İ. TINDAŞ, 2015

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NİĞDE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

T.C.
NİĞDE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL GENETİK MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

PATATESİN KURAKLIK TOLERANSININ DÜZENLENMESİNDE ROL ALAN miRNA'LARIN BELİRLENMESİ

İLKNUR TINDAŞ

Temmuz 2015

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

İlknur TINDAŞ

Arş. Gör. ilknur TINDAŞ tarafından **Yrd. Doç. Dr. Ufuk DEMİREL** danışmanlığında hazırlanan **"Patatesin Kuraklık Toleransının Düzenlenmesinde Rol Alan miRNA'ların Belirlenmesi"** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Tarımsal Genetik Mühendisliği** Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hakan ÖZKAN, Çukurova Üniversitesi

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ufuk DEMİREL, Niğde Üniversitesi

Üye : Yrd. Doç. Dr. Zahide Neslihan ÖZTÜRK, Niğde Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından ..../..../20.... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..../..../20.... tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

..../..../20....

Doç. Dr. Murat BARUT
MÜDÜR

ÖZET

PATATESİN KURAKLIK TOLERANSININ DÜZENLENMESİNDE ROL ALAN miRNA'LARIN BELİRLENMESİ

TINDAŞ, İlknur
Niğde Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Genetik Mühendisliği
Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ufuk DEMİREL

Temmuz 2015, 112 sayfa

Patates su eksikliği ve yüksek sıcaklık gibi abiyotik stresslere nispeten hassas bir bitkidir. Bitkilerin miRNA'lar aracılığıyla bazı genlerin ifadelerinde düzenleme yaparak, kuraklık stresine karşı tolerans mekanizması geliştirdikleri belirlenmiştir. Bir miRNA'nın aynı stres koşullarında, farklı bitki türlerinde değişik düzenleyici etkilerde bulunduğu bilinmektedir. Bu nedenle tez kapsamında, patatese özgü bazı miRNA'ların kuraklık stresi koşullarındaki düzenleyici etkileri iki faklı patates çeşidinde incelenmiştir. Tez çalışması sonucunda, kurak koşullarda her iki çeşitte stu-miR398a'nın ifadesinin azaldığı buna karşın aday hedef gen Cu/Zn SOD'un ifadesinin arttığı belirlenmiştir. Bunun yanında, Russet Burbank'ta miR224'ün ifadesi çarpıcı düzeyde azalırken, hedef geni Fe SOD'un ifadesinin artmıştır. Böylece, stu-miR398a'nın ve mir224'ün gedef genlerinin sırasıyla Cu/Zn SOD ve Fe SOD olabileceğine dair ilk moleküler bulgular elde edilmiştir. Elde edilen sonuçların, miRNA aracılığıyla düzenleme yaparak kurağa toleranslı patates çeşitlerinin geliştirilmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Solanum tuberosum, kuraklık, fizyolojik karakterler miRNA, hedef genler

SUMMARY

IDENTIFICATION OF miRNAs REGULATING DROUHT TOLERANCE IN POTATO

TINDAŞ, İlknur
Nigde University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Agricultural Genetic Engineering

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ufuk DEMİREL
July 2015, 112 pages

Potato is a relatively sensitive plant to various unfavorable environmental conditions such as water deficit and high temperatures. Plant miRNAs regulate gene expression under abiotic stress conditions such as drought, therfore, plants can develope tolerance mechanism against stress facrotrs. The purpose of this study is to determine physiological response and the expression levels of some drought-responsive potato miRNAs and their target mRNAs under 10 days of drought application in two potato cultivars. Desiree and Russet Burbank potato cultivars were used to comprehend regulatory effect of miRNAs on the estimated target genes under drought conditions. While stu-miR398a was down-regulated, target gene Cu/Zn SOD was up-regulated in both cultivars in the study. Besides, expression of miR224 dramatically decreased and expression of target gene Fe SOD increased in Russet Burbank under drougt conditions. Therfore, this is the first molecular report suggesting the targeting of Cu/Zn SOD and Fe SOD genes by stu-miR398a and miR224, respectively, in potato under drought conditions. The obtained results could be useful to develop drought-tolerant potato varieties mediated by miRNA regulation in the future studies.

Keywords: Solanum tuberosum, drought, physiological characters miRNA target genes

ÖNSÖZ

Yükseköğrenimim sırasında ve bu tezin konusunun belirlenmesinde, çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ufuk DEMİREL'e, patates tohumlarının temininde yardımlarından ve desteğinden dolayı sayın Prof. Dr. Mehmet Emin ÇALIŞKAN'a, laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını benden esirgemeyen ve bana sabır göstermeyi başarabilen Arş Gör. Caner YAVUZ ve Tolga DİNÇ'e, Değerli arkadaşlarım Arş Gör. Derya KAHVECİOĞLU, Okt. Eda Nur ŞENGÜL, Yrd. Doç. Dr. Mina FURAT, Yrd. Doç. Dr. Savaş MARAŞLI, Arş Gör. Seda KAYA'ya, eğitim hayatım boyunca karşılaştığım tüm zorluklarda yanımda olan ve desteğini benden esirgemeyen annem Sultan TINDAŞ ve babam Sami TINDAŞ'a, sonsuz teşekkürlerimi sunarım…

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv

SUMMARY v

ÖNSÖZ vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELER DİZİNİ x

ŞEKİLLER DİZİNİ xi

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ xvi

BÖLÜM I GİRİŞ 1

BÖLÜM II GENEL BİLGİLER 4

2.1 Kuraklık 4

2.2 Patates ve Kuraklık 11

2.3 Bitki mikroRNA'ları ve Biyolojik Sentezleri 14

2.4 miRNA Yolağında Etkili Ana Enzimler 17

2.4.1 Bitkide dicer enzimi 17

2.4.2 Hua enhancer1 (HEN1, metil transferaz) 18

2.4.3 Argonaute 18

2.5 Patateste miRNA Çalışmaları 19

2.6 Bitkilerde Kuraklığa Tepkide Rol Alan miRNA'lar 24

BÖLÜM III MATERYAL VE METOD 28

3.1 Materyal 28

3.1.1 Bitki materyali ve stres uygulaması 28

3.1.2 Hoagland çözeltisinin hazırlanması 29

3.1.3 Fotosentez hızı 30

3.1.4 Stoma iletkenliği 30
3.1.5 Terleme hızı 30
3.1.6 Nispi su içeriği 31
3.1.7 Klorofil indeksi 31
3.1.8 Bitki sıcaklığı 31
3.1.9 Prolin miktar tayini 32
3.1.10 Malondialdehit (MDA) ölçümü 32
3.1.11 Yaprakta hidrojen peroksit miktar tayini 34
3.1.12 Yumru sayısı 35
3.1.13 Tek yumru ağırlığı 35
3.1.14 Bitki başına yumru verimi 35
3.1.15 Toplam RNA izolasyonu 35
3.1.16 Toplam RNA saflaştırması 37
3.1.17 cDNA sentezi 38
3.1.17.1 miRNA'dan cDNA sentezi 38
3.1.17.2 mRNA'dan cDNA sentezi 41
3.1.18 cDNA sentezi doğrulanması 42
3.1.18.1 miRNA'dan elde edilen cDNA'ların standard PCR ile doğrulanması ... 42
3.1.18.2 mRNA'dan elde edilen cDNA'ların standart PCR ile doğrulaması 43
3.1.19 Gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR) 44
BÖLÜM IV BULGULAR 47
4.1 Fizyolojik Karakterler 47
4.1.1 Fotosentez hızı 48
4.1.2 Stoma iletkenliği 51
4.1.3 Terleme hızı 53
4.1.4 Nispi su içeriği 55

4.1.5 Klorofil indeksi 57
4.1.6 Bitki sıcaklığı 59
4.1.7 Prolin içeriği 61
4.1.8 Malondialdehit (MDA) ölçümü 62
4.1.9 Yaprakta hidrojen peroksit miktarı tayini 64
4.1.10 Verim ile ilgili sonuçlar 66
4.2 miRNA ve hedef gen ifade analizleri 69
4.2.1 Toplam RNA izolasyonu 69
4.2.2 miRNA ve hedef gen ifade analizleri 73
4.2.2.1 stu-miR398a ile tahmini hedef genleri L-askorbat oksidaz ve Cu/Zn SOD'un qRT-PCR analizleri 76
4.2.2.2 stu-miR398b'nin qRT-PCR analizi 84
4.2.2.3 stu-miR156a ve hedef geni Cu/Zn SOD 87
4.2.2.4 miR224 ve tahmini hedef geni Fe SOD'un qRT-PCR analizleri 88
4.2.2.5 stu-miR742 qRT-PCR analizi 93
4.2.2.6 Piyrolin-5-karboksilat sentaz qRT-PCR analizi 94
BÖLÜM V TARTIŞMA 98
KAYNAKLAR 100
ÖZGEÇMİŞ 112

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bitkilerde prolin birikimini tetikleyen abiyotik stres etmenleri 8
Çizelge 2.2. Bitkilerde stres yanıtı ile ilgili yaygın miRNA'lar 23
Çizelge 2.3. Bitki geliştirilmesi için miRNA hedeflerini manipüle eden örnekler..... 24
Çizelge 3.1. 1X Hoagland besin çözeltisi içeriği 29
Çizelge 3.2. Hoagland besin çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan Solüsyon III içeriği 29
Çizelge 3.3. Hoagland besin çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan Fe-EDTA içeriği 29
Çizelge 3.4. İncelenen miRNA dizileri, hedef genleri, hedef gen aksesyon numaraları 39
Çizelge 3.5. miRNA'dan cDNA sentezi için kullanılan sap ilmek primerleri 40
Çizelge 3.6. Sap-ilmek primeri ile miRNA'dan cDNA sentezi reaksiyon içeriği..... 41
Çizelge 3.7. Tek zincirli cDNA sentezi reaksiyon içeriği 41
Çizelge 3.8. miRNA'ya özel ileri primerler ve sap-ilmeğe özgü evrensel primer 42
Çizelge 3.9. miRNA'dan yapılan cDNA sentezinin doğrulaması için kullanılan standard PCR'ın içeriği 42
Çizelge 3.10. miRNA'dan yapılan cDNA sentezinin doğrulanması için kullanılan PCR'ın sıcaklık döngüsü 43
Çizelge 3.11. mRNA'dan elde edilen cDNA ve hedef gen primerleri ile standard PCR doğrulaması reaksiyon içeriği..... 43
Çizelge 3.12. mRNA'dan elde edilen cDNA ve hedef gen primerleri ile standard PCR doğrulaması sıcaklık döngüsü 44
Çizelge 3.13. Hedef gen primerleri tasarlama koşulları 45
Çizelge 3.14. Hedef gen primerleri..... 45
Çizelge 3.15. miRNA'ya özel ileri primerler ve sap-ilmeğe özgü evrensel primeri 45
Çizelge 3.16. qRT-PCR içeriği 46
Çizelge 3.17. qRT-PCR sıcaklık döngüsü 46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bitki abiyotik stres tepkisinin genel aşamaları 5
Şekil 2.2. Pamukta yaprak su potansiyeli ve fotosentez arasındaki ilişki 6
Şekil 2.3. Prolin mekanizması yolağı 9
Şekil 2.4. miRNA biyogenez yolağının genel adımları 15
Şekil 2.5. Hayvan ve bitkide miRNA sentez yolağı. 17
Şekil 2.6. Dicer/RISC enzim kompleksi tarafından dsRNA'nın kesilmesi 18
Şekil 2.7. Olgun miRNA'nın Argonaute ile birleşerek sabit hale gelmesi 19
Şekil 3.1. Sap-ilmek primeri tasarlama aşamaları şeması 39
Şekil 4.1. Desiree çeşidinin kontrol ve kurak koşullarda morfolojik görünümü 48
Şekil 4.2. Russet Burbank çeşidinin kontrol ve kurak koşullarda morfolojik görünümü 48
Şekil 4.3. Kontrol ve kuraklık koşullarında Desiree çeşidinin fotosentez hızı 50
Şekil 4.4. Kontrol ve kuraklık koşullarında Russet Burbank çeşidinin fotosentez hızı.. 50
Şekil 4.5. Kontrol ve kurak koşullarda Desiree çeşidinin stoma iletkenliği 52
Şekil 4.6. Kontrol ve kurak koşullarda Russet Burbank çeşidinin stoma iletkenliği 52
Şekil 4.7. Kontrol ve kurak koşullarda Desiree çeşidinin terleme hızı 54
Şekil 4.8. Kontrol ve kurak koşullarda Russet Burbank çeşidinin terleme hızı 55
Şekil 4.9. Kontrol ve kurak koşullarda Desiree çeşidinin nispi su içeriği (RWC) 56
Şekil 4.10. Kontrol ve kurak koşullarda Russet Burbank çeşidinin nispi su içeriği (RWC) 57
Şekil 4.11. Kontrol ve kurak koşullarda Desiree çeşidinin klorofil indeksi 58
Şekil 4.12. Kontrol ve kurak koşullarda Russet Burbank çeşidinin klorofil indeksi 58
Şekil 4.13. Kontrol ve kurak koşullarda Desiree çeşidinin bitki sıcaklığı 60
Şekil 4.14. Kontrol ve kurak koşullarda Russet Burbank çeşidinin bitki sıcaklığı 60
Şekil 4.15. Prolin standard eğrisi 61
Şekil 4.16. Kontrol ve kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank çeşidinin prolin miktarı 62
Şekil 4.17. Kontrol ve kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank çeşidinin malondialdehit (MDA) miktarı 63
Şekil 4.18. Standartlara göre çizilen hidrojen peroksit miktarı grafiği 65

Şekil 4. 19. Kontrol ve kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank çeşidinin hidrojen peroksit miktarı 65
Şekil 4.20. Kontrol ve kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank çeşidinin yumru sayısı 67
Şekil 4.21. Kontrol ve kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank çeşidinin tek yumru ağırlığı 68
Şekil 4.22. Kontrol ve kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank bitki yumru verimi 68
Şekil 4.23. Toplam RNA izolasyonu jel görüntüsü 70
Şekil 4.24. Genomik DNA uzaklaştırılması sonrası RNA jel görüntüsü 71
Şekil 4.25. Agaroz jel sisteminde kullanılan markör 71
Şekil 4.26. mRNA'dan cDNA sentezinin PCR ile doğrulaması 72
Şekil 4.27. miRNA'dan cDNA sentezinin PCR ile doğrulaması 73
Şekil 4.28. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'nin *ef1α* erime eğrisi grafiği ... 75
Şekil 4.29. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ın *ef1α* erime eğrisi grafiği 75
Şekil 4.30. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'nin *ef1α* PCR ürünü çoğalma eğrisi 75
Şekil 4.31. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ın *ef1α* PCR ürünü çoğalma eğrisi 76
Şekil 4.32. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de stu-miR398a erime eğrisi grafiği 76
Şekil 4.33. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank stu-miR398a erime eğrisi grafiği 77
Şekil 4.34. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de L-askorbat oksidaz erime eğrisi grafiği 77
Şekil 4.35. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta L-askorbat oksidaz erime eğrisi grafiği 77
Şekil 4.36. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de Cu/Zn SOD erime eğrisi grafiği 78
Şekil 4. 37. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta Cu/Zn SOD erime eğrisi grafiği 78

Şekil 4.38. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de stu-miR398a PCR ürünü çoğalma eğrisi 79
Şekil 4.39. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta stu-miR398a PCR ürünü çoğalma eğrisi 79
Şekil 4.40. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de L-askorbat oksidaz PCR ürünü çoğalma eğrisi 80
Şekil 4.41. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta L-askorbat oksidaz PCR ürünü çoğalma eğrisi 80
Şekil 4.42. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de Cu/Zn SOD PCR ürünü çoğalma eğrisi 80
Şekil 4.43. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta Cu/Zn SOD PCR ürünü çoğalma eğrisi 81
Şekil 4.44. Desiree ve Russet Burbank'ta stu-miR398a (a) ve L-askorbat oksidaz (b) ifade analizi 81
Şekil 4.45. Askorbat oksidazın rol aldığı askorbat oksidasyon reaksiyonu..... 82
Şekil 4.46. Desiree ve Russet Burbank'ta stu-miR398a (a) ve Cu/Zn SOD (b) ifade analizi 83
Şekil 4.47. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de stu-miR398b erime eğrisi grafiği 85
Şekil 4.48. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta stu-miR398b erime eğrisi grafiği 85
Şekil 4.49. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de stu-miR398b PCR ürünü çoğalma eğrisi 86
Şekil 4.50. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta stu-miR398b PCR ürünü çoğalma eğrisi 86
Şekil 4.51. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de stu-miR156a erime eğrisi grafiği 87
Şekil 4.52. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank stu-miR156a erime eğrisi grafiği 87
Şekil 4.53. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de stu-miR156a PCR ürünü çoğalma eğrisi 88

Şekil 4.54. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta stu-miR156a PCR ürünü çoğalma eğrisi 88
Şekil 4.55. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de miR224 erime eğrisi grafiği 89
Şekil 4.56. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta miR224 erime eğrisi grafiği 89
Şekil 4.57. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de Fe SOD erime eğrisi grafiği 90
Şekil 4.58. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta Fe SOD erime eğrisi grafiği 90
Şekil 4.59. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de miR224 PCR ürünü çoğalma eğrisi 90
Şekil 4.60. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta miR224 PCR ürünü çoğalma eğrisi 91
Şekil 4.61. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de Fe SOD PCR ürünü çoğalma eğrisi 91
Şekil 4.62. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta Fe SOD PCR ürünü çoğalma eğrisi 91
Şekil 4.63. Desiree ve Russet Burbank'ta miR224 (a) ve Fe SOD (b) ifade analizi 92
Şekil 4.64. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de stu-miR742 erime eğrisi grafiği 93
Şekil 4.65. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet stu-miR742 erime eğrisi grafiği93
Şekil 4.66. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de stu-miR742 PCR ürünü çoğalma eğrisi 94
Şekil 4.67. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta stu-miR742 PCR ürünü çoğalma eğrisi 94
Şekil 4.68. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree P5CS erime eğrisi grafiği 95
Şekil 4.69. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank P5CS erime eğrisi grafiği 95
Şekil 4.70. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de P5CS PCR ürünü çoğalma eğrisi 95

Şekil 4.71. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta P5CS PCR ürünü çoğalma eğrisi 96
Şekil 4.72. Desiree ve Russet Burbank'ta P5CS ifade analizi 96

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	**Açıklama**
cDNA	Tamamlayıcı DNA
Ct	Eşik döngü değeri
DEPC	Dietilpirokarbonat
DLC	Dicer enzimi
DNA	Deoksiribonükleikasit
dNTP	Dinükleotidtrifosfat
dsDNA	Çift iplikli DNA
EtBr	Etidyum bromür
EtOH	Etanol
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HEN	Hua Enhancer
HSTY	miRNA'yı sitoplazmaya taşıyan protein
L	Litre
miRNA	mikroRNA
NaCl	Sodyum klorür
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
ng	Nanogram
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pre-miRNA	Ön-mikroRNA
pri-miRNA	Öncül mikroRNA
qRT-PCR	Kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RISC	RNA tarafından uyarılan sessizleştirme tümleşiği
RNA	Ribonükleikasit
rpm	Santrifuj işleminde dakikadaki devir sayısı
rRNA	Ribozomal RNA
TE	Tris-EDTA
Tm	Erime sıcaklığı
α	Alfa
µg	Mikrogram

μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar

BÖLÜM I

GİRİŞ

Patates su eksikliği ve yüksek sıcaklık gibi ters çevre koşullarına nispeten hassas bir bitkidir. Tarımda kullanılabilecek su kaynakları giderek azalmakta ve hava sıcaklıkları dünya genelinde artmaktadır. Bu durumun bir serin iklim bitkisi olan patatesin tarımını ileride olumsuz yönde etkileyeceği düşünülmektedir. Ters çevre koşulları nedeniyle patateste meydana gelen verim düşüşlerini en az düzeyde tutabilmek veya tamamen engellemek hem önemli verim kayıplarını ortadan kaldıracaktır hem de patatesin daha az su kaynaklarına sahip bölgelerde tarımının yapılmasına imkân sağlayacaktır. Kuraklık, dünya çapında kültür bitkilerinin verimini düşüren önemli stres etmenlerinden birisidir (Khamssi, 2011). Kuraklığa karşı bitkilerin fizyo-biyokimyasal ve moleküler tepkilerinin tam olarak anlaşılması, kurağa daha toleranslı bitkilerin geliştirilmesini kolaylaştırması bakımından büyük önem taşımaktadır (Jaleel vd., 2006). Bitkiler kuraklık stresinden, suyun emilme mekanizmasını geliştirerek veya terlemeyi azaltarak kaçınmaya çalışırlar (Ruiz-Sanchez vd., 2007). Bitkilerin su eksikliğine verdiği cevaplar, fenolojik yanıtlar, morfolojik değişimler, fizyolojik değişiklikler ve biyokimyasal adaptasyonlar, örneğin bitki yapısındaki, büyüme hızındaki, doku ozmotik potansiyel ve antioksidan savunmasındaki değişiklikler şeklinde görülebilir (Duan vd., 2007). Yetersiz su koşulları altında, bitkide osmolit birikimi ozmotik ayarlama için zorunludur. Ama osmolit birikimi, temel olarak su durumuna, bitki büyüme evresi ve çeşidine bağlıdır (Shao vd., 2006).

Bitkilerin strese toleransı iç içe girmiş çok karmaşık biyolojik olaylar ile sağlanmaktadır. Bilim insanları bu karmaşık biyolojik olayları anlamak ve strese daha toleranslı tarımsal bitkiler geliştirmek için araştırmalar yapmaktadırlar. Yapılan çalışmalar, mikroRNA'ların (miRNA) bitkilerin stres koşullarına tepkisinde yer aldıklarını ortaya koymaktadır ve bu durum, strese toleranslı bitki oluşturmak amacıyla yürütülen çalışmalar için yeni yaklaşımların geliştirilmesine neden olmuştur.

Bitkilerde moleküler seviyedeki abiyotik strese tolerans mekanizmalarının anlaşılması için ilk yapılan işlemler strese tepki veren genlerin belirlenmesi ve bu genlerin stres koşullarındaki ifade düzeylerinin tespit edilmesidir. Arkasından bu genlerin işlevleri aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Abiyotik toleranstaki işlevi tespit edilen genler nihai

olarak strese toleranslı çeşit geliştirmesi için kullanılabilmektedir. Çeşitli ters çevre koşullarına karşı bitkilerin miRNA'lar aracılığıyla bazı genlerin ifadelerinde düzenleme yaptığı ve böylece strese karşı tolerans mekanizması geliştirdiği belirlenmiştir. miRNA'ların bu işlevlerinin keşfedilmesi, bilim insanlarına miRNA'lar vasıtasıyla bazı genlerin ifadelerinin baskılanması veya bazı genlerin ifadelerinin arttırılması vasıtasıyla istenilen tarımsal karakterlerin moleküler olarak doğrudan düzenlenmesi ve bitki ıslahında uygulanabilmesinin mümkün olabileceği fikrini uyandırmıştır. miRNA temelli moleküler düzenleme çalışmaları, tarımsal ürün veriminin artırılması ve kalitesinin yükseltilmesi için güçlü bir potansiyele sahiptir. Bununla birlikte, bir miRNA'nın aynı stres koşullarında farklı bitki türlerinde değişik düzenleyici etkileri bulunmaktadır. Bu nedenle, miRNA'ların düzenleyici etkilerinin her bitki türünde belirlenmesi gerekmektedir. miRNA'ların bir bitki türündeki düzenleyici etkileri belirlendikten sonra, o bitki türüne göre miRNA temelli moleküler düzenleme stratejileri geliştirilmesi gerekmektedir.

Kuraklık diğer çevresel faktörler gibi oksidatif strese neden olur. Bitkiler, olumsuz koşullar altında oksidatif stres hasarına tahammül edebilmek için karotenoid, flavonoidler, α- tokoferol, askorbik asit ve glutatyon gibi moleküllerin yer aldığı enzimatik olmayan sisteme ve süperoksit dismutaz (SOD), askorbik peroksidaz (APX), katalaz (CAT) ve peroksidaz (POX) gibi enzimlerin görev aldığı enzimatik antioksidan sistemine sahiptirler. Bu enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidant sistemlerinin bileşenleri çeşitli çevre stresleri altında birikirler. Toleranslı çeşitlerde hassas çeşitlere göre daha yüksek antioksidan enzim aktivitesi görülmesiyle, bu sistemlerin çevresel strese karşı bitkilere tolerans kazandırmada rol oynadıkları düşünülmektedir. Bu nedenle tez çalışmasında, antioksidanların süpürülmesinde ve patatesin abiyotik strese toleransında önemli bir role sahip olan SOD mRNA'larını hedef aldığı biyoinformatik yöntemlerle tahmin edilmiş olan miRNA'ların ve tahmini hedef genlerinin kurak koşullar altındaki iki farklı patates çeşidindeki ifade değişiklikleri araştırılmıştır. Bunlarla ilave olarak iki patates çeşidinde kurak stresi koşullarında, kuraklık toleransı ile ilişkili bazı fizyolojik karakterlerde ne gibi değişikliklerin meydana geldiği tespit edilmiş ve sonuç olarak incelenen miRNA'ların patatesin kuraklık stresine tepkisinde nasıl rol aldığı hakkında çıkarımlar yapılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmanın en önemli özelliği, biyoinformatik yöntemlerle patateste Cu/Zn-SOD'u hedeflediği tahmin edilen stu-miR398 ve stu-miR156'nın, Fe-SOD'u hedeflediği tahmin edilen miR224 ve stu-

miR742'nin ifade analizlerinin ve hedef genlerinin ifadesiyle mukayesesinin patateste kurak koşullarda ilk defa deneysel yollarla yapılmış olmasıdır.

Sonuç itibariyle tez kapsamında, kuraklık toleransı ile ilişkili fizyolojik karakterler, miRNA'lar ve tahmini hedef genler arasındaki ilişkiler belirlenmeye çalışılmıştır. Böylece incelenen miRNA'ların kuraklık stresi koşullarında patates bitkisindeki düzenleyici rolü hakkında ilk bilgiler elde edilmiştir. Elde edilen sonuçların, kuraklığa toleranslı patates çeşitleri geliştirmek için miRNA temelli strateji oluşturulmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

2.1 Kuraklık

Dünyada tatlı su kaynakları giderek azalmakta ve dünya nüfusunun % 40'ının yer aldığı yaklaşık 80 ülkede ciddi su sıkıntısı yaşanmaktadır. Bunun yanında nüfusun artmasına bağlı olarak dünya genelinde ihtiyaç duyulan su miktarı gittikçe artmaktadır. Dünya genelinde mevcut olan tatlı suyun %85'inin tarımsal amaçlı kullanıldığı, buna karşın bu suyun % 50'den daha azının etkili bir şekilde değerlendirildiği bildirilmektedir (Hamdy vd., 2003). Bazı bölgelerde yağışta meydana gelen azalmalar ve yağış düzensizliklerinin sebep olduğu su kaynakları miktarındaki azalma ile tarımda bitkilerin ihtiyaç duydukları su yeterince karşılanamamakta ve sonuç itibariyle tarımsal bitkiler kuraklık stresi ile karşı karşıya kalmaktadırlar. Kuraklık stresi tarımda önemli verim kayıplarına sebebiyet veren ciddi abiyotik stres etmenlerinden birisidir.

Dünyada su kaynaklarının daha etkin kullanılması ve kuraklıktan kaynaklanan tarımsal üretimdeki azalmayı engellemek için tarımda daha az su kullanmak amacıyla sulama yöntemlerinin iyileştirilmesi ve kuraklığa toleranslı yeni çeşitlerin ıslah edilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Etkin sulama yöntemlerinin uygulandığı ve yetersiz su koşullarında verimi az düşen çeşitlerin yetiştirildiği bir üretim modelinin uygulanması, yetersiz su kaynaklarının olduğu bölgelerde verim kaybını en aza indirmek için uzun süreli ve etkili bir çözüm olarak öne çıkmaktadır. Kurağa daha toleranslı bitki çeşitlerinin geliştirilmesi için kurağa tolerans mekanizmalarının anlaşılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak bitkilerin strese toleransı iç içe girmiş çok karmaşık biyolojik olaylar ile sağlanmaktadır. Bilim insanları bu karmaşık biyolojik olayları anlamak ve kurağa daha toleranslı tarımsal bitkiler geliştirmek için yoğun araştırmalar yapmaktadırlar.

Bitkiler, yer değiştiremeyen canlılar olduğundan kuraklık gibi çevresel koşullardaki abiyotik streslere ve olumsuz koşullara sürekli maruz kalmaktadırlar. Bu nedenle bitkiler, kuraklık, yüksek sıcaklık, soğuk gibi olumsuz çevre koşullarına karşı, kendilerine özgü büyüme ve gelişme mekanizmaları geliştirmiş ve bunlardan en az etkilenecek şekilde uyum sağlamışlardır. Aynı türe ait bitkilerin dünya üzerindeki dağılımına bakıldığında,

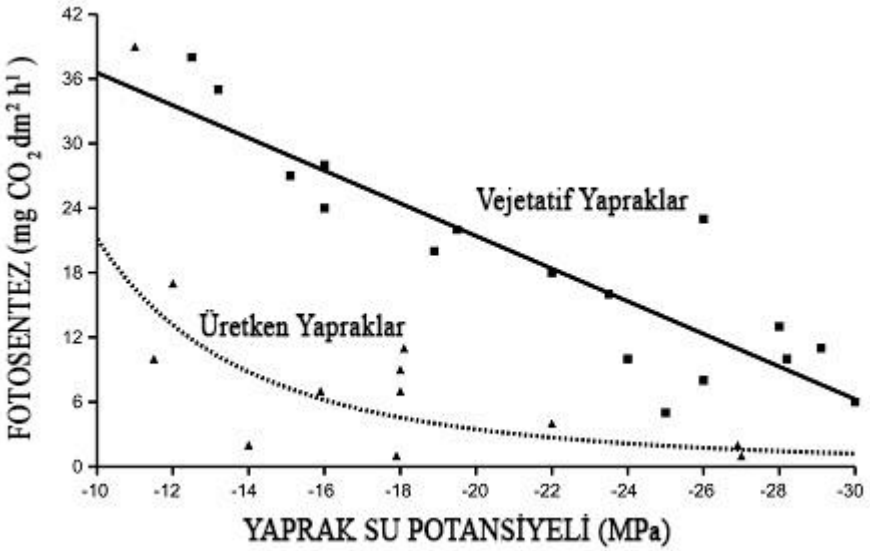
farklı iklim koşullarında bulundukları çevre koşullarına göre uyum sağlamaları bu duruma en iyi örnektir (Dolferus, 2014). Kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler seviyelerde değişiklikler meydana gelmekte ve bu değişiklikler sonucu bitkiler kuraklığa karşı bir düzeye kadar tolerans gösterebilmektedirler (Şekil 2.1.).

Şekil 2.1. Bitki abiyotik stres tepkisinin genel aşamaları (Öztürk, 2015)

Kuraklık stresinin bitki büyüme ve gelişimine etkisine bakıldığında, generatif dönemde bitki su stresine en hassastır ve bu stres bitki verimini etkileyen fizyolojik karakterleri de önemli derecede etkilemektedir. Çiçeklenme döneminde meydana gelen uzun süreli veya şiddetli kuraklıkta polenler kısırlaşmakta ayrıca, dişicik tepesinin kuruması sebebiyle polenler dişicik tepesinde çimlenememektedir. Bunun yanında tohum bağlama dönemindeki kuraklık, tohuma taşınan fotosentez ürünlerinin azalmasına neden olmaktadır. Bunların neticesinde, tarımsal bitkilerin çiçeklenme ve tohum gelişim döneminde meydana gelen kuraklık stresi yüksek verim kayıplarına neden olabilmektedir. Buna karşın, kurak koşullarda su açığını kapatmak için bitkiler çeşitli adaptasyonlar gösterir örneğin, fazla suya ulaşmak için kök gelişimini uyararak gövde uzamasını yavaşlatır. Su eksikliği bitkide uzun süreli zararlara neden olacak derece görüldüğünde, bitki kök ve gövde gelişimini durdurur, terleme ile su kaybını azaltmak için stomalarını kapatır, yaprak sayısı ve yaprak alanını azaltır ve yapraklarını kaybetmeye başlar. Sürgün ve kök meristemlerindeki hücre bölünmesi ve hücre gelişmesinin durmasına bağlı olarak, bitki büyüme ve gelişmesinde hasarlar görülmektedir. Su eksikliğinde, hücre bölünmesi ve gelişiminin durmasına bağlı olarak fotosentez oranı da düşmektedir (Anjum vd., 2011). Kuraklık stresi koşullarında, yaprak

su oranının düşmesine bağlı olarak gerçekleşen stoma kapanması, yaprak sıcaklığının artmasına neden olmakta ve buna bağlı olarak membran sistemleri zarar görmekte ve bu durum hücre ölümlerine neden olmaktadır (Dolferus, 2014, Farooq vd., 2009).

Stomaların kapatılması suyun kısıtlı olduğu ortamlarda su kaybını azaltmak için en verimli yoldur, ancak buna paralel olarak, CO_2'nin yapraklara girişi azalır ve bu durum fotosentez oranında net bir azalmaya yol neden olur (Cornic, 2000). Su kıtlığında CO_2 fiksasyonundaki sınırlama, CO_2 difüzyonun hücrelerarası boşluklardan kloroplastlara difüzyonundan etkilendiğinden dolayı (Loreto vd., 2003, Molnár vd., 2005), diğer faktörlerde bu durumdan etkilenebilir. Örneğin, ribuloz-1,5-bisfosfat karboksilaz/ oksijenaz'ın (Rubisco) kapasitesinde değişikler meydana gelir ve ribuloz-1,5-bifosfat (RuBP)'un yeniden oluşmasında sorunlar çıkabilir (Medrano, 1997). Fotosentezde kullanılan enzim ve bileşenlerinin kuraklık stresine bağlı değişimine bakıldığında, fotosentez bütün türlerde bitki verimliliğini belirlemede önemli bir rol oynamaktadır ve doğrudan su stresi tarafından etkilendiğini göstermektedir. Buna bağlı olarak, nispi su içeriği ve yaprak su potansiyeli azaldıkça yaprakların fotosentetik oranları da azalmaktadır (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Pamukta yaprak su potansiyeli ve fotosentez arasındaki ilişki (Loka vd., 2011)

Stresi uyaran çevresel değişikler sadece fotosenteze zarar vermekle kalmaz, aynı zamanda stoma hareketi, ışık absorbsiyonu ve CO_2 fiksasyonu için biyokimyasal yolları

da etkiler (Cornic, 2000). Çevresel ve fizyolojik faktörlere stoma yanıtı karmaşık olsa da, bilinmektedir ki stoma iletkenliği, yaprak radyasyonu, yaprak sıcaklığı ve atmosfer su buharı gibi bileşenler ile değişmektedir (Cowan ve Farquhar, 1977). Ek olarak, stoma iletkenliği, karbon asimilasyon ve terleme ile su kaybı arasında ilişki olduğu kabul edilmektedir (Ludlow, 1980). Stoma iletkenlik (gs) ve bağıl su içeriği (RWC) parametreleri, kuraklık stresi altında önemli derecede azalır. Özellikle, stoma durumundaki değişiklik su stresinin ilk belirtisidir (Miyashita vd., 2005). Bu süreçte, bitki su kaybını azaltarak su açığını önlemeye çalışan bir mekanizma geliştirir (Rouhi vd., 2007). Ordog vd., (2013), su eksikliği koşullarında absisik asitin (ABA) stoma davranış düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğunu göstermişlerdir. Su stresi altında, patates yaprakları bekçi hücrelerinde biriken ABA indüklemesiyle stoma kapanması sağlanmaktadır (Tekalign ve Hammes, 2005). Medlyn vd., (2011), kuraklık stresi altında fotosentez ve stoma iletkenliği arasındaki ilişkiyi direk inceleyen çok az sayıda çalışma olduğunu ifade etmişlerdir.

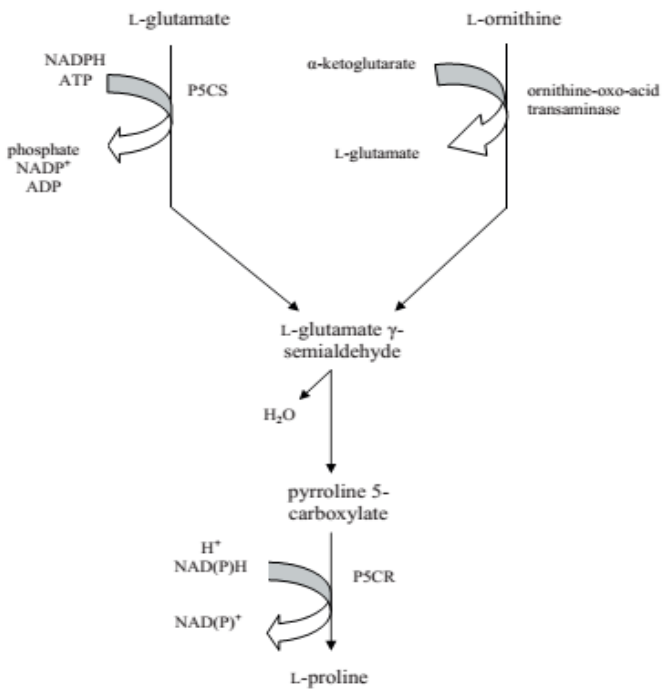
Kuraklık stresi altında klorofil miktarında azalma olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır (Kulshreshta vd., 1987; Majumdar vd., 1991). Sairam vd., (1997) kuraklığa ve sıcaklığa toleranslı ve hassas olan buğday bitkilerinde kuraklık ve sıcaklık stresleri altında klorofil miktarındaki azalmayı ve hassas bitkilerin farklı cevaplar verdiklerini göstermişlerdir. Kuraklığa dayanıklı çeşitlerde kuraklık stresi altında daha yüksek klorofil miktarı ve sıcaklığa dayanıklı çeşitlerde de daha yüksek klorofil miktarı olduğu görülmüştür. Ashraf vd., (1994), klorofil miktarındaki bu azalmanın sebebinin, klorofilaz enziminin aktivisindeki artma ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Kurak koşullarda bitkinin verdiği tepkiyi klorofil seviyesinde ölçmek için kullanılan Konica Minolta SPAD-502 Plus Klorofilmetre, klorofil miktarını dolaylı yoldan ölçmektedir. Bu cihaz, klorofil tarafından ayrı ayrı absorbe edilen 650 nm ve 940 nm dalga boylarındaki yaprağa nüfuz eden ışığı ölçmektedir.

Bitkiler, su eksikliği stresinden en az oranda etkilemek için ozmotik dengeleme yapmaktadırlar. Hücre turgor dengelenmesinde önemli rol oynayan ‘ozmolit’ adı verilen çözünür maddeler, kuraklık stresi altındaki bitkilerde sentezlenirler ve biriktirilirler. Örneğin, betain, organik asitler ve karbonhidratlar gibi farklı bileşenler ve asparajin, glisin ve prolin gibi amino asitler stres altındaki bitkilerde osmotik ayarlamada ve hücre içi yapıların korunmasında uyumsal roller oynamaktadır (Öztürk, 2015). Birçok

çalışmada bu ozmolitlerin birikmesi ve stres toleransı arasında pozitif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (Yamada vd., 2003, Yang vd., 2003). Kuraklık koşullarında, ilk biriken aminoasit olan prolinin hücre içi konsantrasyonun ölçülmesi, araştırmalarda bitkilerin su eksikliği stresine girdiklerini göstermek için kullanılmaktadır (Öztürk, 2015). Ozmotik olarak aktif bir bileşen olan prolin, oluşturduğu bileşikler aracılığıyla protein yapılarını korumakta ve lipit oksidasyonunu azaltarak membran sistemlerindeki zararlanmayı engellemektedir (Mansour 1998, Özden vd., 2009). Diğer birçok amino asit ile karşılaştırıldığında prolin, nispeten kısa ve yüksek düzeyde düzenlenmiş yolağın uç ürünü olması yönünden metabolik bir avantaja sahiptir. Böylece prolin birikimi, birçok denge reaksiyonlarında aracı mekanizmalara merkezi katılımcı olan glutamat gibi çoklu kullanım substratları üreterek daha az metabolik reaksiyonları etkiler (Hare ve Cress, 1997). Ayrıca, prolinin α-nitrojeni sekonder bir amin olduğundan, prolin transaminasyon ve dekarboksilasyon reaksiyonlarına diğer amino asitlere kıyasla yaygın olarak giren bir amino asit değildir (Phang, 1985). Glutamattan prolin biyosentetik yolağı kısa olmasına rağmen, son derece yüksek oranda indirgeyici tüketimi içerir. Ayrıca, prolin bozulması yüksek enerji çıkışı yeteneğine sahiptir. Prolin birikiminin, enerji depolanması açısından mükemmel olduğu gösterilmiştir çünkü bir prolin molekülü oksidasyonu 30 ATP eşdeğerinde ürün vermektedir (Atkison, 1977). Bu iki özelliğin, bitkilerde strese alışma aşamasında veya stresten kurtulma aşamasındaki iyileşmede, değerli bir kaynak olan prolinin önemli ölçüde katkıda bulunduğuna inanılmaktadır. Bu duruma göre, prolin birikiminin olumlu etkisi, strese maruz kalma süresi boyunca doğrudan herhangi bir işlev göstermektense stresten kurtulma üzerinde büyümeyi arttırdığı öne sürülmektedir (Hare ve Cress, 1997). Doğal çevre olaylarında yaygın olarak karşılaşılan birçok stres olaylarına cevapta karşılaşılan prolin birikimi sayesinde (Çizelge 2.1.), tarımsal yönden önemi olan ürünler üzerinde genetik mühendisliği ile yapılan prolin aşırı üretimi, abiyotik stres etmenlerine direnci yükseltmekte ve böylece ürün verimliliğini de arttırmaktadır.

Çizelge 2.1. Bitkilerde prolin birikimini tetikleyen abiyotik stres etmenleri

Stres	**Referanslar**
Su eksikliği	Delauney ve Verma 1993; Heuer B. 1993.
Tuzluluk	Delauney ve Verma 1993; Heuer B. 1994.
Yüksek sıcaklık	Chu vd., 1978; Kuo vd., 1986.
Düşük sıcaklık	Chu vd., 1978; Draper SR 1972; Naidu vd., 1991; Van vd., 1985.
Ağır metal toksisitesi	Alia ve Pardha Saradhi, 1991; Bassi ve Sharma, 1993.
Patojen infeksiyonu	Labanauskas vd.,1974; Meon vd., 1978; Mohanty ve Sridhar, 1982; Seitz ve Hochster, 1964.
Oksijen eksikliği	Aloni ve Rosenshtein, 1982; Kuo vd., 1986; Labanauskas vd.,1974.
Besin eksikliği	Goring ve Thien1979; Vaucheret vd., 1992.
Atmosfer kirliliği	Anbazhagan vd.,1988; Godzik S ve Linskens HF, 1974.
UV- radyasyonu	Pardha vd., 1995)



Şekil 2.3. Prolin mekanizması yolağı

Zwitteriyonik (dipolar iyon) kuvaterner amonyum bileşikleri ve betain gibi organik osmolit birikimi sağlayan polioller, su eksikliğinde bitki hücrelerine biyokimyasal cevap vermede iyi karakterize edilmişlerdir (Delauney vd., 1993). Zarar verici derecede yüksek iyonik güçten kaçınırken, sitoplazmik osmolit birikimi, dış su potansiyeli altındaki seviyede hücresel su potansiyelini azaltmaya yardımcı olur. Bu durum, suyun hücre içerisinde tutulmasını ve hareketini sağlar. Devamlı büyüme için, su basıncının sürekliliğinin sağlanması gereklidir. Ozmotik strese cevapta, bazı aminoasitlerin birikimimin cevap olduğu bilinse de, prolin su eksikliğinde bitkilerin adaptasyonunda gözle görülür bir şekilde özel koruyucu etkiye sahiptir ve birçok bitkide tercih edilen organik ozmolit olarak görülmektedir (Hare ve Cress, 1997; Handa vd., 1986). Stres koşullarında koruyucu etkiye sahip olan prolinin yüksek yapılı bitkilerde prolin mekanizması bakıldığında, L-ornitin ve L-glutamat olarak iki alternatif yol görülmektedir (Şekil 2.3.). Delauney vd., (1993), tarafından, prolin-5-karboksilat sentetaz (P5CS) ve prolin-5-karboksilat redüktaz (P5CR) enzimlerinin prolin biyosentezinde önemli rol oynadıkları gösterilmiştir. Ayrıca, transgenik tütün bitkilerinde P5CS aşırı ifadesi, prolin konsantrasyonunu ve kuraklık ve tuzluluk stresine karşı direnci arttırdığı gösterilmiştir (Kavi Kishor vd., 1995). Stres koşullarının ortadan kalkmasıyla, mitokondri içerisinde prolinin 2-oksoglutarata dönüşen hızlı katabolizması ile mitokondriyal oksidatif fosforilasyon destekleyen ve mitokondriyal elektron taşımasına yardımcı olan

indirgenmiş ürünler oluşur ve oluşan ATP ile stresin tetiklediği hasarlar azaltılır (Hare ve Cress, 1997).

