

**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ZEYTİN (*Olea europaea* L.) BİTKİSİNDE PERİYODİSİTE İLE İLİŞKİLİ
miRNA'LARIN KARAKTERİZASYONU**

Huriye YANIK

KİMYA ANABİLİM DALI

**ÇANKIRI
2013**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Huriye YANIK tarafından hazırlanan “**Zeytin (*Olea europaea* L.) bitkisinde periyodisite ile ilişkili miRNA’ların karakterizasyonu**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.


Danışman : Doç. Dr. Turgay ÜNVER



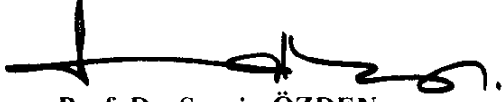
Jüri Üyeleri :

Yrd. Doç. Dr. Mine TÜRKTAS

Yrd. Doç. Dr. Serhat DÖKER



Yukarıdaki sonucu onaylarım



Prof. Dr. Sezgin ÖZDEN
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ZEYTİN (*Olea europaea* L.) BİTKİSİNDE PERİYODİSITE İLE İLİŞKİLİ miRNA'LARIN KARAKTERİZASYONU

Huriye YANIK

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Turgay ÜNVER

Zeytin, yaprağında çeşitli antioksidanlar içeren, meyvesinin salamura yapılmasıyla sofralık zeytin, yağa işlenmesiyle de insan sağlığına yararlı birçok etkisi olan zeytinyağının oluşmasını sağlayan ekonomik açıdan önemli bir bitkidir. Bu çalışmada zeytin bitkisinde periyodisitenin moleküler ve fizyolojik mekanizmasında rol oynayan mikro-RNA (miRNA)'ların analiz edilmesi amacıyla var ve yok yıllarının Temmuz-Kasım aylarına ait yaprak ve meyve örnekleri toplanmıştır. Günümüze kadar deneysel olarak zeytine ait periyodisite ile ilişkili hiçbir miRNA klonlanmamış ve karakterize edilmemiştir. Bu tez kapsamında miRNA saptamaya yönelik bir yaklaşım olan küçük RNA (sRNA) kütüphanelerinin klonlanması ve yüksek verimli dizileme tekniği ile dizilenmesiyle zeytin yaprak-meyve örneklerine ait olan miRNA'lar bulunmuş ve ifade düzeyi farklılıkları ölçülmüştür. Dizi analizi sonucunda 18-30 nükleotid uzunluğundaki miRNA'ların, 6 sRNA kütüphanesinin (ham meyve, olgun meyve, var kasım yaprak, yok kasım yaprak, var temmuz yaprak, yok temmuz yaprak) her birisinde yaklaşık 15 milyon dizi okuması yapılmıştır. Zeytin bitkisinde 22 miRNA familyasına ait toplam 135 korunmuş miRNA tanımlanmıştır. Ayrıca bu çalışma kapsamında 38 yeni miRNA tespit edilmiştir. Periyodisite ile ilişkili bazı miRNA ve hedef genlerinin kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) analiz sonuçları, yüksek verimli dizileme tekniği sonuçlarını deneysel olarak desteklemiştir. Sonuçta çeşitli biyoinformatik ve deneysel analizlerden yararlanarak zeytinde miRNA'ların periyodisite ile ilişkili rolleri tespit edilmiştir.

2013, 123 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Alternans, miRNA, *Olea europaea* L., periyodisite, yüksek verimli dizileme, zeytin, qRT-PCR

ABSTRACT

M.S. Thesis

CHARACTERIZATION OF ALTERNATE BEARING-ASSOCIATED miRNAs IN OLIVE (*Olea europaea* L.)

Huriye YANIK

Cankiri Karatekin University
Institute of Science
Department of Chemistry

Supervisors: Assoc. Prof. Dr. Turgay UNVER

Olive tree is an economically important plant as its leaves contain various antioxidants, fruits are used for brine production named table olive, and it is processed for olive oil, which has positive effects on human health. In this study leaf and fruit samples which belong to July-November months from on and off years collected in order to analyze of micro-RNAs (miRNAs) which play role in molecular and physiological mechanisms of periodicity in olive. Up to date no miRNA associated with periodicity has not been experimentally cloned and characterized in olive. In this thesis, miRNAs belonging to leaf and fruit in olive were identified and differential expressions were measured via small RNA (sRNA) library construction and high-throughput next generation sequencing. As a result, olive miRNAs which are 18-30 nt length were sequenced about 15 million reads in six sRNA libraries (unripe fruit, ripe fruit, on november leaf, off november leaf, on july leaf, off july leaf). 135 known members of 22 conserved miRNA families were identified in olive. Additionally 38 novel miRNAs have been identified. Moreover, the periodicity associated miRNAs and their target gene expressions were experimentally validated via quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) analyses. Consequently, olive alternate bearing associated miRNAs have been identified by the advantage of the various bioinformatics and experimental analyses.