Kuraklık stresi koşullarında bitkilerde meydana gelen önemli biyokimyasal değişiklerden diğeri hidrojen peroksit, hidroksil, süperoksit anyonu ve tekli oksijen gibi reaktif oksijen bileşiklerinin (ROS) artmasıdır (Bhargava ve Sawant, 2013). Kuraklık stresi altında, artan reaktif oksijen bileşikleri çeşitli sinyal iletim mekanizmalarında rol almakta ve fotosentez gibi önemli reaksiyonları etkilemektedir. Örneğin, fotosistem kloroplast mehler reaksiyonu yoluyla hızlandırılmış reaktif oksijen türleri üretimi artmakta ve fotosentez taşıma kapasitesindeki değişiklikler meydana gelmektedir, bu durum karbon dioksit (CO_2) asimilasyonun engellenmesine neden olmaktadır (Asada, 1999). Bu duruma bağlı olarak, CO_2 fiksasyonundaki sınırlama nedeniyle RUBP oksijenasyonu maksimum olduğu zaman fotorespirasyon da artmaktadır (Noctor vd., 2002). Ayrıca, PSII'de aşırı ışık enerjisi kaybı ve anten pigmenti kaybı gibi metabolik değişiklikler, kuraklık stresi koşullarında potansiyel tehlike olan reaktif oksijen türlerinin üretimine neden olmaktadır (Foyer ve J. Harbinson, 1999).

Kuraklık kaynaklı uyarılan ROS oluşumu, membran lipid peroksidasyonu için uygun bir belirteç olarak kabul edilen malondialdehit içeriğini (MDA) de arttırmaktadır. ROS'un neden olduğu lipid peroksidasyonu, zar stabilitesinde azalmaya neden olmaktadır. ROS kaynaklı membran lipit peroksidasyonu, hücresel bütünlüğünün bozulmasına, hücre fonksiyonu bozulmasına neden olarak bitkilerin hayatta kalmasında olumsuzluklara yol açabilir. Bu nedenle, bitkiler kuraklık tarafından tetiklenen reaktif oksijen bileşiklerinin birikimi ile oluşan oksidatif stres ile mücadelede, kuraklık stresi ile başa çıkmak için enzimatik ve enzimatik olmayan bir dizi antioksidan sistemi geliştirir (Ali, 2008). Enzimatik antioksidan sistemde süperoksit dismutaz (SOD), peroksidazlar (POD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR) ve katalaz (CAT) enzimleri yer alırken, enzimatik olmayan antioksidan sistem askorbik asit ve indirgenmiş glutatyon (GSH) gibi bazı düşük molekül ağırlıklı bileşikler içermektedir. Bu mekanizma, bitkilerin stres koşulları ile mücadelede kuraklık stresi sırasında oluşan reaktif oksijen bileşiklerinin indirgenmesi ve birikimlerinin engellenmesi için gerekmektedir. Böylece, enzimatik antioksidanlar doğrudan reaktif oksijen bileşiklerini moleküler reaktif oksijen bileşiklerine indirgeyerek birikimlerini engelleyebilir ya da enzimatik olmayan antioksidanlar ile birlikte işlev görebilir (Sharma ve Dubey, 2005).

Kuraklık stresi koşullarında bitkiler, su eksikliğinin olumsuz etkilerini gidermek için gen anlatımlarında değişiklikler oluşturmaktadırlar. Böylece bitkiler maruz kaldıkları strese karşı savunma mekanizması geliştirirler. Stres koşullarında yetişen bir bitkinin gen anlatımında şu şekilde değişiklikler meydana gelir; 1) yeni gen ifadeleri yapılır, 2) bazı genlerin ifadesi artar, 3) bazı genlerin ifadesi azalır ve 4) bazı genlerin ifadesi tamamen baskılanır. Gen ifadesi, RNA sentezi (transkripsiyon) ve protein sentezi (translasiyon) olmak üzere iki aşamalı işlem vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Transkripsiyon aşamasında, sentezlendiği genin baz dizisine özgü olan tek iplikçikli bir RNA üretilir. Translasiyonda ise mRNA'nın nükleotid dizisi protein sentezi için amino asit dizisine dönüştürülür. mRNA, protein kodlayan DNA dizisinin kopyasını taşıması nedeniyle gen ifadesinde merkezi bir role sahiptir. Normal koşullardaki bitkilerle kıyas edildiğinde, stres koşullarındaki bitkilerin gen ifadesinde bir farlılık oluştuğunda ilk olarak, üretilen mRNA'nın miktarında değişim olmaktadır. Kuraklık stresi koşullarında, gen ifadelerinin yeniden düzenlemesinde önemli rol oynadığı düşünülen moleküllerden biri yaklaşık 21 nükleotid uzunluğunda olan mikro RNA'lardır (miRNA). Homolojiye bağlı nükleotit eşleşmesi ile hedef mRNA moleküllerinin ifadelerinin düzenlenmesinde rol oynayan miRNA'lar, gen ifadelerini transkripsiyon sonrası seviyede düzenleyerek, hedef gen ifadelerinin azalmasına ve/veya durmasına neden olurlar. Patates bitkilerinde kuraklığa yanıt veren miRNA ailesi, onların kuraklık stresi üzerine ifade profilleri ve hedef mRNA'ları tanımlanmıştır, bunlardan bazıları stu-miR171a, stu-miR171b ve stu-miR171c'dir (Hwang vd., 2011). Sonuç olarak, miRNA'ların kuraklık gibi abiyotik stress koşullarında düzenleyici rol oynayan genleri transkripsiyon sonrası seviyede düzenleyerek bitkinin strese olan tolerasını arttırdığı yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır.

2.2 Patates ve Kuraklık

Patates (*Solanum tuberosum* L.) yumruları, yüksek besin değeri olan, zengin içeriğe sahip önemli bir gıda maddesidir. 2013 yılı verilerine göre mısır, çeltik ve buğdaydan sonra en çok üretimi yapılan 4. bitkidir ve dünyada yaklaşık 376 milyon tonluk üretimi yapılmaktadır (Anonim, 2015). Patates esasen suyu diğer tarımsal bitkilere göre daha etkili kullanan bir bitkidir. Uygulanan her m^3 suya karşılık patates 5600 kcal besin enerjisi üretirken, mısır 3860 kcal, buğday 2300 kcal, çeltik ise 2000 kcal enerji üretmektedir (Renault ve Wallender, 2000). Buna karşın patates kök sisteminin yüzlek olması

nedeniyle su eksikliğinden çabuk etkilenmekte ve yeterli suyun olmadığı koşullarda verim ve kalitede çok büyük azalma olmaktadır (Levy 1985, Iwama 2008, Satchithanantham vd., 2014). Bu nedenle de patates çoğunlukla su stresine hassas bir bitki olarak değerlendirilmektedir (Van Loon 1981, Schafleitner 2009, Levy vd., 2013, Monneveux vd., 2013). Patates ılıman iklime sahip orta ve kuzey Avrupa, Kuzey Amerika, Japonya gibi bölgelerde çoğunlukla yağışa dayalı olarak yetiştirilirken, diğer bölgelerde sulanarak yetiştirilmektedir. Yağışa dayalı yetiştirildiği bölgelerde yetersiz yağış nedeniyle, sulamanın zorunlu olduğu kurak, yarı-kurak ve hava nispi neminin düşük olduğu bölgelerde ise yetersiz sulama sebebiyle genel olarak kuraklık stresine maruz kalmaktadır (Levy vd., 2013). Kuraklığın patates üretimine etkisinin büyüklüğü, kuraklığın meydana geldiği bitki gelişim dönemine, kuraklığın süresine ve şiddetine bağlıdır. Her bir mm su kısıtlaması sonucu ortalama yumru veriminde 117 kg/ha verim düşüşü meydana geldiği tahmin edilmektedir (Vos ve Groenwold 1988). Kuraklık stresi tarımsal açıdan patatesin bitki gelişimini yavaşlatmakta (Deplonde ve Ledent 2001), erkenciliği teşvik ederek yaşam döngüsünü kısaltmakta (Kumar vd., 2007), yumru sayısını düşürmekte (Eiasu vd., 2007) ve yumru büyüklüğünü azaltmaktadır (Schafleitner vd., 2007). Bunların sonucunda yumru veriminde ve kalitesinde azalma meydana gelmektedir. Jefferies ve McKerron (1987), kurak koşullarda farklı patates çeşitlerinde toplam kuru madde üretimi ile yumru veriminin düştüğünü ve kuru madde oranının arttığını bildirmişlerdir. Bunun yanında, kuraklık stresi patateste fizyolojik olarak yaprak alan indeksinin düşmesine (Shahnazari vd., 2007), stoma iletkenliğinin azalmasına (Bansal ve Nagarajan 1986), birim yaprak alanındaki fotosentezin azalmasına (Vasquez-Robinet vd., 2008) neden olmaktadır.

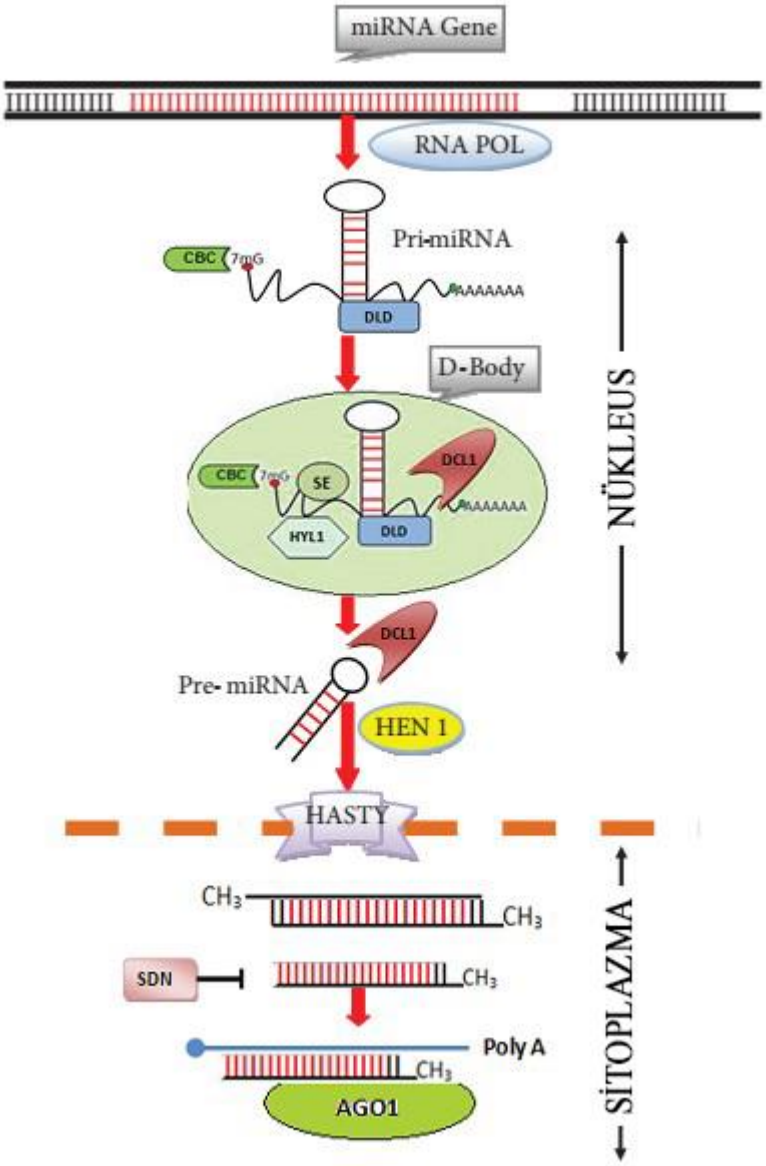
Fizyolojik ölçümlere dayalı kuraklığa toleranslı patates genotiplerinin belirlenmesine yönelik ilk çalışmalarda, klorofil ışıması (Fv/Fm) ve kanopi sıcaklık değerlerinin kuraklığa toleranslı patates genotiplerinin taranmasında bir seleksiyon yöntemi olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Ranalli vd., 1997). Ancak daha sonraki yıllarda yapılan başka çalışmalarda kuraklık stresi koşullarında klorofil ışıması patates çeşitleri arasında bir farklılık oluşturmamış, ayrıca klorofil ışıması ile yumru verimi arasında herhangi bir ilişki tespit edilememiştir (Tourneux vd., 2003; Schafleitner vd., 2007). Prolinin bitkileri kurumaya ve oksidatif strese karşı koruduğuna dair bilgiler mevcut olmasına rağmen (Kavi Kishor vd., 2005; Ozden vd., 2009), patateste kuraklık toleransı ve osmolitlerin birikimi üzerine araştırmalar çok sınırlı sayıda kalmış, bu nedenle patatesin kurağa

toleransı ve prolin birikimi arasındaki ilişki hakkında kesin bilgiler oluşamamıştır. Bansal vd., (1986), kuraklık stresi koşullarında on farklı patates genotipinde prolin seviyesinin arttığını tespit etmişlerdir. Aynı araştırıcılar, kurağa hassas olan genotiplerde kurağa toleranslı genotiplere göre daha yüksek düzeyde prolin oluştuğunu ve sonuç olarak yumru verimi ile prolin seviyesi arasında önemli negatif ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada, prolin seviyesinin kurağa hassas patates çeşitlerinde toleranslı olanlara göre daha erken dönemde arttığı gözlemlenmiştir (Schafleitner vd., 2007). Buna karşın, Heuer ve Nadler (1998) su stresi koşullarında prolin içeriğinde önemli bir değişim gözlemlememişlerdir. Benzer şekilde, kuraklık stresi koşullarında patates yapraklarındaki prolin içeriği ile yumru kuru madde kaybı arasında bir ilişki tespit edilememiştir (Levy, 1983). And Dağlarında yerel olarak yetiştirilen kuraklık stresine adapte olmuş patateslerde antioksidanlar, flavonoidler, sıcak şok proteinleri ve geç embriyogenes proteinleri (LEA) ile ilişkili genlerin ifadesinin daha yüksek olduğu bulunmuştur (Watkinson vd., 2008; Schafleitner vd., 2007). Ramirez vd., (2014) patateste SPAD metre ile ölçülen klorofil miktarının ve "yeşil kalma" özelliğinin kurağa toleranslı genotiplerin seçiminde kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Geçmiş yıllarda patateste karbon izotop karakteri ve kuraklık toleransı arasındaki ilişkinin belirlenmesine yönelik yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalar sonucunda, kuraklığa toleransın taranmasında karbon izotop ayırımı karakterinin uygun olmadığı, yumru verimini yansıtmadığı ve karbon izotop karakterinin genotiplerle ve kuraklık uygulamasıyla ilişkisinin yıllara göre farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Jefferies vd., 1997; Deblonde vd., 1999; Anithakumari, 2012). Ancak, Ramirez vd., (2014), Belçika'da yapılan Avrupa Patates Araştırma Birliği (EAPR) konferansında patateste karbon izotop karakteri ve kurağa tolerans ilişkisi üzerine olan bu sonuçları tekrar gözden geçirmek amacıyla bir çalışma yürüttüklerini bildirmişlerdir. Bu amaçla yaprakçık ve yumruları materyal olarak kullanarak karbon izotop ayırımı ile kuraklık toleransı ilişkisini incelemişlerdir. Sonuçta, yaprak ve yumru karbon izotop ayırımı karakterlerinin ikisinin de "kuraklık tolerans indeksi" ile pozitif korelasyonu olduğunu, karbon izotop ayırımı karakterinin su kullanım etkinliği ile güçlü negatif ilişkisinin olduğunu belirlemişlerdir. Ramirez vd., (2014), bu sonuçlar doğrultusunda karbon izotop ayırımı karakterinin kurağa toleranslı patateslerin taranması için kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

2.3 Bitki mikroRNA'ları ve Biyolojik Sentezleri

MikroRNA'lar (miRNA'lar) yaklaşık 21 nükleotid uzunluğunda, tek zincirli küçük RNA'lardır. miRNA'lar, mRNA hedefinin kesilmesine veya translasyonal baskıya aracılık yaparak genlerin ifadelerini düzenlerler, bu şekilde hayvan ve bitkilerin gelişiminde önemli rol almaktadırlar (Jung ve Kang 2007). miRNA'lar, ilk olarak Lee vd., (1993) tarafından lin-14 geninin *C. elegans*'da gelişim biyolojisindeki rolünün incelendiği çalışma sırasında keşfedilmiştir. Araştırmacılar incelenen LIN-14 proteininin, başka bir gen olan lin-4 geni tarafından kodlanan kısa bir RNA ürünü tarafından düzenlendiğini gözlemlemişlerdir. Bitki miRNA'ları ise ilk kez 2002 yılında Arabidopsis'te bulunmuştur (Reinhart, 2002). Bitki miRNA'larının organ gelişimi, yaprak morfolojisi, çiçek organlarının oluşumu ve kök gelişimi gibi önemli işlevlere ek olarak, küçük RNA yolağında geribildirim düzenlenmesinde görev aldıkları ve bazı küçük müdahaleci RNA'ların (siRNA'lar) biyogenezini yönlendirdikleri bulunmuştur. Ayrıca, bitkilerin kuraklık, yüksek sıcaklık, soğuk, mineral besin eksikliği ve mekanik zararlanma gibi çeşitli stres etmenlerine tepkisinde miRNA'lar düzenleyici rol almaktadırlar.

Haziran 2015 dönemi itibariyle miRBase veritabanında, 72 bitki türüne ait toplam 8.495 adet olgun bitki miRNA'sı kayıtlı durumdadır (miRBase veritabanı). Çok sayıda miRNA'nın hedefleri biyoinformatik yöntemlerle tahmin edilmiş, bunlardan bazıları doğrulanmış ve deneysel olarak teyit edilmiştir. Bitki miRNA araştırmaları 2002'den bu yana hız kazanmıştır ve buna miRNA sentezine katılan bitkisel proteinlerin keşfi de eşlik etmiştir (Mangrauthia vd., 2013).



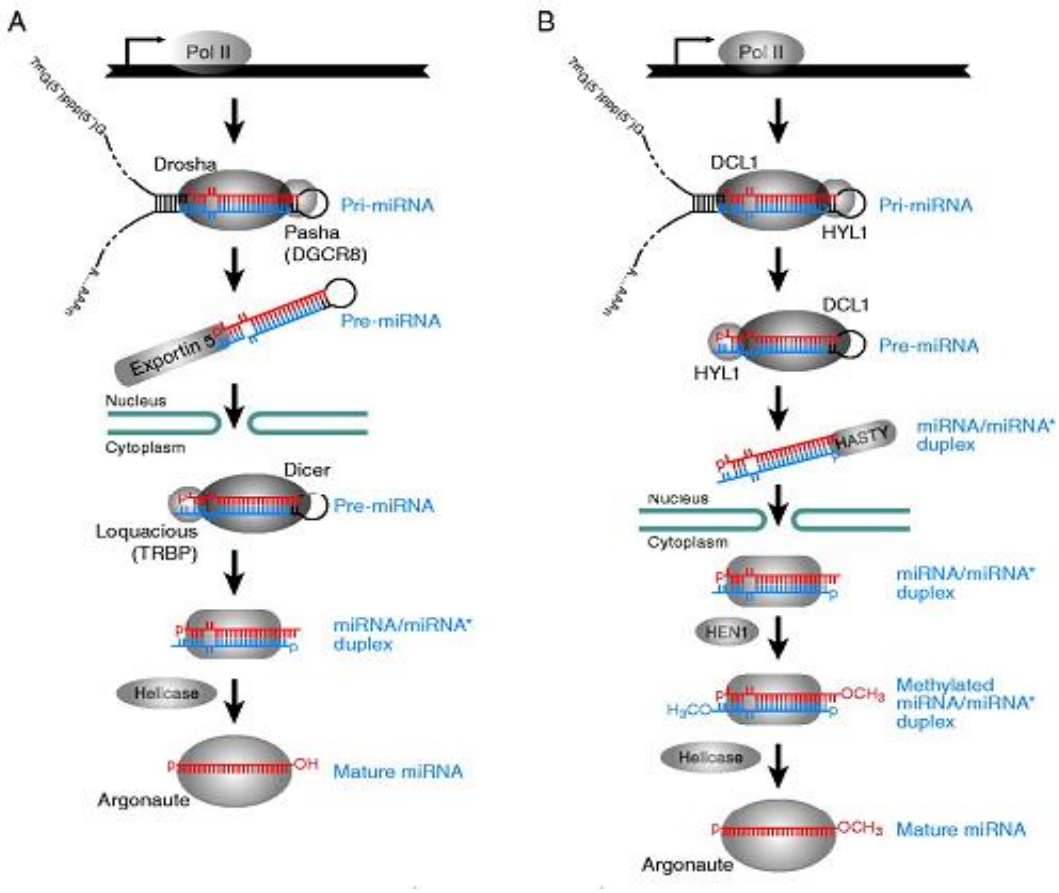
Şekil 2.4. miRNA biyogenez yolağının genel adımları (Eldem vd., 2013)

Bitki miRNA öncül dizileri (pri-miRNA), RNA polimeraz II (POL II) tarafından sentezlenmektedir (Şekil 2.4.). pri–miRNA'lar 5' ucunda kep ve 3' ucunda poli-A kuyruğuna sahiptir, bunlar RNA polimeraz II transkripsiyonunun ayrıcı özellikleridir. pri-miRNA saç tokası gibi ikincil yapıları oluşturur ve muhtemelen 'D-body' içerisinde onların işlemi sürene kadar, çekirdeksel RNA bağlayıcı protein Dawdle (DLD) tarafından tutulurak kuvvetlendirilir. Transkripsiyonun ardından, 'Hyponasty leaves1' (HYL1), Serrate (SE) ve çekirdek başlık bağlayıcı kompleksi (CBC) proteinleri yardımıyla, RNaz III enzimi (Dicer like1-DCL1) tarafından pri-miRNA, 70-80 nükleotit uzunluğunda ön-miRNA'ya (pre-miRNA) küçültülür. Bitkilerde Drosha homologları olmadığından, DCL1, çekirdek içerisinde pri-miRNA ve pre-miRNA dizilerinin işleminden sorumludur

(Eldem vd., 2013). Sonra, olgum miRNA ve yıldız miRNA (miRNA/miRNA*) çift zinciri HEN1 metil transferaz tarafından 3'- uçlarından metillenir, bu metilleme, bu çift zincirli RNA'yı küçük RNA parçalayıcı nükleazdan (SDN) korur. miRNA/miRNA* çift zinciri exportin-5 benzeri protein olan Hasty aracılığı ile sitoplazmaya taşınır. Exportin 5' bir çekirdeksel taşıma reseptörüdür (Kim 2005). Sonunda, metillenmiş miRNA/miRNA* çift zinciri seçici bir şekilde, hedef mRNA'yı baskılamak için veya kesmek için Argonaute (AGO) içeren RNA tarfından uyarılan sessizleştirme tümleşiği (RNA-induced silencing complex; RISC) ile birleşir (Eldem vd., 2013). Aktif RISC ile birleşen miRNA'lar, protein sentezinin baskılanmasına veya hedef mRNA'nın yıkımına neden olurlar (Lagos-Quintana, 2001).

miRNA'lar, hedef mRNA'ların 3'-çevrilmeyen bölgeleriyle (3'-untranslated region; UTR) kısmen eşlenirler, miRNA'nın kısmen eşlenik olduğu 6-8 nükleotidlik bölge yüksek oranda korunmuştur. Bu bağlanma mRNA'nın karasızlığına ve yıkılmasına neden olabilir. Benzer eşlenik dizilere sahip olan her miRNA farklı mRNA' lara bağlanabilir (Selbach vd., 2008). Böylece, bir miRNA birden fazla hedef mRNA'nın ifadesini transkripsiyon sonrası düzeyde düzenleyebilmektedir.

Hayvanlarda, iki temel basamak ile olgun miRNA'lar elde edilmektedir. Bitkilerde miRNA olgunlaşması, Drosha homoloğuna sahip olmamaları nedeniyle, hayvanlardaki yolaktan farklıdır. Bitkilerde Drosha yerine, RNaz III enzimi DICER-LIKE (DCL1) bulunur (Şekil 2.5.), bu hayvanlardaki miRNA olgunlaşması için gerekli olan Dicer'a homologdur (Du ve Zamore, 2005).

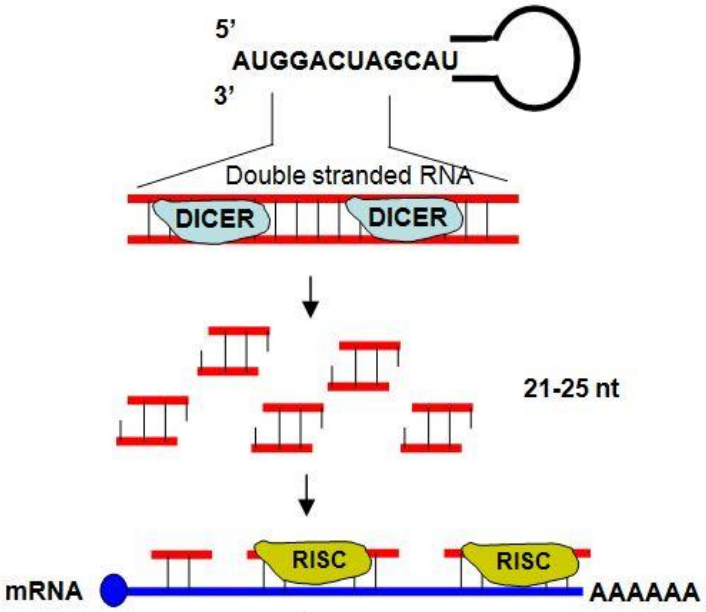


Şekil 2.5. Hayvan ve bitkide miRNA sentez yolağı (Du ve Zamore, 2005).

2.4 miRNA Yolağında Etkili Ana Enzimler

2.4.1 Bitkide dicer enzimi

Dicer, uzun çift sarmallı RNA (dsRNA)'yı kısa dsRNA'ya parçalayan bir enzimdir ve dsRNA ve RNAi aracılı gen regülasyonu sürecinde önemli bir anahtardır. Dicer proteini, RNAz III endonükleazları sınıfındandır ve kesme aktivitesini gerçekleştirebilmesi için beş ana basamak vardır (1) RBD (RNA'ya bağlanan parça, (2) dsRNA dan ~21-24 nükleotitlik kısa RNA'ya kesilme için gerekli iki RNaz III parçası, (3) PAZ (Piwi, Argonaute, Zwile) parçaları ve bu parçalar 3'ünda 2 nükleotidlik kesilmiş RNA substratındaki çıkıntıya bağlanır; (4) çift sarmal RNA prosesinde gerekli olan C ucu helikaz parçası (Mangrauthia vd., 2013). Bitkiler birden fazla dicer proteinine sahiptir, örneğin Arabidopsis dört Dicer proteinine sahiptir, bunlar DCL 1, 2, 3 ve 4'tür. DCL2, DCL3 ve DCL4 siRNA üretimi için gerekli iken, DCL1 ise miRNA üretiminden sorumludur (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Dicer/RISC enzim kompleksi tarafından dsRNA'nın kesilmesi (Kim, 2003; Zamore vd., 2000, Wall ve Shi, 2003)

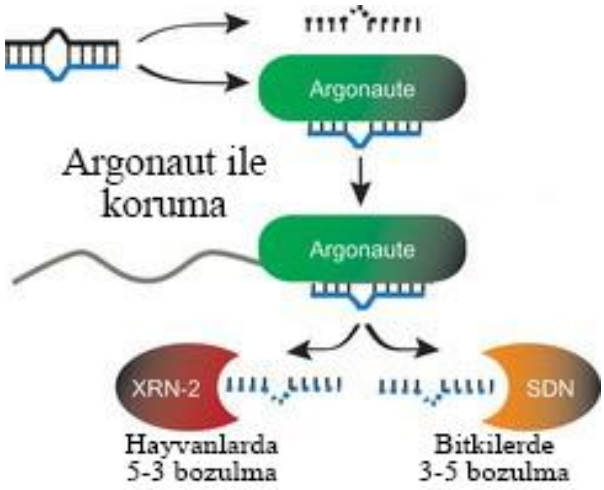
2.4.2 Hua enhancer1 (HEN1, metil transferaz)

HEN1, çift zincirli RNA'ya bağlanma motifine ve C-terminal metiltransferez parçasına sahip olduğu kabul edilen enzimdir. Bu enzim 2'-O-metil grubunu bitki miRNA'sının ve siRNA'sının 3'-terminal nükleotidine ekler ve onları bozulmaya karşı korur (Huang vd., 2009). Hen1-1, hen1-2 ve hen1-4 mutasyonlarının, tüm metiltransferaz bölgesinde, miRNA metabolizmasını uzlaştırdıkları gösterilmiştir. Saflaştırılmış HEN1 proteini, miRNA/miRNA* çiftini *in vitro* olarak metilleyebilir. HEN1, substratına ve substrat olarak görev yapan farklı birincil dizilerin miRNA/miRNA* dizilerine karşı son derece seçicidir. Ayrıca HEN1'in substratı olan iki zincirli pre-miRNA'yı sekans yerine yapı olarak tanıdığı öne sürülmektedir (Yang vd., 2006).

2.4.3 Argonaute

Argonaute proteini (AGO), RISC (RNAi' nin indüklenmiş susturma kompleksi)'in en önemli bileşenidir ve bu kompleks kesilme işleminde veya hedef RNA'nın baskılanmasında gereklidir. Küçük RNA'lar hedef mRNA'ya ulaşmada RISC kompleksinin rehberi gibi davranır (Şekil 2.7.). AGO 2 tane ünitesine sahiptir, bunlar PAZ ve PIWI domainleridir. Bitki ve hayvanlarda farklı AGO proteinleri siRISC ve miRISC üyeleridir. AGO-2 mi-RISC'in parçası iken AGO-1 si-RISC'in parçasıdır. Şu

ana kadar Arabidopsis'te birçok AGO proteini varlığı bildirilmiştir, AGO-4, RNA yönetimli DNA metilasyonuna katılan siRNA'ya bağlı tekrarlar oluşturur, AGO-7 siRNA (tasi-RNA) ve uzun siRNA üzerinde karşı etki oluşturduğu görülürken, AGO-6 DNA metilasyonunda ve transkripsiyonel gen susturulmasında rol oynar (Naqvi vd., 2009).



Şekil 2.7. Olgun miRNA'nın Argonaute ile birleşerek sabit hale gelmesi (Kai, 2010)

2.5 Patateste miRNA Çalışmaları

Patates bitkisinde bitki gelişiminde rol oynayan miRNA'ların ve hedef genlerin belirlenmesine yönelik çalışmalar 2009 yılında başlamış olup halen devam etmektedir. Zhang vd., (2009), diğer bitki türlerinde bilinen miRNA'ları kullanarak patates EST, GSS ve nükleoit veri tabanlarındaki dizilerle karşılaştırmışlar ve bu in silico yaklaşım ile *S. tuberosum*'da 48 tane potansiyel miRNA tespit etmişlerdir. Gerçekleştirdikleri biyoinformatik analizler sonucunda bu miRNA'larının çiçek, yaprak, kök ve sap gelişiminde, sinyal iletiminde, metabolizma yolaklarında ve strese tepkide yer alan 186 adet potansiyel hedef geni düzenleyebileceğini bildirmişlerdir. Biyoinformatik yöntemlerle tahmin edilen patates miRNA'larının varlığını doğrulamak için 48 adet aday miRNA içerisinden rastlantısal olarak seçilen sadece 12 tanesi için RT-PCR analizleri yapılmıştır (Zhang vd., 2009). Sonuç olarak, incelenen miRNA'ların bazılarının tüm bitki kısımlarında ifade edildiği fakat ifade düzeylerinin dokulara göre değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Patatesteki miRNA'ların tahmin edilmesine yönelik in silico yaklaşımlar gerçekleştirilen başka bir araştırmada ise 48 aileye bağlı 71 adet potansiyel miRNA tespit edilmiştir (Yang vd., 2010). Bu 71 adet miRNA içerisinden 65 tanesinin ilk kez tahmin edildiği aynı araştırıcılar tarafından belirtilmiştir. Tahmin edilen 71 miRNA'dan sadece

7 tanesi doğrulama amacı için seçilmiş ve patatesin farklı dokularındaki ifade düzeyleri gerçek zamanlı PCR yöntemiyle incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar, bu 7 adet miRNA'nın hepsinin başarılı bir şekilde çoğaltılabildiğini ve farklı dokularda ifade düzeylerinde farklılık olduğunu göstermiştir (Yang vd., 2010). Araştırıcılar her bir miRNA'nın farklı dokularda değişik seviyede ifade edilmesinin, miRNA'ların patatesin organ gelişimi veya vejetatif gelişiminin düzenlenmesindeki işlevleriyle ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir (Yang vd., 2010). Xie vd., (2011), diğer bitkilerde tespit edilen miRNA sayısı ile mukayese edildiğinde daha önce patateste belirlenen miRNA sayısının az olduğunu ve patateste daha fazla miRNA'nın olabileceğini düşünmüşlerdir. Bunun üzerine biyoinformatik yaklaşımlarla yeni modifiye edilmiş genom karşılaştırma stratejisi kullanarak 78 aileden oluşan toplam 202 adet potansiyel miRNA belirlemişlerdir. Bu 78 aileden 54 tanesinin patateste yeni olduğunu tespit etmişlerdir. Bu 202 potansiyel miRNA'dan sadece seçtikleri 12 adet miRNA'nın ifadelerini genç yaprak, olgunlaşmamış çiçek ve olgun çiçek dokularında analiz etmişler ve sonuç olarak analiz edilen miRNA'ların 11 tanesinin her üç dokuda ifade edildiğini bir tanesinin ise genç yaprak dokusunda ifade edilmediğini gözlemlemişlerdir. Xie vd., (2011), belirledikleri miRNA'ların toplam 1094 adet hedef geninin olduğunu tahmin etmiş ve bu genlerin bazılarının transkripsiyon faktörlerini kodladığını, bazı genlerin ise strese tepkide, sinyal iletiminde ve diğer metabolik aşamalarda işlevlerinin olduğunu bildirmişlerdir. Solanaceae familyasına ait farklı tarımsal bitkilerdeki miRNA'ların ve hedef genlerinin in silico ortamda tahmin edilmesine yönelik yapılan başka bir araştırmada ise patateste 22 adet miRNA ve 221 adet hedef gen belirlenmiştir (Kim vd., 2011). Zhang vd., (2013 ve 2014), yeni nesil dizileme yaklaşımı ve patates genom dizisinden (PGSC, 2011) yararlanarak, patateste 159 miRNA ailesine ait 259 adet miRNA belirlemişlerdir. Bu miRNA ailelerinden sadece 28 ailenin diğer bitkilerde de korunmuş miRNA aileleri olduğu, diğerlerinin ise patatese özgü olduğunu bildirmişlerdir. Tahmin edilen potansiyel hedef genler içerisinde transkripsiyon faktörleri, savunma mekanizmasında rol alan genler, kinaz ve iyon dengesi ile ilgili genler, çiçeklenme ve yumru oluşumundan sorumlu genler bulunmaktadır (Zhang vd., 2013). Üç farklı dokuda ve yumru gelişiminin dört farklı aşamasından alınan örneklerle patates miRNA'larını belirlemeyi ve karakterize etmeyi amaçlayan başka bir çalışmada, 33 adet ailenin üyesi olan 89 adet korunmuş miRNA, 147 adet patatese özgü miRNA ve 112 adet patatese özgü aday miRNA belirlenmiştir (Lakhotia vd., 2014). Bu çalışmada yapılan ifade analizleri sonucunda bazı miRNA'ların dokuya özgü ifade oluştururken bir kaçının yumru oluşumu devresine özgü

ifade edildiği ortaya konulmuştur. Soğukta muhafaza edilen patates yumrularındaki miRNA'ların ve hedef genlerin genom genelinde araştırılmasına yönelik ilk çalışma Ou vd., (2014) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada, 53 tane bilinen, 60 tane ise yeni miRNA bulunmuş ve 70 tane hedef gen tespit edilmiştir. Aynı araştırıcılar hasat sonrasındaki yumrularda gen ifadesinin düzenlenmesinde miRNA'larının aktif olduğunu bildirmektedirler. Ayrıca, depolamaya tepkisi farklı olan iki ayrı patates genotipi arasında 11 tane miRNA'nın ve 34 tane hedef genin ifade modellerinde farklılık gözlenmiştir (Ou vd., 2014). Yine 2014 yılında yayınlanan başka bir çalışmada ise Din vd., (2014) karşılaştırmalı genomik yaklaşımı ile 110 aileye ait 120 yeni miRNA tespit etmiş ve rastgele seçilmiş sadece 10 adet miRNA'nın ifadesini kantitatif RT-PCR yöntemi ile kanıtlamışlardır. Aynı çalışma, 120 miRNA'ya ait olduğu tespit edilen 433 potansiyel hedef genin metabolizma, transkripsiyon faktör, büyüme ve gelişim ve diğer fizyolojik karakterlere ait olduklarını belirtmektedir (Din vd., 2014).

Patateste bugüne kadar abiyotik stres faktörleri içerisinden sadece kurağa toleransın düzenlenmesinde rol alan miRNA'ların tespit edilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların sonuçları ilk olarak 2011 yılında yayımlanmaya başlamış ve bu güne kadar bu konuda üçü aynı araştırma grubu tarafından olmak üzere sadece beş makale yayımlanmıştır. Hwang vd., (2011), patateste kuraklık stresi koşullarında ifadesi değişen stu-miR396, stu-miR159a ve stu-miR157a isimli üç tane miRNA belirlemişlerdir. Kuraklık uygulamasından sonraki birinci saatten altıncı saate kadar stu-miR396'ın ifadesi kademeli olarak artış göstermiştir. stu-miR159a ve stu-miR157a'nın ifadesi ise birinci ve üçüncü saatte azalırken altıncı saate artmıştır. Hwang vd., (2011), kuraklık stresi koşullarında miR171 ailesine dahil miRNA'ların ifade değişikliğini inceledikleri başka bir çalışmalarında, miR171a, miR171b ve miR171c'nin ifadelerinin kuraklık stresi koşullarında değiştiğini gözlemlemişlerdir. Kuraklık uygulamasını açık havada kurutma yaparak ve ortama %15 PEG 6000 ekleyerek iki şekilde gerçekleştirmişlerdir. Açık havada kurutma uygulamasında, seçilen miRNA'ların ifadeleri stres uygulamasının birinci saatinde azalmış ardından altıncı saate kadar artış göstermiştir. PEG ile kuraklık uygulamasında miR171a'nın ifadesi benzer şekilde 1 saat sonra azalmış, ardından 3 saat sonra artış göstermiş ve incelenen 48 saat süresince bu düzeyde sabit kalmıştır. miR171b'nin ifadesi, açık havada kurutma uygulamasının birinci saatinde azalmış, üçüncü saatte artış göstererek kontrol seviyesine ulaşmış altıncı saate ise kontrol seviyesini geçmiştir. PEG uygulamasında ise 6. saate kadar miR171b ifadesinde hafif bir

azalış olmuş fakat 12. saatten itibaren miR171b'nin ifadesi kontrole göre daha yüksek olmuştur. miR171c'nin açık havada kurutma uygulamasındaki ifade modeli, mir171a'nınkiyle aynı olmuştur. PEG uygulamasında ise 1 saat sonra ifadesi azalmış ardından ifadesinde hafif yükselişler meydana gelerek 48 saat sonra kontrol seviyesine ulaşmıştır. Hwang vd., (2011), benzer başka bir çalışmalarında, kuraklık stresi koşullarında stu-miR172c, stu-miR172d, ve stu-miR172e miRNA'larının ifadelerinin değiştiğini belirlemişlerdir. Kuraklık stresi altında patateste prolin artışından sorumlu genlerin ifadesin düzenlenmesinde rol alan toplam 11 miRNA'dan oluşan 6 adet miRNA ailesi tahmin edilmiştir (Yang vd., 2013). Yapılan qRT-PCR analizleri sonucunda tahmin edilen 11 miRNA'nın 10 tanesi başarılı bir şekilde tespit edilmiş ve bunlardan 9 tanesinin ifadesi kurak koşullarda azalırken bir tanesinin ifadesi artmıştır. İfade ve işlev analizleri sonucunda, miR172, miR396a, miR396c ve miR4233'ün prolin sentezinden sorumlu genlerden biri olan P5CS geninin ifadesinin düzenlenmesinde rol alıyor olabileceğine dair bulgular elde edilmiştir. Bunun yanında yine prolin sentezinden sorumlu diğer genler olan P5CR ve ProDH genlerinin sırasıyla miR2673 ve miR6461 tarafından düzenliyor olabileceğine dair sonuçlar elde edilmiştir (Yang vd., 2013). Kurağa toleransın düzenlenmesinde rol alan patates miRNA'ların belirlenmesi amacıyla yapılan en son ve kapsamlı çalışmada, kontrol örneklerinde 458 adet bilinen, 674 adet ise yeni miRNA, kuraklık uygulanmış örneklerde ise 471 adet bilinen, 566 adet yeni miRNA tespit edilmiştir (Zhang vd., 2014). Aynı çalışmada, kuraklık stresi koşullarında ifadesi 2 kattan fazla değişen korunmuş miRNA'lar seçilmiş ve bunlar içerisinden 100 tanesinin ifadesinde azalma, 99 tanesinin ifadesinde ise artma gözlemlenmiştir. Aynı özellikte seçilmiş yeni miRNA'lar içerisinden 119 tanesinin ifadesi artarken, 151 tanesinin ifadesi azalmıştır. Zhang vd., (2014), bilinen miRNA'ların 246 tane, yeni miRNA'ların ise 214 tane hedef genlerinin olduğunu tahmin etmişlerdir. miRNA ve hedef genlerinde yapılan ifade analizleri sonucunda miR811, miR814, miR835 ve miR4398 isimli miRNA'ların kuraklıkla ilişkili genlerin düzenlenmesinde rol alan miRNA olarak tanımlanmışlardır. Bu miRNA'ların hedef genleri sırasıyla MYB transkripsiyon faktörü, hidroksilprolin-zengin glikoprotein, quaporin ve WRKY transkripsiyon faktörüdür. Kuraklık stresi ile ilişkili miRNA'lar ile hedef genlerin ifadeleri negatif korelasyon göstermişlerdir. Bu sonuçlar, patatesin kuraklığa tepki veya tolerans mekanizmasına miRNA'ların katıldıklarının moleküler kanıtı olarak değerlendirilebilir.

Bulgular, bitkilerin strese yanıtında miRNA'ların gerekli olduğunu ve miRNA'ların stres direnci için transgen mühendisliğinde ümit vaat eden aday genler olduğunu göstermektedir (Çizelge 2.2.).

Çizelge 2.2. Bitkilerde stres yanıtı ile ilgili yaygın miRNA'lar (Eldem vd., 2013)

Bitki	**Stres**	**miRNA**	**Hedef genler ve proteinler**	**Referanslar**
Arabidopsis, arpa, çeltik, kavak	Kuraklık, tuz, soğuk, mantarsı patojen	miR156	SBP ailesi TF'ler	Liu vd., (2008), Lu vd., (2008), Kantar vd.,(2010), Zhou vd., (2010), Li vd., (2011), Xin vd., (2011), Xin vd., (2011)
Arabidopsis, soya	Kuraklık, ABA, tuz, bakteriyel patojen	miR159	MYB33 ve MYB101, MYB33 ve MYB65 TF'ler	Reyes ve Chua (2007); Frazier vd., (2011), Alonso-Peral vd., (2012)
Kavak, mısır, çeltik	Kuraklık, tuz	miR162	dcl1	Zhou vd., (2010), Li vd., (2011)
Kavak	Mekanik Stres	miR164	NAC TF'ler	Lu vd., (2005)
Arabidopsis, Arpa, soya, buğday, mısır	Tuz, soğuk, kuraklık, ısı, mantarsı ve bakteriyel patojen	miR165/miR166	HD-ZIP III TF'ler, PHABULOSA, homeobox genleri	Liu vd., (2008), Zhou vd., (2008), Lv vd., (2010), Ding vd., (2009), Kantar vd., (2010), Xin vd., (2011), Li vd., (2011), Zhang vd., (2011)
Arabidopsis, mısır, çeltik	Kuraklık, tuz, soğuk, besin yoksunluğu, bakteriyel patojen	miR167	ARF6 ve ARF8 TF'ler	Liu vd., (2008), Li vd., (2010), Lv vd., (2010), Zhou vd., (2010), Frazier vd., (2011), Zhang vd., (2011), Sunkar vd., (2012)
Arabidopsis, çeltik, kavak, buğday	Kuraklık, tuz, soğuk, ısı	miR168	ago1	Liu vd., (2008), Lu vd., (2008), Zhou vd., (2010), Xin vd., (2011)

Dış çevresel streslere bitki adaptasyonunu geliştirerek (abiyotik streslere bitki toleransı ve biyotik strese karşı bitki korunması) veya içsel ürün potansiyelini artırarak (bitki mimarisi modifikasyonu ve bitki gelişim değişimi) ürün iyileştirmek için kullanılan miRNA'lar ve onların hedef potansiyelleri üzerine bazı bilgiler Çizelge 2.3.'de verilmektedir (Zhou, 2013).

Çizelge 2.3. Bitki geliştirilmesi için miRNA hedeflerini manipüle eden örnekler (Zhou, 2013)

MikroRNA hedefi	**MikroRNA**	**İfade stratejisi**	**Gelişmiş agronomik özellik**	**Bitki türleri**	**Referans**
NFYA5	miR169	3'UTR'sız NFYA5 aşırı ifadesi	Kuraklık toleransı	Arabidopsis	Li vd., (2008)
GmNFYA3	miR169	3'UTR'sız NFYA5 aşırı ifadesi	Kuraklık toleransı	Soya, Arabidopsis	Ni vd., (2013)
PCF5	miR319	RNAi	Soğuk toleransı	Çeltik	Yang vd., (2013)
PCF8	miR319	RNAi	Soğuk toleransı	Çeltik	Yang vd., (2013)

2.6 Bitkilerde Kuraklığa Tepkide Rol Alan miRNA'lar

miRNA araştırmaları üzerindeki son gelişmeler, stres cevabı için gerekli olan genlerin transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde miRNA'ların hayati önemini ortaya koymuştur (Covarrubias ve Reyes, 2010). miRNA'lar çeşitli stresler altında farklı olarak düzenlenirler. Bazı miRNA'lar stres altında az veya fazla ifade edilir ya da stres altında yeni miRNA'lar sentezlenir. Bitkilerde tanımlanmış ve karakterize edilmiş çeşitli biyotik ve abiyotik stres düzenlenmiş miRNA'lara bakıldığında, çoğunlukla miRNA'lar abiyotik stres yanıtında önemli rol oynayan çeşitli transkripsiyon faktörleri ya da fonksiyonel enzimleri kodlayan genleri hedef alırlar (Bej ve Basak, 2014).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, miRNA'ların genleri susturması vasıtasıyla bitki gelişiminin kontrolünde güçlü ve beklenmedik rollere sahip olduklarını ortaya koymuştur. miRNA'lar yaprak oluşumu, çiçek farklılaşması ve gelişimi, köklenme ve kök gelişiminin sağlanması, iletim demetlerinin gelişimi, vejetatif aşamadan generatif aşamaya geçişin sağlanması gibi bir çok gelişim olayını düzenlemektedirler (Jones-Rhoades vd., 2006; Chuck vd., 2009). Ayrıca, miRNA'ların hormon sinyal iletiminde (Liu ve Chen, 2009), çevresel strese tepkide ve patojenlere karşı savunmada (Sunkar vd., 2006) önemli role sahip oldukları keşfedilmiştir. Bu düzenleyici miRNA'ların yukarıda belirtilen işlevlerinin keşfedilmesi, bilim insanlarına miRNA'lar vasıtasıyla bazı genlerin sessizleştirilmesi veya bazı genlerin ifadelerinin arttırılması fikrini uyandırmıştır. Hedef genlerin sessizleştirilmesi veya ifadelerinin artırılması vasıtasıyla istenilen tarımsal

karakterlerin moleküler olarak doğrudan düzenlenmesi ve bitki ıslahında uygulanabilmesi mümkün olabilecektir. Özetle, miRNA temelli moleküler düzenleme çalışmaları, tarımsal ürün veriminin artırılması ve kalitesinin yükseltilmesi için güçlü bir potansiyele sahiptir. Bunların içerisinden bazılarının abiyotik stresle ilişkileri belirlenmiştir. Örneğin, kuraklık stresi koşullarında miRNA'lardan biri olan miR169'un ekspresyonu Arabidopsis'de azalmakta ve miR169'un hedefi olan çekirdek faktörü YA5 (NFYA5)'in ekspresyonu önemli ölçüde uyarılmaktadır (Li vd., 2008). Aynı çalışmada, nakavt yöntemiyle sessizleştirilmiş nfya5 bitkilerinde ve yüksek düzeyde miR169a ifade eden transgenik bitkilerde, yaprak su kaybının arttığı ve transgenik olmayan kontrol bitkilerine göre kuraklık stresine karşı daha hassas oldukları gözlenmiştir. Buna karşın yüksek NFYA5 ifadesine sahip transgenik Arabidopsis bitkilerinde daha düşük su kaybı gözlemlenmiş ve bu transgenik bitkilerin kuraklık stresine yabani (transgenik olmayan) bitkilere göre daha dirençli oldukları tespit edilmiştir (Li vd., 2008). Benzer şekilde, miR169'un hedefi olan ve yeni karakterize edilmiş soya fasulyesi GmNFYA3 geni Arabidopsis'e aktarılmış ve transgenik Arabidopsis bitkilerinde su kaybı azalarak kuraklık stresine tolerans artmıştır (Ni vd., 2013). Fakat Arabidopsis'te GmNFYA3'ün aşırı ifade edilmesi tuzluluk stresi ve dışarıdan uygulanan ABA'ya karşı duyarlılığın artmasına neden olmuştur (Ni vd., 2013). Domateste (*Solanum lycopersicum*) yukarıda belirtilen bulguların tersi gözlemler elde edilmiştir. Kuraklık stresi koşullarında domateste miR169'un ekspresyonu Arabidopsis'tekinin aksine artmış ve onun hedefleri olan NF-YA1/2/3 ve MRP1 genlerinin ekspresyonu azalmıştır. Domates miR169c'sının sürekli aşırı ifadesi stoma açıklıklarının, terleme oranının ve yaprak su kaybının azalmasına neden olmuştur, böylece yabani tip kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında transgenik bitkilerde kuraklık toleransı artmıştır (Zhang vd., 2011). Transgenik domates bitkileri tarla koşulları altında gözle görülebilir morfolojik ve gelişimsel değişim göstermemiştir. Bu durum, abiyotik strese toleranslı bitkiler elde etmek için miR169 veya onun hedeflerinin potansiyel aday genler olabileceğini ortaya koymuştur (Zhang vd., 2011). miR169'un yüksek düzeyde ekspresyonu domateste kuraklık stresine karşı toleransı artırırken, Arabidopsis'te toleransı azaltmaktadır. Bu bulgulardan, aynı miRNA'nın aynı koşullarda farklı bitki türlerinde değişik düzenleyici etkilerinin olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, spesifik miRNA'ların düzenleyici etkilerinin her bitki türünde belirlenmesi gerekmekte ve bitki türüne göre miRNA temelli moleküler düzenleme stratejileri geliştirilmesi gerekmektedir. Arabidopsis'de (Liu vd., 2008; Sunkar ve Zhu 2004), çeltikte (Lv vd., 2010) ve şeker kamışında (Thiebaut vd., 2011) miR319'un

ifadesinin soğuk stresi ile değişiklik gösterdiği belirtilmiştir. Çeltikte soğuk stresine tepki olarak miR319'un ifadesi azalmış OsPCF5, OsPCF6, OsPCF7, OsPCF8 ve OsTCP21 isimli hedef genlerinin ifadesi ise artmıştır (Lv vd., 2010). Daha detaylı transgenik çalışmalar, yüksek düzeyde ifade edilen Osa-miR319 geninin üşümeye alıştırdıktan (chilling acclimation) sonra (12 °C) çeltiğin soğuk stres toleransının (4 °C) artmasına neden olduğunu ortaya koymuştur (Yang vd., 2013). Ancak, miR319 transgenik çeltik bitkileri şiddetli gelişimsel gerileme göstermiştir. miR319'un pleyiotropik etkisini önlemek amacıyla miR319'un iki hedef geni olan OsPCF5 ve OsTCP21 için iki RNAi hattı geliştirilmiştir. Bu RNAi hatları, üşüme alıştırması (chilling acclimation) koşuluyla yabani tip kontrollere göre hem daha iyi soğuk toleransı göstermişlerdir hem de fenotipik olarak normal bir gelişme sergilemişlerdir. Zhou vd., (2013), golf alanlarında tercih edilen bir çim türü olan *Agrostis stolonifera*'nın kuraklığa ve tuzluluğa toleransının miR319 aracılığıyla düzenlenmesinin araştırılmasına yönelik bir araştırma yürütmüşlerdir. Çalışma sonucunda, çeltik miR319 geni (Osa-miR319) transfer edilmiş ve yüksek düzeyde miR319 ifadesi gerçekleştiren transgenik *A. stolonifera* bitkilerinin kuraklığa ve tuzluluğa toleransı artmıştır. Bu tolerans artışı yaprak mumsuluğundaki artış, su tutmadaki artış ve sodyum alımındaki azalma ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan gen ifade analizleri sonucunda, miR319'un dört adet tahmini hedef geninin (TCP-AsPCF5, TCP-AsPCF6, TCP-AsPCF8 ve TCP-AsPCF14) ifadesi önemli ölçüde azalmış ve artan abiotik stres toleransının bu genlerin ifadesindeki azalışla ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Zhou vd., 2013). Bununla birlikte, Osa-miR319'un ekspresyonunun artması yaprak boyutunda artış, sapta genişleme, sürgün sayısında azalma gibi *A. stolonifera* bitkisinde istenmeyen özelliklerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu sonuçlar, bitkilerde abiyotik stres toleransını artırmak için bir bitkiden diğer bitkilere miRNA DNA dizisinin aktarılabileceğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, miRNA ekspresyon değişikliklerinin stres toleransı haricindeki diğer karakterlere etkisine de dikkat edilmesi gerekmektedir. Guan vd., (2013), özellikle üreme organlarının korunması için yeni bir bitki termotolerans mekanizması keşfetmişlerdir. Bu mekanizmada miRNA398'in ifadesi artmakta, böylece miR398'in hedefi olan bakır/çinko süperoksit dismutaz genlerinin (CSD1 ve CSD2) ve CCS geninin (CSD1 ve CSD2 için bakır şaperonu kodlayan gen) ifadesi azalmaktadır (Guan vd., 2013). Aynı çalışmada csd1, csd2 ve ccs mutant bitkilerinin, sıcaklık transkripsiyon faktörü ile sıcak şok proteini birikiminde artış ve düşük çiçeklenme zararlanması gösteren yabani (mutant olmayan) bitkilere göre daha fazla yüksek sıcaklık toleransı gösterdiği bulunmuştur (Guan vd., 2013). Bu sonuçlar,

miR398 veya onun hedeflerinin moleküler olarak düzenlenmesi vasıtasıyla özellikle çiçeklenme dönemi yüksek sıcaklıklara denk gelen yazlık bitkilerin yüksek sıcaklığa toleransının arttırılabileceğini düşündürmektedir. Oksidatif stres koşullarında Cu/Zn SOD ifadesi üzerine yapılan ayrıntılı çalışma, abiyotik stres sırasında miRNA'ların önemli rol oynadığını göstererek, miR398 tarafından transkripsiyon sonrası kontrol altında olduğunu ortaya koymuştur (Sunkar vd., 2006). miR398, Cu dengesi için merkezi bir düzenleyicidir, Cu toksisitesinde; miR398 nın azalan düzenlenmesi, ROS detoksifikasyonu için yüksek CSDs ile sonuçlanır, ayrıca Cu eksikliği miR398 seviyelerini arttırır, bu durum, ROS detoksifikasyonunu devralan Fe (demir) Süperoksit dismutaz (FSD) artması ile birlikte ve fotosentez için gerekli olan bir Cu-içeren protein olan plastosiyanin (PC) dağıtılan sınırlı Cu miktarı ile birlikte gözlemlenir (Beauclair vd., 2010, Yamasaki vd., 2007).

miR398 den ayrı olarak, diğer birçok miRNA'nın abiyotik stres tepkisinde doğrudan veya dolaylı olarak gerekli olduğu bulunmuştur (Sunka ve Zhu, 2004;. Sunkar vd., 2007). MYB transkripsiyon faktörlerini (MYB33, MYB65, MYB101 ve MYB104) hedef alan miR159'un, kuraklık koşullarında stres hormonu ABA tarafından uyarıldığı bildirilmiştir (Reyes ve Chua, 2007).

BÖLÜM III

MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Bitki materyali ve stres uygulaması

Denemede Desiree ve Russet Burbank olmak üzere iki farklı patates çeşidi kullanılmıştır. Avrupa Patates Veribankası (The European Cultivated Potato Database) kayıtlarında Desiree'nin kurağa toleransı yüksek ve çok yüksek, Russet Burbank'ın kurağa toleransı ise farklı iki kaynağa dayanarak hem düşük hem de yüksek olarak bildirilmektedir. Patates çeşitleri, Niğde Üniversitesi Tarımsal Genetik Mühendisliği Bölümü Patates Islah Programı kapsamındaki koleksiyondan temin edilmiştir.

Patates bitkileri sera koşullarında yetiştirilmiştir. Dikim öncesi bütün saksılardaki toprak nem seviyesi tarla kapasitesinde olacak şekilde ayarlanarak, patates yumruları 2:1 oranında torf ve perlit içeren 12 litre hacimli saksılara dikilmiştir. Sera sıcaklık koşulları gündüz 24 ^{o}C, gece 16 ^{o}C (12/12 saat gündüz/gece) olacak şekilde ayarlanmıştır. Bitkilere stres uygulama dönemine kadar, toprak tarla kapasitesini kaybetmeyecek şekilde %50 seyreltilmiş Hoagland besin çözeltisi ile sulama yapılmış ve çıkıştan 45 gün sonra (Erken yumru gelişim döneminde) bitkilere stres uygulamaları başlatılmıştır. Bu dönemde bitkiler kontrol ve kuraklık stresi uygulamaları şekilde 2 gruba ayrılıp, kontrol bitkilerine hiçbir stres uygulaması yapılmayıp, yukarıda belirtilen optimum koşullarda yetiştirilmiştir. Kuraklık stresi uygulamasında ise çıkıştan sonraki 45. günde (erken yumru gelişim dönemi) sulama kesilerek, 10 gün süreyle sulama yapılmamış ve 10. günde kuraklık uygulamasının ve kontrol bitkilerinin yaprakçık hasatları yapılmıştır. Bir bitkideki gelişimini tamamlamış en genç yaprağın tepe yaprakçığı RNA izolasyonu için hasat edilmiştir.

3.1.2 Hoagland çözeltisinin hazırlanması

Çözeltinin hazırlanması için makroelement (Çizelge 3.1.) ve mikroelementler (Çizelge 3.2.) suda çözülerek, 20 litrelik karışım 10X olacak şekilde Çizelge 3.2.'de verilen miktarlara göre hazırlanmıştır. Hogland besin çözeltisini hazırlamak için gerekli stok makro ve mikro besin element çözeltileri otoklavlanarak +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.1. 1X Hoagland besin çözeltisi içeriği

Elementler	1X için hacim
1 M NH_4NO_3 (Amonyum nitrat)	5 ml/L
1 M KNO_3 (Potasyum Nitrat)	5 ml/L
1 M KH_2PO_4 (MKP- Mono potasyum fosfat)	1 ml/L
1 M $CaCI_2.2H_2O$ (Kalsiyum Klorür)	4 ml/L
1 M $MgSO_4.7H_2O$ (Magnezyum Sülfat)	2 ml/L
Solüsyon III	1 ml/L
Fe-EDTA	0.2 ml/L
pH	5.5

Çizelge 3.2. Hoagland besin çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan Solüsyon III içeriği

Mikroelementler	1 Litre için gerekli miktar
HBO_3 (Borik Asit)	2.86 g
$MnSO_4.H_2O$ (Mangan Sülfat)	1.54 g
$ZnSO_4.7H_2O$ (Çinko Sülfat)	0.23 g
$CuSO_4.5H_2O$ (Bakır Sülfat)	0.09 g
$MoNaO_4.2H_2O$ (Sodyum Molibdat)	0.025 g

Çizelge 3.3. Hoagland besin çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan Fe-EDTA içeriği

İçerik	1 Litre için gerekli miktar
$Na_2EDTA.2H_2O$ (Sodyum Etilendiamin Tetraasetik Asit)	37.3 g
$FeCI.6H_2O$ (Demir Klorür)	26.74 g

3.1.3 Fotosentez hızı

Kontrol ve stres uygulamalarında fotosentez hızı ölçümleri çıkıştan 45 gün sonra, 10 gün süreyle 1., 3., 5., 7., 9. ve 10. günde fotosentez cihazının sabit ışık şiddeti (1000 µmol/m^2/sn), CO_2 miktarı (400 µmol) ve hava akışı (500 µmol/sn) koşullarında taşınabilir fotosentez sistemi (LI-6400 XT Licor) kullanılarak yapılmıştır. Ölçümler 4 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Fotosentez ölçümleri her bir tekerrürde 2 bitkide ve her bir bitkide en az 2 farklı yaprakçıkta yapılmıştır. Fotosentez ölçümü için patates bitkilerinin üsten ikinci veya üçüncü yapraklarının tepe yaprakçıkları kullanılmıştır.

3.1.4 Stoma iletkenliği

Kontrol ve stres uygulamalarında stoma iletkenliği ölçümleri çıkıştan 45 gün sonra, 10 gün süreyle 1., 3., 5., 7., 9. ve 10. günde fotosentez cihazının sabit ışık şiddeti (1000 µmol/m2/sn), CO2 miktarı (400 µmol) ve hava akışı (500 µmol/sn) koşullarında taşınabilir fotosentez sistemi (LI-6400 XT Licor) kullanılarak yapılmıştır. Ölçümler 4 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Stoma iletkenliği ölçümleri her bir tekerrürden 2 bitkide ve her bir bitkide en az 2 farklı yaprakçıkta yapılmıştır. Stoma iletkenliği ölçümü için patates bitkilerinin üsten ikinci veya üçüncü yapraklarının tepe yaprakçıkları kullanılmıştır.

3.1.5 Terleme hızı

Kontrol ve stres uygulamalarında terleme hızı ölçümleri çıkıştan 45 gün sonra, 10 gün süreyle 1., 3., 5., 7., 9. ve 10. günde fotosentez cihazının sabit ışık şiddeti (1000 µmol/m2/sn), CO2 miktarı (400 µmol) ve hava akışı (500 µmol/sn) koşullarında taşınabilir fotosentez sistemi (LI-6400 XT Licor) kullanılarak yapılmıştır. Ölçümler 4 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Terleme hızı ölçümleri her bir tekerrürden 2 bitkide ve her bir bitkide en az 2 farklı yaprakçıkta yapılmıştır. Terleme hızı ölçümü için patates bitkilerinin üsten ikinci veya üçüncü yapraklarının tepe yaprakçıkları kullanılmıştır.

3.1.6 Nispi su içeriği

Kontrol ve stres uygulamalarında nispi su içeriği çıkıştan 45 gün sonra, 10 günlük süre içerisinde, 1., 3., 5., 9. ve 10. günlerde üsten ikinci veya üçüncü yapraklarının tepe yaprakçıklarında yapılmıştır. Nispi su içeriği (RWC) ölçümleri için 4 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Her bir tekerrürde iki bitkiden ve her bir bitkiden 1 adet gelişimini tamamlamış yaprak örneği alınarak buz üzerine konulmuştur. Hasat edilen yaprak örnekleri hızlı bir şekilde laboratuvara götürülemüş ve hemen hassas terazi ile taze ağırlığı ölçülmüştür. Taze yapraklar, saf su içerisinde en az 18 saat bekletilerek turgor haline gelmeleri sağlanmış ve ardından yaprakların turgor ağırlıkları ölçülmüştür. Turgor ağırlık ölçümünden sonra yapraklar, mikrodalga fırında 500W güçte 10 dk süreyle kurutulmuş ve ardından, yaprakların tam olarak kuruması sağlamak için 95 ºC'de 2-3 saat etüvde bekletilmiş ve ardından kuru ağırlıkları tartılmıştır. Bu işlemlerin ardından bitkilerin RWC değerleri Denklem 3.1'e göre hesaplanmıştır.

$$\text{RWC} : [(\text{Taze Ağırlık} - \text{Kuru Ağırlık}) / (\text{Turgor Ağırlık} - \text{Kuru Ağırlık})] \times 100 \qquad (3.1)$$

3.1.7 Klorofil indeksi

Yaprak klorofil indeksi, kontrol ve stres uygulamalarında çıkıştan 45 gün sonra, 10 gün süreyle, 1., 3., 5., 7., 9. ve 10. günde Chlorophyll-Meter (Konica Minolta SPAD-502 Plus Klorofilmetre) aleti kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler 4 tekerrürlü olarak ve her tekerrürde 4 bitkide gerçekleştirilmiştir. Yaprak klorofil indeksi ölçümleri her bitkinin 3 farklı yaprakçığından yapılmıştır. Yaprak klorofil indeksi ölçümleri için patates bitkilerinin üsten ikinci veya üçüncü yapraklarının tepe yaprakçıkları kullanılmıştır.

3.1.8 Bitki sıcaklığı

Bitki sıcaklığı, kontrol ve stres uygulamalarında bitki sıcaklığı çıkıştan 45 gün sonra, 10 gün süreyle, 1., 3., 5., 7., 9. ve 10. günde kızılötesi termometre (IRT) aleti (MASTECH BM380 Lazer Sıcaklık Ölçüm Cihazı) kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümler 4 tekerrürlü olarak ve her tekerrürde 4 bitkide gerçekleştirilmiştir. Bitki sıcaklığı ölçümleri patates bitkilerinin üst yapraklarında yapılmıştır.

3.1.9 Prolin miktar tayini

Denemede çıkıştan sonraki 45. günde (erken yumru gelişim dönemi) kuraklık uygulamasında sulama kesilerek, 10 gün süreyle sulama yapılmamış ve 10. günde kuraklık uygulamasının ve kontrol bitkilerinin yaprakçık hasatları yapılmıştır. Bir bitkide gelişimini tamamlamış en genç yaprağın tepe yaprakçığı prolin miktar tayini için hasat edilmiştir. Örnekler 4 tekerrürlü olarak ve her tekerrürde 4 bitkiden alınmıştır. Yaprak örnekleri sıvı azot içerisinde havan ve havan kolu yardımıyla öğütülerek toz haline getirilmiş ve −80 ºC'de muhafaza edilmiştir. Prolin içeriği, Bates vd., (1973) tarafından geliştirilen yöntemin modifiye edilmesi ile belirlenmiştir.

Prolin miktarı aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. 100 mg yaprak örneği 2 ml %3'lük sülfosalisilik asit içinde öğütülüp vortekste güçlü bir şekilde karıştırılmıştır.
2. Karışım 4 ºC de, 10 000 x g güçte 10 dk santrifüj yapılarak çöktürülmüştür.
3. 0.2 ml üst faz ile taze hazırlanmış 0,2 ml ninhidrin çözeltisi (1,25 g ninhidrin, 30 ml glacial asetik asit, 20 ml 6 M ortofosforik asit) ile karıştırılmıştır. Karışım 3-4 defa ters düz edilerek karıştırılmıştır.
4. Karışım 90 ºC'de 1 saat inkübe edildikten sonra inkübasyon süresi sonunda reaksiyon buzda sonlandırılmıştır.
5. Her bir reaksiyon karışımına 1 ml tolün eklenip vortekste 15 sn. karıştırılmıştır.
6. Pembe hale gelen üst fazdan 1 ml alınıp, küvete eklendikten sonra, üzerine 2 ml tolün eklenmiştir.
7. 20 dk karanlıkta bekletildikten sonra tolün fazının ölçümü spektrofotometrede 520 nm dalga boyunda yapılmıştır. Kör olarak 3 ml tolün kullanılmıştır. Prolin konsantrasyonu, oluşturulan standart eğriden elde edilen formüle göre hesaplanmıştır. Standart grafiği çiziminde 0,375 µg/µl, 0,750 µg/µl, 1,500 µg/µl, 3,00 g/µl, 3,750 µg/µl, 5,625 µg/µl, 7,500 µg/µl, 11,250 µg/µl konsantrasyonundaki değerler kullanılmıştır.

3.1.10 Malondialdehit (MDA) ölçümü

Denemede çıkıştan sonraki 45. günde (erken yumru gelişim dönemi) kuraklık uygulamasında sulama kesilerek, 10 gün süreyle sulama yapılmamış ve 10. günde

kuraklık uygulamasının ve kontrol bitkilerinin yaprakçık hasatları yapılmıştır. Bir bitkideki gelişimini tamamlamış en genç yaprağın tepe yaprakçığı malondialdehit (MDA) ölçümü için hasat edilmiştir. Örnekler 4 tekerrürlü olarak ve her tekerrürde 4 bitkiden alınmıştır. Yaprak örnekleri sıvı azot içerisinde havan ve havan kolu yardımıyla öğütülerek toz haline getirilmiş ve −80 ºC'de muhafaza edilmiştir. Hem hücre hem de organel membranlarında ROS seviyeleri eşik değere ulaştığında meydana gelen lipid peroksidasyonun, bir ürünü olan malondialdehit (MDA) adı verilen bu maddenin miktar tayini ile lipid peroksidasyonu derecesi ölçülebilmektedir

MDA ölçümünde kullanılmak üzere, 100 ml, 1M KI 50 ml, 10 mM K-fosfat tamponu, 200 ml, % 0,1 TCA çözeltisi, % 0,5 TBA ve % 20 TCA içeren çözelti hazırlanmıştır. % 0.5 TBA ve % 20 TCA içeren çözeltisinin hazırlanması için 10 g TCA ve 250 mg TBA tartılarak 30 ml otoklavlanmış saf suda çözülerek 50 ml toplam hacme tamamlanmıştır. 10 mM potasyum fosfat tamponu için 1M K_2HPO_4 (pH7.0) ve 1M K2HPO_4 (pH 7.0) çözeltileri gerekmektedir. 17,418 g K_2HPO_4 tartılarak, 100 ml saf suda çözülmüştür ve 13, 609 g K_2HPO_4 tartılarak 100 ml saf suda çözülmüştür. 1M K_2HPO_4'dan 61,5 ml ve 1M K_2HPO_4'dan 38, 5 ml alınarak 100 mM 100ml potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) elde edilmiştir. 10 mM potasyum fosfat tamponu kullanılmak üzere 100 mM dan seyreltilmiştir. Heath ve Packer (1968) yöntemine göre yapılan analizde aşağıda verilen basamaklar takip edilmiştir.

1. 100 mg bitki örneği tartılır ve %0.1 lik 5 ml (w/v) TCA solüsyonu içerisinde parçalanmıştır.
2. Daha sonra bu örnek 10 000 x g de 20 dk santrifüj edilmiştir.
3. Elde edilen üst fazdan 1 ml alınarak ve üzerine %0,5 (w/v) TBA içeren %20lik (w/v) TCA çözeltisinden 2 ml eklenmiştir
4. Karışım kaynayan suda 30 dk inkübe edildikten sonra reaksiyonu durdurmak için tüpler buz içerisinde bekletilmiştir.
5. Daha sonra örnekler 10 000 x g de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst fazın absorbansı 532 nm de ve 600 nm de okunmuştur. Kör olarak, 3 ml %0.5TBA içeren %20lik TCA çözeltisi kör olarak kullanılmıştır.
6. MDA miktarı, 155 $mM^{-1}cm^{-1}$ seyreltme katsayı değeri kullanılarak aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

   MDA (µmol/g FW) = [(A532−A600)/155]×103 ×Seyreltme faktörü (df)

3.1.11 Yaprakta hidrojen peroksit miktar tayini

Denemede çıkıştan sonraki 45. günde (erken yumru gelişim dönemi) kuraklık uygulamasında sulama kesilerek, 10 gün süreyle sulama yapılmamış ve 10. günde kuraklık uygulamasının ve kontrol bitkilerinin yaprakçık hasatları yapılmıştır. Bir bitkideki gelişimini tamamlamış en genç yaprağın tepe yaprakçığı yaprakta H_2O_2 miktarını belirlemek için hasat edilmiştir. Örnekler 4 tekerrürlü olarak ve her tekerrürde 4 bitkiden alınmıştır. Yaprak örnekleri sıvı azot içerisinde havan ve havan kolu yardımıyla öğütülerek toz haline getirilmiş ve -80 ºC'de muhafaza edilmiştir. Serbest oksijen radikallerinden biri olan hidrojen peroksidin (H_2O_2) kurak koşullarda patates bitkilerindeki değişimini belirlemek için yapraktaki H_2O_2 konsantrasyonu ölçülmüştür. Yapraklardaki H_2O_2 konsantrasyonu Loreto ve Velikova (2001)'e göre belirlenmiştir.

Yaprakta hidrojen peroksit miktar tayininde kullanılmak üzere, 100 ml 1M KI, 50 ml 10 mM K-fosfat tamponu, 200 ml %0,1 TCA çözeltisi, % 0,5 TBA ve % 20 TCA içeren çözelti hazırlanmıştır. %0,5 TBA ve % 20 TCA içeren çözeltisinin hazırlanması için 10g TCA ve 250mg TBA tartılarak 30 ml otoklavlanmış saf suda çözülerek 50 ml toplam hacme tamamlanmıştır. 10 mM potasyum fosfat tamponu için 1M K_2HPO_4 (pH7.0) ve 1M K_2HPO_4 (pH 7.0) çözeltileri gerekmektedir. 17,418 g K_2HPO_4 tartılarak, 100 ml saf suda çözülmüştür ve 13,609 g K_2HPO_4 tartılarak 100 ml saf suda çözülmüştür. 1M K_2HPO_4'dan 61,5 ml ve 1M K_2HPO_4'dan 38, 5 ml alınarak 100 mM 100ml potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) elde edilmiştir. 10 mM potasyum fosfat tamponu kullanılmak üzere 100 mM'dan seyreltilmiştir.

Yaprakta hidrojen peroksit miktar tayini aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. 100 mg yaprak örnekleri 4 °C'de 5 ml %0,1 trikloroasetik asit (TCA) (w/v) içerisinde homojenize edilmiştir.
2. Homojenat +4°C'de 10 000 x g güçte 10 dk santrifüj yapılarak çöktürülmüştür
3. Daha sonra, 0,75 ml üstfaz, 0,75 ml 10 mM K-fosfat tamponu (pH 7.0) ve 1,5 ml 1M KI karıştırılmıştır.
4. Her bir örneğe ait karışımdaki H_2O_2 konsantrasyonuna ait absorbans değerleri 390 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Kör olarak 1,5 ml 1M KI, 0,75 ml 10 mM K-fosfat tamponu (pH 7.0), 0,75 ml 0,1% trikloroasetik asir (TCA) (w/v) kullanılmıştır.

Absorbans değerleri standart kalibrasyon eğrisinden elde edilen formülde yerlerine konularak konsantrasyon hesaplanamıştır H_2O_2 standart eğrisi 10-100 nmol konsantrasyon aralığında çözeltilerin hazırlanıp apsorbans değerlerinin ölçülmesi sonucunda bulunmuştur. Standart grafiği çizilmesi için, 10 nmol, 20 nmol, 30 nmol, 40 nmol, 50 nmol, 60 nmol, 70 nmol, 80 nmol, 90 nmol, 100 nmol konsantrasyondaki absorbans değerleri kullanılmıştır.

3.1.12 Yumru sayısı

Kontrol ve stres uygulamalarında 4 tekerrürlü olarak yetiştirilen Desiree ve Russet Burbank çeşitleri 85. günde hasat edilmiştir ve her bir saksıya ait yumrular sayılmıştır. Her tekerrürdeki bitkilerin ortalama yumru sayısı hesaplanmıştır.

3.1.13 Tek yumru ağırlığı

Kontrol ve stres uygulamalarında 4 tekerrürlü olarak yetiştirilen Desiree ve Russet Burbank çeşitleri 85. günde hasat edilmiştir. Her bir tekerrürdeki her bitkiye ait yumruların toplam ağırlığı tartılmış ve toplam yumru sayısına bölünerek tek yumru ağırlığı hesaplanmıştır.

3.1.14 Bitki başına yumru verimi

Kontrol ve stres uygulamalarında 4 tekerrürlü olarak yetiştirilen Desiree ve Russet Burbank çeşitleri 85. günde hasat edilmiştir. Her bir tekerrürdeki her bitkiye ait yumruların toplam ağırlığı tartılmıştır. Her tekerrürün bitki başına yumru verimi ortalaması hesaplanmıştır.

3.1.15 Toplam RNA izolasyonu

miRNA ve hedef genlerinin ifade analizleri için kontrol ve stres uygulamalarından elde edilen yapraklardan ilk olarak toplam RNA izolasyonu yapılmıştır. Toplam RNA izolasyonu için Qiagen RNeasy Plant Mini Kit isimli ticari kit kullanılmıştır. Havan ve havan kolları ise 300 °C'de gece boyu bekletilmiştir. RNA izolasyonu için RNaz ve DNaz

ari filtreli pipet uçları kullanılmıştır. RNA izolasyonunda kullanılan pipetler ve RNA izolasyonun yapıldığı tezgâhın üzeri, RNaz bulaşmasını engellemek için %30'luk H_2O_2 ile temizlenmiştir. RNA izolasyonu aşamasında ortama RNaz bulaşmasını önlemek için denemede kullanılan bütün plastik malzemeler ile gerekli tüm çözeltiler, RNaz aktivitesini engelleyen dietilpirokarbonat (DEPC) ile muamele edilmiştir. DEPC muamelesine ilave olarak malzemeler, 121 ºC'de 15 dk otoklav yapılarak sterilize edilmiştir.

RNA izolasyonu aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Yaprak örnekleri sıvı azot içerisinde havanda toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen örnekten 100 mg tartılmıştır.
2. Tartılan örnek üzerine 450 µl buffer RLT eklenerek, vorteks yapılmıştır. Tüpler 56 C'de 1 ile 3 dk arası inkübasyona bırakılmıştır.
3. Karışım 2'ml lik homojenizasyon kolonlarına (QIAshredder) transfer edilmiş ve 2 dk 13,400 (rpm) devirde santrifüj yapılarak karışım homojen hale getirilmiştir.
4. Dikkatli bir şekilde yaklaşık 450 µl lik süpernatant kısım RNase-free 1.5-mL yeni mikrosantrifüj tüplere aktarılmıştır.
5. Karışıma 225 µl etanol (hacmin yarısı kadar) eklenmiş, pipetaj yardımı ile karıştırılmıştır. Bu kısımda santrifüj yapılmamıştır.
6. Karışım, 2 ml' lik RNA tutucu kolonlara (RNeasy mini column) aktarılmış, 10.000 (rpm) devirde 15 saniye santrifüj yapılarak RNA kolono tutturulmuş ve alta geçen sıvı kısım atılmıştır.
7. Kolonu temizlemek için kolona 700 µl RW1 yıkama tamponu eklenmiş ve >10.000 (rpm) devirde 15 saniye santrifüj yapılarak, alta geçen sıvı kısım atılmıştır.
8. RNeasy mini spin kolon yeni bir toplama tüpüne aktarılmış ve kolona 500 µl RPE yıkama tamponu eklenerek, >10.000 (rpm) devirde 15 saniye santrifüj yapılarak, kolon yıkanmış ve toplama tüpünde toplanan sıvısı atılmıştır.
9. RNA tutucu kolona tekrar 500 µl RPE tamponu eklenmiş, 2 dk >10.000 (rpm) devirde santrifüj yapılarak kolonun son yıkaması gerçekleştirilmiştir. Toplama tüpü, içerisindeki sıvı ile birlikte atılmıştır.
10. Kolondaki etanol kalıntısını uzaklaştırmak için kolon teni bir santrifüj tüpüne yerleştirilmiş ve 1 dk 14.000 (rpm) devirde tekrar santrüfüj yapılmıştır.

11. Temizlenen kolon 1,5 ml'lik yeni bir RNaz'dan ari tüpe yerleştirilmiş ve kolondaki RNA'yı çözmek için kolona 50 µl RNaz'dan ari su eklenmiş ve 1 dk >10.000 devirde santrifüj yapılmıştır.
12. Örnekler -20 ºC de saklanmıştır.

Örneklerin toplam RNA konsantrasyonları ve saflığı spektrofotometrik yöntemle BioSpec UV-Vis spektrofotometre cihazı (SHIMADZU) kullanılarak belirlenmiştir. Ölçümlerden önce, kör olarak RNase'dan arındırılmış 2 µl su kullanılmıştır. İzole edilen RNA örneklerinin sağlamlığı agaroz jel analizi ile kontrol edilmiştir. Örnekler, 0.5x TBE kullanılarak hazırlanan %1.5 konsantrasyonundaki agaroz jelde (7V/cm) 50 dk koşturulmuştur ve böylece izolasyonun başarılı yapılıp yapılmadığı kontrol edilmiştir. Agaroz jel analizinde kullanmak amacıyla ilk olarak, 108 g Tris base, 27,5 g Borik asit, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0) içeren stok 5X TBE tamponu hazırlanmış ve jel analizinde 5X TBE tamponu, 0.5X'e seyreltilmiştir.

3.1.16 Toplam RNA saflaştırması

Toplam RNA'dan DNA bulaşmasını uzaklaştırmak için genomik DNA eleminasyon kolono içeren RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) isimli ticari kit kullanılmıştır. RNA saflaştırma işlemi aşağıda açıklanan şekilde yapılmıştır.

1. RNA izoasyonunda sonra elde edilen örnekler üzerine 250 µl buffer RLT eklenerek, pipetleme yapılmıştır.
2. Karışım gDNA eliminasyon kolonuna transfer edilmiş ve 30 s 13,400 (rpm) devirde santrifüj yapılmıştır. gDNA eleminasyon kolonu atılmıştır.
3. Toplama tüpüne geçen RNA örneği üzerine 350 µl 70% etanol eklenmiş ve pipetleme yapılmıştır. Bu kısımda santrifüj yapılmamıştır.
4. Karışım 2 ml toplama tüpü içerisindeki RNA tutucu kolona (RNeasy mini column) aktarılmış, >10.000 (rpm) devirde 15 saniye santrifüj yapılarak RNA kolona tutturulmuş ve alttaki sıvı kısım dökülmüştür.
5. Kolonu temizlemek için kolona 700 µl RW1 yıkama tamponu eklenmiş ve >10.000 (rpm) devirde 15 saniye santrifüj yapılarak, alta geçen sıvı kısım atılmıştır.

6. RNeasy mini spin kolon yeni bir toplama tüpüne aktarılmış ve kolona 500 µl RPE yıkama tamponu eklenerek, >10.000 (rpm) devirde 15 saniye santrifüj yapılarak, kolon yıkanmış ve toplama tüpünde toplanan sıvı atılmıştır.
7. RNA tutucu kolona tekrar 500 µl RPE tamponu eklenmiş, 2 dk >10.000 (rpm) devirde santrifüj yapılarak kolonun son yıkaması gerçekleştirilmiştir. Toplama tüpü, içerisindeki sıvı ile birlikte atılmıştır.
8. Kolondaki etanol kalıntısını uzaklaştırmak için kolon teni bir santrifüj tüpüne yerleştirilmiş ve 1 dk 14.000 (rpm) devirde tekrar santrüfüj yapılmıştır.
9. Temizlenen kolon 1,5 ml'lik yeni bir RNaz'dan ari tüpe yerleştirilmiş ve kolondaki RNA'yı çözmek için kolona 50 µl RNaz'dan ari su eklenmiş ve 1 dk >10.000 devirde santrifüj yapılmıştır.
10. Örnekler -20 ºC de saklanmıştır.

Örneklerin toplam RNA konsantrasyonları ve saflığı spektrofotometrik yöntemle BioSpec UV-Vis spektrofotometre cihazı (SHIMADZU) kullanılarak belirlenmiştir. Ölçümlerden önce, kör olarak RNaz'dan arındırılmış 2 µl su kullanılmıştır. İzole edilen RNA örneklerinin sağlamlığı ve DNA bulaşığı olup olmadığı, agaroz jel analizi ile kontrol edilmiştir. Örnekler, 0.5x TBE kullanılarak hazırlanan %1.5 agaroz jelde (70V/cm) 50 dk koşturulmuştur ve böylece saflaştırmanın başarılı yapılıp yapılmadığı kontrol edilmiştir. Agaroz jel analizinde kullanmak amacıyla ilk olarak, 108 g Tris base, 27,5 g Borik asit, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0) içeren stok 5X TBE tamponu hazırlanmış ve jel analizinde 5X TBE tamponu, 0.5X'e seyreltilmiştir.

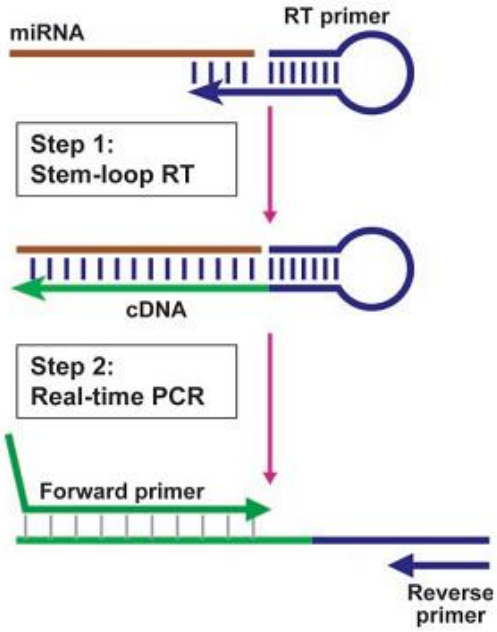
3.1.17 cDNA sentezi

3.1.17.1 miRNA'dan cDNA sentezi

Tez kapsamında incelenen miRNA ve hedef genlerine ait bilgiler Çizelge 3.4.'de verilmiştir. miRNA ve hedef gen transkriptlerin kuraklık stresi koşullarındaki ifade düzeylerinin belirlenmesi amacıyla hassasiyeti yüksek olan qRT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla uygun kitler kullanılarak önce sap-ilmek (stem-loop) yöntemiyle miRNA'ların cDNA sentezi gerçekleştirilmiş ve ardından qRT-PCR analizi yapılmıştır. cDNA sentezi için her bir miRNA'ya özgü sap-ilmek primer (Şekil 3.1.) tasarlanmıştır (Kramer, 2011).

Çizelge 3.4. İncelenen miRNA dizileri, hedef genleri, hedef gen aksesyon numaraları

miRNA adı	miRNA dizisi	Hedef Gen	Hedef Gen numarası	Kaynak
stu-miR398a	UAUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	L-askorbat oksidaz	XM_006356302	Zhang vd., 2013
stu-miR398a	UAUGUUCUCAGGUCGCCCCUG	Superoksit dismutaz[Cu-Zn]	PGSC0003DMT400027651(UniPort), XM_006342669.1 (NCBI)	Hedef gen olabileceği tez kapsamında yapılan biyoinformatik analizler sonucunda öngörülmüştür.
stu-miR398b	GAGUGUGCCUUAGAACACAGGU	Superoksit dismutaz[Cu-Zn]	PGSC0003DMT400027651(UniPort), XM_006342669.1 (NCBI)	Zhang vd., 2013
stu-miR398b	GAGUGUGCCUUAGAACACAGGU	L-askorbat oksidaz	XM_006356302	Hedef gen olabileceği tez kapsamında yapılan biyoinformatik analizler sonucunda öngörülmüştür.
stu-miR156a	UGACAGAAAGAGAAGUGAGCAC	Superoksit dismutaz[Cu-Zn]	AU279098, XM_006342669.1	Xie vd., 2011
miR224	AGGCUUAGAUAUGACAUAGGG	Superoksit dismutaz [Fe]	PGSC0003DMT400013447 (UniPort), XM_006358116.1 (NCBI)	Lakhotia vd., 2014.
stu-miR742	AGGCTTAGATATGACATAGGGC	Superoksit dismutaz [Fe]	CV302935.1, XM_006358116.1	Zhang vd., 2014.



Şekil 3.1. Sap-ilmek primeri tasarlama aşamaları şeması (Kramer, 2011)

miRNA için qRT-PCR primeri tasarlama basamakları:

1. ilgili miRNA'nın olgun dizisi alınır.
2. sap ilmek primeri için, olgun miRNA dizisinin 3' ucundan son 6 baz uzunluğundaki dizinin ters tamamlayıcısı alınır.
3. Chen vd., (2005) tarafından belirlenen 44 baz uzunluğundaki sap ilmek dizisinin 3' ucuna eklenir. miRNA'dan cDNA yapmak için bu tasarlanan sap ilmek primeri kullanılır (Şekil 3.1.).
4. qRT-PCR analizinde miRNA'dan elde edilen cDNA'yı çoğaltmak için ileri primer tasarlanır. İleri primer için olgun miRNA'nın, 5' ucundan 12-17 baz uzunluğu seçilir, erime sıcaklığının yaklaşık 60 ºC yapmak için, seçilen yaklaşık 12-17 baz uzunluğundaki dizinin 5' ucuna tercihe göre 3-6 baz uzunluğunda bir dizi eklenir ve http:www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer programında erime sıcaklığı hesaplanır.
5. Geri primer evrenseldir. Sap ilmek primeri dizisi kullanılarak tasarlanmıştır. Geri primer dizi "5′-CCA GTG CAG GGT CCG AGG TA-3′" şeklinde verilmiştir (Kramer, 2011).

miRNA'dan cDNA sentezi için Revers transkripsiyon kiti (Thermo Scientific RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit) kullanılmıştır. Kurak ve kontrol koşullarında Desiree ve Russet Burbank çeşitlerinden saf olarak elde edilen toplam RNA'ların kalıp olarak kullanılmasıyla tez kapsamında incelenen miRNA'lardan, miRNA'ya özgü sap-ilmek (stem-loop/SL) primerleri (Çizelge 3.5.) kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır.