2013, 123 pages

Key Words: Alternate bearing, miRNA, *Olea europaea* L., periodicity, high-throughput sequencing, olive, qRT-PCR

TEŞEKKÜR

Bu araştırmayı yüksek lisans tezi olarak veren, tez çalışmasının başlangıcından bitimine kadar her türlü katkı, eleştiri ve yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Turgay ÜNVER'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması kapsamında hazırlanan 'Genome-wide identification of alternate bearing-associated microRNAs (miRNAs) in olive (*Olea europaea* L.)' makalesinin yazımında, biyoinformatik analizlerinin değerlendirilmesinde katkı sağlayan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Mine Türkteş'a, bitki örneklerinin toplanmasında, örneklerin RNA izolasyonlarının gerçekleştirilmesinde ve makalenin basımında önemli eleştirileri ile katkı sağlayan Doç. Dr. Ekrem Dündar'a, miRNA'ların dizilenmesinde, biyoinformatik analizlerin değerlendirilmesinde ve makalenin basımında önemli eleştirileri ile katkı sağlayan Prof. Dr. Gabriel Dorado ve Dr. Pilar Hernández'e, deneylerin organizasyonunda, deneysel ve biyoinformatik analizlerin değerlendirilmesinde, makalenin yazımında ve basımında önemli eleştirileri ile katkı sağlayan danışman hocam Doç. Dr. Turgay Ünver'e,

Çankırı Karatekin Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda tez ve proje çalışmalarımın yürütülmesinde önemli katkı sağlayan ve pozitif enerjisi ile daima motive eden değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Sezer OKAY'a, Araş. Gör. Behcet İnal'a, Dr. Hatice Böke'ye, Morteza Hajyzadeh'e, lisansüstü eğitimim boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. İbrahim Demirtaş ve lisansüstü öğrencilerine, aynı laboratuvarı paylaştığım Esmâ Özhüner, Uzm. Emine Gülden Erkiş, Ramazan Beyaz ve Süleyman Demirhan'a,

2012/10 kodlu projeyi destekleyen Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) Koordinasyon Birimi'ne, 1090661 kodlu projeyi destekleyen TÜBİTAK'a, DPT2010K120720 kodlu projeyi destekleyen Devlet Planlama Teşkilatı'na ve AGL2010-17316 kodlu projeyi destekleyen İspanya'daki "Ministerio de Economía y Competitividad" Kurumu'na,

Ayrıca maddi ve manevi her türlü destekleriyle yanımda olduklarını bildiğim aileme en derin teşekkürlerimi sunarım.

Huriye YANIK
Çankırı, Temmuz 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Zeytin.....	1
1.2 Periyodisite (Alternans)	2
1.3 miRNA.....	5
1.3.1 Bitki miRNA'larının sentezi	6
1.3.2 Bitki miRNA ve hedef genlerinin teşhisi	10
2. KAYNAK ÖZETLERİ	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM	13
3.1 Materyal.....	13
3.2 Yöntem	14
3.2.1 Total RNA izolasyonu	14
3.2.2 mirVana ile miRNA izolasyonu	14
3.2.3 RNA'nın saflaştırılması	15
3.2.4 sRNA kütüphanesinin oluşturulması	15
3.2.4.1 RNA kütüphanesinin klonlanması.....	17
3.2.4.2 Klonlama için 'competent' hücre hazırlanması.....	17
3.2.4.3 <i>E. coli</i> competent hücrelerinin ligasyon ürünü ile transformasyonu	17
3.2.4.4 Kolonilerden plazmid izolasyonu	18
3.2.5 Yüksek verimli dizileme tekniği ile sRNA analizi	18
3.2.5.1 Yeni miRNA'ların tahmini	19
3.2.5.2 miRNA hedef genlerinin tahmini.....	19
3.2.6 miRNA'ların ölçülmesi	20
3.2.6.1 miRNA'lara özgü cDNA sentezi	20
3.2.6.2 miRNA'ların qRT-PCR ile miktar ölçümü	23
3.2.7 miRNA hedef genlerinin biyoinformatik yöntemlerle saptanması.....	25
3.2.7.1 miRNA hedef genlerinin cDNA sentezi	26
3.2.7.2 miRNA hedef genlerinin qRT-PCR ile miktar ölçümü.....	26
4. BULGULAR	29
4.1 Biyoinformatik Analizler	29
4.2 Deneysel Analizler.....	43
4.2.1 miR164 ve tar164	44
4.2.2 miR396 ve tar396	45
4.2.3 miR171 ve tar171	46
4.2.4 miR168 ve tar168	46
4.2.5 miR159 ve tar159	47
4.2.6 miR395 ve tar395	47
4.2.7 miR166 ve tar166	48
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	49
KAYNAKLAR.....	56

EKLER	63
EK 1.	64
EK 2.	68
EK 3.	106
EK 4.	109
EK 5.	110
EK 5.1.	110
EK 5.2.	114
EK 6.	118
ÖZGEÇMİŞ	122

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
bp	Baz çifti
dk	Dakika
M	Molarite
Mb	Mega baz çifti
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
°C	Celsius
pmol	Pikomol
rpm	Santrifüj işleminde dakikadaki devir sayısı
sn	Saniye