Çizelge 3.5. miRNA'dan cDNA sentezi için kullanılan sap ilmek primerleri

Primer adı	miRNA'ya özgü sap-ilmek (stem-loop/SL) primeri
stu-miR398a_SL (stem loop)	5′- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCAGGGG 3'
stu-miR398b_SL (stem loop)	5′- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGGGGT -3'
stu-miR156a_SL (stem loop)	5′- GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AC GTGCTC -3'
miR224_SL (stem loop)	5′- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCCCTAT -3'
stu-miR742_SL (stem loop)	5′- GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGCCCTA -3'

Çizelge 3.6. Sap-ilmek primeri ile miRNA'dan cDNA sentezi reaksiyon içeriği

1. Reaksiyon	Miktar (µl	Konsantrasyon
RNA (100 ng/ul)	9.5	950 ng
miRNA'ya özgü sap-ilmek primer (5uM)	3	0.75 µM
5X reaksiyon buffer	4	1X
RiboLock RNase inhibitörü	0.5	20 U
dNTP (her biri 10 mM)	2	1 mM
Revert Aid Reverse Transcriptase (Ters Transkriptaz) (200U)	1	200 U
Toplam hacim	20	

Reaksiyon karışımı (Çizelge 3.6.) 42 ºC de 60 dk ve sonrasında reaksiyonun sonlandırılması için 70 ºC de 10 dk inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.1.17.2 mRNA'dan cDNA sentezi

Toplam mRNA'dan cDNA sentezi için Revers transkripsiyon kiti (Invitrogen SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit) kullanılmıştır. Kurak ve kontrol koşullarında Desiree ve Russet Burbank çeşitlerinden saf olarak elde edilen toplam RNA'ların kalıp olarak kullanılmasıyla mRNA'lardan cDNA sentezi yapılmıştır.

Çizelge 3.7. Tek zincirli cDNA sentezi reaksiyon içeriği

İçerik	**Miktar**
5X VILO™ Reaksiyon kaşırımı	10 µl
10X SuperScript® Enzim karışımı	5 µl
RNA (100 ng/µl)	25µl
DEPC'li su	10 µl
Toplam hacim	50 µl

Hazırlanan reaksiyon karışımı (Çizelge 3.7.), 25°C'de 10 dk, 42°C'de 60 dk ve sonrasında reaksiyonun sonlandırılması için 85 ºC de 5 dk inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

Toplam mRNA'dan elde edilen cDNA örnekleri, Cu/Zn süperoksidaz dismutaz (Cu/Zn SOD), Fe süperoksidaz dismutaz (Fe SOD), L-askorbat oksidaz, ve Piyrolin-5-

karboksilat sentaz (Pyrroline-5-carboxylate synthase; P5CS) genlerinin ifade analizinde kullanılmıştır.

3.1.18 cDNA sentezi doğrulanması

3.1.18.1 miRNA'dan elde edilen cDNA'ların standard PCR ile doğrulanması

miRNA'dan cDNA sentezinin gerçekleşip gerçekleşmediği standard PCR ile test edilmiştir. miRNA'lardan elde edilen cDNA'ların doğrulanması analizinde, incelenen miRNA'ya özgü ileri primer ve sap-ilmeğe özgü evrensel primer dizileri Çizelge 3.8.'de listelenmiştir. Bu primerler aynı zamanda qRT-PCR çalışmalarında kullanılmıştır.

Çizelge 3.8. miRNA'ya özel ileri primerler ve sap-ilmeğe özgü evrensel primer

İleri ve Geri Primerler	Primer dizileri
miRNA evrensel	5′-CCA GTG CAG GGT CCG AGG TA-3′
stu-miR398a_Forward	5'- GCA TAT GTT CTC AGG TCG CC -3'
stu-miR398b_Forward	5'- CGC ATT GTG TTC TCA GGG TC -3'
stu-miR156a_Forward	5'- CAC GCA TGA CAG AAA GAG AAG TG – 3'
stu-miR742_Forward	5'- CAC GCA AGG CTT AGA TAT GAC A -3'
miR224_Forward	5'- GCA AGG CTT AGA TAT GAC ATA GGG -3'

cDNA doğrulama çalışmalarında kullanılan PCR içeriği ve sıcaklık döngüsü koşulları sırasıyla Çizelge 3.9.'da ve Çizelge 3.10.'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. miRNA'dan yapılan cDNA sentezinin doğrulaması için kullanılan standard PCR'ın içeriği

Standard-PCR içeriği	Miktar	Son Konsantrasyon
cDNA (1:10)	1 µl	
10X buffer	2 µl	1X
dNTP (her biri 25 mM)	0.16 µl	0.2 µM
$MgCI_2$ (25 mM)	1.2 µl	0.2 µM
F primer (5uM) (gene özgü)	2 µl	0.5 µM
R primer (5uM) (evrensel)	2 µl	0.5 µM
Taq DNA polymerase 5u/ul	0.2 µl	0.5 u/µl
dH_2O	11.44 µl	
Toplam hacim	20 µl	

Çizelge 3.10. miRNA'dan yapılan cDNA sentezinin doğrulanması için kullanılan PCR'ın sıcaklık döngüsü

Basamak	İşlev	Sıcaklık (°C)	Süre (sa:dk:sn)	Tekrar
1	Taq Polimeraz aktifleştirme	94	0:2:0	yok
2	DNA denatürasyonu	94	0:1:0	
3	Primer bağlama	60	0:0:30	
4	SYBR Green sinyal taraması			
5	Yeni DNA zincir sentezi	72	0:0:30	
6	Geri Dön	2. Basamak		30
7	Erime eğrisi (melting curve) analizi	70°C'den 99°C'ye, 1.0°C aralıkla	0:0:5	yok

Standard PCR deneme ürünleri, %2 agaroz jelde, (7V/cm) 50 dk koşturularak analiz edilmiştir.

3.1.18.2 mRNA'dan elde edilen cDNA'ların standart PCR ile doğrulaması

Kalıp olarak mRNA'nın kullanıldığı cDNA sentezi, *ef1α* primerleri kullanılarak standart-PCR ile doğrulanmıştır. mRNA'dan elde edilen cDNA'ların standart PCR doğrulama çalışmalarında kullanılan PCR içeri ve sıcaklık döngüsü koşulları sırasıyla Çizelge 3.11.'de ve Çizelge 3.12.'de reaksiyon miktarları verilmiştir.

Çizelge 3.11. mRNA'dan elde edilen cDNA ve hedef gen primerleri ile standard PCR doğrulaması reaksiyon içeriği

Standard-PCR içeriği	Miktar	Son Konsantrasyon
cDNA (1:10)	1 µl	
10X buffer	2 µl	1X
dNTP (her biri 25 mM)	0.16 µl	0.2 µM
$MgCI_2$ (25 mM)	1.2 µl	0.2 µM
F primer (5uM) (gene özgü)	2 µl	0.5 µM
R primer (5uM) (gene özgü)	2 µl	0.5 µM
Taq DNA polymerase 5u/ul	0.2 µl	0.5 u/µl
dH_2O	11.44 µl	
Toplam hacim	20 µl	

Çizelge 3.12. mRNA'dan elde edilen cDNA ve hedef gen primerleri ile standard PCR doğrulaması sıcaklık döngüsü

Basamak	İşlev	Sıcaklık (°C)	Süre (sa:dk:sn)	Tekrar
1	Taq Polimeraz aktifleştirme	94.00	0:2:0	yok
2	DNA denatürasyonu	94.00	0:1:0	
3	Primer bağlama	60.00	0:0:30	
4	SYBR Green sinyal taraması			
5	Yeni DNA zincir sentezi	72.00	0:0:30	
6	Geri Dön	2. Basamak		30
7	Erime eğrisi analizi	70°C'den 99°C'ye, 1.0°C aralıkla	0:0:5	yok

Standard PCR deneme sonuçları, %2 konsantrsyonundaki agaroz jelde 3 ul (BioLabs, 50 bp DNA Ladder, #N3236S) marker yüklenerek, (7V/cm) 50 dk koşturulmuştur.

3.1.19 Gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR)

miRNA ve hedef genlerinin kuraklık stresine bağlı ekspresyonlarını belirlemek amacıyla, kontrol ve kuraklık stresi uygulamalarında qRT-PCR analizleri yapılmıştır. Hedef genlerin qRT-PCR analizinde kullanılacak primerler Çizelge 3.13.'de belirtilen koşullar doğrultusunda Primer 3 yazılımı kullanılarak tasarlanmıştır, Tasarlanan primerler için http://www.idtdna.com/calc/analyzer yazılımında homodimer ve heterodimer analizleri yapılmış ve bu analizler sonucu delta G değeri -9'dan büyük olanlar qRT-PCR denmelerinde kullanılmıştır. qRT-PCR analizlerinde kullanılan hedef gen primerleri ve miRNA primerleri sırasıyla Çizelge 3.14. ve Çizelge 3.15.'de listelenmiştir. Optimum qRT-PCR koşullarını belirlemek amacıyla farklı qRT-PCR koşulları denenmiştir. Bu denemelerde uygun cDNA miktarını, uygun primer miktarını ve uygun bağlanma sıcaklığını belirlenmeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu ön çalışmalar sonucunda, Çizelge 3.16. ve Çizelge 3.17.'de belirtilen reaksiyon içerikleri ve sıcaklık döngüsü koşulları oluşturulmuştur.

Çizelge 3.13. Hedef gen primerleri tasarlama koşulları

Özellik	**Minimum**	**Optimum**	**maksimum**
Ürün büyüklüğü	100 bp	150 bp	200 bp
Geri dönüş numarası	4		
Primer büyüklüğü	18 bp	20 bp	25 bp
Primer Tm	57 ºC	60 ºC	63 ºC
Ürün Tm	72 ºC	85 ºC	90 ºC
Primer GC içeriği	% 45	% 50	% 55

Çizelge 3.14. Hedef gen primerleri

Hedef gen ileri ve geri primerleri	**Hedef gen primer dizileri**
ef1-alpha Forward	5'- ATTGGAAACGGATATGCTCCA-3'
ef1-alpha Reverse	3'- TCCTTACCTGAACGCCTGTCA-3'
St L-ascorbate oxidase Forward	5'- CCCTATGGATGGACAGCACT -3'
St L-ascorbate oxidase Reverse	5'- GATGAACACCCTCAGCCAAT -3'
St Fe SOD Forward	5'- TTTGGGATTACTCGCCACTC -3'
St Fe SOD Reverse	5'- TCACTGCCTCCCATGATACA -3'
St P5CS Forward	5'- CGCTTCTCGTTCATGAGGAT -3'
St P5CS_Reverse	5'- AGCTTGCTTTAGGTCCACCA -3'
St Cu/Zn SOD Forward	5'- CTCCAGGGTTAATTGCTCCT -3'
St Cu/Zn SOD _Reverse	5'- GCCCGCATTTCTTTTATGGT -3'

Çizelge 3.15. miRNA'ya özel ileri primerler ve sap-ilmeğe özgü evrensel primeri

İleri ve Geri Primerler	**Primer dizileri**
miRNA evrensel	5′-CCA GTG CAG GGT CCG AGG TA-3′
stu-miR398a_Forward	5'- GCA TAT GTT CTC AGG TCG CC -3'
stu-miR398b_Forward	5'- CGC ATT GTG TTC TCA GGG TC -3'
stu-miR156a_Forward	5'- CAC GCA TGA CAG AAA GAG AAG TG – 3'
stu-miR742_Forward	5'- CAC GCA AGG CTT AGA TAT GAC A -3'
miR224_Forward	5'- GCA AGG CTT AGA TAT GAC ATA GGG -3'

Çizelge 3.16. qRT-PCR içeriği

RT-PCR içeriği	**Miktar (µl)**
Total Mix (2X) (Qiagen)	5.0
F Primer (2 µM)	0.4
R Primer (2 µM) (miRNA evrensel primeri)	0.4
Ultra saf su	1.7
cDNA* (1:200) veya (1:100)	2.5

*stu-miR398a, stu-miR398b, miR224, St L-ascorbat oksidaz, St Fe SOD, St P5CS, St Cu/Zn SOD için 1:200, stu-miR156a, stu-miR742 için 1:100 oranında seyreltilmiş cDNA'lar kullanılmıştır.

Çizelge 3.17. qRT-PCR sıcaklık döngüsü

Basamak	İşlev	Sıcaklık (°C)	Süre (sa:dk:sn)	Döngü
1	Taq Polimeraz aktifleştirme	95.00	0:15:00	yok
2	DNA denatürasyonu	95.00	0:00:10	40
3	Primer bağlama	60.00	0:00:15	
5	Yeni DNA zincir sentezi	72.00	0:00:20	
7	Erime eğrisi analizi	70°C'den 99°C'ye, 1.0°C aralıkla	00:00:05	yok

Normalleştirme için *ef1α* geni referans gene olarak seçilmiştir. *ef1α* geni, Nicot vd., (2005)'nın patateste abiyotik ve biyotik stres koşulları altında qRT-PCR çalışmalarında normalizasyon için kullanılabilecek uygun yeni referans genlerin belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmanın sonucuna dayanarak seçilmiştir. Her bir reaksiyon 3 teknik tekrarlı olarak kurulmuştur. PCR'ın sadece tek bir ürün oluşturup oluşturmadığını belirlemek için erime eğrisi (melting curve) analizi yapılmıştır.

miRNA hedef gen ekspresyon analizinde örneklerin eşik (threshold) değerleri çalışmada kullanılacak olan Rotor-Gene Q (QIAGEN) RT-PCR cihazının Software yazılımı aracılığı ile analiz edilmiştir. qRT-PCR analiz sonuçlarına göre örneklerin Ct değerlerine ait standart sapmalar Microsoft Excel programı yardımıyla hesaplanarak genlerin ekspresyon düzeyi, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ oransal hesaplama metoduna göre belirlenmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001).

BÖLÜM IV

BULGULAR

4.1 Fizyolojik Karakterler

Son yıllarda dünyada tatlı su kaynaklarında meydana gelen azalmanın, tarımsal üretimi tehdit edeceği, gelecekte tarım sektörünü daha büyük ölçüde zarara uğratabileceği ve hatta ülkelerin ekonomisi üzerinde tehdit oluşturacabileceği düşünülmektedir. Yapılan inceleme ve araştırmalar sonucunda, 1970'lerden günümüze Türkiye'nin birçok bölgesinde kuraklık sorunun arttığı ve günümüz ile karşılaştırıldığında gelecekte uzun süreli ve daha şiddetli kuraklık sorunlarıyla karşılaşılacağının muhtemel olduğu bildirilmiştir (Sen vd., 2012). Yaşam kalitemizin sürekliliği açısından var olan gıda üretiminin korunması ve devamlılığının sağlanması için küresel iklim değişikliğinden dolayı artması beklenen kuraklık sorunu ile mücadele edilmesi gerekmektedir. Bitkilerin kuraklık stresine toleransı üzerine uzun yıllar çalışmalar yapılmasına rağmen, patatesin su eksikliğine karşı verdiği tepki mekanizmasının anlaşılması üzerine ve kuraklık stresine karşı tolerans geliştirmeye yönelik yapılan araştırmaların yetersiz olduğu görülmektedir. Bu nedenle kurak koşullara daha toleranslı patates çeşitleri geliştirmek için öncelikle patates bitkilerinin kuraklık stresine tepkisini anlamaya yönelik çalışmaların artması gerekmektedir. Bilindiği gibi, kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler seviyelerde değişiklikler meydana gelmektedir. Kuraklık stresi altında, diğer kültür bitkilerinde olduğu gibi patateste de ilk gözlemlenen morfolojik tepki, pörsüme denilen su kaybı nedeniyle özellikle yapraklarda meydana gelen gevşeme ve sarkmadır. Denemede kullanılan, Desiree ve Russet Burbank patates çeşitlerinde de kuraklık stresi altında gözlemlenen ilk morfolojik tepki yapraklardaki pörsüme olmuştur (Şekil 4.1.). Avrupa Patates Veribankası Desiree’nin kuraklık stresine direncini yüksek ve çok yüksek olarak, Russet Burbank’in direncini hem düşük hem de yüksek olarak bildirmektedir. Tez kapsamında uygulanan kuraklığın 10. gününde Desiree’nin yaprak ve diğer toprak üstü aksamlarının Russet Burbank’den daha fazla pörsüdüğü gözlemlenmiştir (Şekil 4.1.; 4.2.). Fakat kuraklığın 10. gününün sonunda yapılan sulamanın ardından (ertesi sabah) Desiree’nin morfolojik olarak kendini toparladığı ve kontrol bitkilerine benzer bir görüm kazandığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç,

kuraklık stresi koşullarının ortadan kalkması durumunda Desiree'nin hızlı bir şekilde kendini toparlayabildiğinin bir göstergesi olarak nitelendirilebilir. Bununla birlikte, tez kapsamında yapılan gözlemler sonucunda, kurak koşullar süresince Russet Burbank'in morfolojik olarak, kurağa toleranslı olduğu bildirilen Desiree'den daha az olumsuz etkilendiği belirlenmiştir.

Şekil 4.1. Desiree çeşidinin kontrol ve kurak koşullarda morfolojik görünümü

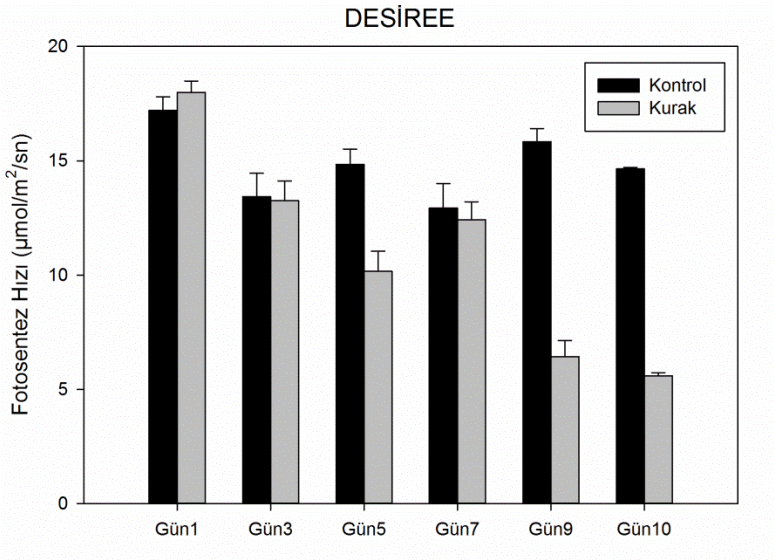
Şekil 4.2. Russet Burbank çeşidinin kontrol ve kurak koşullarda morfolojik görünümü

4.1.1 Fotosentez hızı

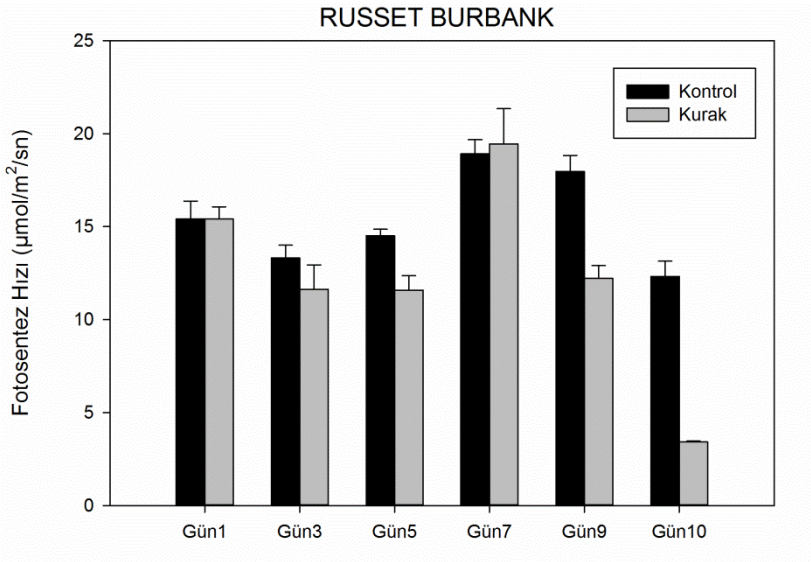
Kontrol ve stres uygulamalarında, çıkıştan 45 gün sonra, 10 gün süreyle 1., 3., 5., 7., 9. ve 10. günlerde üsten ikinci veya üçüncü yapraklarının tepe yaprakçıklarında, Desiree ve

Russet Burbank çeşitlerinde yapılan fotosentez hızı ölçümlerinin sonuçları Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de verilmektedir. Kontrol koşullarında Desiree'nin ortalama fotosentez hızı 1. gün 17,20 µmol/m^2/sn, 3. gün 13,43 µmol/m^2/sn, 5.gün 14,84 µmol/m^2/sn, 7. gün 12,94 µmol/m^2/sn, 9. gün 15,84 µmol/m^2/sn ve 10. gün 14,65 µmol/m^2/sn olarak gerçekleşmiştir. Desire'nin kurak koşullardaki ortalama fotosentez hızı ise 1. gün 17,99 µmol/m^2/sn, 3. gün 13,26 µmol/m^2/sn, 5. gün 10,16 µmol/m^2/sn, 7. gün 12,42 µmol/m^2/sn, 9. gün 6,43 µmol/m^2/sn ve 10. gün 5,59 µmol/m^2/sn olmuştur. Kontrol koşullarında Russet Burbank'ın ortalama fotosentez hızı 1. gün 15,43, µmol/m^2/sn, 3. gün 13,32 µmol/m^2/sn, 5. gün 14,51 µmol/m^2/sn, 7. gün 18,93 µmol/m^2/sn, 9. gün 17,97 µmol/m^2/sn ve 10. gün 12,33 µmol/m^2/sn olarak gerçekleşmiştir. Kurak koşullarda Russet Burbank fotosentez hızı, 1. gün 15,42 µmol/m^2/sn, 3. gün 11,64 µmol/m^2/sn, 5. gün 11,58 µmol/m^2/sn, 7. gün 19,45 µmol/m^2/sn, 9. gün 12,22 µmol/m^2/sn ve 10. gün 4,65 µmol/m^2/sn olarak gerçekleşmiştir.

Kurağa maruz bırakılan Desiree çeşidinin fotosentez hızında ilk önemli azalma, kuraklık uygulamasının 5. gününde gözlemlenmiştir. Kuraklık uygulamasının 7. günüde, kurak koşullardaki Desiree'nin fotosentez hızı kontrol koşullarındakine çok yakın düzeyde gerçekleşmiştir. Kontrol uygulamasıyla mukayese edildiğinde, kurak koşullar altında Desiree'nin fotosentez hızında kuraklık uygulamasının 9. gününde çarpıcı bir düşüş gözlenerek %59,4 oranında azalma belirlenmiştir. Kuraklık uygulamasının 10. gününde ise Desiree'nin fotosentez hızında kontrole göre çarpıcı bir düşüş ile %61,8 oranında azalma belirlenmiştir. Russet Burbank çeşidinde, kuraklık 3. günden itibaren fotosentez hızı üzerine etkisini göstermiş, 7. gündeki kurak ve kontrol koşullarındaki artıştan sonra, 9. ve 10. günlerde kurak koşullarda fotosentez hızında önemli azalma meydana gelmiştir. Kontrol uygulamasıyla mukayese edildiğinde, kurak koşullar altında Russet Burbank'ın fotosentez hızında kuraklık uygulamasının 9. gününde %31,9 oranında azalma belirlenmiştir. Kuraklık uygulamasının 10. gününde ise Russet Burbank fotosentez hızında kontrole göre çarpıcı bir düşüş ile %72,2 azalma belirlenmiştir.



Şekil 4.3. Kontrol ve kuraklık koşullarında Desiree çeşidinin fotosentez hızı



Şekil 4.4. Kontrol ve kuraklık koşullarında Russet Burbank çeşidinin fotosentez hızı

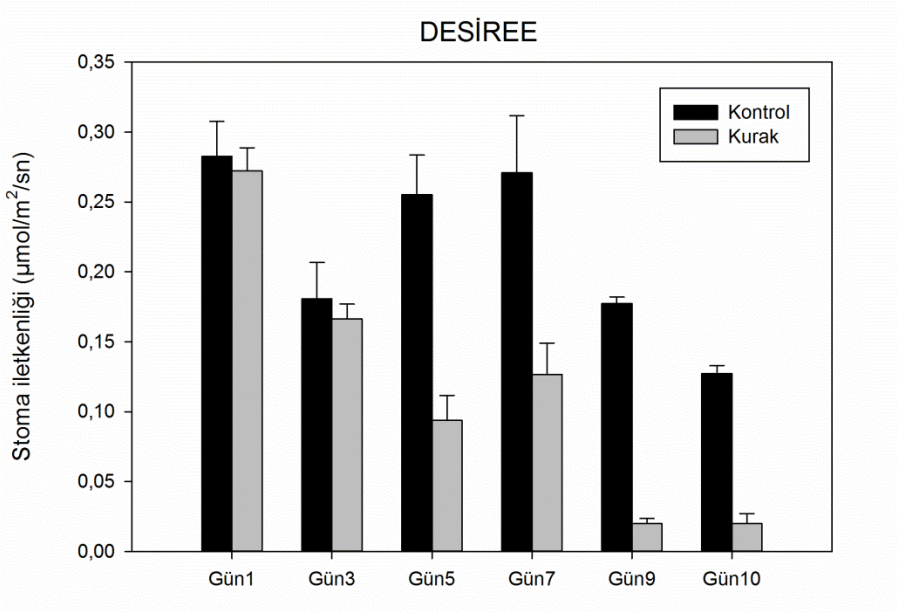
Kuraklık abiyotik stresler arasında verimi en çok etkileyen faktörler arasındadır. Çünkü kuraklık su potansiyelindeki değişime bağlı olarak fotosentez, stomaların açılıp kapanması, yaprak büyüklüğü gibi fizyolojik olayları doğrudan etkilemektedir. Bu nedenle, su yetersizliği stresine maruz kalan bitkiler, su kaybına tolerans göstermek ve su kaybını önlemeye çalışmak için, fizyolojik, morfolojik ve kimyasal değişimler aracılığıyla kuraklık stresine uyum sağlamaya çalışmaktadırlar. Hücre bölünmesinin devamlılığına, farklılaşmasına ve hücrenin büyümesine bağlı olan bitki büyüme ve gelişmesi kurak koşullarda yavaşlamaktadır. Bitki hücrelerinin bölünmesi ve büyümesindeki azalmaya bağlı olarak, bitki yapısındaki organlarda da oransal küçülmeler

görülmektedir. Düşük su potansiyelinden dolayı, klorofil oluşumu yavaşlamakta ve buna bağlı olarak fotosentez etkinliğinde azalma görülmektedir. Ayrıca yaprakta turgor basıncının düşmesine neden olan düşük su potansiyeli, hücrede absisik asit birikmesine neden olmaktadır. Bu durum stomaların kapanmasına neden olmakta ve buna bağlı olarak fotosentez etkinliğinde azalma görülmektedir. Yüksek stres seviyelerinde bitkilerin fotosentetik depresyona girmelerinin diğer nedeni, fotosentez ürünlerinin (asimilat) taşınmasının yavaşlamasıdır ve buna bağlı olarak CO_2 asimilasyonu düşmektedir (Özer vd., 1997). Fotosentez hızı sonuçlarına bakıldığında, Desiree çeşidinde kurak koşullarda Russet Burbank çeşidine kıyasla daha fazla azalma görülmektedir. Bunun yanında, kuraklık uygulamasının 10.gününde Russet Burbank fotosentez hızında ani bir düşüş meydana gelmiş ve kurak koşullarda Russet Burbank'ın fotosentez hızı Desiree'den daha düşük olmuştur. Desiree'den daha düşük Kuraklık uygulamasının 9. gününde her iki çeşitte, kontrol ile karşılaştırılığında, kuraklık uygulamasıda fotosentez hızında yüksek düzeyde azalma göze çarpmaktadır. Kuraklığın uygulandığı tarihten itibaren, her iki çeşitte, beklendiği gibi 10. günde en az fotosentez etkinliği görülmektedir.

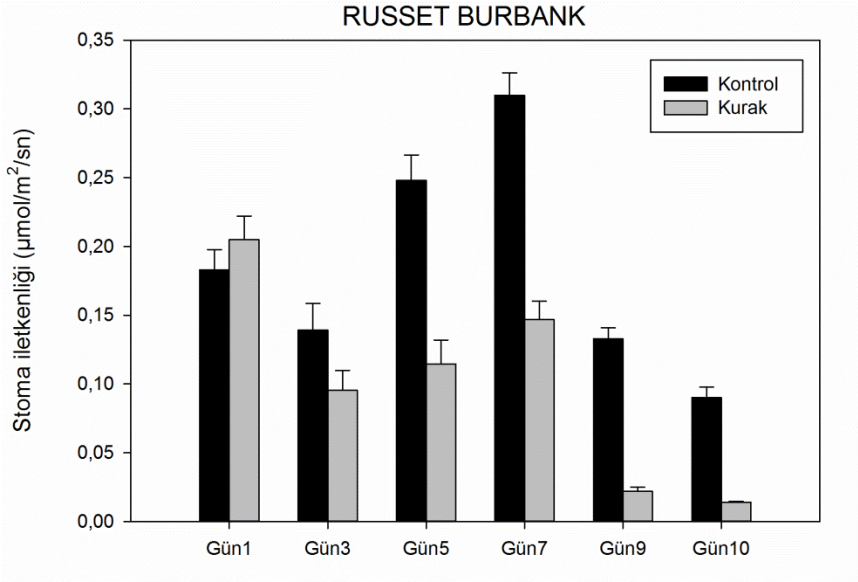
4.1.2 Stoma iletkenliği

Kontrol ve stres uygulamalarında, çıkıştan 45 gün sonra, 10 gün süreyle, üsten ikinci veya üçüncü yapraklarının tepe yaprakçıklarında yapılan Desiree ve Russet Burbank çeşitlerinde stoma iletkenliği ölçümleri değerleri grafiği Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmektedir. Kontrol koşullarında Desiree'nin ortalama stoma iletkenliği 1. gün 0,28 µmol/m^2/sn, 3. gün 0,18 µmol/m^2/sn, 5. gün 0,26 µmol/m^2/sn, 7. gün 0,27 µmol/m^2/sn, 9. gün 0,18 µmol/m^2/sn ve 10. gün 0,13 µmol/m^2/sn olarak gerçekleşmiştir. Desiree'nin kurak koşullardaki ortalama stoma iletkenliği ise 1. gün 0,27 µmol/m^2/sn, 3. gün 0,17 µmol/m^2/sn, 5. gün 0,09 µmol/m^2/sn, 7. gün 0,13 µmol/m^2/sn, 9. gün 0,02 µmol/m^2/sn ve 10. gün 0,02 µmol/m^2/sn olmuştur. Kontrol koşullarında Russet Burbank'ın ortalama stoma iletkenliği 1. gün 0,18, µmol/m^2/sn, 3. gün 0,14 µmol/m^2/sn, 5. gün 0,25 µmol/m^2/sn, 7. gün 0,32 µmol/m^2/sn, 9. gün 0,13 µmol/m^2/sn ve 10. gün 0,09 µmol/m^2/sn olarak gerçekleşmiştir. Kurak koşullarda Russet Burbank ortalama stoma iletkenliği, 1. gün 0,21 µmol/m^2/sn, 3. gün 0,10 µmol/m^2/sn, 5. gün 0,12 µmol/m^2/sn, 7. gün 0,16 µmol/m^2/sn, 9. gün 0,02 µmol/m^2/sn ve 10. gün 0,01, µmol/m^2/sn olarak gerçekleşmiştir. Kontrol uygulamasıyla mukayese edildiğinde, kurak koşullar altında kuraklık uygulmasının 5. gününde Desiree'nin stoma iletkenliğinde önemli bir azalma gözlenmiş

ve bu azalma 9. gününde %88,8'e ulaşmıştır. Kuraklık uygulamasının 10. gününde ise Desiree'nin stoma iletkenliğinde kontrole göre %84,3 azalma belirlenmiştir. Kontrol uygulamasıyla mukayese edildiğinde, kurak koşullar altında Russet Burbank'ın stoma iletkenliğinde 3. gün bir azalma meydana gelmiş ve stoma iletkenliğinde giderek daha fazla azalma olmuş, 9. günde ise %83,4 oranında düşüş gözlemlenmiştir. Kuraklık uygulamasının 10. gününde ise Russet Burbank'ın stoma iletkenliğinde kontrole göre %84,4 azalma belirlenmiştir.



Şekil 4.5. Kontrol ve kurak koşullarda Desiree çeşidinin stoma iletkenliği



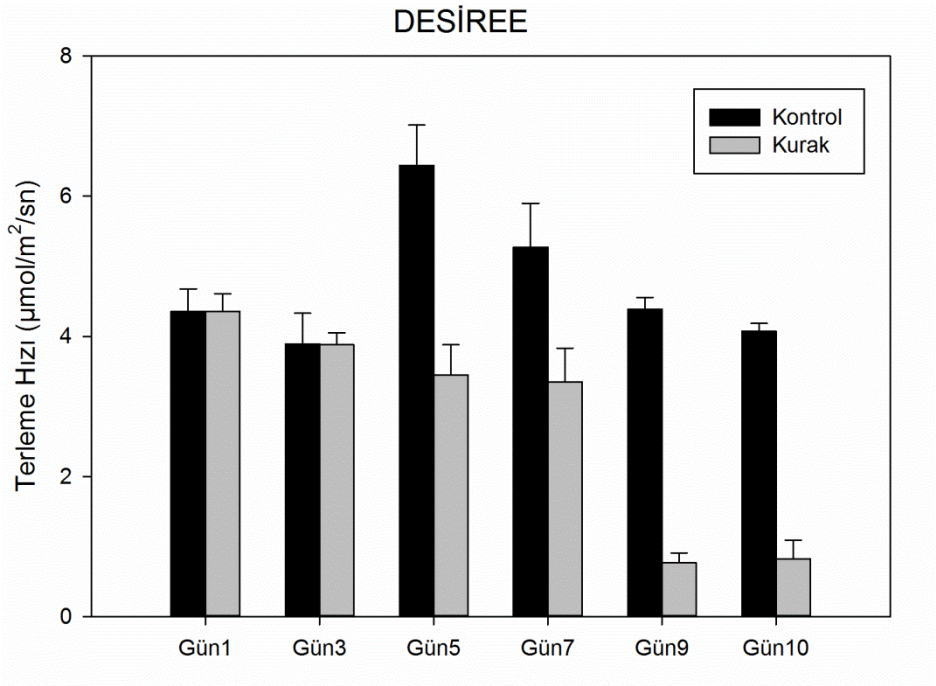
Şekil 4.6. Kontrol ve kurak koşullarda Russet Burbank çeşidinin stoma iletkenliği

Desiree çeşidinde (Şekil 4.6.), kurak koşullarda stoma iletkenliğinde ilk önemli azalma 5. günde gözlemlenmiş ve kontrole göre kurak koşullarda kurak uygulamasının 10. gününe kadar Desiree'nin stoma iletkenliği çarpıcı düzeyde düşük olmuştur. Kurak koşullarda Russet Burbank çeşidinin stoma iletkenliğindeki ilk önemli azalma kuraklık uygulamasının 3. gününde meydana gelmiş (Şekil 4.6.) ve kuraklık uygulamasının 10. gününe kadar kontrole göre hep düşük kalmıştır. Stoma iletkenliğindeki bu sonuçlar, fotosentez hızı ile paralellik göstermiştir. Kuraklığın süresinin ve şiddetinin artmasına bağlı olarak, 9. ve 10. her iki çeşidin günlerde stoma iletkenliğinde ciddi bir düşüş görülmektedir. Kuraklık stresinde stoma iletkenliğindeki genel düşüş, kuraklığın etkisiyle su kaybını azaltmak için bitkilerin stomalarını kapatma eğilimine girmelerinden kaynaklanmaktadır. Kurak koşullarda, bitkilerin stoma kapatma eğilimlerine, yapraklarda meydana gelen düşük su potansiyeli neden olmakta ve buna bağlı olarak, turgor basıncı düşmektedir. Bu durumda, hücrede absisik asit birikimi gerçekleşmekte ve buna bağlı olarak stomalar kapanmaktadır. Bu durum, aynı zamanda fotosentez hızının azalmasına neden olmaktadır.

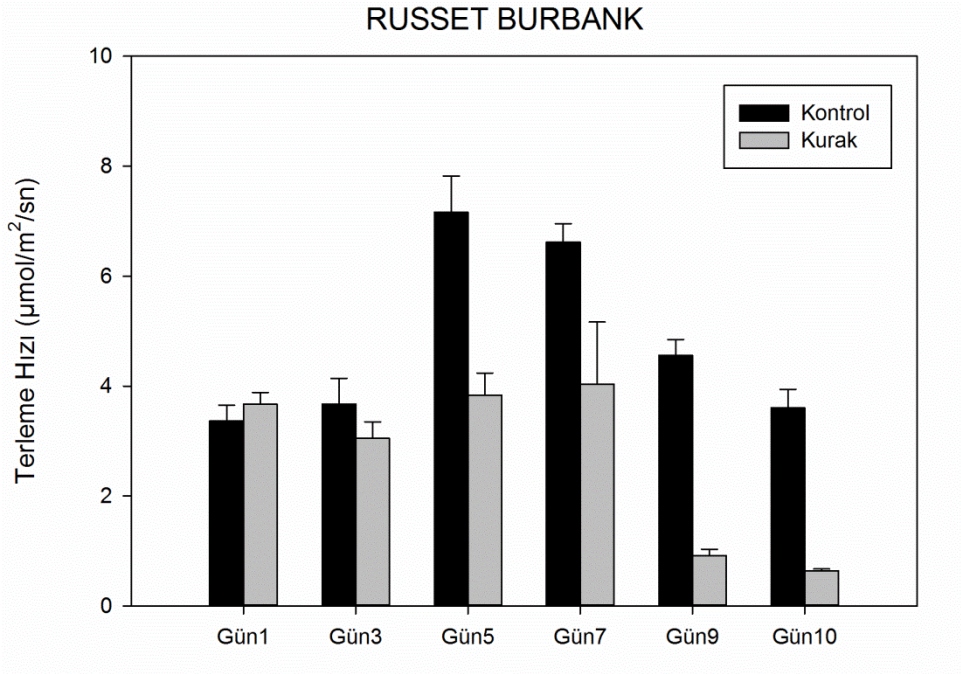
4.1.3 Terleme hızı

Kontrol ve stres uygulamalarında, çıkıştan 45 gün sonra, 10 gün süreyle, üsten ikinci veya üçüncü yapraklarının tepe yaprakçıklarında yapılan Desiree ve Russet Burbank çeşitlerinde terleme hızı ölçümleri değerleri grafiği Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verilmektedir. Kontrol koşullarında Desiree'nin ortalama terleme hızı 1. gün 4,35 µmol/m^2/sn, 3. gün 3,89 µmol/m^2/sn, 5. gün 6,44 µmol/m^2/sn, 7. gün 5,27 µmol/m^2/sn, 9. gün 4,39 µmol/m^2/sn ve 10. gün 4,07 µmol/m^2/sn olarak gerçekleşmiştir. Desire'nin kurak koşullardaki ortalama terleme hızı ise 1. gün 4,36 µmol/m^2/sn, 3. gün 3,88 µmol/m^2/sn, 5. gün 3,45 µmol/m^2/sn, 7. gün 3,35 µmol/m^2/sn, 9. gün 0,77 µmol/m^2/sn ve 10. gün 0,82 µmol/m^2/sn olmuştur. Kontrol koşullarında Russet Burbank'ın ortalama terleme hızı 1. gün 3,36, µmol/m^2/sn, 3. gün 3,67 µmol/m^2/sn, 5. gün 5,16 µmol/m^2/sn, 7. gün 6,62 µmol/m^2/sn, 9. gün 4,56 µmol/m^2/sn ve 10. gün 3,61 µmol/m^2/sn olarak gerçekleşmiştir. Kurak koşullarda Russet Burbank ortalama terleme hızı, 1. gün 3,67 µmol/m^2/sn, 3. gün 3,05 µmol/m^2/sn, 5. gün 3,84 µmol/m^2/sn, 7. gün 4,04 µmol/m^2/sn, 9. gün 0,92 µmol/m^2/sn ve 10. gün 0,64 µmol/m^2/sn olarak gerçekleşmiştir. Desiree çeşidinde (Şekil 4.7.), 5. günden itibaren terleme hızı düşmektedir, kuraklığın şiddeditin arttığı 9. ve 10 günlere bakıldığında terleme hızı değerlerinde ciddi düşüşler

görülmektedir. Kontrol uygulamasıyla mukayese edildiğinde, kurak koşullar altında Desiree'nin ortalama terleme hızı kuraklık uygulamasının 9. gününde çarpıcı bir düşüş göstererek %82,4 oranında azalmıştır. Kuraklık uygulamasının 10. gününde ise Desiree'nin terleme hızı kontrole göre %79,8 azalma belirlenmiştir. Russet Burbank çeşidinde (Şekil 4.8.), kontrol ve kurak koşulları karşılaştırıldığında, 3. günden itibaren, terleme hızında düşüş olduğu, 9. ve 10 günlerde kuraklık koşullarında, kuraklığın şiddetinin artmasına bağlı olarak terleme hızında ciddi oranlarda azalma görülmektedir. Kontrol uygulamasıyla mukayese edildiğinde, kurak koşullar altında Russet Burbank'ın stoma iletkenliği kuraklık uygulamasının 9. gününde %79,9 oranında azalmıştır. Kuraklık uygulamasının 10. gününde ise Russet Burbank'ın stoma iletkenliği kontrole göre çarpıcı bir düşüş göstererek %82,3 azalma belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Kontrol ve kurak koşullarda Desiree çeşidinin terleme hızı



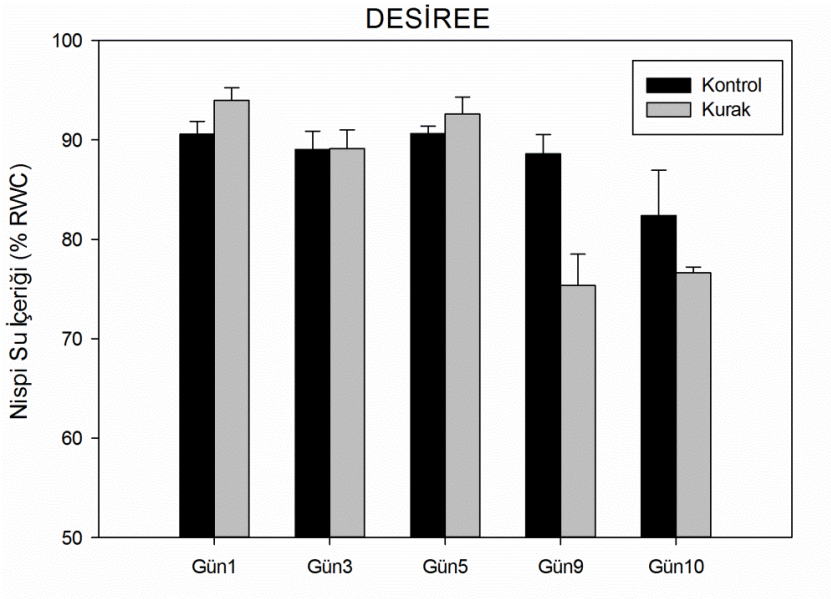
Şekil 4.8. Kontrol ve kurak koşullarda Russet Burbank çeşidinin terleme hızı

Kuraklık koşullarında bitkilerdeki terleme hızındaki azalmaya, bitkilerin stoma kapatma eğilimleri neden olmaktadır. Kuraklık stresi nedeniyle yapraklarda meydana gelen düşük su potansiyelinden dolayı bitkiler stomalarını kapatmakta ve buna bağlı olarak, turgor basıncı düşmektedir. Bu durum, hücrede absisik asit birikimini tetiklemekte ve stomaların kapanmasına yardımcı olmaktadır. Bitkinin kuraklık stresinden en az etkilenmek için gerçekleştirdiği stomalarını kapatma eğilimi, terleme hızının azalmasına neden olmaktadır.