Kısaltmalar

ABA	Absisik asit
BGI	Beijing Genom Enstitüsü
cDNA	Komplementer DNA
ddH ₂ O	Deiyonize su
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
DTT	Dithiothreitol
EST	İfade edilmiş dizi parçaları
GA ₃	Gibberellik asit
GO	Gen Ontoloji
HM	Ham meyve
IAA	Indol-3-asetik asit
KEGG	Genom ve Genlerin Kyoto Ansiklopedisi
miRNA	mikro-RNA
mRNA	Mesajcı RNA
NTC	Negatif kontrol
OM	Olgun meyve
ORF	Açık okuma çerçevesi
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pre-miRNA	Prekürsör miRNA
pri-miRNA	Primer miRNA
qRT-PCR	Kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RdRP	RNA bağımlı RNA polimeraz

RISC	RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi
RNA	Ribonükleik asit
RNaz out	Ribonükleaz inhibitör
RT-PCR	Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
siRNA	Küçük müdahale-edici RNA
TAE	Tris-Asetik asit-EDTA
UTR	Translasyona uğramayan bölge
VK	Var kısım
VT	Var temmuz
YK	Yok kısım
YT	Yok temmuz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Lee ve arkadaşları tarafından keşfedilen ilk miRNA	5
Şekil 1.2	pri-miRNA ve pre-miRNA yapısı	6
Şekil 1.3	Bitkilerde miRNA sentezi ve aktivitesi	7
Şekil 1.4	miRNA:miRNA* ikilisinin tespiti	8
Şekil 1.5	miRNA'nın gen ifadesini post-transkripsiyonel düzeyde inhibe etmesi	9
Şekil 3.1	miRNA'nın qRT-PCR deney planı	24
Şekil 3.2	tar396, tar395 ve tar164 hedef genlerinin qRT-PCR deney planı	28
Şekil 4.1	6 farklı kütüphanedeki miRNA'ların nükleotid uzunlukları	30
Şekil 4.2	Benzersiz okumaların ortak ve özgü yüzdesi	30
Şekil 4.3	6 farklı kütüphanedeki farklı sRNA gruplarının sınıflandırılması	31
Şekil 4.4	6 farklı kütüphanede en fazla sayıda ifade edilen miRNA'lar	36
Şekil 4.5	Tahmini yeni miRNA'lardan miR1 ve miR2'nin ikincil yapısı	37
Şekil 4.6	6 farklı kütüphanede önemli derecede ifade edilen yeni miRNA'lar	39
Şekil 4.7	18S rRNA normalizasyonunun çoğalma grafiği	43
Şekil 4.8	18S rRNA normalizasyonunun erime sıcaklığı grafiği	43
Şekil 4.9	miR164 ve tar164'ün miktar analizi.....	44
Şekil 4.10	miR164'ün VK-YK kütüphanelerindeki karşılaştırmalı çoğalma grafiği ...	44
Şekil 4.11	miR396 ve tar396'nın miktar analizi	45
Şekil 4.12	miR396'nın VT-YT kütüphanelerindeki karşılaştırmalı çoğalma grafiği...	45
Şekil 4.13	miR171 ve tar171'in miktar analizi	46
Şekil 4.14	miR168 ve tar168'in miktar analizi	46
Şekil 4.15	miR159 ve tar159'un miktar analizi	47
Şekil 4.16	miR395 ve tar395'in miktar analizi	47
Şekil 4.17	miR166 ve tar166'nın miktar analizi	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	Periyodisite gösteren önemli türler	2
Çizelge 3.1	Var ve yok yıllarında toplanan zeytin bitkisi örnekleri	13
Çizelge 3.2	miRNA cDNA sentezi için tasarlanan RT primerler	21
Çizelge 3.3	1.500 ng RNA için toplam RNA'lerden alınması gereken hacim	21
Çizelge 3.4	miRNA cDNA sentezi için ilk aşama	22
Çizelge 3.5	miRNA cDNA sentezi PCR programı	23
Çizelge 3.6	miRNA miktar analizi için tasarlanan ileri primerler	23
Çizelge 3.7	6 farklı kütüphanede miRNA miktar analizi için qRT-PCR karışımı	24
Çizelge 3.8	miRNA qRT-PCR programı	25
Çizelge 3.9	miRNA hedef gen cDNA sentezinin ilk aşaması	26
Çizelge 3.10	miRNA hedef gen miktar analizi için tasarlanan ileri ve geri primerler	27
Çizelge 3.11	miRNA hedef genlerinin miktar analizi için qRT-PCR karışımı	27
Çizelge 3.12	miRNA hedef geni qRT-PCR programı	28
Çizelge 4.1	6 farklı kütüphanedeki sRNA'ların okuma istatistikleri.....	29
Çizelge 4.2	6 farklı kütüphanedeki benzersiz sRNA'ların istatistiği.....	31
Çizelge 4.3	6 farklı kütüphanede belirlenen miRNA'ların okuma sayıları	33
Çizelge 4.4	miRNA öncülünün her iki kolundan tahmin edilen 38 yeni miRNA.....	38
Çizelge 4.5	miRNA hedef genlerinin GO analizi.....	41
Çizelge 4.6	miRNA'ların hedeflediği genlerin metabolik yolları	42