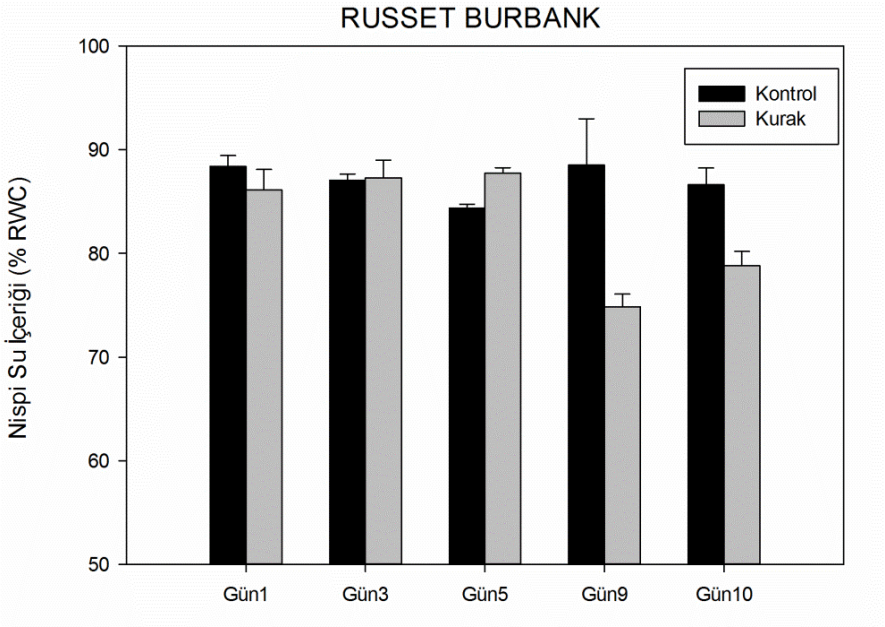
4.1.4 Nispi su içeriği

Kontrol ve stres uygulamalarında nispi su içeriği çıkıştan 45 gün sonra, 10 günlük süre içerisinde, 1., 3., 5., 9., ve 10., günlerde üsten ikinci veya üçüncü yapraklarının tepe yaprakçıklarında yapılan nispi su içeriği (RWC) ölçüm grafikleri Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmektedir. Kontrol koşullarında Desiree'nin ortalama nispi su içeriği 1. gün %90,56, 3. gün %89,0, 5. gün %90,6, 9. gün %88,5 ve 10. gün 82,3 olarak gerçekleşmiştir. Desire'nin kurak koşullardaki ortalama nispi su içeriği ise 1. gün %93,9, 3. gün %89,1, 5. gün %92,5, 9. gün %75,3 ve 10. gün %76,6 olmuştur. Kontrol koşullarında Russet Burbank'ın ortalama nispi su içeriği 1. gün %88,4, 3. gün %87,0, 5. gün %84,3, 9. gün %88,5 ve 10. gün %86,6 olarak gerçekleşmiştir. Kurak koşullarda

Russet Burbank ortalama nispi su içeriği 1. gün %86,1, 3. gün %87,2, 5. gün %87,7, 9. gün %74,8 ve 10. gün %78,8 olarak gerçekleşmiştir. Kontrol uygulamasıyla mukayese edildiğinde, kurak koşullar altında Desire'nin nispi su içeriği kuraklık uygulamasının 9. gününde %14,9 oranında azalma gözlenmiştir. Kuraklık uygulamasının 10. gününde ise Desiree'nin nispi su içeriği kontrole göre %6,9 oranında azalma belirlenmiştir. Kontrol uygulamasıyla mukayese edildiğinde, kurak koşullar altında Russet Burbank'ın nispi su içeriği kuraklık uygulamasının 9. gününde %15,4 oranında azalmıştır. Kuraklık uygulamasının 10. gününde ise Russet Burbank'ın nispi su içeriği kontrole göre %9,0 oranında azalma belirlenmiştir.



Şekil 4.9. Kontrol ve kurak koşullarda Desiree çeşidinin nispi su içeriği (RWC)



Şekil 4.10. Kontrol ve kurak koşullarda Russet Burbank çeşidinin nispi su içeriği (RWC)

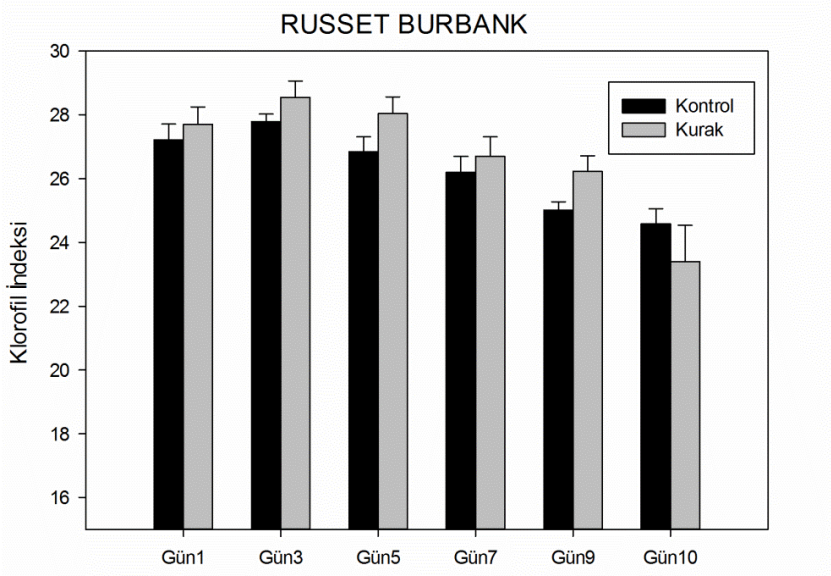
Kuraklık stresi koşullarında, hem Desiree çeşidinde (Şekil 4.9.) hem de Russet Burbank çeşidinde (Şekil 4.10.), nispi su içeriğinin 9. ve 10. günlerde düştüğü görülmektedir. Bitkilerin kuraklık stresine girdiğinin belirlenmesinde ve bitkide su stresinin algılanmasında, bitki su miktarının düşmesi ve buna bağlı olarak, yaprak oransal su içeriğinde düşme saptanması büyük öneme sahiptir. Kuraklık etkisi ile bitkilerde yaprak su miktarının düşmesine bağlı olarak, yaprakların nispi su içeriği azalmaktadır.

4.1.5 Klorofil indeksi

Kontrol ve stres uygulamalarında çıkıştan 45 gün sonra, 10 gün süreyle yapılan yaprak klorofil indeksi ölçüm grafikleri Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de verilmektedir. Kontrol koşullarında Desiree'nin ortalama klorofil indeksi 1. gün 30,74, 3. gün 31,58, 5. gün 29,98, 7.gün 29,38, 9. gün 27,28 ve 10. gün 27,05 olarak gerçekleşmiştir. Desire'nin kurak koşullardaki ortalama klorofil indeksi ise 1. gün 30,59, 3. gün 31,32, 5. gün 29,77, 7.gün 27,79, 9. gün 25,21 ve 10. gün 22,75 olmuştur. Kontrol koşullarında Russet Burbank ortalama klorofil indeksi 1. gün 27,22, 3. gün 27,79, 5. gün 26,84, 7.gün 26,21, 9. gün 25,01 ve 10. gün 24,58 olarak gerçekleşmiştir. Kurak koşullarda Russet Burbank ortalama klorofil indeksi 1. gün 27,70, 3. gün 28,55, 5. gün 28,04, 7.gün 26,70, 9. gün 26,23 ve 10. gün 23,40 olarak gerçekleşmiştir. Kontrol uygulamasıyla mukayese edildiğinde, kurak koşullar altında Desiree'nin klorofil indeksi kuraklık uygulamasında

9. gününde %7,5 oranında azalmıştır. Kuraklık uygulamasının 10. gününde ise Desiree'nin klorofil indeksinde kontrole göre %15,8 oranında azalma belirlenmiştir. Kontrol uygulamasıyla mukayese edildiğinde, kurak koşullar altında Russet Burbank'ın klorofil indeksi kuraklık uygulamasının 9. gününde %4,8 oranında artmıştır. Kuraklık uygulamasının 10. gününde ise Russet Burbank'ın klorofil indeksinde kontrole göre %4,7 oranında azalma belirlenmiştir.

Şekil 4.11. Kontrol ve kurak koşullarda Desiree çeşidinin klorofil indeksi



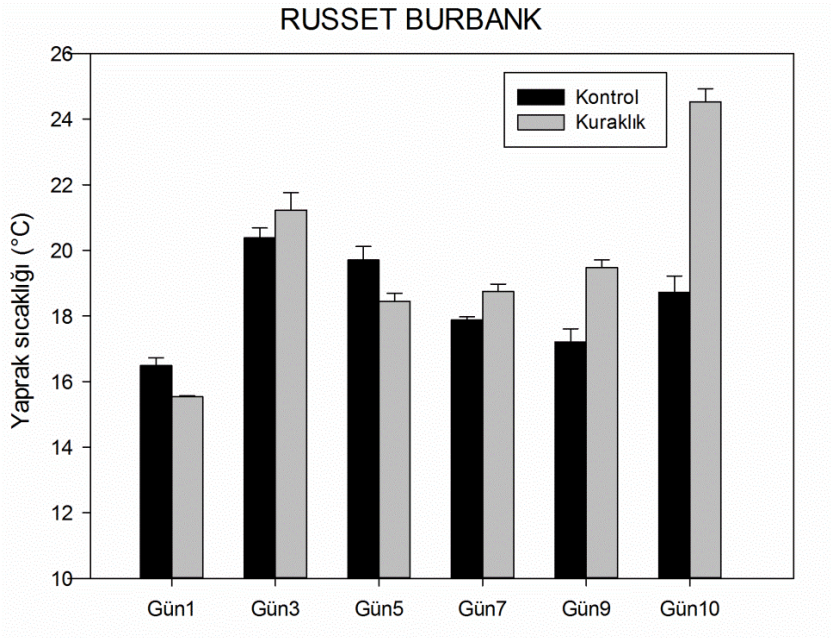
Şekil 4.12. Kontrol ve kurak koşullarda Russet Burbank çeşidinin klorofil indeksi

Kuraklık stresi koşullarında, Desiree çeşidinde (Şekil 4.11.) klorofil indeksi değerindeki ilk önemli azalma kuraklık uygulamasının 7. gününde meydana gelmiş ve kuraklık uygulamasının 9. ve 10. günlerinde de Desiree'nin klorofil miktarı kontrole göre daha düşük olmuştur. Kurak koşullardaki Russet Burbank çeşidi (Şekil 4.12.) incelendiğinde, kuraklık uygulamasının 9. gününe kadar klorofil miktarında bir azalma gözlenmemiş, aksine Russet Burbank'in klorofil miktarının kurak koşullarda kontrole göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak, kurak koşullarda kuraklık uygulamasının 10. gününde, Russet Burbank çeşidinin klorofil miktarında kontrole göre bir düşüş meydana gelmiştir. Klorofil miktarındaki azalmalara, kuraklık koşullarında artan reaktif oksijen bileşiklerinin neden olduğu; zarda lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, enzim inhibisyonu, klorofil parçalanması gibi zararlanmalar neden olarak gösterilebilir. Kuraklık koşullarında, kloroplastların yapısal ve fonksiyonel olarak zarar görmelerine bağlı olarak, klorofil birikiminde azalmalar görülmekte ve bu durumdan klorofil biyosentezi olumsuz etkilenmektedir.

4.1.6 Bitki sıcaklığı

Kontrol ve stres uygulamalarında çıkıştan 45 gün sonra, 10 gün süreyle yapılan bitki sıcaklığı ölçüm grafikleri Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'de verilmektedir. Kontrol koşullarında Desiree'nin ortalama bitki sıcaklığı 1. gün 15,7 ºC, 3. gün 20,7 ºC, 5. gün 20,0 ºC, 7.gün 16,8 ºC, 9. gün 16,6 ºC ve 10. gün 19,1 ºC olarak gerçekleşmiştir. Desire'nin kurak koşullardaki ortalama bitki sıcaklığı ise 1. gün 16,9 ºC, 3. gün 20,5 ºC, 5. gün 20,9 ºC, 7.gün 19,7 ºC, 9. gün 19,4 ºC ve 10. gün 20,0 ºC olmuştur. Kontrol koşullarında Russet Burbank ortalama bitki sıcaklığı 1. gün 16,5 ºC, 3. Gün 20,4 ºC, 5. gün 19,7 ºC, 7.gün 17,9 ºC, 9. gün 17,2 ºC ve 10. gün 18,7 ºC olarak gerçekleşmiştir. Kurak koşullarda Russet Burbank ortalama bitki sıcaklığı 1. gün 15,5 ºC, 3. gün 21,2 ºC, 5. gün 18,4 ºC, 7.gün 18,8 ºC, 9. gün 19,5 ºC ve 10. gün 24,5 ºC olarak gerçekleşmiştir. Kontrol uygulamasıyla mukayese edildiğinde, kurak koşullar altında Desire'nin bitki sıcaklığında kuraklık uygulamasının 9. gününde %16,5 oranında artma gözlenmiştir. Kuraklık uygulamasının 10. gününde ise Desiree'nin bitki sıcaklığında kontrole göre %4,6 oranında artma belirlenmiştir. Kontrol uygulamasıyla mukayese edildiğinde, kurak koşullar altında Russet Burbank'ın bitki sıcaklığında kuraklık uygulamasının 9. gününde %13,1 oranında artmıştır. Kuraklık uygulamasının 10. gününde ise Russet Burbank'ın bitki sıcaklığında kontrole göre %30,9 oranında artma belirlenmiştir.

Şekil 4.13. Kontrol ve kurak koşullarda Desiree çeşidinin bitki sıcaklığı



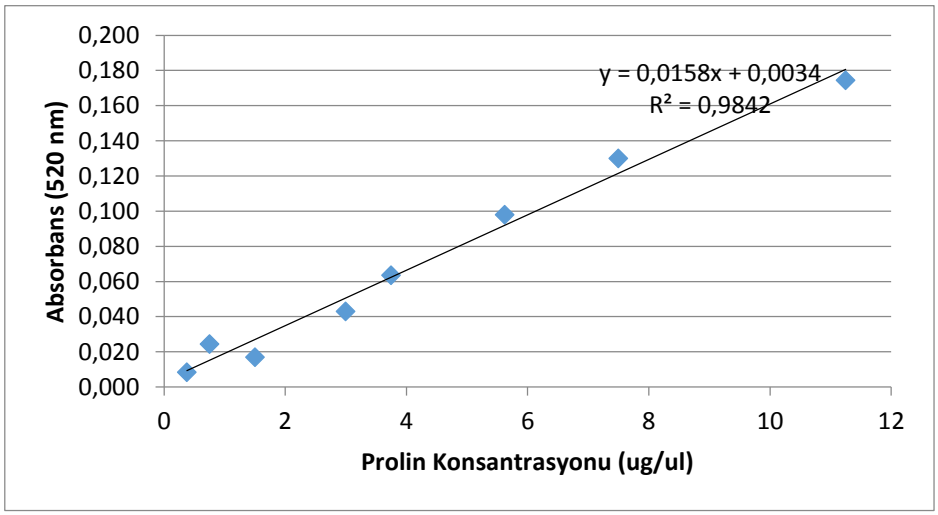
Şekil 4.14. Kontrol ve kurak koşullarda Russet Burbank çeşidinin bitki sıcaklığı

Kuraklık stresi koşullarında, hem Desiree çeşidinde (Şekil 4.13.), hem de Russet Burbank çeşidinde (Şekil 4.14.) kuraklık uygulamasının 7., 9. ve 10. günlerde yaprak sıcaklığında artış görülmektedir. Her iki çeşittte, kuraklık stresinin en etkin görüldüğü, 7., 9., ve 10 günlerdeki yaprak sıcaklığı artışına ve yaprak su içeriğinin azalmasına, stoma iletkenliği ve terlemede ciddi azalmaların meydana gelmesi sebep olmuş olabilir. Kurak koşullar

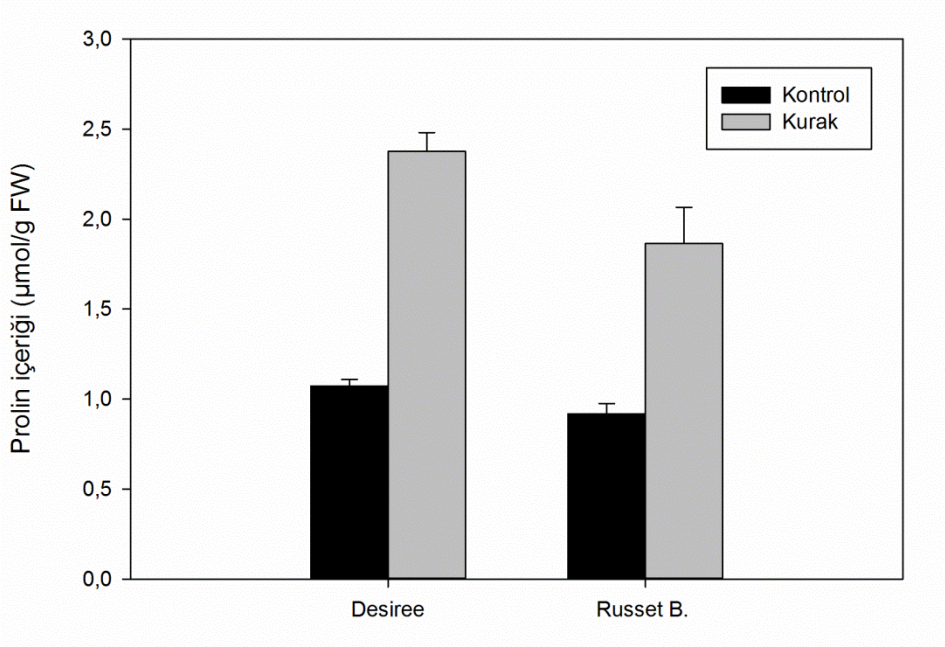
altında, yapraklardaki su oranının düşmesi ve stoma kapanması etkisiyle, yaprak sıcaklığı artmaktadır. Özellikle, kuraklık uygulamasının son günü olan 10. güne bakıldığında, Russet Burbank çeşidinde Desiree çeşidine kıyasla, yaprak sıcaklığının daha fazla arttığı görülmektedir. Her iki çeşitte kurak koşullarda bitki sıcaklığının artmasına bağlı olarak, membran sistemlerinde zararlanmaların meydana gelmiş olacağı tahmin edilmektedir. Tez kapsamında, patates çeşitlerinin kurak koşullardaki membran zaralanma durumları, yapraklardaki malondialdehit miktarının ölçülmesiyle incelenmiştir.

4.1.7 Prolin içeriği

Kontrol ve stres uygulamalarında çıkıştan 45 gün sonra, 10 gün süreyle yapılan kuraklık uygulamasında, 10. gününde kuraklık uygulamasının ve kontrol bitkilerinin yaprakçıklarından yapılan prolin miktar tayini sonuçları Şekil 4.16' da verilmektedir. Prolin konsantrasyonu hesaplanmasında kullanılan, standart eğri grafiği Şekil 4.15'de verilmiştir. Desiree'nin ortalama prolin içeriği kontrol koşullarda 1,07 µmol/g FW, kurak koşullarda ise 2,38 µmol/g FW olarak hesaplanmıştır. Russet Burbank'ın ortalama prolin içeriği kontrol koşullarda 0,92 µmol/g FW, kurak koşullarda ise 1,86 µmol/g FW olarak hesaplanmıştır. Kontrol uygulamasıyla mukayese edildiğinde, kurak koşullar altında Desiree'nin prolin içeriği %121,7, Russet Burbank'ın prolin içeriği ise %103 oranında artmıştır.



Şekil 4.15. Prolin standard eğrisi



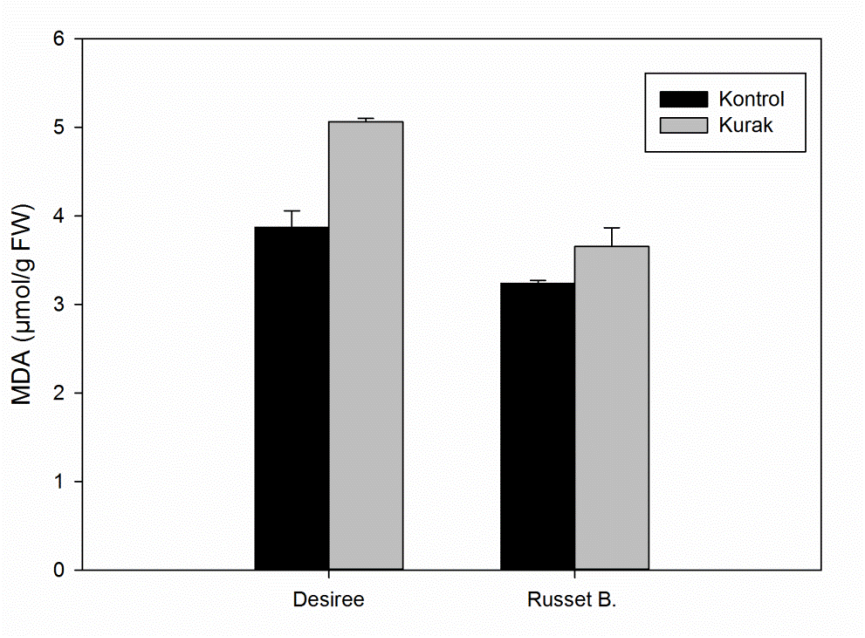
Şekil 4.16. Kontrol ve kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank çeşidinin prolin miktarı

Kuraklık stresi koşullarında, Desiree ve Russet Burbank çeşitlerinde (Şekil 4.16.), prolin miktarının arttığı görülmektedir. Her iki çeşit kendi içinde karşılaştırıldığında, Desiree çeşidinde Russet Burbank'a göre daha fazla prolin birikimi olduğu görülmektedir. Bilindiği gibi bitkiler kuraklık stresinde, su dengesinin korunması için prolin gibi çözünür maddeleri biriktirerek, dolaylı yollardan bitkinin kuraklık stresine dayanıklılığını sağlarlar. Prolin birikimi ile yaprak su potansiyeli dengelenir ve bu durum sayesinde, bitki stoma iletkenliğini ve fotosentez etkinliğini korumaya çalışır. Prolin birikimi sayesinde, lipid oksidasyonu engellenir ve protein yapılarının korunması sağlanır (Öztürk, 2015).

4.1.8 Malondialdehit (MDA) ölçümü

Kontrol ve stres uygulamalarında çıkıştan 45 gün sonra, 10 gün süreyle yapılan kuraklık uygulamasında, 10. gününde kuraklık uygulaması ve kontrol bitkilerinden hasat edilen yaprakçıklardan yapılan malondialdehit ölçümü sonuçları Şekil 4.17'de verilmektedir. Kontrol koşullarında Desiree'nin ortalama malondialdehit içeriği 3,87 µmol/g FW, kurak koşullarındaki Desiree'nin ortalama malondialdehit içeriği ise 5,06 µmol/g FW olarak hesaplanmıştır. Kontrol koşullarında Russet Burbank'ın ortalama malondialdehit içeriği 3,23 µmol/g FW, kurak koşullarındaki Russet Burbank'ın ortalama malondialdehit içeriği ise 3,65 µmol/g FW olarak hesaplanmıştır. Kontrol uygulamasıyla mukayese edildiğinde,

kurak koşullar altında Desire'nin malondialdehit içeriği %30,8 oranında artmıştır. Kontrol uygulamasıyla mukayese edildiğinde, kurak koşullar altında Russet Burbank'ın malondialdehit içeriği %12,9 oranında artmıştır.



Şekil 4.17. Kontrol ve kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank çeşidinin malondialdehit (MDA) miktarı

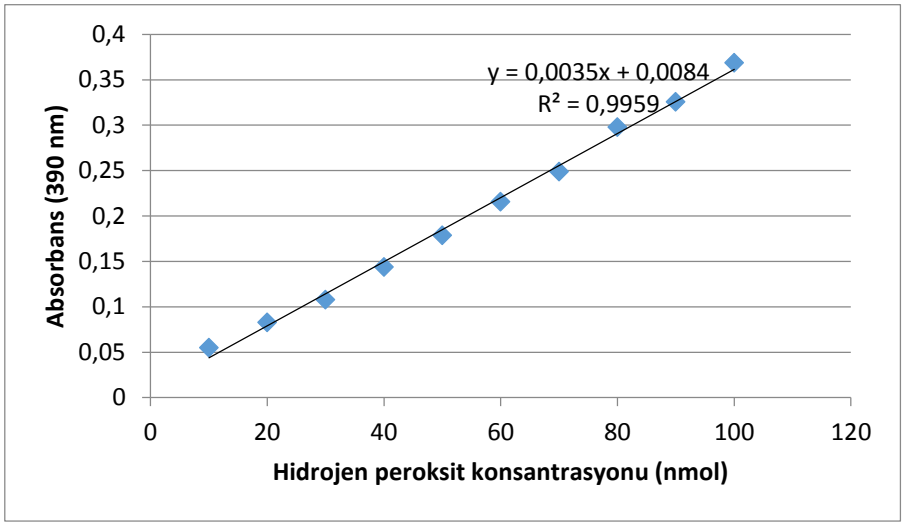
Desiree ve Russet Burbank çeşidinin (Şekil 4.17.), kuraklık koşullarında malondialdehit miktarının artığı görülmektedir. Bu artışa sebep olarak, kuraklığın etkisiyle artan reaktif oksijen türlerinin neden olduğu lipid peroksidasyonu neden olmaktadır. Hem hücre hem de organel membranlarında ROS seviyeleri eşik değere ulaştığında meydana gelen lipid peroksidasyonun, bitki büyüme ve gelişmesi için zararlı olduğu düşünülmektedir. Bu süreçte, strese maruz kalan bitki hücrelerinde serbest radikallerin artması nedeniyle, membran yapısında bulunan doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılır. Bu durumda yağ asidi zinciri bir lipid radikali özelliğine sahip olur. Lipid radikali niteliğine sahip olan yağ asidi, oksijen ile reaksiyona girer ve lipid peroksil radikalini meydana getirir. Oluşan lipid peroksil radikali diğer lipidlerle zincir reaksiyonuna girer ve lipid hidroperoksitlerin oluşmasına neden olur. Lipid peroksidasyonun en önemli ürünlerinden olan malondialdehit (MDA), hücre membranlarından iyon alışverişini etkiler. Hücre membranlarından iyon alışverişini etkileyen malondialdehit, membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına neden olur ve bu durum iyon geçirgenliği ve enzim aktivitesi gibi membran olaylarında zararlanmalara

neden olur (Akkuş, 1995). Bu zararlanma sonucunda, membran bütünlüğü bozulmakta ve bu nedenle hücrenin elektrolitlere olan geçirgenliğinin artmaktadır. Hücrenin elektrolitlere olan geçirgenliğinin artmasıyla, hücrenin içine Ca^{+2} ve Na^{+} iyonlarının geçişi olmaktadır. Bu durumun hücrenin enerji oluşturan mekanizmalarını olumsuz etkilediği düşünülmektedir. Ca^{+2} iyonların hücre içine geçmesiyle, proteaz ve fosfolipaz enzimleri aktive olmaktadır. Proteaz ve fosfolipaz enzimlerinin etkinliğinin artması, protein ve lipid yapılarının zarar görmesine neden olmakta ve hücre zarı hasara uğramaktadır. Bu sürecin bir ürünü olan malondialdehit (MDA) adı verilen bu maddenin miktar tayini ile lipid peroksidasyonu derecesi ölçülebilmektedir. Malondialdehit (MDA), hücre zarı hasara uğradığında açığa çıktığından; yüksek miktarda bulunması durumunda hücre zarının tahrip olduğu, düşük miktarda ölçülmesi durumunda ise hücre zarı yapısının bozulmadığını veya az seviyede etkilendiği düşünülmektedir. Yapılan çalışmamızda, kuraklık stresi altında olan Desiree ve Russet Burbank çeşitlerinde kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında, malondialdehit miktarlarının daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca, Desiree çeşidindeki malondialdehit miktarının, Russet Burbank çeşidindeki malondialdehit miktarından daha fazla olması, Desiree çeşidinin kuraklık stresinden daha çok etkilendiğini ve bu çeşitteki hücre zarının daha çok tahrip olduğu, protein ve lipid yapılarının daha çok zarar gördüğü ve bu durumların membran bütünlüğünün bozulmasına neden olduğu düşünülmektedir.

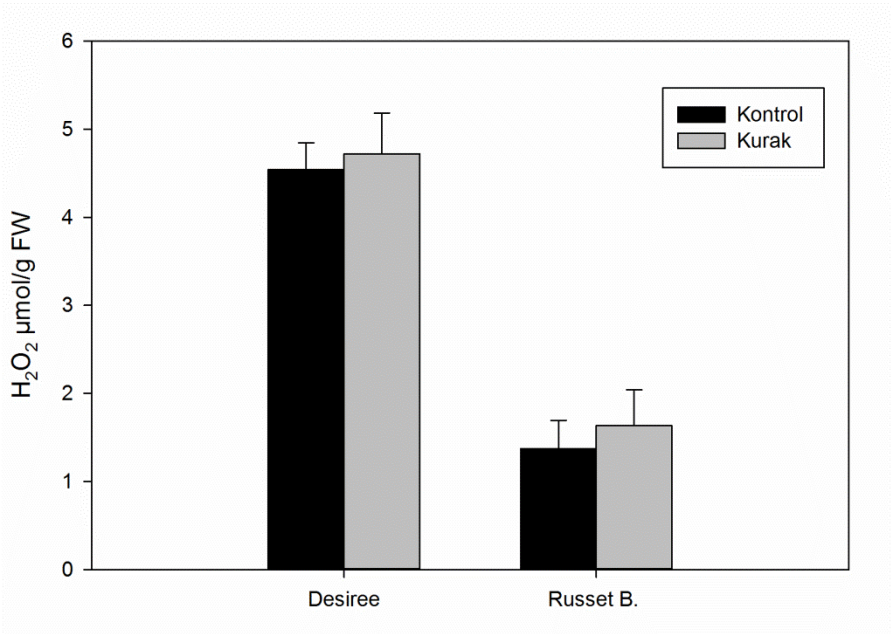
4.1.9 Yaprakta hidrojen peroksit miktarı tayini

Kontrol ve stres uygulamalarında çıkıştan 45 gün sonra, 10 gün süreyle yapılan kuraklık uygulamasında, 10. gününde kuraklık uygulaması ve kontrol bitkilerinden hasat edilen yaprakçıklardan yapılan hidrojen peroksit miktar tayini sonuçları Şekil 4.19'da verilmektedir. Hidrojen peroksit miktarı hesaplanmasında kullanılan, standart eğri grafiği Şekil 4.18'de verilmiştir. Kontrol koşullarında Desiree'nin ortalama hidrojen peroksit içeriği 4,54 µmol/g FW, kurak koşullarındaki Desiree'nin ortalama hidrojen peroksit içeriği ise 4,72 µmol/g FW olarak hesaplanmıştır. Kontrol koşullarında Russet Burbank'ın ortalama hidrojen peroksit içeriği 1,37 µmol/g FW, kurak koşullarındaki Russet Burbank'ın ortalama hidrojen peroksit içeriği ise 1,63 µmol/g FW olarak hesaplanmıştır. Kontrol uygulamasıyla mukayese edildiğinde, kurak koşullar altında Desire'nin hidrojen peroksit içeriği %3,9 oranında artmıştır. Kontrol uygulamasıyla

mukayese edildiğinde, kurak koşullar altında Russet Burbank'ın hidrojen peroksit içeriği %18,8 oranında artmıştır.



Şekil 4.18. Standartlara göre çizilen hidrojen peroksit miktarı grafiği



Şekil 4. 19. Kontrol ve kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank çeşidinin hidrojen peroksit miktarı

Desiree ve Russet Burbank çeşidinin (Şekil 4.19.) kuraklığa maruz bırakılması sonrası, kuraklık koşullarında hidrojen peroksit miktarının düşük seviyede arttığı görülmektedir. Desiree'de meydana gelen düşük seviyedeki H_2O_2 artışı oransal olarak Russet Burbank'tan daha az gerçekleşmiştir.

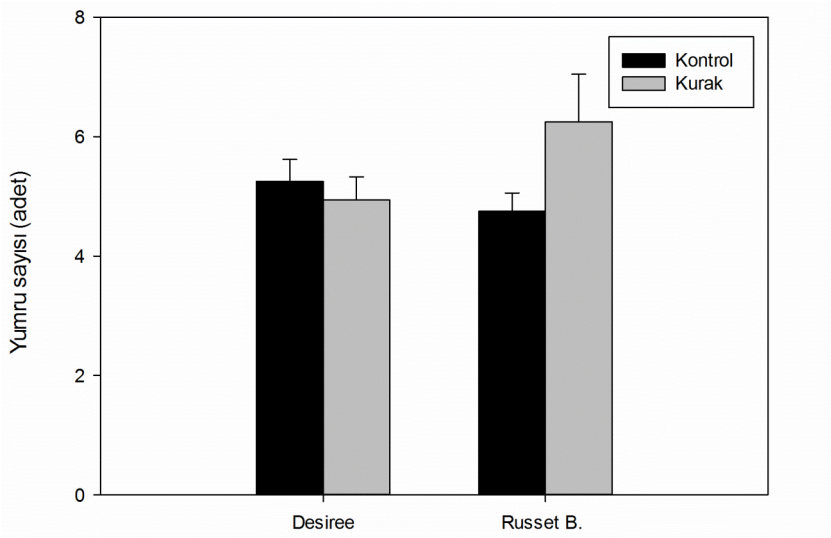
Kuraklık koşuları altında meydana gelen serbest oksijen radikalleri artmasına bağlı olarak, fotosentetik karbon metabolizması ve elektron taşınım aktivitesinde azalma meydana geldiği bilinmektedir. Bitkiler su yetersizliği durumlarında, su kaybını azaltarak canlılığını sürdürebilmek için stomalarını kapatmakta ve bu nedenle fotosentezin temel maddelerinden biri olan karbondioksitin girişi engellenmektedir. Bu durumda, CO_2 fiksasyonu azalmakta ve biyosentetik reaksiyonlar gerilemektedir. Yetersiz su koşullarında, biyosentetik reaksiyonların gerilemesi ve ATP'ye olan gereksinimin azalması, mitokondri ve kloroplastlardaki elektron taşıma sisteminde elektron fazlalığına neden olmaktadır. Bitki biyosentezi için yeterli CO_2 olmadığından, fotosentez için absorbe edilen ışık enerjisi ve açığa çıkan elektronlar, CO_2 indirgenmesinde kullanılamamaktadır. Açığa çıkan fazlalık elektronlar, moleküler O_2'in aktivasyonunda kullanılmak üzere kloroplastlarda biriktirilmektedir. fotosentetik kaynaklı elektronlar ve enerjinin, CO_2 yerine moleküler O_2'e aktarılması nedeniyle, bitki için toksik olan oksijen radikalleri ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi türevleri açığa çıkmaktadır. Sentezlenen serbest radikaller ve türevleri, protein membran lipitleri ve nükleik asitler gibi hücre bileşenlerine zarar vermektedir.

Desiree ve Russet Burbank çeşidinin kuraklığa maruz bırakılması sonrası kontrol ve kuraklık arasındaki hidrojen peroksit miktarına bakıldığında, kurak koşullarda hidrojen peroksit miktarının düşük seviyede arttığı görülmektedir. Bunun yanında, tez kapsamında yapılan diğer çalışmalar sonucunda, kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank çeşitlerinde prolin seviyesinin, prolin sentezinde rol alan P5CS geninin, antioksidan enzim sisteminde rol alan SOD enzimlerini kodlayan Cu/Zn SOD ve Fe SOD genlerinin ifadelerinin önemli düzeyde arttığı gözlenmiştir. Bitkilerde artan prolin miktarının ve bunun yanında artan antioksidan enzim aktivitelerinin süperoksit radikallerinin birikimini engellediği bilinmektedir. Bu nedenle, kurak koşullarda denemedeki patates bitkilerinde önemsiz seviyede H_2O_2 artışı olması, Desiree ve Russet Burbank çeşitlerindeki antioksidan sistem mekanizmasına bağlanabilir.

4.1.10 Verim ile ilgili sonuçlar

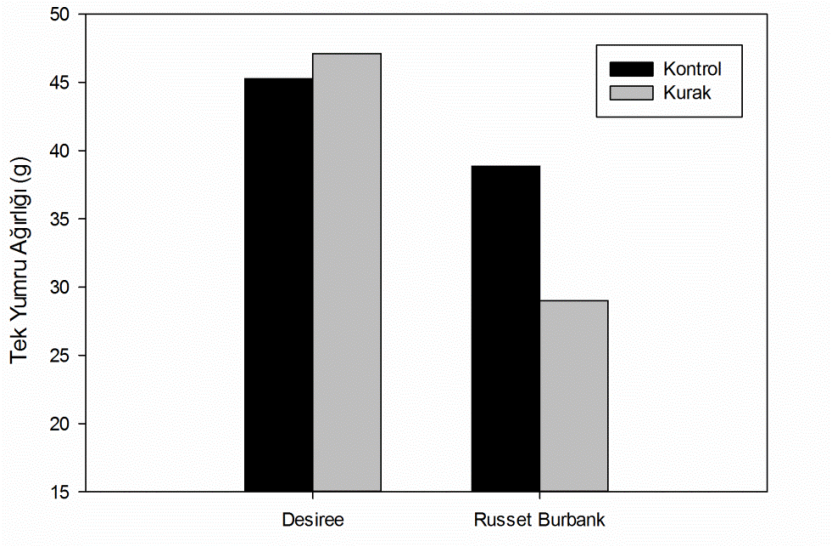
Kontrol ve stres uygulamalarında 4 tekerrürlü olarak yetiştirilen Desiree ve Russet Burbank çeşitleri çıkıştan 85 gün sonra hasat edilmiştir. Bitki başına yumru sayısı sonuçları Şekil 4.20.'de sunulmuştur. Şekil 4.20.'de görüldüğü gibi Desiree çeşidinde

kurak koşullarda yumru sayısı hafif bir azalma gösterirken, Russet Burbank çeşidinde artmıştır. Kontrol koşullarında Desiree'nin ortalama yumru sayısı 5,25 adet iken, kurak koşullarda ortalama yumru sayısı 4,93 adet olmuştur. Kontrol koşullarında Russet Burbank'ın ortalama yumru sayısı 4,75 adet gerçekleşirken, kurak koşullarda ortalama yumru sayısı 6,25 olmuştur. Kontrol uygulamasıyla mukayese edildiğinde, kurak koşullar altında Desire'nin ortalama yumru sayısı %5,9 oranında azalırken, Russet Burbank'ın ortalama yumru sayısı %31,5 oranında artmıştır.



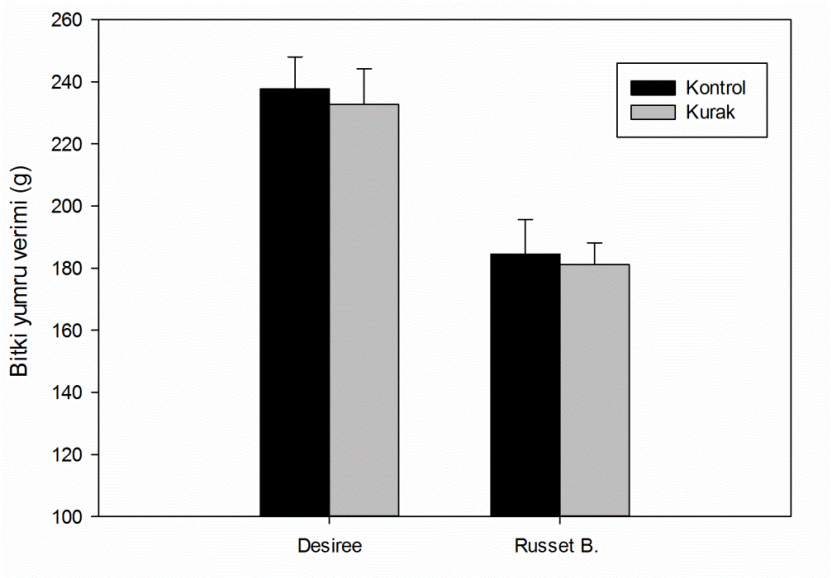
Şekil 4.20. Kontrol ve kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank çeşidinin yumru sayısı

Bitki başına yumru ağırlığının, toplam yumru sayısına bölünmesiyle elde edilen tek yumru ağırlığı sonuçları Şekil 4.21.'de verilmektedir. Şekil 4.21.'de görüldüğü gibi kurak koşullarda tek yumru ağırlığı Desiree çeşidinde hafif bir artış gösterirken, Russet Burbank çeşidinde dikkate değer oranda azalmıştır. Kontrol koşullarında Desiree'nin tek yumru ağırlığı 45,27 g olurken, kurak koşullarda hafif bir artışla 47,11 g olmuştur. Kontrol koşullarında Russet Burbank'ta 38,8 g olan tek yumru ağırlığı, kurak koşullarda azalarak 28,9 g'a düşmüştür. Kontrol uygulamasıyla mukayese edildiğinde, kurak koşullar altında Desire'nin tek yumru ağırlığı %4 oranında artarken, Russet Burbank'ın tek yumru ağırlığı %25,3 oranında azalmıştır.



Şekil 4.21. Kontrol ve kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank çeşidinin tek yumru ağırlığı

Bitki başına yumru verimi sonuçlar Şekil 4.22.'de verilmektedir. Şekil 4.22.'de görüldüğü gibi, kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank çeşitlerinin bitki yumru verimlerinde hafif bir azalma meydana gelmiştir. Kontrol koşullarında Desiree'nin bitki yumru verimi 237,6 g iken, kuraklık uygulamasında bitki yumru verimi 232,6 g'a düşmüştür. Russet Burbank'ın kontrol koşullarında 184,4 g olan bitki başına yumru verimi, kurak koşullarda hafif bir artışla 181,1 g'a düşmüştür. Kontrol uygulamasıyla mukayese edildiğinde, kurak koşullar altında Desire'nin bitki başına yumru verimi %2,1, Russet Burbank'ın bitki başına yumru verimi ise %1,7 oranında azalmıştır.



Şekil 4.22. Kontrol ve kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank bitki yumru verimi

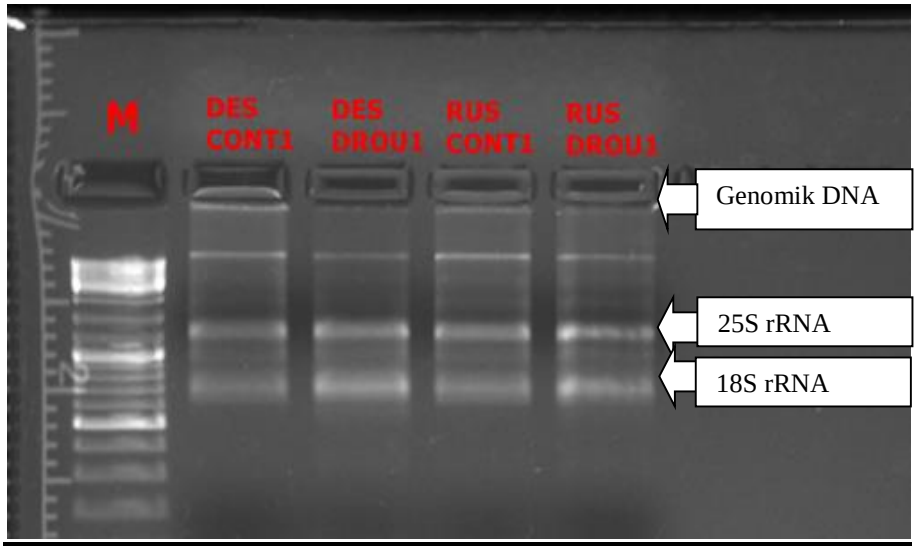
Tarımsal üretim alanlarında, toprakların verimliliğini olumsuz yönde etkileyen, ürün verimini sınırlandıran en önemli sorunlardan birisi bitkilerin kuraklığa maruz kalmasıdır. Bu durum, büyüme ve gelişmeyi engellemekte ve buna bağlı olarak verim ve kalitenin azalmasına neden olmaktadır. Tarımsal açıdan, kuraklık stresi altında olan patatese bakıldığında, bitki gelişiminin yavaşladığı (Deblonde ve Ledent 2001), erkenciliğin teşvik edilmesi nedeniyle yaşam döngüsünün kısaldığı (Kumar vd., 2007), yumru sayısının düştüğü (Eiasu vd., 2007) ve yumru büyüklüğünün azaldığı bilinmektedir (Schafleitner vd., 2007). Bu durumların sonucunda, yumru kalitesi ve veriminde azalmaların olması muhtemeldir. Desiree ve Russet Burbank çeşitlerinin bitki yumru verimi değerlerine bakıldığında, yumru verimlerinde hafif bir azalma gözlemlenmiştir. Her ne kadar erken yumru gelişim döneminde başlanan (45. gün) ve 10 gün süren kuraklık uygulanmasında, bitki büyüme ve gelişmesinde önemli rolü olan fotosentez hızında azalama gözlemlense de, bu azalma 5-7 günlük bir dönemi kapsamıştır. Hatta her iki çeşidin fotosentez hızındaki önemli azalma sadece kuraklık uygulamasının 9. ve 10. günü yani sadece iki gün meydana gelmiştir. Sonuç itibariyle, kuraklık uygulamasından sonraki dönemde yapılan tam sulama ile bitkiler kendilerini önemli düzeyde toplamış olmalıdırlar. Böylece kuraklık stresinden kaynaklanan zarar en aza indirilmiştir. Bu sonuçlara göre, verimin azalmasında kuraklığın oluştuğu dönemin, süresinin ve şiddetinin önemli olduğu, kısa süreli kuraklığın çeşitli fizyolojik olaylar üzerine olumsuz etkisi olsa da, verimi çok fazla etkileyemediği ortaya çıkmaktadır. Daha uzun süreli bir kuraklık dönemi veya aralıklarla daha fazla sayıda kuraklık stresinin oluşması, patatesin yumru veriminde önemli azalmalara sebebiyet verebilir.