1.GİRİŞ

1.1 Zeytin

Kültür ve yabani zeytin bitkileri yaklaşık olarak 1.800 Mb genom büyüklüğüne sahip olup ($2n=46$) diploittirler (De la Rosa *et al.* 2003). Zeytinin de dahil olduğu *Olea* cinsine ait 30 kadar tür, Akdeniz havzası ve çevresinde geniş bir yayılım göstermektedir (Besnard *et al.* 2002). Dünya genelinde ülkemiz zeytin üretimi bakımından 4. sırada, zeytin üretim alanı bakımından 5. sırada yer almaktadır (Aktaş 2008). Dünyadaki zeytin üretiminin % 92'si yağlık, % 8'i ise sofralık olarak değerlendirilmektedir (Akıllıoğlu vd. 2000). Uluslararası Zeytinyağı Konseyi verilerine göre Türkiye, dünya zeytinyağı üretiminde 2005/06–2008/09 üretim yıllarının ortalamasına göre % 4,7'lik pay ile 5. sırada yer almaktadır (Öztürk vd. 2009).

Zeytin meyvesi drupa tipi meyve olup (Sanchez 1994) epikarp (kabuk), mezokarp (etli kısım), endokarp (çekirdek) olmak üzere 3 kısımdan oluşmaktadır (Suakar 2006). Tanesine has acı tat veren oleuropein nedeniyle bitkiler aleminin diğer meyvelerinden ayrılmaktadır (UZK 1997). Zeytin meyvesinin besisi dokusu bol miktarda yağ içermektedir. Zeytin meyvesi ham ve olgun halde salamura yapılarak yenilmekte; ayrıca ezilerek yağı çıkarılmaktadır. Yağ çıkarıldıktan sonra geriye kalan 'pirina' olarak adlandırılan küspe; gübre ve hayvan yemi şeklinde değerlendirilmektedir (Öksüz 1998).

Zeytinin yağa işlenmesi ile elde edilen yan ürünlerden zeytin yaprağı ve zeytin karasuyunun polifenolik bileşiklerce zengin yapısı ve buna bağlı olarak antioksidan, antitrombotik, antiinflamasyon, hipokolesterolemik, antimikrobiyal ve antiviral gibi çok yönlü biyolojik aktiviteleri bilimsel çalışmalarla ortaya konmuştur (Aktaş ve Basmacıoğlu-Malayoğlu 2011).

Zeytinyağı ve zeytin ürünlerinin insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri yapılarında bulunan çok yönlü biyoaktif bileşiklere dayandırılır. Bu bileşikler tokoferoller, polifenoller, fosfolipidler, karotenoidler, klorofiller, steroller ve skualen olarak

gruplandırılır (Visioli *et al.* 2002). Zeytin yaprağındaki başlıca antioksidan maddeler ise oleuropein, hidroksityrosol, rutin, verbaskosid, kateşin, luteolin-7-glukosid ve apigenin-7-glukosid'tir (Garcia *et al.* 2000).

1.2 Periyodisite (Alternans)

Bazı meyve tür ve çeşitlerinin bir yıl ürün verip, ertesi yıl hiç ürün vermemesi veya çok az ürün vermesi olayına periyodisite veya alternans denir. Bir yıl çok ürün verip ertesi yıl hiç meyve vermemesine mutlak periyodisite, az meyve vermesine de kısmi periyodisite denilmektedir (Turhan 2011). Periyodisitenin şiddeti familya ve tür açısından farklılık gösterse de hemen hemen tüm meyve ağaçlarında yaygın bir şekilde görülmektedir (Monselise and Goldschmidt 1982, Poli 1987) (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1 Periyodisite gösteren önemli türler (Monselise and Goldschmidt 1982)

Familya	Tür	Türkçe adı
Anacardiaceae	<i>Mangifera indica</i>	Mango
	<i>Pistacia vera</i>	A. fıstığı
Corylaceae	<i>Corylus avellana</i>	Fındık
Ericaceae	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	-
Juglandaceae	<i>Carya illinoensis</i>	Pikan
Lauraceae	<i>Persea americana</i>	Avokado
Oleaceae	<i>Olea europaea</i>	Zeytin
	<i>Malus sylvestris</i>	Elma
	<i>Pyrus communis</i>	Armut
	<i>Prunus domestica</i>	Erik
Rubiaceae	<i>Prunus armeniaca</i>	Kayısı
	<i>Coffea arabica</i>	Kahve
Rutaceae	<i>Citrus sinensis</i>	Portakal
	<i>Citrus raticulata</i>	Mandarin

Periyodisite, zeytin (Rallo and Fernandez 1985, Rallo and Suarez 1989, Rallo and Martin 1991, Rallo *et al.* 1994, Nejad and Niroomand 2007, Lavee 2007), elma (Izadyar *et al.* 2008), pekan cevizi (Wood *et al.* 2004), mango (Abdel Rahim *et al.* 2011), mandalin (Munoz-Fambuena *et al.* 2011), fıstık (Brown *et al.* 1995), meşe (Crawley and Long 1995), palmiye (Pillay *et al.* 2002), avokado (Garner and Lovatt 2008) gibi pek çok ağacı etkilemektedir (Monselise and Goldschmidt 1982). Antepfıstığı, fındık ve zeytin mutlak periyodisite gösteren türlerdir (Turhan 2011).

Zeytin bitkisinde biyolojik devir iki yılda tamamlanmaktadır. Zeytin ağaçlarında mahsul bir önceki yıl büyüyen sürgünler üzerinde oluşmaktadır. Ağaçlarda ilk yılda sürgün ve dalların gelişimi (vegetatif gelişme) ikinci yılda ise çiçek ve meyve bağlama (generatif gelişme) ağırlıklı olmaktadır (Shimon 2007). Zeytin bitkisi yıl içinde iki dönemde gelişme gösterir. Bunlar Haziran-Temmuz ayları ve hasat sonrası dönem olan Mart-Nisan aylarıdır (ZAE 2010). Şubat ayından itibaren Nisan ayına kadar çiçek tomurcuklarının oluşumu başlar. Nisan-Mayıs aylarında çiçeklenme görülür. Mayıs-Haziran aylarında meyve tutumu gözlenir. Haziran-Temmuz aylarında meyve büyümesi başlar ve Eylül ayı itibariyle meyvelerde yağ birikimi gözlenir. Kasım ayı ile beraber renk dönüşümü gözlenir. Bu arada boş (ürünsüz) yılında meyve oluşmadığından çiçeklenme sonrası sürgün gelişimi devam ederken meyve gelişimi için herhangi bir fizyolojik aktivite gerçekleşmez (YAYÇEP 2009).

Zeytinde çiçek tomurcuğu indüklenmesi yaz periyodu boyunca olmaktadır (Rallo *et al.* 1994). Çiçek tomurcuğu uyartımı ve oluşumu üzerinde genel olarak iki hipotez vardır. Bunlardan ilk ve eski olanı bir bitkideki tomurcukların gelişim yönünün genel olarak vegetatif yönde olduğu ve bazı faktörlerin bu tomurcuklar üzerinde pozitif etki oluşturarak bunların gelişimini generatif yöne değiştirdiğidir. Bu hipoteze pozitif uyartım hipotezi denir. İkincisi ve benimsenmeye başlanana ise negatif uyartımdır. Bu hipoteze göre tüm tomurcuklardaki gelişme generatif yöndedir. Bazı faktörler ise bu tomurcukların gelişimini vegetatif gelişme yönüne sevk etmektedir ve bu etkiden kurtulan tomurcuklar çiçek tomurcuklarını oluşturmaktadır (Lang 1965).

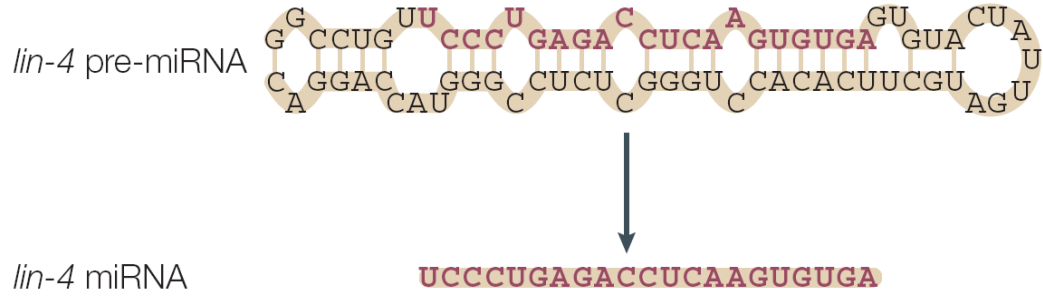
Çiçek tomurcuğu oluşumu üzerine etkili pek çok içsel ve çevresel faktörler vardır. İçsel faktörler bitki organlarının içerdiği bitki hormonları, karbohidratlar ve bitki besin maddeleridir. Çevresel faktörler ise fotoperiyot, çevre sıcaklığı ve bakım koşullarıdır (Halevy 1964, Cassin *et al.* 1969, Lenz 1969, Moss 1969, Moss 1970, Goldschmidt and Monselise 1972, Moss 1977, Cohen 1981, Goldschmidt and Golomb 1982, Goldschmidt *et al.* 1985, Pharis and King 1985, Lord and Eckard 1987, Harty and Van Staden 1988, Lovatt *et al.* 1988, Davenport 1990, Greenberg *et al.* 1993).