4.2 miRNA ve hedef gen ifade analizleri

4.2.1 Toplam RNA izolasyonu

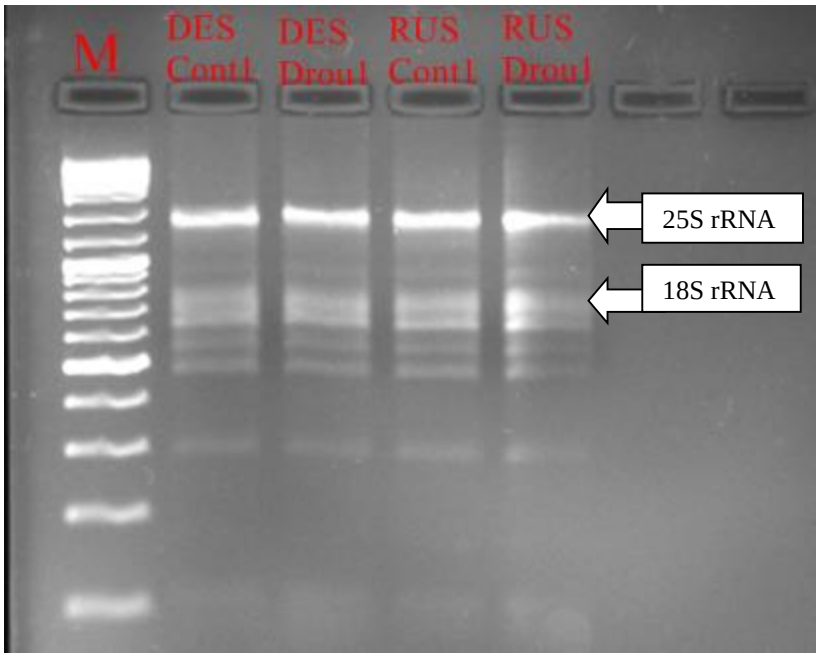
Kontrol ve kurak koşullarındaki Desiree (DESCONT: Desiree kontrol, DESDROU: Desiree kurak) ve Russet Burbank (RUSCONT: Russet Burbank kontrol, RUSDROU: Russet Burbank kurak) çeşitlerinde izole edilen toplam RNA örnekleri, 0,5x TBE kullanılarak hazılanan %1,5 agaroz jelde (7V/cm) 50 dk koşturulmuş ve böylece izolasyonun başarılı yapılıp yapılmadığı agoroz jelde kontrol edilmiştir. RNA agaroz jel analiz sonucu Şekil 4.23.'te sunulmuştur. Şekilde toplam RNA içerisinde, genomik DNA, 25S rRNA ve 18S rRNA ve bunlara ek olarak kloroplast ve mitokondri rRNA bantları

görülmektedir. Daha sonraki aşamada, gen ifade analiz sonuçlarını etkilememesi için genomik DNA temizlemesi yapılmıştır.

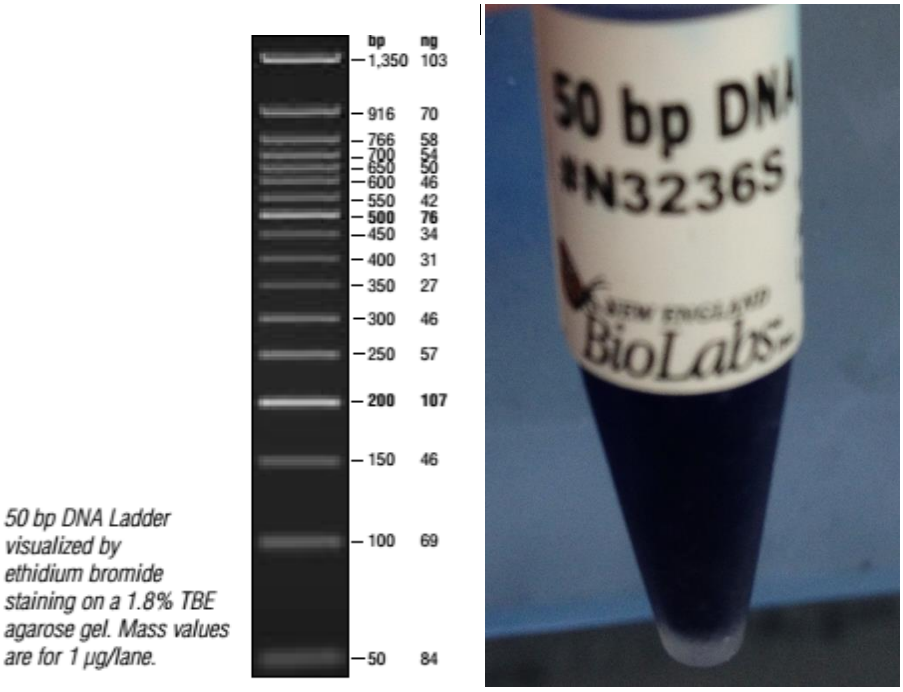


Şekil 4.23. Toplam RNA izolasyonu jel görüntüsü

Nanodrop ölçümlerinden sonra 100 ng/µl olacak şekilde seyreltilen RNA örnekleri, gDNA temizlemesinin başarılı yapılıp yapılmadığını ve RNA'nın sağlamlığını kontrol edilmek üzere agaroz jele yüklenmiştir. Kontrol ve kurak koşullardaki Desiree (DESCONT: Desiree kontrol, DESDROU: Desiree kurak) ve Russet Burbank (RUSCONT: Russet Burbank kontrol, RUSDROU: Russet Burbank kurak) çeşitlerinde gDNA'dan temizlenen toplam RNA örnekleri görüntüsü Şekil 4.24.'de sunulmuştur. Toplam RNA izolasyon sonucu Şekil 4.24.'de sunulmuştur. Toplam RNA izolasyon örneklerinin verildiği Şekil 4.23.'de en üstte bulunan genomik DNA bantlarının temizlendiği görülmektedir. Bu sonuç, RNA örneklerinin gDNA'dan başarılı bir şekilde temizlendiğini ortaya koymaktadır.



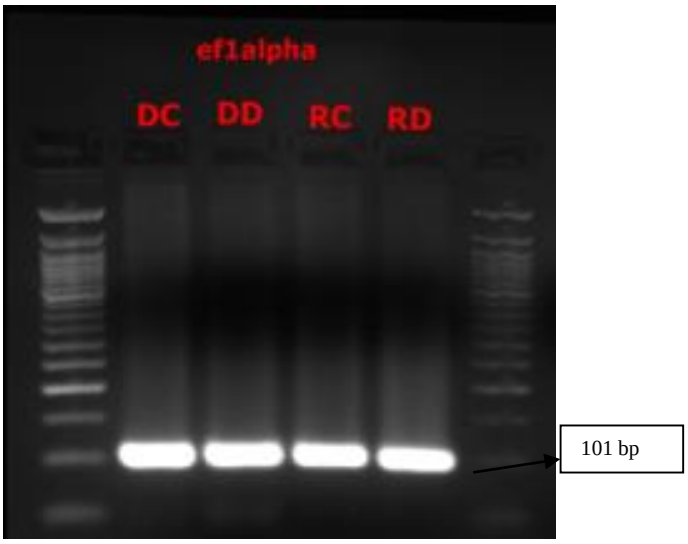
Şekil 4.24. Genomik DNA uzaklaştırılması sonrası RNA jel görüntüsü



Şekil 4.25. Agaroz jel sisteminde kullanılan markör

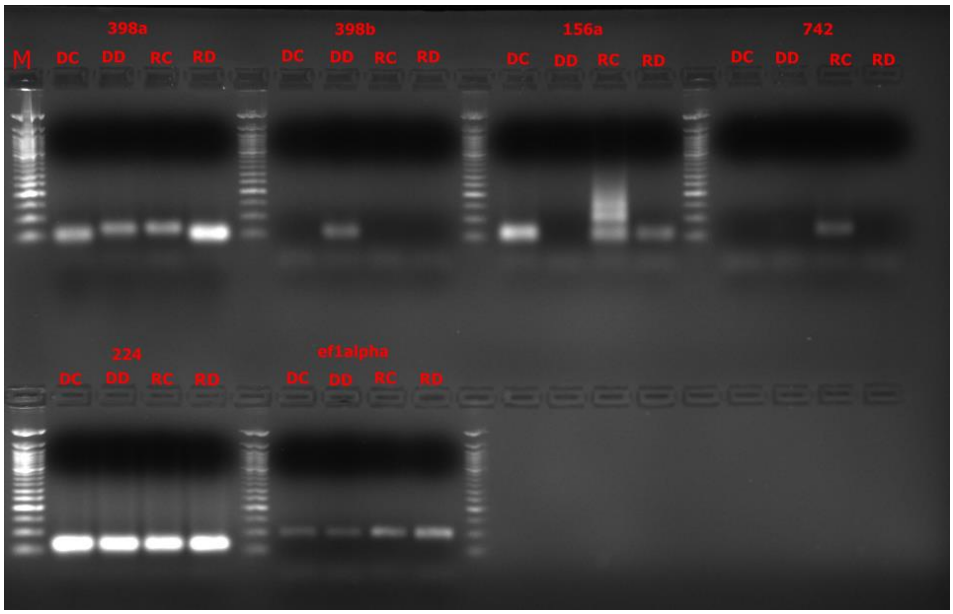
Kontrol ve kurak koşullarda yetiştirilen Desiree (DC: Desiree kontrol, DD: Desiree kurak) ve Russet Burbank (RC: Russet Burbank kontrol, RD: Russet Burbank kurak) çeşitlerine ait toplam mRNA örnekleri kullanılarak mRNA'dan cDNA sentezi yapılmıştır. Ardından mRNA'dan cDNA sentezinin gerçekleştirilip gerçekleştirilmediği *ef1α* pirimerleri kullanarak standard PCR ile analiz edilmiştir. PCR ile yapılan cDNA

doğrulama analiz sonuçlarını gösteren agaroz jel görüntüsü Şekil 4.26.'da verilmiştir. Dört PCR örneğinde de *ef1α* için beklenen 101 baz uzunluğunda bantlar gözlemlenmiştir. Böylece standard PCR analizi ile mRNA'dan cDNA sentezinin başarıyla gerçekleştirildiği belirlenmiştir.



Şekil 4.26. mRNA'dan cDNA sentezinin PCR ile doğrulaması

Kontrol ve kurak koşullarda Desiree yetiştirilen (DC: Desiree kontrol, DD: Desiree kurak) ve Russet Burbank (RC: Russet Burbank kontrol, RD: Russet Burbank kurak) çeşitlerine ait toplam RNA örnekleri kullanılarak miRNA'dan cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA sentezinin gerçekleşip gerçekleşmediği, ilgili miRNA'ya özgü primerler ve sap-ilmeğe özgü evrensel primer kullanılarak standard PCR ile analiz edilmiştir. Yapılan doğrulama çalışmasının agaroz jel analiz sonucu Şekil 4.27.'de sunulmuştur.



Şekil 4.27. miRNA'dan cDNA sentezinin PCR ile doğrulaması

Standard-PCR yapılan cDNA doğrulama analiz sonuçlarını gösteren agaroz jel resmi Şekil 4.27.'de verilmiştir. Standard-PCR yapılan mikro-cDNA doğrulaması agaroz jel görüntüsüne bakıldığında, stu-miR398a ve miR224 için yaklaşık 65-66 bp uzunluğunda ürün elde edilmiştir. stu-miR398b için yapılan doğrulama çalışmasında, sadece kurak koşullarında yetiştirilen Desiree cDNA örneklerinden beklenen uzunlukta bant elde edilirken, diğer cDNA örneklerinden PCR ürünü oluşmamıştır. stu-miR156a için yapılan doğrulama çalışmasında, kurak koşullarda yetiştirilen Desiree cDNA örneği hariç, diğer cDNA örneklerinden beklenen uzunlukta PCR ürünü üretilmiştir. stu-miR742 için sadece kontrol koşullarında yetiştirilen Russet Burbank cDNA örneğinden beklenen uzunlukta PCR ürünü elde edilirken, diğer cDNA örneklerinde PCR ürünü meydana gelmemiştir.

4.2.2 miRNA ve hedef gen ifade analizleri

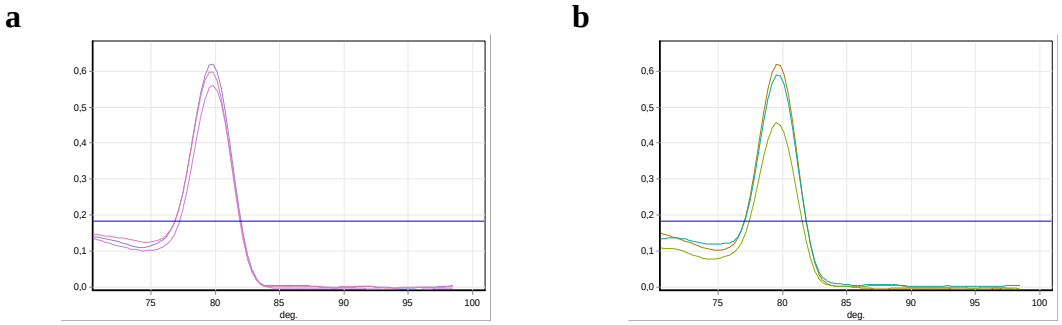
Patates üzerine yapılan araştırmalarda, abiyotik stres faktörlerine karşı dayanıklılığın sağlanması için klasik ıslah yöntemleri ve seleksiyonlarla dayanıklılık sağlanmaya çalışılmıştır. Ancak, kuraklığa dayanıklılıkta kuraklık stresine toleranstaki mekanizmaların anlaşılması gerekmektedir. Bu nedenle, strese yanıt sırasında transkripsiyondaki değişikliklerin ve transkripsiyon sonrası mekanizmalar vasıtasıyla gen ifadelerindeki düzenlenmelerin ve diğer uyum mekanizmalarının anlaşılması önemlidir. Bu çalışmada, patatesin enzimatik antioksidan sisteminde yer alan SOD enzimlerini kodlayan genlerin ve bu genleri hedef aldığı tahmin edilen patates miRNA'larının

kuraklık stresine tepkileri hakkında, moleküler düzeyde deneysel veriler toplanmıştır. Çalışmamızda kontrol ve stres koşullarında bazı miRNA'ların ve hedef genlerinin ifadeleri tespit edilmiştir. Tez kapsamında 3 genin (Cu/Zn SOD, Fe SOD ve L-askorbat oksidaz) ve bu genleri hedef aldığı tahmin edilen 5 miRNA'nın (stu-miR398a, stu-miR398b, stu-miR156a, miR224 ve stu-miR742) kuraklık stresi altındaki ifade değişimlerini belirlemek ve biyoinformatik olarak miRNA hedefi olduğu tahmin edilen genlerin gerçekten hedef gen olup olmadıkları hakkında ilk deneysel verileri elde etmek amacıyla, kontrol ve kurak koşullarında yetiştirilen Desiree ve Russet Burbank çeşitlerinden elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak qRT-PCR (Quantitative Real-Time PCR) analizleri yapılmıştır. İncelenen miRNA'ların isimleri, nükleotit dizileri, hedef genleri hakkındaki bilgiler materyal ve metot bölümünde Çizelge 3.4.'de verilmiştir. Bunların yanında, kuraklık toleransında rol aldığı düşünülen prolinin sentezinde görevli Piyrolin-5-karboksilat sentazı kodlayan P5CS geninin kuraklık koşullarındaki ifade değişimi de incelenmiştir. Biyoinformatik yöntemlerle patateste Cu/Zn-SOD'u hedeflediği tahmin edilen miR398 ve miR156'nın, Fe-SOD'u hedeflediği tahmin edilen miR224 ve miR742'nin kontrol ve kurak koşullarda yetiştirilen iki farklı patates çeşidinde ifade analizlerinin ve bu miRNA'ların ifadelerinin hedef genlerinin ifadesiyle karşılaştırılmasının yapıldığına dair herhangi bir kaynağa rastlanmamıştır. Bu özelliği sebebiyle bu çalışmanın patateste ilk defa yapılmış olduğu tahmin edilmektedir. Bu tez kapsamında incelenen patates miRNA'larının kuraklık stresi koşullarındaki ifadeler ve tahmini hedef genleriyle ilişkileri hakkında deneysel yollarla elde edilen veriler, kuraklığa toleranslı patates çeşitleri geliştirmek için miRNA temelli çalışmalara katkı sağlayacaktır.

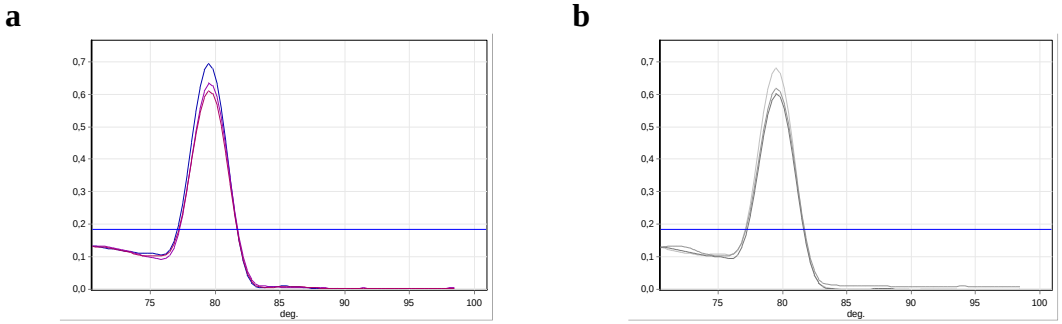
Gen ifadesinin oransal değişimi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemine göre hesaplanmış ve normalizasyon için patateste çok istikrarlı bir gen olan *ef1α* geni referans gene olarak seçilmiştir (Nicot vd., 2005). PCR'ın sadece tek bir ürün oluşturup oluşturmadığını belirlemek için erime eğrisi (melting curve) analizi yapılmıştır. Erime eğrisi analizi sonucunda, reaksiyon grafiğinde yalnızca bir zirve gözlemleniyorsa bu durumda reaksiyonda bir tane PCR ürünü (amplicon) olduğu doğrulanmıştır.

Kontrol ve kuraklık koşulları yetiştirilen Desiree ve Russet Burbank çeşitlerinin *ef1α* genine ait erime eğrisi (melting curve) sonuçları sırasıyla Şekil 4.28. ve Şekil 4.29.'da

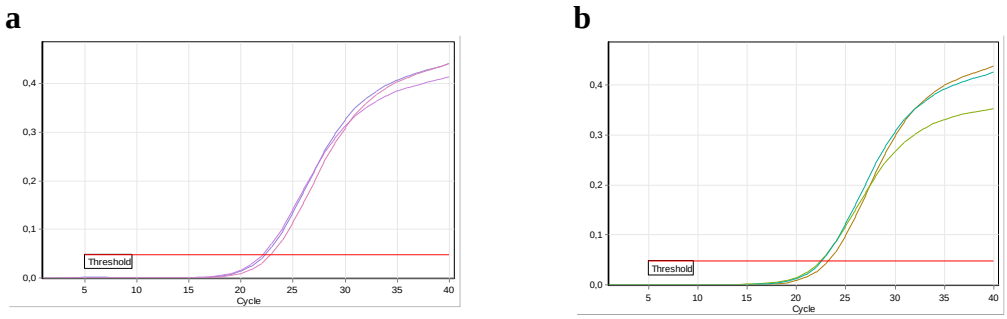
verilmiştir. *ef1α* geninde yapılan analiz sonucunda, tek bir zirve gözlenmiş ve böylece kullanılan *ef1α* primerleriyle tek bir PCR ürünü elde edildiği ve qRT-PCR analizlerinde elde edilen sinyalin bu tek PCR ürününden elde edildiği doğrulanmıştır. Kontrol ve kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank'ta meydana gelen *ef1α* geninin ifadesine ait qRT-PCR analiz sonucunda elde edilen PCR ürünü çoğalma eğrisi Şekil 4.30. ve 4.31.'de gösterilmiştir.



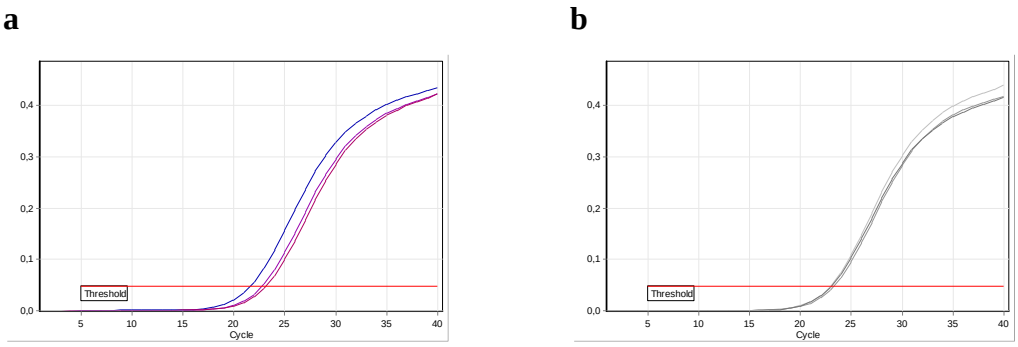
Şekil 4.28. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'nin *ef1α* erime eğrisi grafiği



Şekil 4.29. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ın *ef1α* erime eğrisi grafiği



Şekil 4.30. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'nin *ef1α* PCR ürünü çoğalma eğrisi

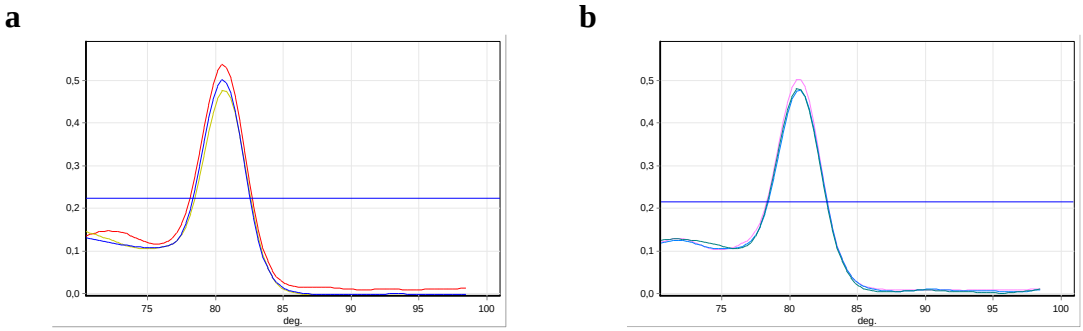


Şekil 4.31. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ın *ef1α* PCR ürünü çoğalma eğrisi

4.2.2.1 stu-miR398a ile tahmini hedef genleri L-askorbat oksidaz ve Cu/Zn SOD'un qRT-PCR analizleri

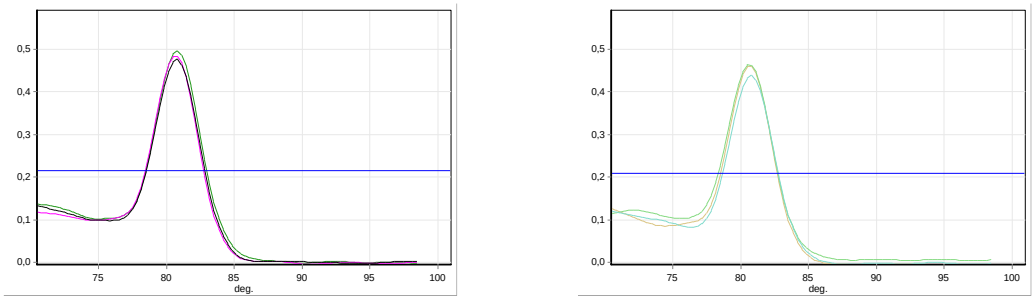
stu-miR398a ifade analizinde, qRT-PCR'ın sadece tek bir ürün oluşturup oluşturmadığını belirlemek için erime eğrisi (melting curve) analizi yapılmıştır. Erime eğrisi analizi sonucunda, reaksiyon grafiğinde yalnızca bir zirve gözlemlenmiş ve bu durumda reaksiyonda bir tane stu-miR398a ürünü (amplicon) olduğu doğrulanmıştır.

Desiree ve Russet Burbank'ta stu-miR398a'nın erime eğrisi analiz sonuçları Şekil 4.32. ve Şekil 4.33.'de verilmiştir.



Şekil 4.32. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de stu-miR398a erime eğrisi grafiği

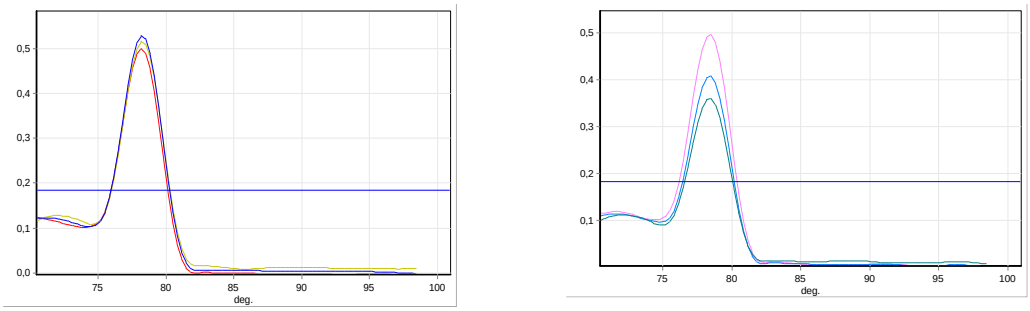
a **b**



Şekil 4.33. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank stu-miR398a erime eğrisi grafiği

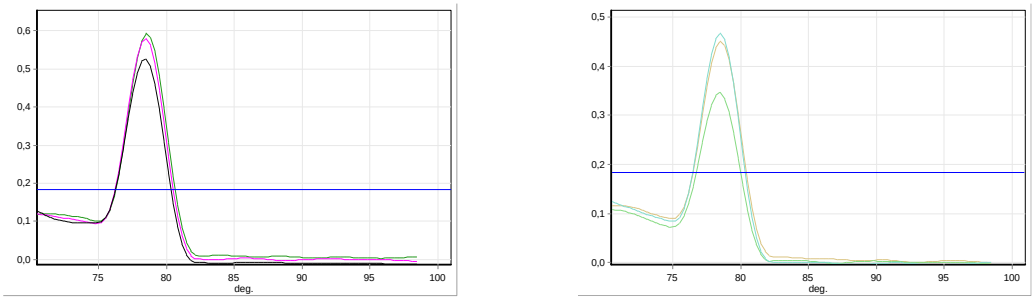
L-askorbat oksidaz ifade analizinde, qRT-PCR'ın sadece tek bir ürün oluşturup oluşturmadığını belirlemek için erime eğrisi (melting curve) analizi yapılmıştır. Erime eğrisi analizi sonucunda, reaksiyon grafiğinde yalnızca bir zirve gözlemlenmiş ve bu durumda reaksiyonda bir tane L-askorbat oksidaz ürünü (amplicon) olduğu doğrulanmıştır. Desiree ve Russet Burbank'ta L-askorbat oksidaz'ın erime eğrisi analiz sonuçları Şekil 4.34. ve Şekil 4.35.'de verilmiştir.

a **b**



Şekil 4.34. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de L-askorbat oksidaz erime eğrisi grafiği

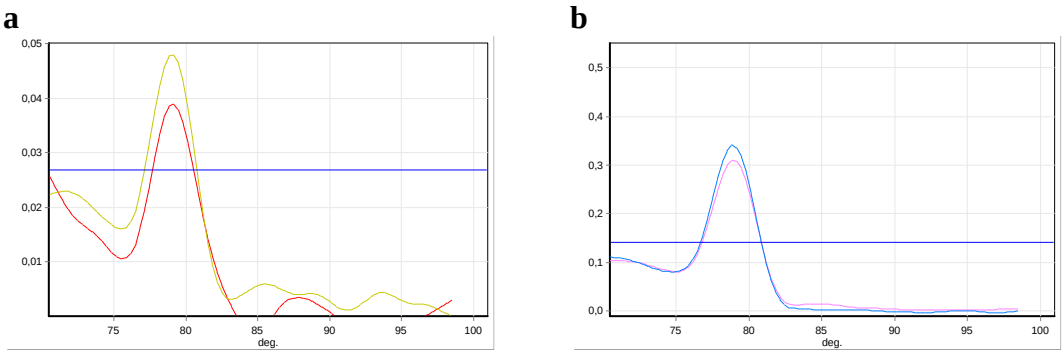
a **b**



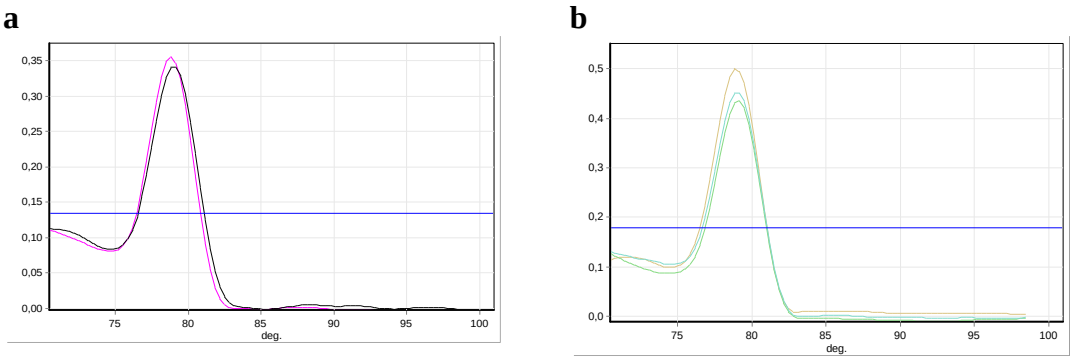
Şekil 4.35. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta L-askorbat oksidaz erime eğrisi grafiği

Cu/Zn SOD ifade analizinde, qRT-PCR'ın sadece tek bir ürün oluşturup oluşturmadığını belirlemek için erime eğrisi (melting curve) analizi yapılmıştır. Erime eğrisi analizi sonucunda, reaksiyon grafiğinde yalnızca bir zirve gözlemlenmiş ve bu durumda reaksiyonda, bir tane Cu/Zn SOD ürünü (amplicon) olduğu doğrulanmıştır.

Desiree ve Russet Burbank'ta Cu/Zn SOD'un erime eğrisi analiz sonuçları Şekil 4.36. ve Şekil 4.37.'de verilmiştir.

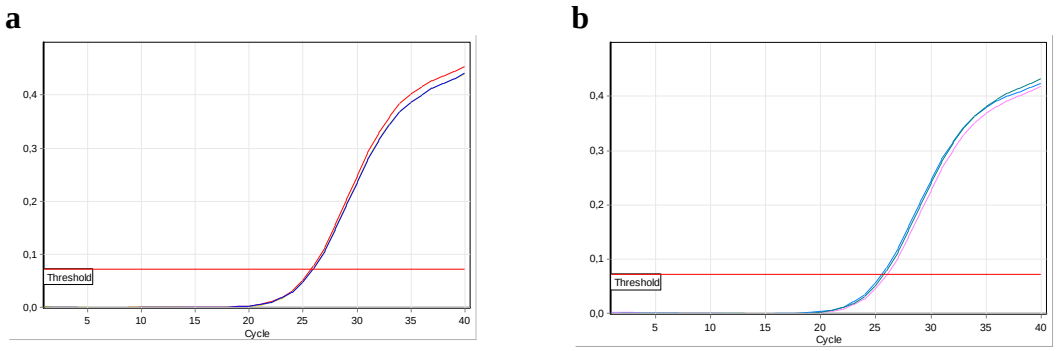


Şekil 4.36. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de Cu/Zn SOD erime eğrisi grafiği

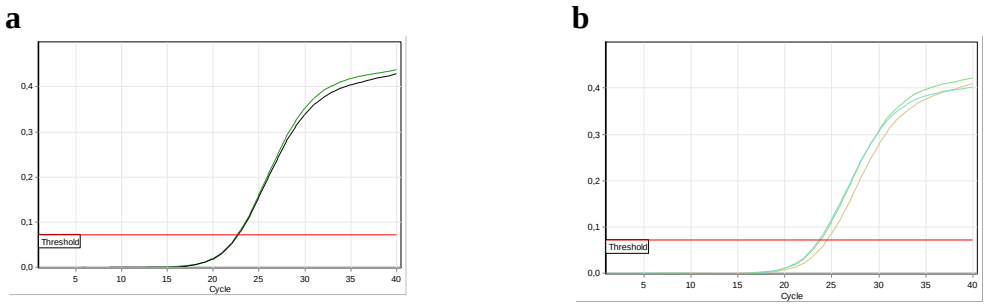


Şekil 4.37. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta Cu/Zn SOD erime eğrisi grafiği

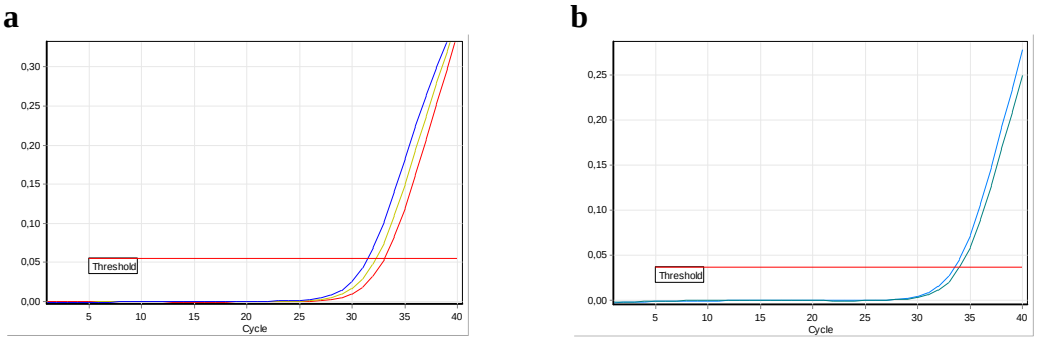
Kontrol ve kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank'ta meydana gelen stu-miR398a'nın ifadesine ait qRT-PCR analiz sonucunda elde edilen PCR ürünü çoğalma eğrisi sonuçları Şekil 4.38. ve Şekil 4.39.'da gösterilmiştir. Stu-miR398a'nın hedefi olduğu tahmin edilen L-askorbat oksidaz geninin, kontrol ve kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank'taki ifadesine ait qRT-PCR analiz sonucunda elde edilen PCR ürünü çoğalma eğrisi Şekil 4.40. ve Şekil 4.41.'de sunulmuştur. Cu/Zn SOD geninin, kontrol ve kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank'taki ifadesine ait qRT-PCR analiz sonucunda elde edilen PCR ürünü çoğalma eğrisi Şekil 4.42. ve Şekil 4.43.'de sunulmuştur.



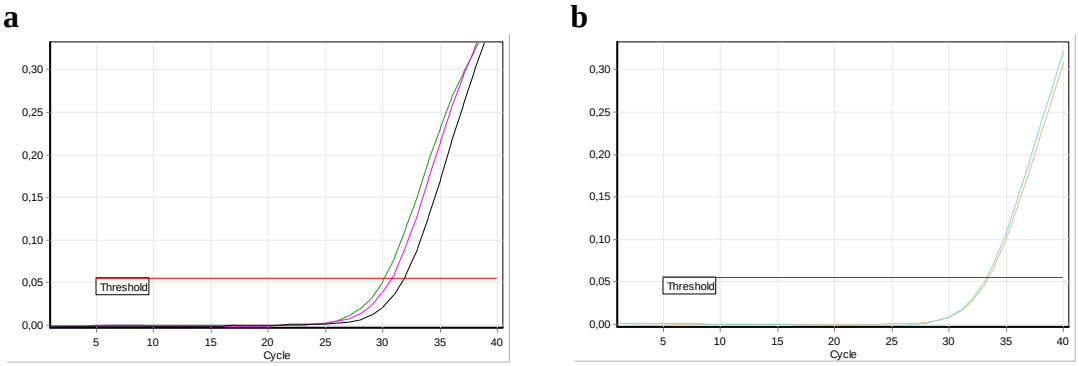
Şekil 4.38. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de stu-miR398a PCR ürünü çoğalma eğrisi



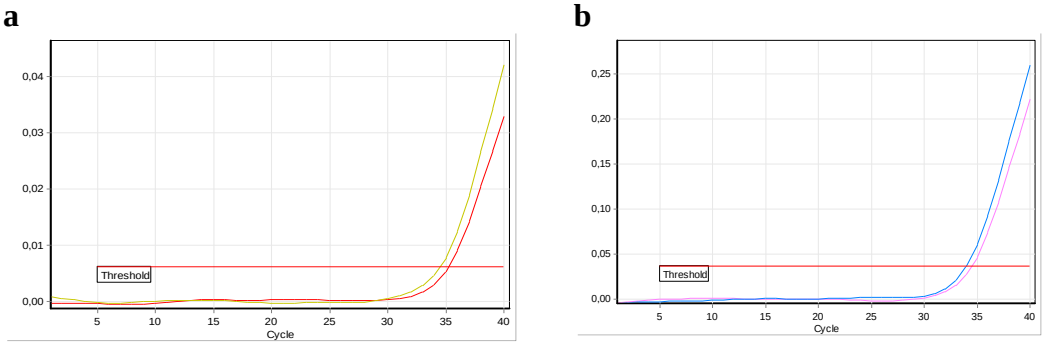
Şekil 4.39. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta stu-miR398a PCR ürünü çoğalma eğrisi



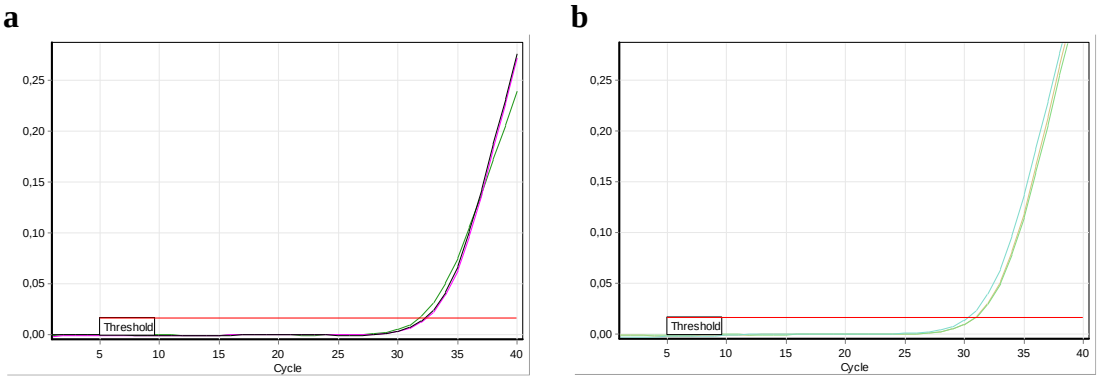
Şekil 4.40. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de L-askorbat oksidaz PCR ürünü çoğalma eğrisi



Şekil 4.41. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta L-askorbat oksidaz PCR ürünü çoğalma eğrisi

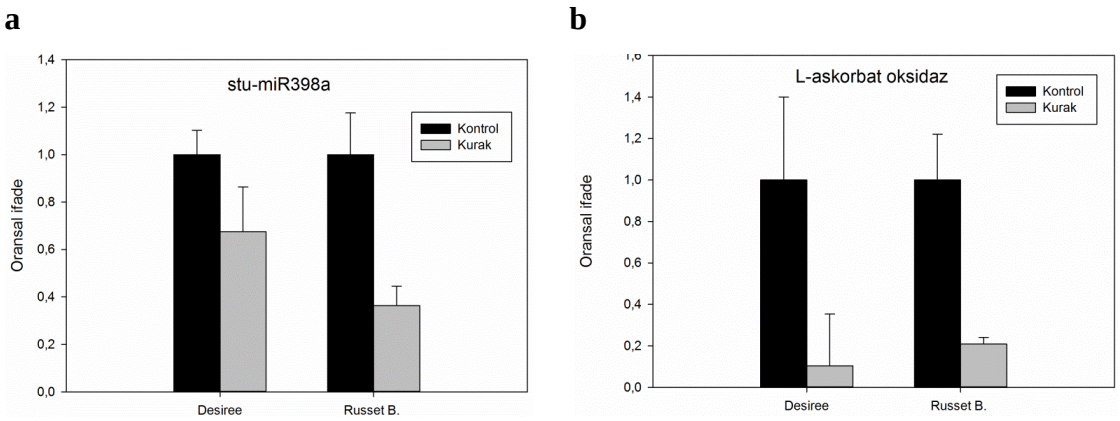


Şekil 4.42. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de Cu/Zn SOD PCR ürünü çoğalma eğrisi



Şekil 4.43. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta Cu/Zn SOD PCR ürünü çoğalma eğrisi

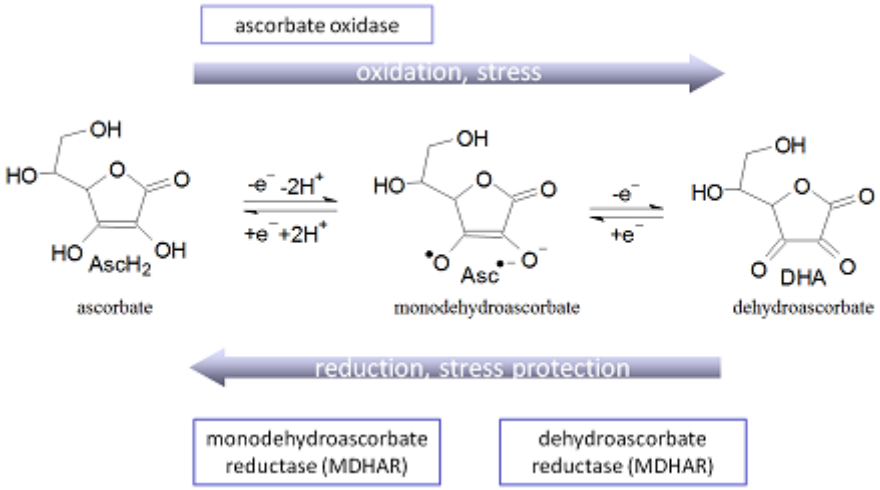
Desiree ve Russet Burbankta kontrol ve kurak koşullarda, stu-miR398a ifadesine ait qRT-PCR analizi sonucu Şekil 4.44.'de sunulmuştur. Desiree ve Russet Burbank'ta kurak koşullarda stu-miR398a ifadesinin azaldığı görülmektedir. Desiree ve Russet Burbank'ta kontrol ve kurak koşullarda, L-askorbat oksidaz ifadesine ait qRT-PCR analizi sonucu Şekil 4.44.'de verilmektedir. Desiree ve Russet Burbankta kurak koşullarda L-askorbat oksidaz ifadesinin azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.44. Desiree ve Russet Burbank'ta stu-miR398a (a) ve L-askorbat oksidaz (b) ifade analizi

Önceki çalışmalarda L-askorbat oksidaz aktivitesinin, çevre koşullarının algısında ya da stres yanıtlarında bir role sahip olduğu tahmin edilmiştir (Şekil 4.45.). Su eksikliği koşullarında, askorbat oksidaz enzimi ve farklı koşullarda ürün miktarı arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Askorbat oksidazın izoformlarının baskılanması ile yabani bitkilerde, stoma iletkenliğinde değişiklikler, şeker metabolizmasında değişiklikler (yaprakta ve meyvede heksoz konsantrasyonu), apoplastik askorbat, şeker ve heksoz

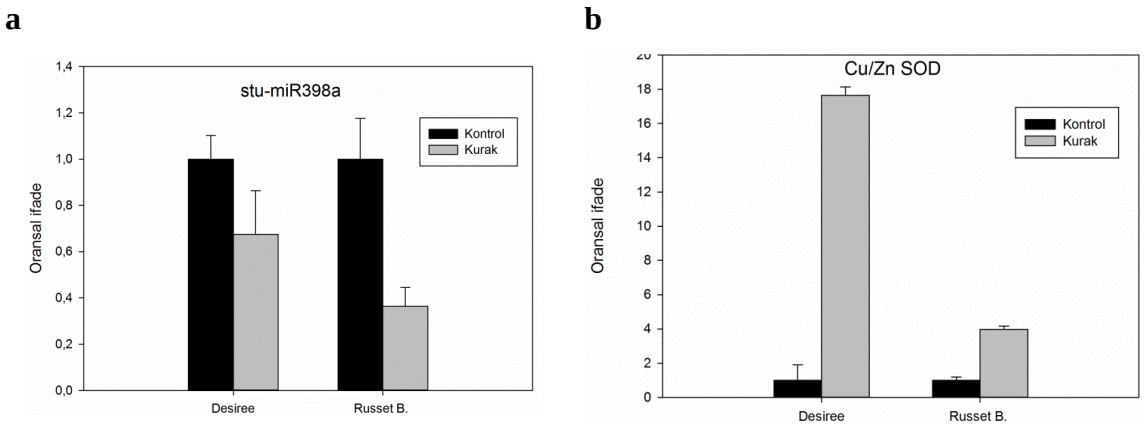
seviyesindeki değişimler gibi birçok fenotipik farklılıklar görülmüştür (Pignocchi ve Fuaye 2003; Pignocchi vd., 2006). Garchery vd., (2013) yaptıkları çalışmalara göre, askorbat oksidaz aktivitesi azalması karbon alımını etkilemiş ve su eksikliğinde domateste ürün verimini arttırmıştır. Bu çalışmada, RNA interferaz yöntemi ile domateste askorbat oksidaz enzim aktivitesi düşürülmüştür ve kısıtlı su koşullarında yabani tip domateslere kıyasla ürün veriminin arttığı görülmüştür. Zhang vd., (2013) makalesindeki verilere göre, L-askorbat oksidazın patatese özel olan stu-miR398a'nın hedefi olduğu biyoinformatik yollarda tahmin edilmiştir. Homolojiye bağlı baz eşleşmesi ile hedef mRNA moleküllerinin ifadelerinin düzenlenmesinde rol oynayan miRNA'lar, gen ifadelerini transkripsiyon sonrası seviyede düzenleyerek, hedef gen ifadelerinin azalmasına ve/veya durmasına neden olurlar. Stu-miR398a'nın hedef geni L-askorbat oksidazın da ifadesinin kurak koşullarda azaldığı görülmüştür. Tahmin edildiği şekilde, kurak koşullarda patates bitkilerinde L-askorbat oksidazın ifadesinde azalma meydana gelmiş (Şekil 4.44.), ancak stu-miR398a'nın da ifadesinde azalma gözlenmiştir. Eğer stu-miR398a, L-askorbat oksidaz enzimini hedef alıyorsa, L-askorbat oksidaz enzim ifadesinin azalması için stu-miR398a ifadesinin artması gerekmektedir. Fakat stu-miR398a'nın kurak koşullarda ifadesinin azaldığı görülmüştür. Bu durumda patatesin kuraklık stresinde, L-askorbat oksidaz gen ifade değişikliğinde miR398a'nın rol almadığı veya farklı bileşenlerin de etkili olabileceği tahmin edilmektedir.