Yapılan çalışmalar genel olarak “var” ve “yok” yıllarındaki element eksikliği, çeşitli hormonların değişimi (Pillay *et al.* 2005) ve karbohidratların periyodisitedeki rolüne (Li *et al.* 2003, Vemmos 2010) dayanmaktadır. Karbohidratların periyodisitedeki rolü ile ilgili 2 hipotez vardır. Bunlardan ilki mannitol transport hızının “yok” yılında meyveden yaprağa doğru azalması sonucu yapraklardaki mannitol birikiminin azalması, diğeri ise yok yılında glukoz, fruktoz ve mannitol dönüşümünün düzensiz olmasıdır (Nejad and Niroomand 2007). Meyve gelişiminde çözülebilir şeker içeriği meyve oluşuktan 90 gün sonra artar ve sonrasında azalmaktadır (Suakar 2012). “Var” yılında fark edilir şeker artışı meyvelerin renk değişiminin başladığı zamana denk gelirken, “yok” yılındaki toplam şeker içeriği ise “var” yılından daha yüksektir (Nejad and Niroomand 2007). Bunun nedeni ise “yok” yılında meyve üretiminin olmamasından kaynaklanmaktadır (Suakar 2012).

Çeşitli hormonların değişimi ile ilgili görüşe göre, gelişen embriyonun çiçek tomurcuğu oluşumunu engelleyen hormonlar üretmesidir. Bu engelleyici hormonun ise giberellik asit olduğu bildirilmektedir. Özellikle genç tohumlarda sentezlenen giberellinler birçok bitkide çiçeklenme başlangıcını engelleyen hormon olarak kabul edilmektedir. Zeytinde yapılan çalışmalar ise yan tomurcuklarda bulunan giberellik asidin çiçeklenmeyi teşvik ederek periyodisiteyi etkilediğini göstermiştir. Diğer taraftan elma meyvelerinde bulunan Indol-3-asetik asit (IAA)’in ve antepfıstığı yaprak ve çekirdeklerinde bulunan Absisik asit (ABA)’in ertesi yılki çiçek gözü oluşumunu etkilediği belirlenmiştir (Turhan 2011).

1.3 miRNA

Lee ve arkadaşları (1993) tarafından *Caenorhabditis elegans*'in gen içeriği incelenmiş ve lin-4 geninin hiçbir protein kodlamamasına karşın 21 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA transkribe ettiği bildirilmiştir (Şekil 1.1). Reinhart ve arkadaşları (2000) tarafından da *C. elegans*'da 22 nükleotid uzunluğunda, let-7 olarak adlandırılan, canlılığın gelişim zamanlamasını düzenleyen farklı bir miRNA keşfedilmiştir. Saydam ve arkadaşları (2011), türler arasında korunmuş olduğu tespit edilen let-7'nin önemli bir biyolojik fonksiyona sahip olduğunu göstermiştir.



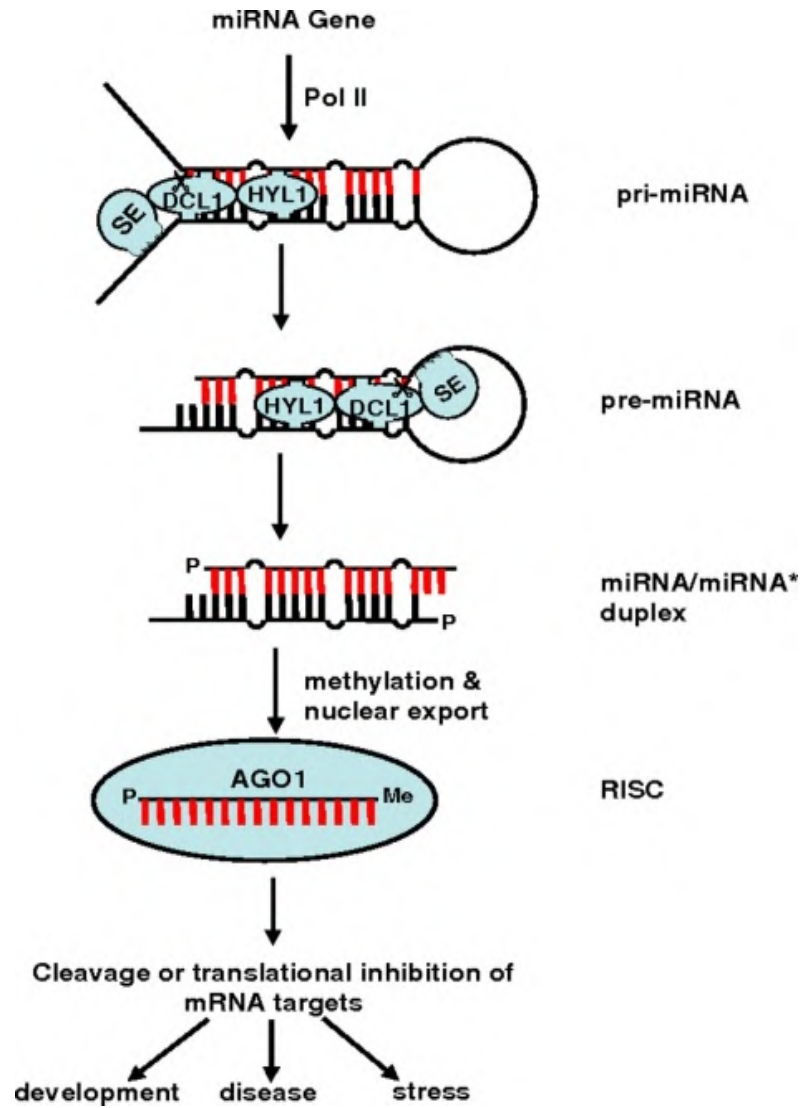
Şekil 1.1 Lee ve arkadaşları tarafından keşfedilen ilk miRNA (He and Hannon 2004)