Şekil 4.45. Askorbat oksidazın rol aldığı askorbat oksidasyon reaksiyonu (Gest vd., 2014)

Desiree ve Russet Burbankta kontrol ve kurak koşullarda, stu-miR398a ifadesine ait qRT-PCR analizi sonucu Şekil 4.46.'da sunulmuştur. Desiree ve Russet Burbank'ta kurak

koşullarda stu-miR398a ifadesinin azaldığı görülmektedir. Desiree ve Russet Burbank'ta kontrol ve kurak koşullarda, Cu/Zn süperoksidaz dismutaz (Cu/Zn SOD) ifadesine ait qRT-PCR analizi sonucu Şekil 4.46.'da verilmektedir. Desiree ve Russet Burbank'ta kurak koşullarda Cu/Zn SOD ifadesinin arttığı görülmektedir.



Şekil 4.46. Desiree ve Russet Burbank'ta stu-miR398a (a) ve Cu/Zn SOD (b) ifade analizi

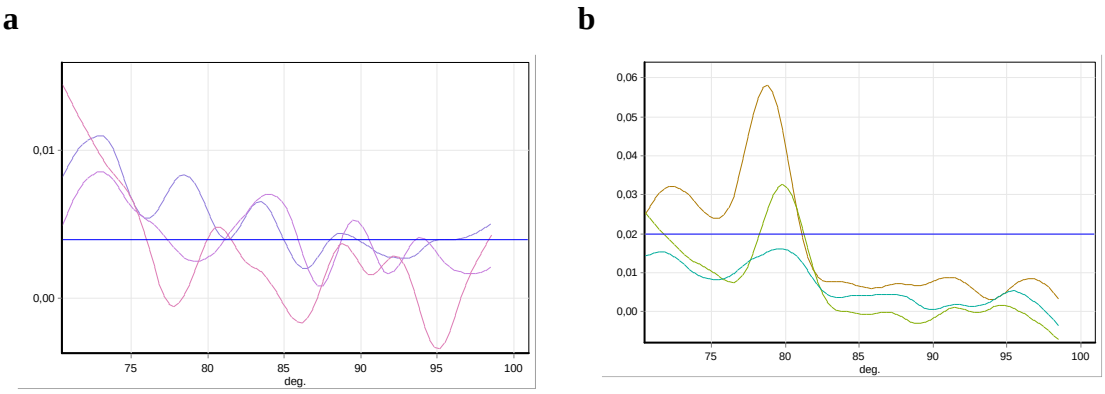
Bitkiler stresle başa çıkmak ve oksidatif stres altında yaşamlarını devam ettirebilmek için, ROS detoksifikasyonunu ve kontrolünü sağlamak için çeşitli antioksidan enzimlere sahiptiler. Süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon peroksidaz (GPX) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimleri, bir substratın oksidasyonunu azaltarak (elektron aktarımıyla) veya engelleyerek, oksidasyona karşı mücadele ederler. SOD izoenzimleri hücrenin farklı alt katmanlarında bulunmaktadırlar. Örneğin, Fe SOD kloroplastta, Mn SOD mitokondri ve peroksizom içinde, Cu/Zn SOD kloroplast, sitoplazma ve muhtemelen çekirdek dışı boşluklarda bulunmaktadır (Alscher vd., 2002). ROS üretimi stres koşullarında farklı organellerde gerçekleşebilir ve bu nedenle farklı çevre koşullarında SOD izoenzim ifade seviyeleri de farklılık gösterebilir (Pereira vd., 2003). Yapılan çalışmalar, biyotik ve abiyotik strese bağlı oluşan oksidatif stresle başa çıkmada ve bitkilerin stres koşulları altında canlılığı sürdürmesine katkı sağlamada, SOD ifadelerindeki artışın önemini vurgulamıştır. Örneğin, Sunkar vd., (2006) çalışmalarında, Cu/Zn SOD genlerinin Arabidopsis'te miRNA'lar tarafından transkripsiyon sonrası düzenlendiklerini tespit etmişlerdir. Oksidatif stres koşullarında miRNA ifadesinin

azaldığı ve bu azalan miRNA ifadesinin transkripsiyon sonrası Cu/Zn SOD gen ifadesini düzenlenlediği ve bu durumun oksidatif stres toleransını etkilediği gösterilmiştir. Arabidopsis'te miR398 ifadesinin azalmasına bağlı olarak, transkripsiyon sonrası düzenleme ve tetikleme ile oksidatif stres tolerasında Cu/Zn SOD ifadesinin arttığı ifade edilmiştir (Sunkar vd., 2006). Patateste stu-miR398a'nın hedef geninin biyoinformatik yollarla Cu/Zn SOD olduğu tahmin edilmiştir (Zhang vd., 2013). Tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalar sonucunda, Desiree ve Russet Burbak çeşitlerinde stu-miR398a ifadesinin azalmasına (Şekil 4.46.), bağlı olarak, transkripsiyon sonrası düzenleme ile oksidatif stres tolerasında rol alan Cu/Zn SOD ifadesinin (Şekil 4.46.) arttığı gözlenmiştir. Önceki biyoinformatik veriler ve tez kapsamında elde edilen deneysel sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde, kuraklık koşullarında patates bitkilerinin stu-miR398a aracılığıyla düzenleme yaparak bir antioksidan sistem enzimi olan Cu/Zn SOD ifadesini arttırdığı ve böylece, patates bitkilerinin kuraklığa toleranslarını arttırmaya çalıştıkları sonucu çıkarılabilir.

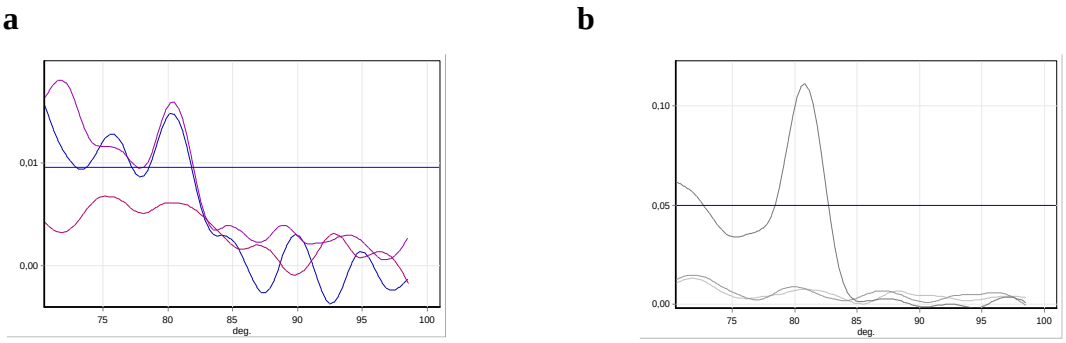
Zhang vd., (2013), tarafından yapılan biyoinformatik analizler sonucunda, stu-miR398a'nın hedefinin L-askorbat oksidaz, stu-miR398b'nin hedefinin ise Cu/Zn SOD olduğu tahmin edilmiştir. Stu-miR398a ve stu-miR398b dizilerinin (Çizelge 3.4.) birbirine çok benzer olmaları sebebiyle, tez kapsamında bu iki miRNA'nın hedeflerinin aynı olabileceği öngörülmüştür. Bu nedenle kurak koşullarda patates bitkilerindeki stu-miR398a'nın ifade değişikliği hem L-askorbat oksidaz hem de Cu/Zn SOD genlerinin ifade değişikliği ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, kurak koşullarda patates bitkilerinde stu-miR398a ile L-askorbat oksidaz ifadeleri arasında benzer bir değişim gözlenirken, stu-miR398a ile Cu/Zn SOD ifadeleri arasında zıt bir ilişki belirlenmiştir. Böylece, bu ilk deneysel verilere dayanarak stu-miR398a'nın hedefinin Cu/Zn SOD olabileceği söylenebilir. Bu durumun ispatlanması için patateste transgenik yaklaşımlar kullanılarak daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

4.2.2.2 stu-miR398b'nin qRT-PCR analizi

Desiree ve Russet Burbank'ta stu-miR398b'nin erime eğrisi analiz sonuçları Şekil 4.47. ve Şekil 4.48.'de verilmiştir.



Şekil 4.47. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de stu-miR398b erime eğrisi grafiği



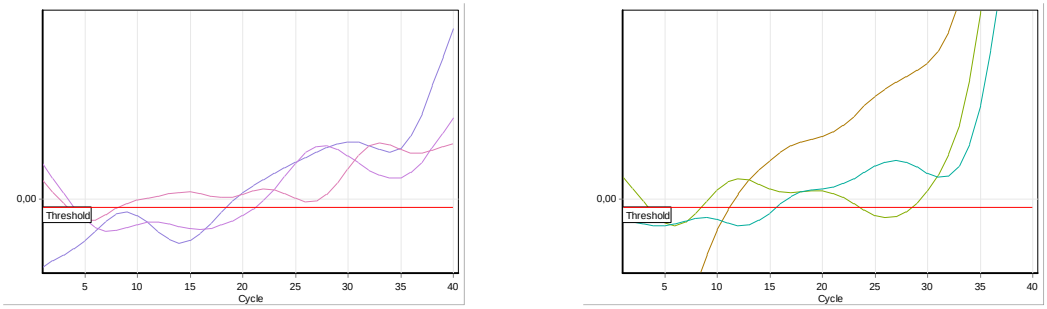
Şekil 4.48. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta stu-miR398b erime eğrisi grafiği

miR398b için erime eğrisi analizi her biri 3 teknik tekrarlı olarak iki kez yapılmış ve her iki analizden aynı sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan erime eğrisi analizi sonucunda kontrol koşullarındaki Desiree çeşidinde stu-miR398b için sinyal zirvesi oluşmamıştır. Bu sonuca göre, bu koşullarda ya qRT-PCR çalışmamış ya da kontrol koşullarda Desiree yapraklarında stu-miR398a ifadesi qRT-PCR ile tespit edilemeyecek kadar düşük seviyede gerçekleşmiştir. Kurak koşullarda yetişen Desiree'nin stu-miR398b erime eğrisi sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.47.), 3 teknik tekrarın iki tanesinde birer tane zayıf zirve sinyali gözlenmiştir. Bu sonuca göre kurak koşullarda yetiştirilen Desiree'de yapılan qRT-PCR analizinde bir ürün elde edildiği söylenebilir. Kontrol koşullarında yetiştirilen Russet Burbank'ta stu-miR398b için yapılan erime eğrisi analizi sonucunda 2 teknik tekrarda birer tane zayıf zirve sinyali elde edildiği gözlemlenmiştir, böylece kontrol koşullarında yetiştirilen Russet Burbank'ta bir adet qRT-PCR ürün oluştuğu söylenebilir. Kurak koşullarda yetiştirilen Russet Burbank çeşidinde stu-miR398b için yapılan erime

eğrisi sonucunda 3 teknik tekrarın bir tanesinde belirgin zirve sinyali gözlenmiştir. Böylece, kurak koşullarda yetiştirilen Russet Burbak'ta 3 teknik tekrardan bir tanesinde qRT-PCR ürünü oluşmuştur.

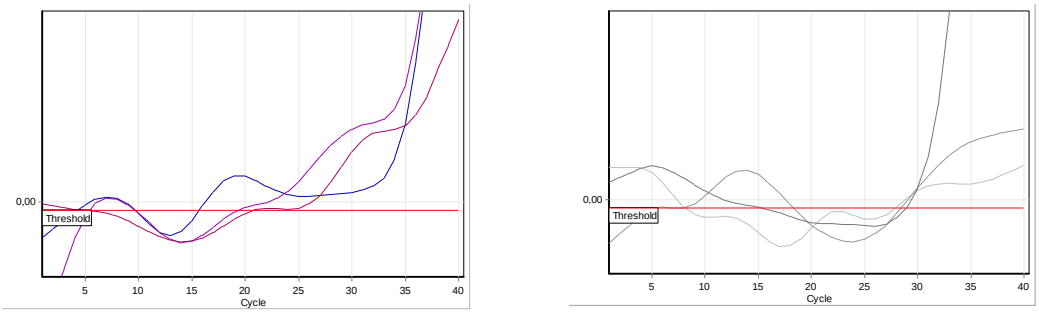
Kontrol ve kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank'ta meydana gelen stu-miR398b'nin ifadesine ait qRT-PCR analiz sonucunda elde edilen PCR ürünü çoğalma eğrisi sonuçları Şekil 4.49. ve Şekil 4.50.'de gösterilmiştir. Stu-miR398b'nın hedefi olduğu tahmin edilen Cu/Zn SOD geninin, kontrol ve kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank'taki ifadesine ait qRT-PCR analiz sonucunda elde edilen PCR ürünü çoğalma eğrisi Şekil 4.42. ve Şekil 4.43.'de sunulmuştur. Stu-miR398b ile yapılan qRT-PCR analizlerinden güvenilir sonuçların elde edilememesi nedeniyle bu miRNA'ya ait oransal ifade değişim grafikleri çizilmemiştir. Stu-miR398b'nin hedefleri olduğu tahmin edilen Cu/Zn SOD ve L-askorbat oksidazın gen ifade analiz sonuçları Şekil 4.46. ve Şekil 4.44.'de verilerek, tezin "stu-miR398a ile tahmini hedef genleri L-askorbat oksidaz ve Cu/Zn SOD'un qRT-PCR analizleri" başlığı altında tartışılmıştır.

a **b**



Şekil 4.49. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de stu-miR398b PCR ürünü çoğalma eğrisi

a **b**

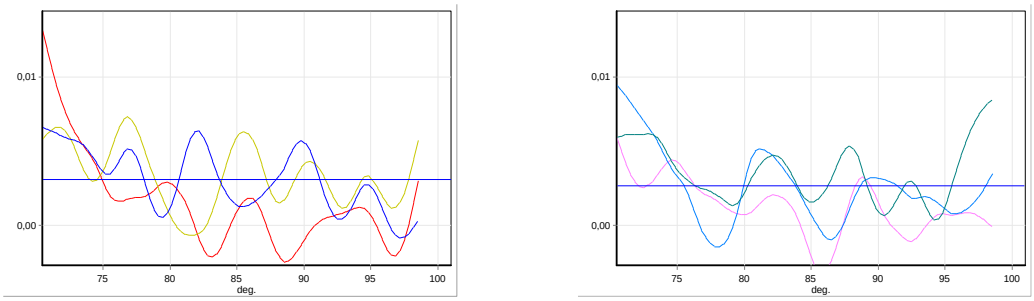


Şekil 4.50. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta stu-miR398b PCR ürünü çoğalma eğrisi

4.2.2.3 stu-miR156a ve hedef geni Cu/Zn SOD

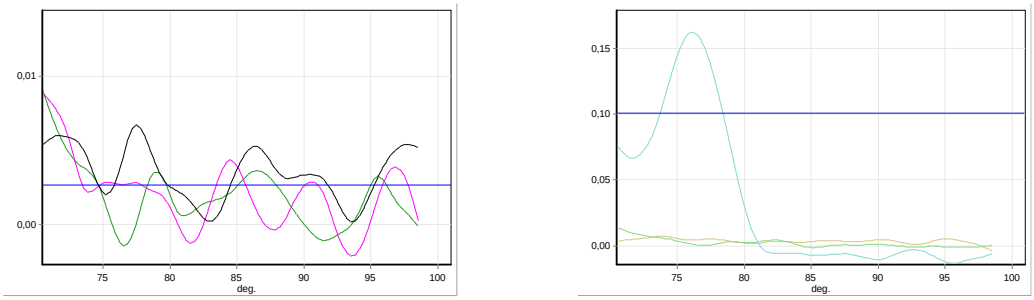
Stu-miR156a ifade analizinde, qRT-PCR'ın sadece tek bir ürün oluşturup oluşturmadığını belirlemek için erime eğrisi (melting curve) analizi yapılmıştır (Şekil 4.51. ve Şekil 4.52.). Erime eğrisi analizi sonucunda, kurak koşullarda yetiştirilen Russet Burbank'ın bir tekrarı haricinde, hiçbir örneğin reaksiyon grafiğinde bir zirve oluşmadığı gözlemlenmiş ve bu durumda yapılan qRT-PCR'da stu-miR156a'ya ait bir ürünün elde edilemediği belirlenmiştir. Stu-miR156a ile yapılan qRT-PCR analizlerinden oransal ifade değişim grafiği çizebilecek sinyal alınamamış ve bu nedenle stu-miR156a için oransal ifade değişim grafikleri çizilmemiştir.

a **b**



Şekil 4.51. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de stu-miR156a erime eğrisi grafiği

a **b**

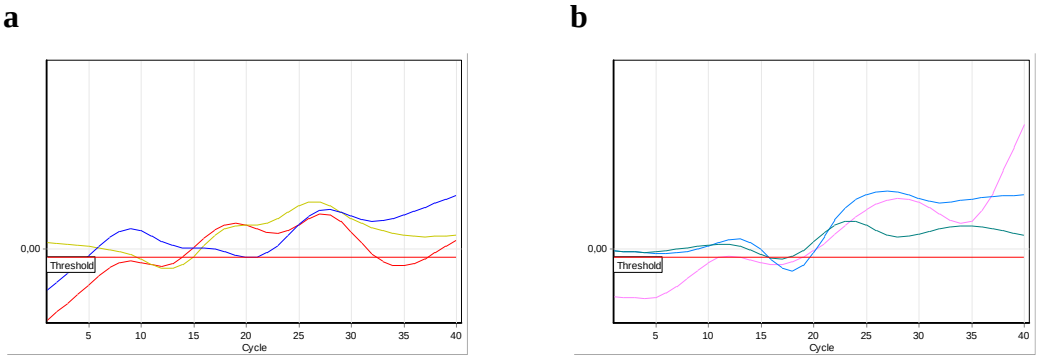


Şekil 4.52. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank stu-miR156a erime eğrisi grafiği

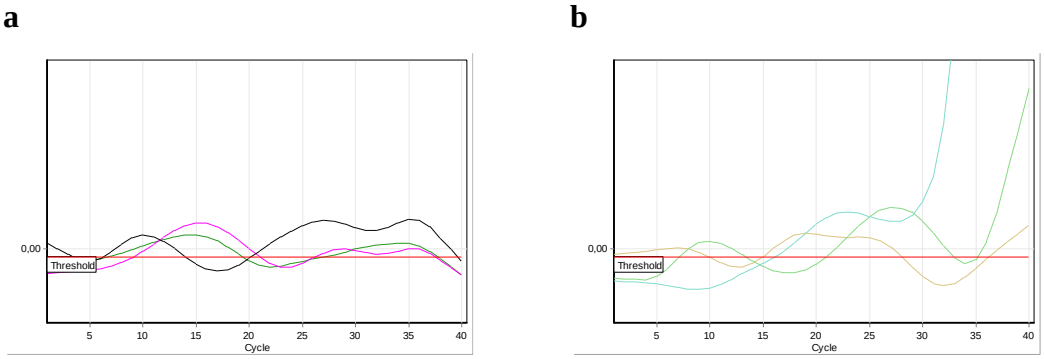
Literatürde kayıtlı, uzunluk ve birkaç nükleotid bakımından farklılık gösteren üç ayrı stu-miR156a dizisi bulunmaktadır (Xie vd., 2011, Hwang vd., 2011, mirBase veribankası). Xie vd., (2011) çalışmalarında, patateste stu-miR156'nın Cu/Zn-SOD'u hedeflediğini biyoinfomatik yollarla tahmin etmişlerdir ve tez kapsamında onların bildirdikleri stu-miR156a miRNA dizisi kullanılarak primerler tasarlanmıştır. Tasarlanan bu primerlerle

stu-miR156a qRT-PCR analizleri yapılmış, ancak erime eğrisi analiz sonuçlarındai (Şekil 4.51. ve Şekil 4.52.) ve PCR ürünü çoğalma eğrisi sonuçlarında (Şekil 4.53. ve Şekil 4.54.) görüldüğü gibi yapılan stu-miR156a qRT-PCR'ı çalışmamıştır. Bu nedenle, ileride yapılacak çalışmalarda, miRBase veri tabanında bulunan stu-miR156a dizisi ve Hwang vd., (2011) makalesinde verilen stu-miR156a dizisi alınarak, primer tasarlanacak ve stu-miR156a ifadesi qRT-PCR analizleriyle incelenecektir.

Kontrol ve kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank'ta stu-miR156a'nın qRT-PCR analiz sonucunda elde edilen PCR ürünü çoğalma eğrisi Şekil 4.53. ve Şekil 4.54.'de verilmiştir.



Şekil 4.53. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de stu-miR156a PCR ürünü çoğalma eğrisi

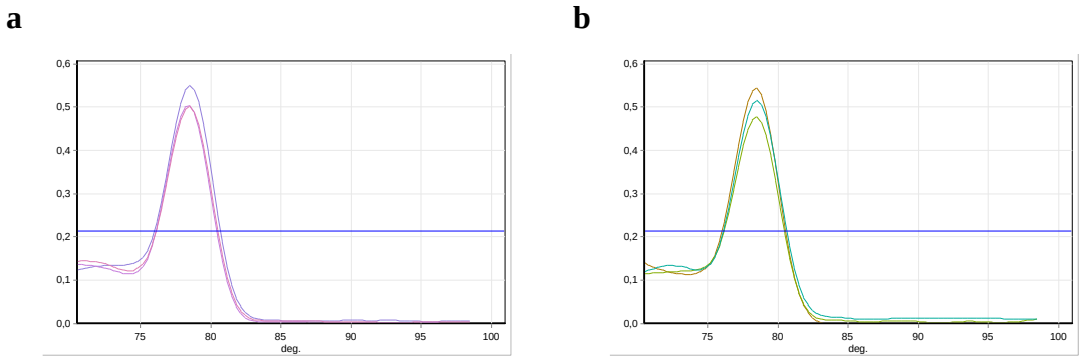


Şekil 4.54. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta stu-miR156a PCR ürünü çoğalma eğrisi

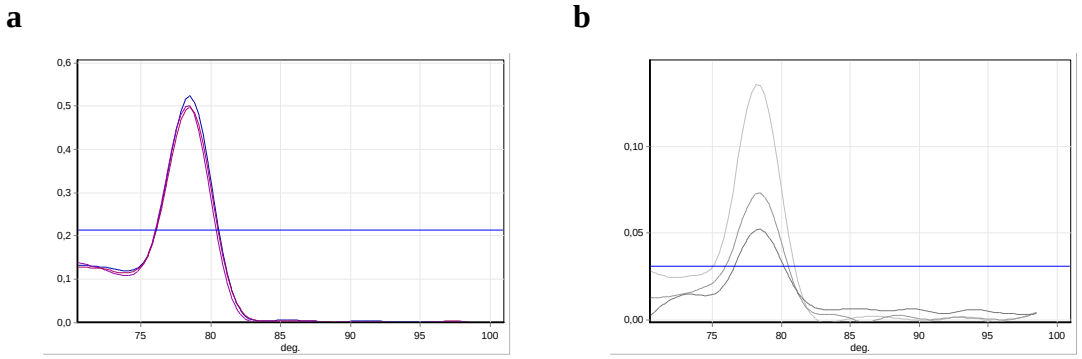
4.2.2.4 miR224 ve tahmini hedef geni Fe SOD'un qRT-PCR analizleri

miR224 ifade analizinde, qRT-PCR'ın sadece tek bir ürün oluşturup oluşturmadığını belirlemek için erime eğrisi (melting curve) analizi yapılmıştır. Erime eğrisi analizi

sonucunda, reaksiyon grafiğinde yalnızca bir zirve gözlemlenmiş ve bu durumda reaksiyonda bir tane miR224 ürünü (amplicon) olduğu doğrulanmıştır. Desiree ve Russet Burbank'ta miR224 ifadesine ait qRT-PCR analizi sonucu elde edilen erime eğrisi analiz sonuçları Şekil 4.55. ve Şekil 4.56.'da verilmiştir.



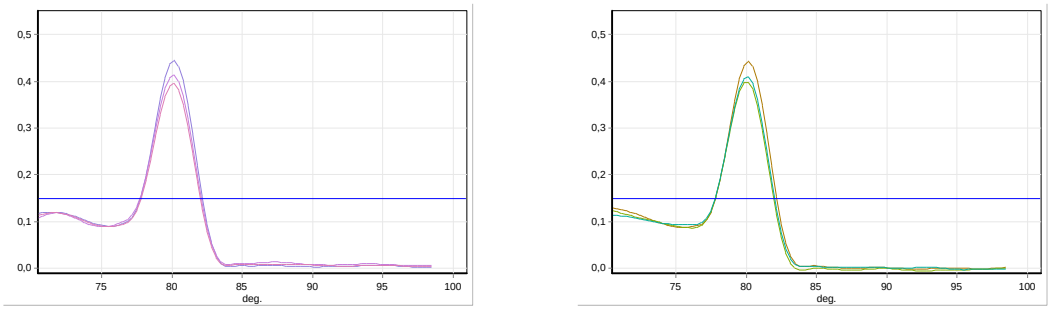
Şekil 4.55. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de miR224 erime eğrisi grafiği



Şekil 4.56. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta miR224 erime eğrisi grafiği

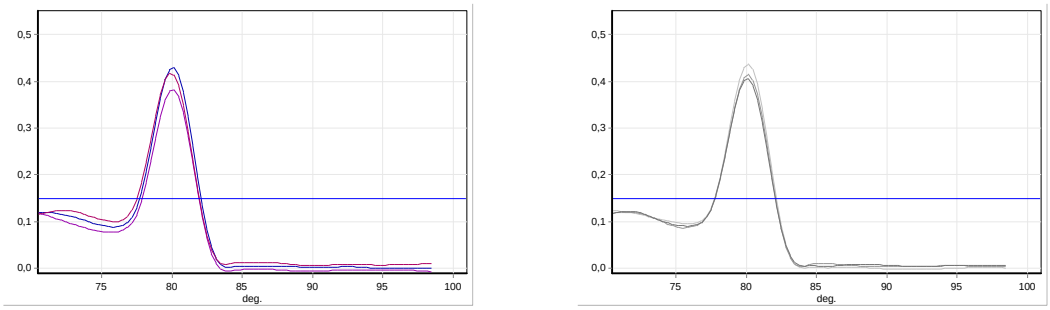
Fe süperoksidaz dismutaz (Fe SOD) ifade analizinde, qRT-PCR'ın sadece tek bir ürün oluşturup oluşturmadığını belirlemek için erime eğrisi (melting curve) analizi yapılmıştır. Erime eğrisi analizi sonucunda, reaksiyon grafiğinde yalnızca bir zirve gözlemlenmiş ve bu durumda reaksiyonda, bir tane Fe süperoksidaz dismutaz (Fe SOD) ürünü (amplicon) olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.57. ve Şekil 4.58.)

a **b**



Şekil 4.57. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de Fe SOD erime eğrisi grafiği

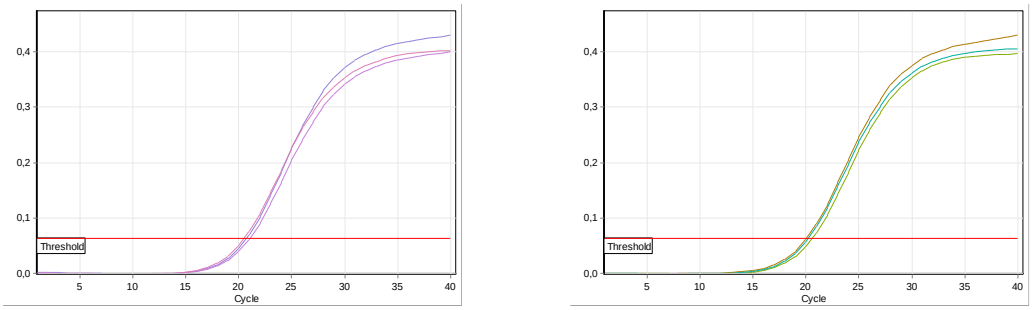
a **b**



Şekil 4.58. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta Fe SOD erime eğrisi grafiği

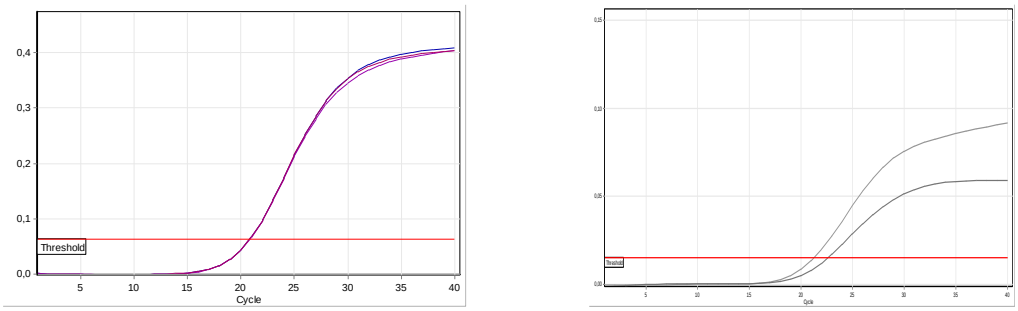
Kontrol ve kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank'ta miR224'ün qRT-PCR analizinden elde edilen PCR ürünü çoğalma eğrisi sonuçları Şekil 4.59. ve 4.60.'da gösterilmiştir. Ayrıca, tahmini hedef gen Fe SOD'un, kontrol ve kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank'taki qRT-PCR analiz sonucunda elde edilen PCR ürünü çoğalma eğrisi Şekil 4.61. ve Şekil 4.62.'de sunulmuştur.

a **b**



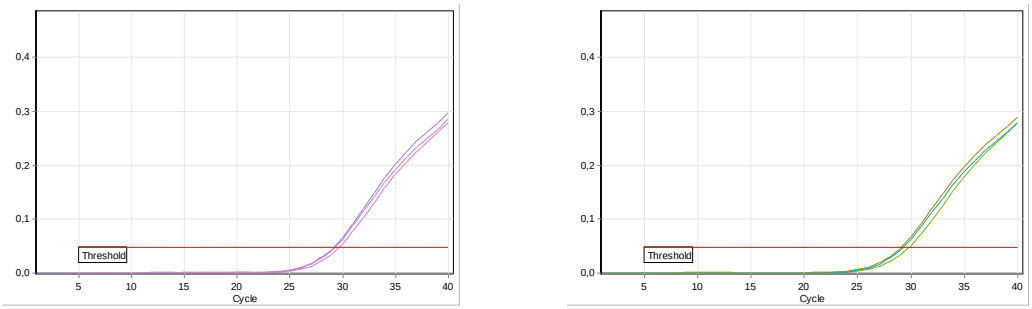
Şekil 4.59. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de miR224 PCR ürünü çoğalma eğrisi

a **b**



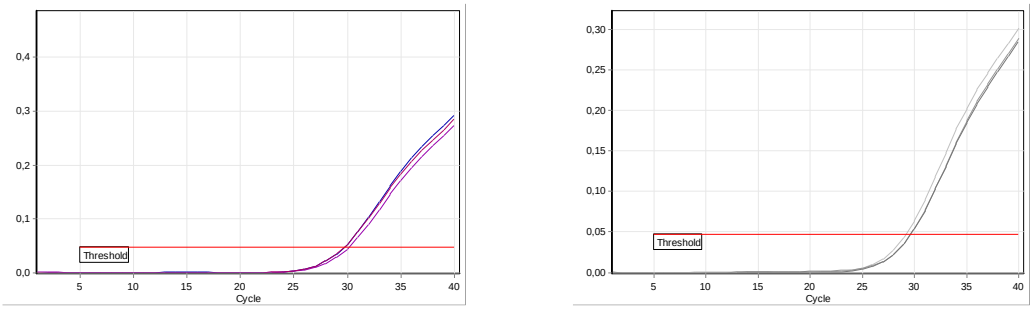
Şekil 4.60. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta miR224 PCR ürünü çoğalma eğrisi

a **b**



Şekil 4.61. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de Fe SOD PCR ürünü çoğalma eğrisi

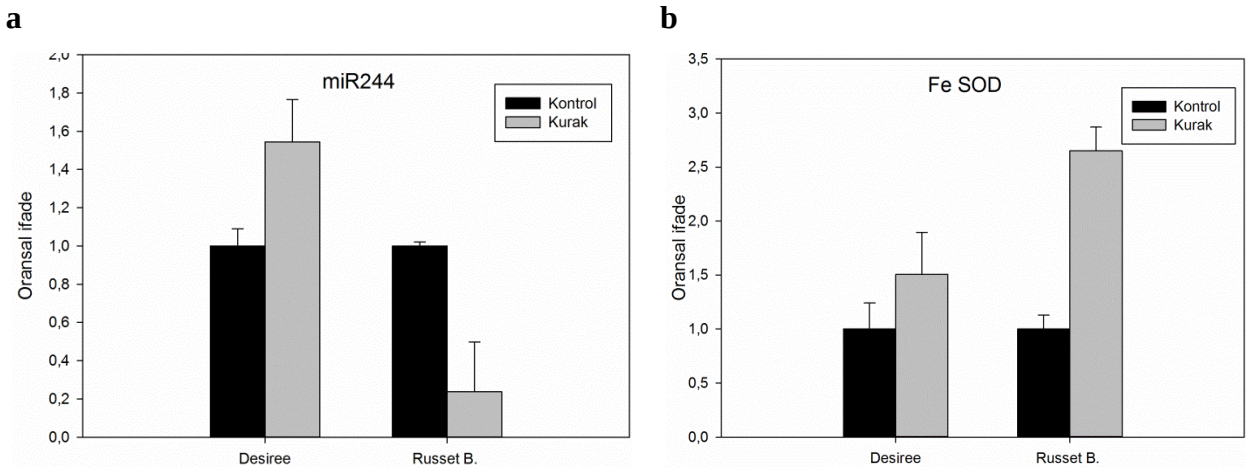
a **b**



Şekil 4.62. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta Fe SOD PCR ürünü çoğalma eğrisi

Desiree ve Russet Burbank'ta kontrol ve kurak koşullarda, miR224 ve Fe SOD ifadesine ait qRT-PCR analizi sonuçları Şekil 4.63.'de sunulmuştur. Desiree'de kurak koşullarda miR224'ün ifadesinde hafif bir artış meydana gelirken, Russet Burbank'ta kurak koşullarda miR224'ün ifadesi önemli ölçüde azalmıştır. Fe SOD'un kurak koşullarda

Desiree çeşidinde hafif artış gösterdiği, Russet Burbank'ta ise 2,5 kattan fazla bir ifade artışı olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.63. Desiree ve Russet Burbank'ta miR224 (a) ve Fe SOD (b) ifade analizi

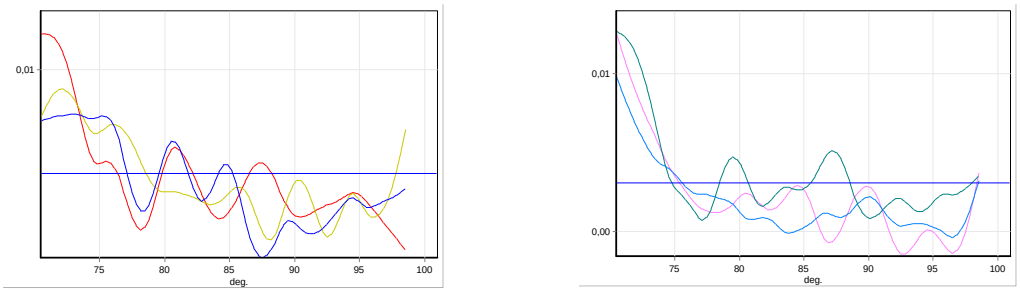
Lakhotia vd., (2014) çalışmalarında, biyoinformatik analizleri kullanarak, miR224'ün hedef geninin Fe SOD olduğunu tahmin etmişlerdir. Tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalar sonucunda kurak koşullarda miR224'ün ifadesinin Desiree'de önemli düzeyde değişmediği ve buna benzer şekilde tahmini hedef gen Fe SOD'un ifadesinin de Desiree'de önemli bir değişim oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Bunun yanında, kurak koşullarda miR224'ün ifadesi Russet Burbank'ta önemli düzeyde (%76,2) azalırken, tahmini hedef gen Fe SOD'un ifadesi tersine 2,6 kat artmıştır. Bu sonuçlar, aynı gen veya aynı miRNA'ların stres koşulları altında, aynı türe ait farklı çeşitlerde ifadelerinin farklı olabileceğini ortaya koymaktadır.

Önceki biyoinformatik analiz sonuçları ve tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalar bir arada değerlendirildiğinde, özellikle Russet Burbak çeşidinde miR224 ile Fe SOD ifadelerinde zıt bir model oluşması nedeniyle, miR224'un transkripsiyon sonrası düzenleme ile Fe SOD'un ifadesinde artışa neden olmuş olabilceği düşünülmektedir. Tez kapsamında elde edilen deneysel sonuçlar, miR224'un hedef geninin Fe SOD olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu durumun ispatlanması için patateste transgenik yaklaşımlar kullanılarak daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

4.2.2.5 stu-miR742 qRT-PCR analizi

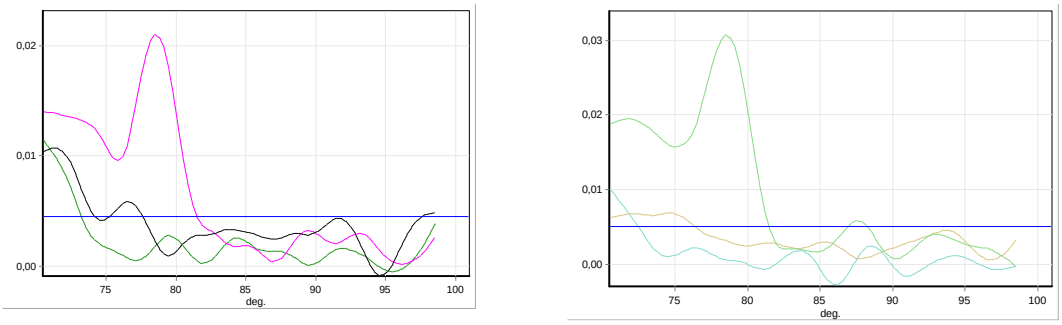
stu-miR742 ifade analizinde, qRT-PCR'ın sadece tek bir ürün oluşturup oluşturmadığını belirlemek için erime eğrisi (melting curve) analizi yapılmıştır. Erime eğrisi analizi sonucunda (Şekil 4.64.), Desiree'nin hem kontrol hem de kurak reaksiyon grafiğinde bir zirve oluşmamış ve bu durumda yapılan qRT-PCR'da stu-miR742'ye ait bir ürünün elde edilemediği belirlenmiştir. Kontrol ve kurak koşullardaki Russet Burbank'in reaksiyon grafikleri incelendiğinde (Şekil 4.65.), her iki koşulda da 3 teknik tekrarın bir tanesinde zirve oluştuğu görülmektedir. Böylece, kontrol ve kurak koşullardaki Russet Burbank, qRT-PCR analizlerinin birer tekrarında ürün oluştumuştur.

a **b**



Şekil 4.64. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de stu-miR742 erime eğrisi grafiği

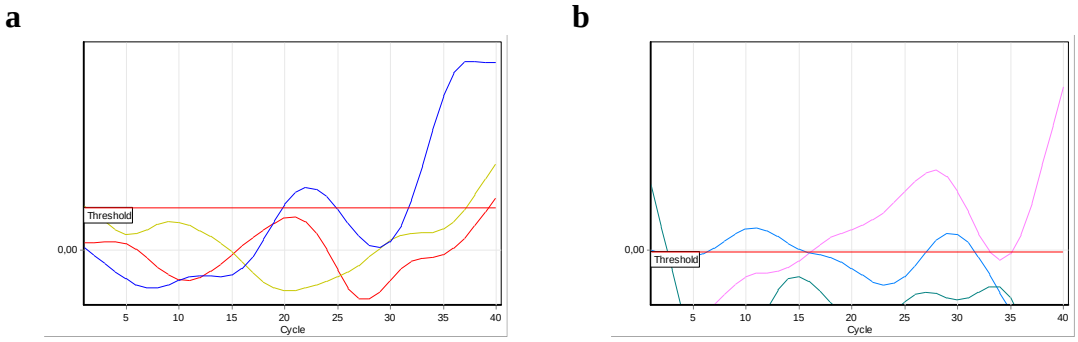
a **b**



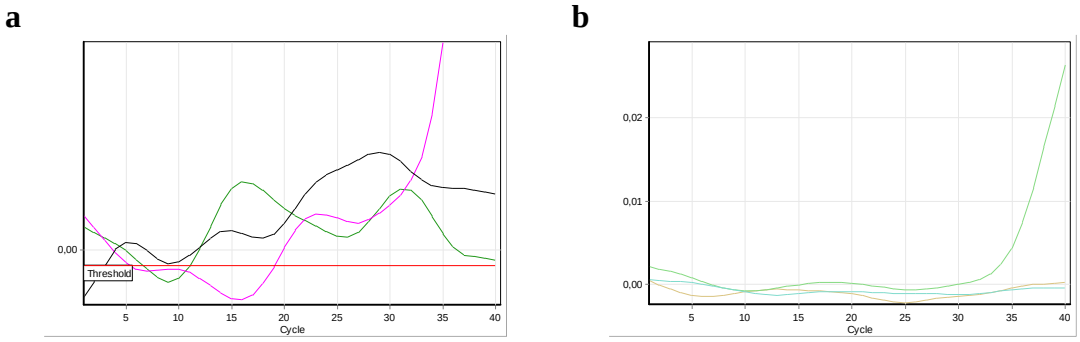
Şekil 4.65. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet stu-miR742 erime eğrisi grafiği

Kontrol ve kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank'ta stu-miR742'nin qRT-PCR analiz sonucunda elde edilen PCR ürünü çoğalma eğrisi sonuçları Şekil 4.66. ve 4.67.'de sunulmuştur. stu-miR742 ile yapılan qRT-PCR analizlerinden güvenilir sonuçların elde edilememesi nedeniyle bu miRNA'ya ait oransal ifade değişim grafikleri çizilmemiştir. stu-miR742'nin hedefi olduğu tahmin edilen Fe SOD geninin, kontrol ve kurak koşullarda

Desiree ve Russet Burbank'taki ifadesine ait qRT-PCR analiz sonucunda elde edilen PCR ürünü çoğalma eğrisi Şekil 4.61. ve 4.62.'de sunulmuştur.



Şekil 4.66. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de stu-miR742 PCR ürünü çoğalma eğrisi



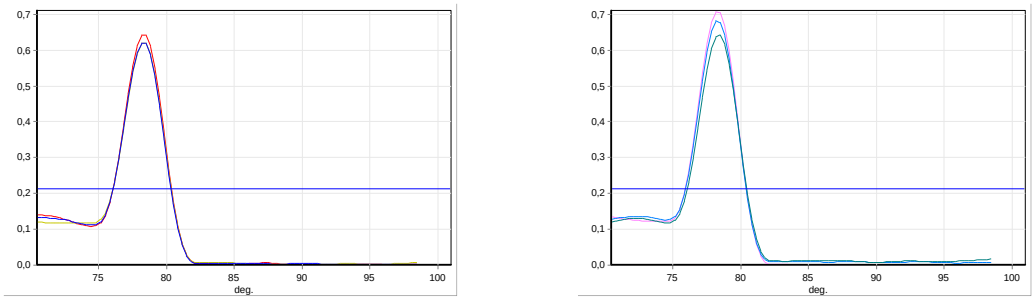
Şekil 4.67. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta stu-miR742 PCR ürünü çoğalma eğrisi

4.2.2.6 Piyrolin-5-karboksilat sentaz qRT-PCR analizi

Piyrolin-5-karboksilat sentaz (Pyrroline-5-carboxylate synthase; P5CS) ifade analizinde, qRT-PCR'ın sadece tek bir ürün oluşturup oluşturmadığını belirlemek için erime eğrisi (melting curve) analizi yapılmıştır. Erime eğrisi analizi sonucunda, reaksiyon grafiğinde yalnızca bir zirve gözlemlenmiş ve bu durumda reaksiyonda bir tane P5CS ürünü (amplicon) olduğu doğrulanmıştır.