miRNA'lar, yüksek seviyede korunan DNA bölgelerinden kodlanan, proteine translasyonu gerçekleşmeyen, yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğundaki sRNA molekülleridir (Unver and Budak 2009a, Saydam vd. 2011). miRNA dizilerinin evrimsel açıdan tanımlanan karakteristik özelliklerinden birisi organizmalar arasında yüksek düzeyde korunmuş olmasıdır (Ambros *et al.* 2003).

miRNA'ların oluşum süreci üç adımda meydana gelmektedir. İlk adımda miRNA genlerinden primer miRNA (pri-miRNA)'ların transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci adımda pri-miRNA'lar prekürsör miRNA (pre-miRNA)'lara nükleus içinde dönüştürülür. Üçüncü ve son adımda olgun miRNA'ların sitoplazma içinde oluşumu gerçekleşir (Saydam vd. 2011).

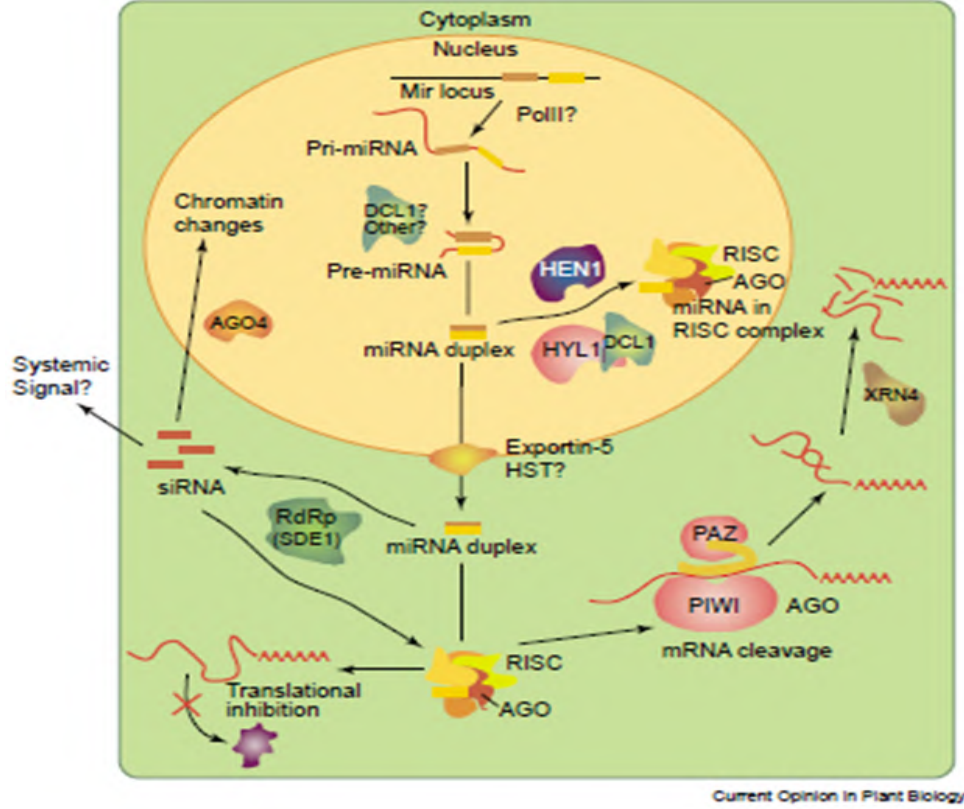
1.3.1 Bitki miRNA'larının sentezi

miRNA'lar, genomik DNA'dan RNA polimeraz II enzimi tarafından primer transkript (pri-miRNA) olarak sentezlenmektedir. pri-miRNA [500-3000 baz çifti (bp)], "cap" ve "poli A" kuyruğuna sahip sap-ilmik yapısındadır (Saydam vd. 2011). pri-miRNA, DCL1 veya diğer protein tipleri tarafından geriye doğru katlanarak pre-miRNA öncülüne dönüştürülmektedir (Kidner and Martienssen 2005) (Şekil 1.2).