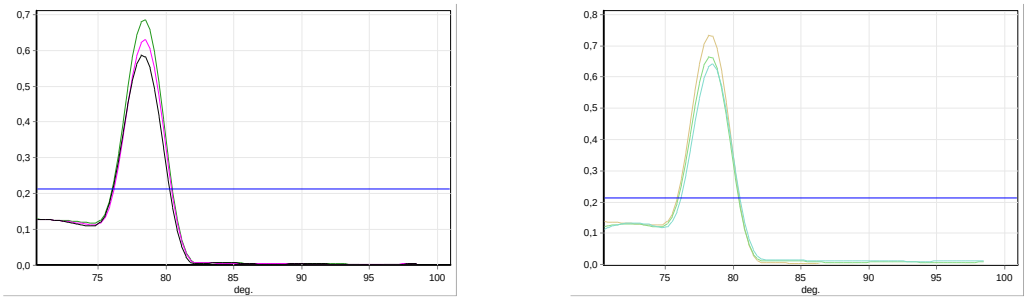
Desiree ve Russet Burbank'ta P5CS'nin erime eğrisi analiz sonuçları Şekil 4.68. ve Şekil 4.69.'da verilmiştir.

a **b**



Şekil 4.68. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree P5CS erime eğrisi grafiği

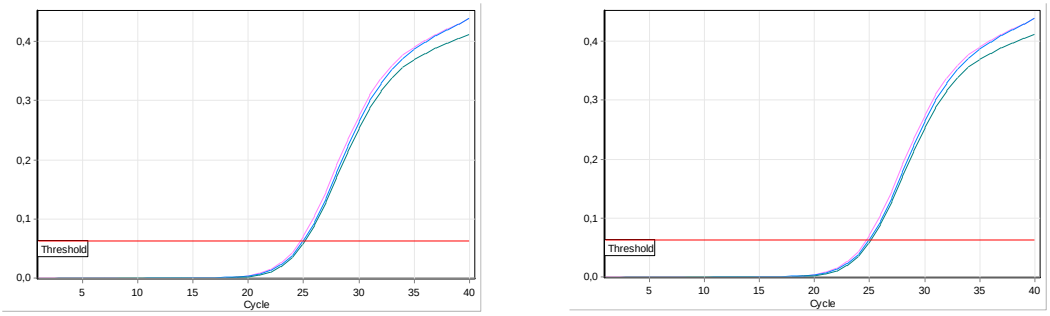
a **b**



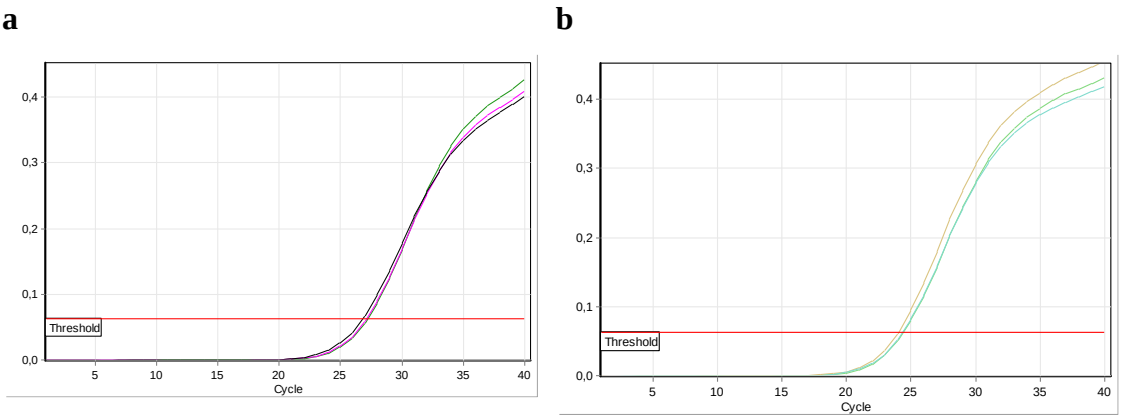
Şekil 4.69. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank P5CS erime eğrisi grafiği

P5CS geninin, kontrol ve kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank'taki qRT-PCR analiz sonucunda elde edilen PCR ürünü çoğalma eğrisi Şekil 4.70. ve 4.71.'de sunulmuştur.

a **b**

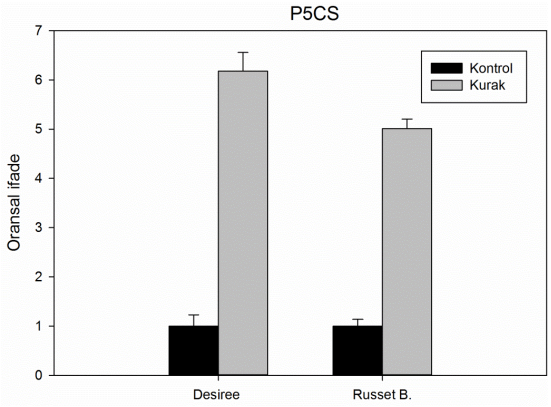


Şekil 4.70. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Desiree'de P5CS PCR ürünü çoğalma eğrisi



Şekil 4.71. Kontrol (a) ve kurak (b) koşullarda Russet Burbank'ta P5CS PCR ürünü çoğalma eğrisi

Desiree ve Russet Burbank'ta kontrol ve kurak koşullarda, P5CS ifadesine ait qRT-PCR analizi sonucu Şekil 4.72.'de sunulmuştur. Prolin sentezinde rol alan P5CS geninin ifadesi kurak koşullarda Desiree'de 6,17 kat, Russet Burbank'te ise 5,01 kat artış göstermiştir. P5CS gen ifadesindeki bu artış kurak koşullarda Desiree ve Russet Burbank'teki prolin seviyesinin artışıyla uyum içerisindedir.



Şekil 4.72. Desiree ve Russet Burbank'ta P5CS ifade analizi

Bitkilerde prolin metabolizmasının regülasyonuna bakıldığında, su eksikliği esnasında prolin biyosentezi ve katabolizması aktive olur ve koşullar normale döndüğünde aktifliği sona erer. Daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında, P5CS genlerinin tütünde uzun süreli kuraklık koşullarında artan ifade gösterdikleri bildirilmiş ve yapraklarda prolin mekanizmasında etkili olan genlerin ifade seviyeleri ile serbest prolin konsantrasyonunun ilişkili olduğu gösterilmiştir (Szabados ve Savoure, 2009). Huang vd., (2013) tarafından yapılan çalışmada, prolin sentezinde görev yapan P5CS geni *Helianthus tuberosus* L. bitkilerine aktarılmış ve tuz stresi altında enzim aktivitelerinde artış meydana geldiği

bildirilmiştir. Transgenik tütün bitkileri üzerinde yapılan çalışmalarda, P5CS gen aktivitesinin arttırılmasına bağlı olarak prolin biyosentezindeki artış gözlenmiş, böylece ROS seviyesinde düşüş olduğu bildirilmiştir (Kavi Kishor, 2005). Prolinin osmotik stres koşullarında hücre içerisindeki yapılar ve makromolekülleri koruyan bir ozmolit olmasının yanında, doğrudan ROS tutma özelliğine sahip olduğu da görülmüştür. Prolinin, ROS tutma özelliğin ek olarak, ROS yakalayıcı enzimleri koruyup stabilize ettiği ve alternatif detoksifikasyon yollarını olumlu etkilediği görülmüştür (Kavi Kishor, 2005). Çeltikte yapılan araştırmada, prolin ön uygulaması civa toksitesi durumunda, ROS'ların yakalanmasına yardımcı olmuştur. Böylece bitki civa toksitesinden korunmaya çalışmıştır (Szabados ve Savoure, 2009). Bilindiği gibi prolin önemli ozmatik koruyucu olup, hücresel yapıların koruması için reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılmasında rol oynarken, kuraklık stresine yanıtta ozmotik düzenleme P5CS gibi spesifik enzimler tarafından sağlanmaktadır. Çalışmamızda P5CS genine bakıldığında, kuraklık koşullarında ifadesinin artığı görülmektedir. Bu sonuçlara göre, kurak koşullarda prolin birikiminin artması Desiree ve Russet Burbank çeşitlerinde, hücrelerinin ozmotik potansiyelinin devam etmesine ve oksidatif zararın azalmasına katkı sağlamış olabilir.

BÖLÜM V

TARTIŞMA

Abiyotik (kuraklık, tuzluluk, düşük ve yüksek sıcaklıklar, besin eksiklik veya fazlalıkları, ağır metaller, hava kirliliği, radyasyon) ve biyotik (bakteri, virüs, hastalık oluşturan mantar gibi zararlılar) olarak ayrılan stres faktörleri nedeniyle, bitki büyüme ve gelişmesi olumsuz etkilenmekte ve bunlara bağlı olarak bitkisel üretimde verim düşüklüğü gibi tarımsal üretimi etkileyecek birçok olumsuzluklar görülmektedir. Bunlar içerisinde, kuraklık bitkisel üretimi sınırlandıran en önemli abiyotik stres faktörlerinden biridir. Bu nedenle bitkilerin kuraklık stresine karşı verdiği tepki, gelişme dönemine, morfolojisine, verim potasiyeline ve genetik potansiyeline bağlı olduğundan bitkilerin morfolojik ve fizyolojik yapılarında farklı değişmelere neden olmaktadır. Su stresi altındaki bitkilerde gerçekleşen morfolojik ve fizyolojik değişimlere bakıldığında, terleme ve fotosentez azalması, bitki bünyesindeki hormonlardan absisik asitin (ABA) artması, protein metabolizmasının bozulması, prolin birikiminin artması, solunumun azalması, stomaların kapanması ve yaprak alanında azalma şeklinde görülen değişimler bitkiler tarafından su kaybının azaltılmasında geliştirilen önemli mekanizmalardır. Bitkilerin strese toleransta gösterdikleri bu tepkiler ve karmaşık biyolojik olaylar dizisi olan strese toleransın anlaşılması gerektirmektedir. Bu çalışmada, patatesin bitkilerin kuraklık stresine karşı gösterdiği tepkinin genetik, fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalarını iyi anlayarak, kuraklığa toleranslı patates bitkilerinin geliştirilmesine yönelik araştırmalara katkı sağlanması amaçlanmıştır

Kuraklığa karşı moleküler seviyede geliştirilen mekanizmalara bakıldığında, miRNA'lar vasıtasıyla bazı genlerin ifadelerinin baskılanması veya bazı genlerin ifadelerinin arttırılması gibi ifade düzenlemeleri ile bitkilerin miRNA'lar aracılığıyla kuraklığa karşı tolerans mekanizması geliştirdiği belirlenmiştir. Bu durum, kuraklığa toleransta miRNA'ların işlevlerinin keşfedilmesi, moleküler olarak doğrudan düzenlenlemelerle istenilen tarımsal karakterlerin elde edilmesi ve bitki ıslahında uygulanabilmesinin mümkün olabileceği fikrini uyandırmıştır. Bu bilgiler ışığında, tez çalışmasında, antioksidanların süpürülmesi mekanizmasında rol oynayan ve patatesin kuraklığa

tolerasında önemli bir role sahip olduğu SOD'u hedef aldığı tahmin edilen miRNA'ların ve tahmini hedef genlerinin kurak koşullar altında Desiree ve Russet Burbank çeşitlerindeki ifade değişiklikleri araştırılmıştır.

Tez kapsamında incelelen fizyolojik ölçümlere bakıldığında, kuraklık uygulamasının özellikle 9. ve 10 günlerinde meydana gelen, fotosentez hızının düşmesi, stoma iletkenliğinin azalması, terleme hızının düşmesi, yaprak oransal su içeriğinin düşmesi, bitki sıcaklığının artması, prolin içeriğinin artması, malondialdehit miktarının artması, tek yumru ağırlığının düşmesi ve bitki yumru veriminin azalması şeklinde görülen değişimler, incelenen patates çeşitlerinin su kesilmesinin 9. ve 10. gününde strese girdiklerini göstermiştir.

Bu tez çalışması sayesinde, incelenen miRNA'ların kuraklık stresi koşullarında patates bitkisindeki düzenleyici rolü hakkında ilk bilgiler elde edilmiştir. Tez çalışmasında elde edilen verilerden, kuraklık stresi koşullarında, Desiree ve Russset Burbank'ta stu-miR398a'nın ifadesi azalmış ve tahmini hedef geni Cu/Zn SOD'un ifadesi her iki çeşitte artmıştır. Ayrıca, kuraklık stresi koşullarında, miR224'ün ifadesi Desire'de önemli düzeyde değişmemiş ancak Russet Burbank çeşidinde çarpıcı düzeyde azalmıştır. miR224'ün hedef geni Fe SOD'un ifadesi kuraklık stresi koşullarında Desiree'de önemli düzeyde değişmezken, Russet Burbank çeşidinde 2.5 kat artmıştır.

Sonuç olarak, patateste stu-miR398a'nın hedefinin Cu/Zn SOD ve miR224'ün hedefinin Fe SOD olabileceğine dair moleküler seviyede ilk deneysel bulgular elde edilmiştir. Ayrıca, elde edilen bulgular kapsamında, stu-miR398a ve miR224'ün kuraklık stresi koşullarında sırasıyla Cu/Zn SOD ve Fe SOD'un ifadesini transkripsiyon sonrası aşamada düzenliyor olabileceği ve böylece kuraklıktan kaynaklanan zararlanmanın azalatılmasına katkı sağlıyor olabileceği tahmin edilmektedir. Tez kapsamında, elde edilen bu bulgular, stu-miR398a'nın ve miR224'ün patatesin kuraklığa tolerasındaki işlevinin aydınlatılmasına yönelik çalışmalara katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Agarwal, S. and Mangrauthia, S.K., "Advances, challenges and prospects in small RNA mediated approaches of virus resistance in plants", ***Journal of Genomes and Exomes*** 2(2), 43-62, 2013.

Akkuş, İ., Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, ***Mimoza Yayınları***, Konya, 1995.

Aküzüm, T., Çakmak, B. and Gökalp, Z., "Türkiye'de Su Kaynakları Yönetiminin Değerlendirilmesi", ***Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*** 3(1), 67-74, 2010.

Anithakumari, A.M., Nataraja, K.N., Visser, R.G.F. and Linden, C.G., "Genetic dissection of drought tolerance and recovery potential by quantitative trait locus mapping of a diploid potato population", ***Molecular Breeding*** 30, 1413-1429, 2012.

Anjum, S.A., Xie, X., Wang, L., Saleem, M.F., Man, C. and Lei, W., "Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stres", ***African Journal of Agricultural Research*** 6, 2026-2032, 2011.

Apel, K. and Hirt, H., "Reactive Oxygen Specıes: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction", ***Annual Review of Plant Biology*** 55, 373, 2004.

Asada, K., "The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons", ***Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*** 50, 601-639, 1999.

Ashraf, M., "Breeding for salinity tolarence in plants", ***Critical Rewievs in Plant Sciences*** 13(1), 27-42, 1994.

Atkinson, D.E., Cellular Energy Metabolism and its Regulation, ***Academic Press***, New York, 1977.

Bahadır, M., "Güneydoğu anadolu proje (gap) alanında sıcaklık ve yağışın trend analizi", ***The Journal Of International Social Research*** 4(16), 48-57, 2011.

Bansal, K.C. and Nagarajan, S., "Leaf water content, stomatal conductance and proline accumulation in leaves of Potato (*Solanum tuberosum* L.) in response to water stres", ***Indian Journal of Plant Physiology*** 29, 397-404, 1986.

Bansal, K.C. and Nagarajan, S., "Reduction of leaf growth by water stress and its recovery in relation to transpiration and stomatal conductance in some potato genotypes", ***Potato Research*** 30, 497-506, 1987.

Beauclair, L., Yu, A. and Bouche, N., "microRNA-directed cleavage and translational repression of the copper chaperone for superoxide dismutase mRNA in Arabidopsis", ***The Plant Journal*** 62, 454-462, 2010.

Bej, S. and Basak, J., "MicroRNAs: The Potential Biomarkers in Plant Stress Response", ***American Journal of Plant Sciences*** 5, 748-759, 2014.

Bhargava, S. and Sawant, K., "Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene Expression", ***Plant Breeding*** 132, 21-32, 2013.

Büyük, İ., Soydam, S. ve Aras, S., "Bitkilerin Stres Koşullarına Verdiği Moleküler Cevaplar", ***Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*** 69(2), 97-110, 2012.

Chen, C., Ridzon, D.A., Broomer, A.J., Zhou, Z., Lee, D.H., Nguyen, J.T., Barbisin, M., Xu, N.L., Mahuvakar, V.R., Andersen, M.R., Lao, K.Q., Livak, K.J. and Guegler, K.J., "Realtime quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR", ***Nucleic Acids Research*** 33, 179, 2005.

Chuck, G., Candela, H. and Hake, S., "Big impacts by small RNAs in plant development", ***Current Opinion in Plant Biology*** 12, 81-86, 2009.

Claussen, W., "Proline as a measure of stress in tomato plants", ***Plant Science*** 168, 241-248, 2005.

Cornic, G., "Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture – not by affecting ATP synthesis", ***Trends in Plant Science*** 5, 187-188, 2000.

Covarrubais, A.A. and Reyes, J.L., "Post-transcriptional gene regulation of salinity and drought responses by plant microRNAs", ***Plant, Cell and Environment*** 33, 481-489, 2010.

Cowan, I.R. and Farquhar, G.D., "Stomatal function in relation to leaf metabolism and environment", ***Symposium of the Society for Experimental Biology*** 31, 471-505, 1977.

Deblonde, P.M.K., Haverkort, A.J. and Ledent, J.F., "Responses of early and late potato cultivars to moderatedrought conditions: agronomic parameters and carbon iso-tope discrimination", ***European Journal of Agronomy*** 11, 91-105, 1999.

Deblonde, P.M.K. and Ledent, J.F., "Effects of moderate drought conditions on green leaf number stem height, leaf length and tuber yield of potato cultivars", ***European Journal of Agronomy*** 14, 31-41, 2001.

Delauney, A.J. and Verma, D.P.S., "Proline biosynthesis and osmoregulation in plants", ***Plant Journal*** 4, 215-223, 1993.

Dimitra, A.L., Derrick, M. and Glen, L., "Water-deficit stress in cotton. In: Oosterhuis, D.M. (ed). Stress Physiology in Cotton", ***Cordova*** 5(37-72), 2011.

Din, M. and Barozai, M.Y.K., "Profiling microRNAs and their targets in an important fleshy fruit: tomato (*Solanum lycopersicum*)", ***Gene*** 535, 198-203, 2014.

Dolferus, R., "To grow or not to grow: A stressful decision for plants", ***Plant Science*** 2229, 247-261, 2014.

Du, T. and Zamore, P.D., "microPrimer: the biogenesis and function of microRNA", ***Development*** 132, 4645-4652, 2005.

Eiasu, B.K., Soundy, P. and Hammes, P.S., "Response of potato (*Solanum tuberosum*) tuber yield components to gel polymer soil Amendments and irrigation regimes", ***New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*** 35(1), 25-31, 2007.

Eldem, V., Okay, S. and Ünver, T., "Plant microRNAs: New players in functional genomics", ***Turkish Journal of Agriculture and Forestry*** 37, 1-21, 2013.

Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. and Basra, S.M.A., "Plant drought stress: effects, mechanisms and management", ***Agronomy for Sustainable Development*** 29, 185-212, 2009.

Foyer, C.H. and Harbinson, J., Relationship between antioxidant metabolism and carotenoids in the regulation of photosynthesis", In The Photochemistry of Carotenoids, ***Kluwer Academic Publisher***, Dordrecht, The Netherlands, 1999.

Garchery, C., Gest, N., Do, P.T., Alhagdow, M., Baldet, P., Menard, G., Rothan, C., Massot, C., Gautier, H., Aarrouf, J., Fernie, A.R. and Stevens, R., "A diminution in ascorbate oxidase activity affects carbon allocation and improves yield in tomato under water deficit", ***Plant, Cell and Environment*** 36, 159-175, 2013.

Gest, N., Garchery, C., Baldet, B., Causse, M., Duboscq, R., Gautier, H., Riqueau, G., Sauvage, C. and Stevens, R., "Variation in tomato fruit ascorbate levels and consequences of manipulation of ascorbate metabolism on drought stress tolerance", ***Acta Horticulturae***, 75-84, 2014.

Guan, Q., Lu, X., Zeng, H., Zhang, Y. and Zhu, J., "Heat stress induction of miR398 triggers a regulatory loop that is critical for thermotolerance in Arabidopsis", ***Plant Journal*** 74(5), 840-851, 2013.

Hamdy, A., Ragab, R. and Scarascia-Mugnozza, E., "Coping with water scarcity: water saving and increasing water productivity", ***Irrigation and Drainage*** 52, 3-20, 2003.

Handa, S., Handa, A.K., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A., "Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stres", ***Plant Physiology*** 80, 938-945, 1986.

Hare, P.D. and Cress, W.A., "Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants", ***Plant Growth Regulation*** 21, 79-102, 1997.

Heuer, B. and Nadler, A., "Physiological response of potato plants to soil salinity and water deficit", ***Plant Science*** 137, 43-51, 1988.

Huang, Z., Zhao, L., Chen, D., Liang, M., Liu, Z., Shao, H. and Long, X., "Salt Stress Encourages Proline Accumulation by Regulating Proline Biosynthesis and Degradation in Jerusalem Artichoke Plantlets", ***PLoS ONE*** 8(4), e62085, 2013.

Hwang, E.W., Shin, S.J. and Kwon, H.B., "Identification of microRNAs and their putative targets that respond to drought stress in *Solanum tuberosum*", ***Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*** 54, 317-324, 2011.

Hwang, E.W., Shin, S.J., Park, S.C., Jeong, M.J. and Kwon, H.B., "Identification of miR172 family members and their putative targets responding to drought stress in *Solanum tuberosum*", ***Genes and Genomics*** 33, 105-110, 2011.

Hwang, E.W., Shin, S.J., Yu, B.K., Byun, M.O. and Kwon, H.B., "miR171 family members are involved in drought response in *Solanum tuberosum*", ***Journal of Plant Biology*** 54, 43-48, 2011.

Iwama, K., "Physiology of the potato: new insights into root system and repercussions for crop management", ***Potato Research*** 51, 333-353, 2008.

Jefferies, R.A. and Mackerron, D.K.L., "Aspects of the physiological-basis of cultivar differences in yield of potato under droughted and irrigated conditions", ***Potato Research*** 30, 201-217, 1987.

Jefferies, R.A. and MacKerron, D.K.L., "Carbon isotope discrimination in irrigated and droughted potato (*Solanum tuberosum* L)", ***Plant, Cell and Environment*** 20, 124-130, 1997.

Jia, X., Wang, W.X., Ren, L., Chen, Q.J., Mendu, V., Willcut, B., Dinkins, R., Tang, X. and Tang, G., "Differential and dynamic regulation of miR398 in response to ABA and salt stress in Populus tremula and Arabidopisis thaliana", ***Plant Molecular Biology*** 71, 51-59, 2009.

Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. and Bartel, B., "MicroRNAs and their regulatory roles in plants", ***Annual Review of Plant Biology*** 57, 19-53, 2006.

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

Kai, Z.S. and Pasquinelli, A.E., "MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs", ***Nature Structural and Molecular Biology*** 17, 5-10, 2010.

Kapluhan, E., "Türkiye'de kuraklık ve kuraklığın tarıma etkisi", ***Marmara Coğrafya Dergisi*** 27, 487-510, 2013.

Kavi-Kishor, P.B., Sangam, S., Amrutha, R.N., Sri-Laxmi, P., Naidu, K.R., Rao, K.R.S.S., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P. and Sreenivasulu, N., "Regulation of

prolinebiosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance", ***Current Science*** 88(3), 424-438, 2005.

Kim, H.J., Baek, K.H., Lee, B.W., Choi, D. and Hur, C.G., "In silico identification and characterization of microRNAs and their putative target genes in Solanaceae plants", ***Genome*** 54, 91-98, 2011.

Kim, J., Krichevsky, A., Grad, Y., Hayes, G.D., Kosik, K.S., Church, G.M. and Ruvkun, G., "Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons", ***Proceedings of the National Academy of Sciences*** 101, 360-365, 2004.

Kim, V.N., "MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing", ***Nature Reviews Molecular Cell Biology*** 6, 376-385, 2005.

Kishor, P.B.K., Hong, Z., Miao, G.H., Hu, C.A.A. and Verma, D.P.S., "Overexpression of Δ1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants", ***Plant Physiology and Biochemistry*** 108, 1387-1394, 1995.

Kramer, M.F., "Stem-loop RT-qPCR for miRNAs", ***Current Protocols in Molecular Biology*** 15, 10-15, 2011.

Kulshreshta, S., Mishra, D.P. and Gupta, R.K., "Changes in content of cholorophyll, proteins and lipids in whole choloplast and chloroplast membrane fractions at different leaf water potentials in drought resistant and sensitive genotypes of wheat", ***Photosynthetica*** 21(1), 65-70, 1987.

Kumar, D., Singh, V., Singh, R.P., Singh, B.P. and Naik, P.S., "Performance of in vitro plantlets for production of mini-tubers in vector free environment", ***American Journal of Potato Research*** 34, 131-132, 2007.

Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. and Tuschl, T., "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs", ***Science*** 294, 853-858, 2001.

Lakhotia, N., Joshi, G., Bhardwaj, A.R., Katiyar-Agarwal, S., Agarwal, M., Jagannath, A., Goel, S. and Kumar, A., "Identification and characterization of miRNAome in root, stem, leaf and tuber developmental stages of potato (*Solanum tuberosum* L.) by high-throughput sequencing", ***BMC Plant Biology*** 14(6), 1-16, 2014.

Levy, D., "Water deficit enhancement of proline and amino nitrogen accumulation in potato plants and its association with susceptibility to drought", ***Physiologia plantarum*** 57, 169-173, 1983.

Levy, D., "The response of potatoes to a single transient heat or drought stress imposed at different stages of tuber growth", ***Potato Research*** 28, 415-424, 1985.

Levy, D. and Tai, G.C.C., "Differential response of potatoes (Solanum tuberosum L.) to salinity in an arid environment and field performance of the seed tubers grown with fresh water in the following season", ***Agricultural Water Management*** 116, 122-127, 2013.

Li, W.X., Oono, Y., Zhu, J., He, X.J., Wu, J.M., Iida, K., Lu, X.Y., Cui, X., Jin, H. and Zhu, J.K., "The Arabidopsis NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance", ***Plant Cell*** 20, 2238-2251, 2008.

Liu, H.H., Tian, X., Li, Y.J., Wu, C.A. and Zheng, C.C., "Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in Arabidopsis thaliana", ***RNA*** 14, 836-843, 2008.

Liu, Q. and Chen, Y.Q., "A new mechanism in plant engineering: the potential roles of microRNAs in molecular breeding for crop improvement", ***Biotechnology Advances*** 28(3), 301-307, 2010.

Loreto, F., Centritto, M. and Chartzoulakis, K., "Photosynthetic limitations in olive cultivars with different sensitivity to salt stres", ***Plant, Cell and Environment*** 26, 595-601, 2003.

Loreto, F. and Velikova, V., "Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes", ***Plant Physiology and Biochemistry*** 127, 1781-1787, 2001.

Lv, D.K., Bai, X., Li, Y., Ding, X.D., Y.Ge, Cai, H., Ji, W., Wu, N. and Zhu, Y.M., "Profiling of cold-stress-responsive miRNAs in rice by microarrays", ***Gene*** 459, 39-47, 2010.

Majumdar, S., Ghosh, S., Glick, B.R. and Dumbroff, E.B., "Activities of chlorophyllase, phosphoenopyruvate carboxyllase and ribolose-1, 5- bisphosphate carboxilase in primary leaves of soybean during senescence and drought", ***Physiologia plantarum*** 81, 473-480, 1991.

Mansour, M.M.F., "Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycinebetaine and proline against NaCl stres", ***Plant Physiology and Biochemistry*** 36, 767-772, 1998.

Medlyn, B.E., "Comment on "Drought-induced reduction in global terrestrial net primary production from 2000 through 2009", ***Science*** 333(6046), 1093-1093, 2011.

Medlyn, B.E., "Drought-Induced Reduction in Global Terrestrial Net Primary Production from 2000 to 2009", ***Science*** 333(6046), 1093-1093, 2011.

Medrano, H., Parry, M.A., Socias, X. and Lawlor, D.W., "Long term water stress inactivates Rubisco in subterranean clover", ***Annals of Applied Biology*** 131, 491-501, 1997.

Mendu, V., "Roles of Micrornas In Plant Abiotic Stress, Development And Viral Infection", ***University of Kentucky Doctoral Dissertations*** 663, 1-10, 2008.

Miyashita, K., Tanakamaru, S., Maitani, T. and Kimura, K., "Recovery responses of photosynthesis, transpiration, and stomatal conductance in kidney bean following drought stres", ***Environmental and Experimental Botany*** 53, 205-214, 2005.

Molnár, I., Dulai, S., Csernák, Á., Prónay, J. and Molnár-Láng, M., "Photosynthetic responses to drought stress in different Aegilops species", ***Acta Biologica Szegediensis*** 49(12), 141-142, 2005.

Monneveux, P., Ramírez, D.A. and Pıno, M.T., "Drought tolerance in potato (S. tuberosum L.) Can we learn from drought tolerance research in cereals?", ***Plant Science*** 205(206), 76-86, 2013.

Naqvi, A.R., Islam, M.N., Choudhury, N.R. and Haq, Q.M., "The fascinating world of RNA interference", ***International Journal of Biological Sciences*** 5, 97-117, 2009.

Ni, Z., Hu, Z., Jiang, Q. and Zhang, H., "GmNFYA3, a target gene of miR169 is a positive regulator of plant tolerance to drought stress", ***Plant Molecular Biology*** 82, 113-129, 2013.

Noctor, G., Veljovic-Jovanovic, S., Driscoll, S., Novitskaya, L. and Foyer, C.H., "Drought and oxidative load in wheat leaves: A predominant role for photorespiration?", ***Annals of Botany*** 89, 841-850, 2002.

Ordog, A., Wodala, B., Rozsavolgyi, T., Tari, I. and F., H., "Regulation of guard cell photosynthetic electron transport by nitric oxide", ***Journal of Experimental Botany*** 64, 1357-1366, 2013.

Ou, Y., Liu, X., Xie, C., Zhang, H., Lin, Y., Li, M., Song, B. and Liu, J., "Genome-Wide Identification of microRNAs and Their Targets in Cold-Stored Potato Tubers by Deep Sequencing and Degradome Analysis", ***Plant Molecular Biology*** 33(3), 584-597, 2015.

Ozden, M., Demirel, U. and Kahraman, A., "Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H2O2", ***Scientia Horticulturae*** 119, 163-168, 2009.

Öztürk, K., "Küresel iklim değişikliği ve Türkiye'ye olası etkileri", ***Gazi Egitim Fakültesi Dergisi*** 22(1), 47-65, 2002.

Özer, H., Karaoğlan T. ve Oral E., "Bitkilerde Su Stresi Ve Dayanıklılık Mekanizması", ***Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*** 28(3), 488-495, 1997.

Öztürk, Z.N., "Bitkilerin Kuraklık Stresine Tepkilerinde Bilinenler ve Yeni Yaklaşımlar", ***Turkish Journal of Agriculture Food Science and Technology*** 3, 307-315, 2015.

Phang, J.M., "The regulatory functions of proline and pyrroline- 5-carboxylic acid", ***Current Topics in Cellular Regulation*** 25, 91-135, 1985.

Pignocchi, C. and Foyer, C.H., "Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling", ***Current Opinion in Plant Biology*** 6, 379-389, 2003.

Pignocchi, C., Kiddle, G., Hernandez, I., Foster, S.J., Asenti, A., Taybi, T., Barnes, J. and Foyer, C.H., "Ascorbate-oxidase-dependent changes in the redox state of the apoplast modulate gene transcript accumulation leading to modified hormone signalling and orchestration of defense processes in tobacco", ***Plant Physiology*** 141, 223-235, 2006.

Rabinowitch, H.D. and Fridovich, I., "Superoxıde Radıcals, Superoxıde Dısmutases And Oxygen-Toxıcıty In Plants", ***Photochemistry and Photobiology*** 37, 679-690, 1983.

Ramírez, D.A., Yactayo, W., Gutıérrez, R., Mares, V., De Mendıburu, F., Posadas, A. and Quıroz, R., "Chlorophyll concentration in leaves is an indicator of potato tuber yield in water-shortage conditions", ***Scientia Horticulturae*** 168(202-209), 2014.

Ranalli, P., Bizarri, M., Borghi, L. and Mari, M., "Genotypic influence on in vitro induction, dormancy length, advancing age and agronomical performance of potato micro-tubers (*Solanum tuberosum* L.)", ***Annals of Applied Biology*** 125, 93-101, 1994.

Ranalli, P., Di, Candilo, M. and Bagatta, M., "Drought tolerance screening for potato improvement", ***Plant Breeding*** 116, 290-292, 1997.

Rebetzke, G.J., Condon, A.G., Richards, R.A. and Farquhar, G.D., "Selection for reduced carbon-isotope discrimination increases aerial biomass and grain yield of rainfed bread wheat", ***Crop Science*** 42, 739-745, 2002.

Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B. and Bartel, D.P., "MicroRNAs in plants", ***Genes & Development*** 16(13), 1616-1626, 2002.

Renault, D. and Wallender, W.W., "Nutritional Water Productivity and Diets From « Crop per drop » towards « Nutrition per drop »", ***Agricultural Water Management*** 345, 275-296, 2000.

Reyes, J.L. and Chua, N.H., "ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination", ***Plant Journal*** 49, 592-606, 2007.

Rouhi, V., Samson, R., Lemeur, R. and Damme, P.V., "Photosynthetic gas exchange characteristics in three different almond species during drought stress and subsequent recovery", ***Environmental and Experimental Botany*** 59, 117-129, 2007.

Sairam, R.K., Deshmukh, P.S. and Shulcla, D.S., "Tolerance of drought and temperature stress in relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat", ***Journal of Agronomy and Crop Science*** 178, 171-178, 1997.

Satchithanantham, S., Krahn, V., Ranjan, R.S. and Sager, S., "Shallow groundwater uptake and irrigation water redistribution within the potato root zone", ***Agricultural Water Management*** 132(101-110), 2014.

Schafleitner, R., "Growing more potatoes with less water", ***Tropical Plant Biology*** 2, 111-121, 2009.

Schafleitner, R., Gutierrez, R., Espino, R., Gaudin, A., Pérez, J., Martínez, M., Domínguez, A., Tincopa, L., Alvarado, C., Numberto, G. and Bonierbale, M., "Field Screening for Variation of Drought Tolerance in *Solanum tuberosum* L. by Agronomical, Physiological and Genetic Analysis", ***Potato Research*** 50, 71-85, 2007.

Schafleitner, R., Gutierrez, Rosales R.O., Gaudin, A., Alvarado Aliaga, C.A., Nomberto Martinez, G., Tincopa Marca, L.R., Avila Boliva, L., Mendiburu Delgado, F., Simon, R. and Bonierbale, M., "Capturing candidate drought tolerance traits in two native Andean potato clones by transcription profiling of field grown plants under water stress", ***Plant Physiology and Biochemistry*** 45, 673-690, 2007.

Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R. and Rajewsky, N., "Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs", ***Nature*** 455, 58-63, 2008.

Sen, B., Topcu, S., Türkeş, M., Sen, B. and Warner, J.F., "Projecting climate change, drought conditions and crop productivity in Turkey", ***Climate Research*** 52, 175-191, 2012.

Shahnazari, A., Liu, F., Andersen, M.N., Jacobsen, S.E. and Jensen, C.R., "Effects of partial root-zone drying on yield, tuber size and water use efficiency in potato under field conditions", ***Field Crops Research*** 100, 117-124, 2007.

Sharma, P. and Dubey, R.S., "Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings", ***Plant Growth Regulation*** 46, 209-221, 2005.

Sire´, C., Moreno, A.B., Garcia-Chapa, M., Lopez-Moya, J.J. and San, S.B., "Diurnal oscillation in the accumulation of Arabidopsis microRNAs, miR167, miR168, miR171 and miR398", ***FEBS Letters*** 583, 1039-1044, 2009.

Sunkar, R., Chinnusamy, V., Zhu, J. and Zhu, J.K., "Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation", ***Trends in Plant Science*** 12, 301-309, 2007.

Sunkar, R., Kapoor, A. and Zhu, J.K., "Posttranscriptional induction of two Cu/Zn Superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by down-regulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance", ***Plant Cell*** 18, 2051-2065, 2006.

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

Szabados, L. and Savouré, A., "Proline: a multifunctional amino acid", ***Trends in Plant Science*** 15, 89-97, 2009.

Tekalign, T. and Hammes, P.S., "Growth and productivity of potato as influenced by cultivar and reproductive growth. II. Growth analysis, tuber yield and quality", ***Scientia Horticulturae*** 105, 29-44, 2005.

Thiebaut, F., Rojas, C.A., Almeida, K.L., Grativol, C., Domiciano, G.C., Lamb, C.R.C., De Almeida Engler, J., Hemerly, A.S. and Ferreira, P.C.G., "Regulation of miR319 during cold stress in sugarcane", ***Plant, Cell and Environment*** 35, 502-512, 2011.

Tourneux, C., Devaux, A., Camacho, M.R., Mamani, P. and Ledent, J.F., "Effect of water shortage on six potato genotypes in the highlands of Bolivia (I): morphological parameters; growth and yield", ***Agronomie*** 23, 169-179, 2003.

Türkeş, M., Küresel iklim Değişikliği ve Çölleşme. İçinde: Günümüz Dünya Sorunları Disiplinlerarası Bir Yaklaşım, ***Eğiten Kitap***, Ankara, 1981.

Türkeş, M., Biyocoğrafyanın İlkeleri, Ekolojik Bir Yaklaşım, Ders Notları, ***Kriter Yayınevi***, İstanbul, 2012a.

Türkeş, M., "Kuraklık, çölleşme ve Birleşmiş Milletler Çölleşme ile Savaşım Sözleşmesi'nin ayrıntılı bir çözümlemesi", ***Marmara Avrupa Araştırmaları Dergisi*** 20, 7-56, 2012b.

Vasquez-Robinet, C., Mane, S.P. and Ulanov, A.V., "Physiological and molecular adaptations to drought in Andean potato genotypes", ***Journal of Experimental Botany*** 59, 2109-2123, 2008.

Vos, J. and Groenwold, J., "Water relations of potato leaves: I. Diurnal changes, gradients in the canopy, and eff ects of leaf-insertion number, cultivar and drought", ***Annals of Botany*** 62, 363-371, 1988.

Wall, N.R. and Shi, Y., "Small RNA: can RNA interference be exploited for therapy?", ***Lancet*** 362, 1401-1403, 2003.

Watkinson, J.I., Hendricks, L., Sioson, A.A., Vasquez-Robinet, C., Stromberg, V., Heath, L.S., Schuler, M., Bohnert, H.J., Bonierbale, M. and Grene, R., "Accessions of Solanum tuberosum ssp. andigena show differences in photosynthetic recovery after drought stress as reflected in gene expression profiles", ***Plant Science*** 171, 745-758, 2006.

Watkinson, J.I., Hendricks, L., Sioson, A.A., Heath, L.S., Bohnert, H.J. and Grene, R., "Tuber development phenotypesin adapted and acclimated, drought-stressed Solanum

tuberosum ssp. andigena have distinct expression profiles of genes associated with carbon metabolism", ***Plant Physiology and Biochemistry*** 46, 34-35, 2008.

Xie, F., Frazier, T.P. and Zhang, B., "Identification, characterization and expression analysis of MicroRNAs and their targets in the potato (*Solanum tuberosum*)", ***Gene*** 473(1), 8-22, 2011.

Yamada, T., Takatsu, Y., Manabe, T., Kasumi, M. and Marubashi, W., "Suppressive effect of trehalose on apoptotic cell death leading to petal senescence in ethylene-insensitive flowers of gladiolus", ***Plant Science*** 164, 213-221, 2003.

Yamasaki, H., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M. and Kobayashi, Y., "Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in Arabidopsis", ***Journal of Biological Chemistry*** 282, 16369-16378, 2007.

Yang, C., Li, D., Mao, D., Liu, X., Li, C., Li, X., Zhao, X., Chen, C. and Zhu, L., "Overexpression of microRNA319 impacts leaf morphogenesis and leads to enhanced cold tolerance in rice (*Oryza sativa* L.)", ***Plant, Cell and Environment*** 36(12), 2207-2218, 2013.

Yang, J., Zhang, N., Ma, C., Qu, Y., Si, H. and Wang, D., "Prediction and verification of microRNAs related to proline accumulation under drought stress in potato", ***Computational Biology and Chemistry*** 46, 48-54, 2013.

Yang, W., Liu, X., Zhang, J., Feng, J. and Li, C., "Prediction and validation of conservative microRNAs of *Solanum tuberosum* L.", ***Molecular Biology Reports*** 37, 3081-3087, 2010.

Yang, W.J., Rich, P.J., Axtell, J.D., Wood, K.V., Bonham, C.C., Ejeta, G., Mickelbart, M.V. and Rhodes, D., "Genotypic variation for glycinebetaine in sorghum", ***Crop Science*** 43, 162-169, 2003.

Yang, Z., Ebright, Y.W., Yu, B. and Chen, X., "HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 29 OH of the 39 terminal nucleotide", ***Nucleic Acids Research*** 34, 667-675, 2006.

Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. and Bartel, D.P., "RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals", ***Cell*** 101(1), 25-33, 2000.

Zhang, N., Yang, J., Wang, Z., Wen, Y., Wang, J., He, W., Liu, B., Si, H. and Wang, D., "Identification of Novel and Conserved MicroRNAs Related to Drought Stress in Potato by Deep Sequencing", ***PLoS ONE*** 9(4), e95489, 2014.

Zhang, R., Marshall, D., Bryan, G.J. and Hornyik, C., "Identification and Characterization of miRNA Transcriptome in Potato by High-Throughput Sequencing", ***PLoS ONE*** 8(2), e57233, 2013.

Zhang, W., Luo, Y., Gong, X., Zeng, W. and Li, S., "Computational identification of 48 potato microRNAs and their targets", ***Computational Biology and Chemistry*** 33, 84-93, 2009.

Zhang, X., Zou, Z., Gong, P., Zhang, J., Ziaf, K., Li, H., Xiao, F. and Ye, Z., "Overexpression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato", ***Biotechnology Letters*** 33, 403-409, 2011.

Zhou, M., Li, D., Li, Z., Hu, Q., Yang, C., Zhu, L. and Luo, H., "Constitutive expression of a miR319 gene alters plant development and enhances salt and drought tolerance in transgenic creeping bentgrass", ***Plant Physiology*** 161, 1375-1391, 2013.

ÖZGEÇMİŞ

İlknur TINDAŞ 1988 yılında Muğla'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Muğla'da tamamladı. 2012 yılında İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü İngilizce Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden mezun oldu. 2012 yılında Ege Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilimda yüksek lisansa başladı ve 2013 yılında Niğde Üniversitesi Tarımsal Genetik Mühendisliği Anabilim Dalında eğitimine devam etti. Halen Niğde Üniversitesi Tarımsal Genetik Mühendisliği Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. 2008 yılında İzmir Yüksek teknoloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Laboratuvarında ,"Recombinant Production of Tat (Tyrosine aminotransferase) Protein of Human Immunodeficiency Virus (HIV)" ve 2010-2011 yılları arasında İzmir Yüksek teknoloji Enstitüsü, Bünyamin Akgül Gen Regulasyonu laboratuvarı'nda 2209 TÜBİTAK Projesi, "Analyzing RNA editing on Drosophila melanogaster microRNA by cloning techniques" isimli projede çalışmıştır. 2011 yılında staj programını Viyana Tıp Fakultesi, Moleküler Onkoloji Araştırma Bölümü, Pediatri Departmanında "Kaser hücrelerinde hücre siklüsündeki protein ekpresyon seviyelerinin belirlenmesi" isimli proje üzerine çalışarak yapmıştır. Niğde Üniversitesi Tarımsal Genetik Mühendisliği'nde 2014-2015 yılları arasında Türkiye'deki Patates Genotiplerinin Moleküler Karakterizasyonu ve Genetik Çeşitliliklerinin Belirlenmesi (TÜBİTAK) ve Klasik Islah Yöntemleri ve Moleküler Markır Teknikleri Kullanılarak Sanayilik Patates Islah Hatlarının Geliştirilmesi (TAGEM) prolejelerinde çalışmıştır. 2014 yılında Max Planck Enstitüsü, Tübingen, Prof. Dr. Detlef Weigel Laboratuvarında "Characterization of new co-factors of plant miRNA biogenesis pathway and Engineering the plant genome using the CRISPR/Cas systems" isimli projede araştımacı olarak çalışmıştr. İyi derecede İngilizce bilmektedir