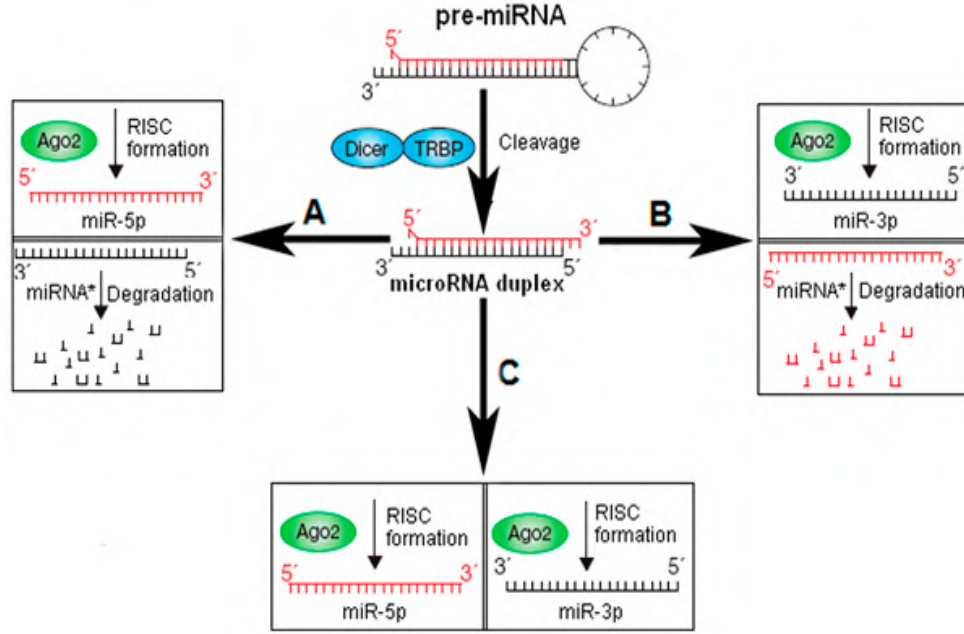
Şekil 1.2 pri-miRNA ve pre-miRNA yapısı (Zhu 2008)

pre-miRNA, HST (Exportin-5) ve nükleer bir protein olan RAN-GTP'ye bağımlı şekilde çekirdekten çıkarılır veya HEN1, HYL1, DCL1 proteinleri tarafından çekirdekte tutulabilmektedir (Wijnhoven *et al.* 2007). Bu proteinler, pre-miRNA'yı 19-24 nükleotid uzunluğundaki çift zincirli miRNA:miRNA* ikilisine dönüştürmektedir (Kidner and Martienssen 2005).



Şekil 1.3 Bitkilerde miRNA sentezi ve aktivitesi (Kidner and Martienssen 2005)

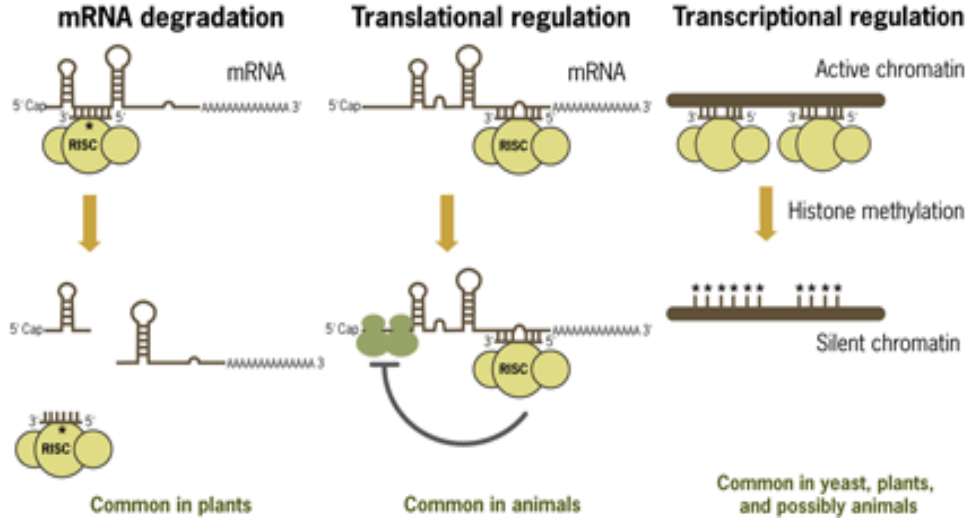
Dicer, aynı zamanda RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RISC) oluşumunu başlatmaktadır. pre-miRNA'nın sap-ilmği, Dicer tarafından kesildikten sonra miRNA:miRNA* ikilisinden sadece 5' ucu daha kararlı olan RISC kompleksine dahil edilmektedir. RISC kompleksinin içinde yer alan bir RNaz olan Argonot'un etkisiyle bu iki iplikçikten uygun olanı seçilmektedir (Şekil 1.3). Seçilen iplikçik kılavuz iplikçik olarak adlandırılırken, diğer iplikçik RISC kompleksinin substratı olarak parçalanmaktadır (Kidner and Martienssen 2005).



Şekil 1.4 miRNA:miRNA* ikilisinin tespiti (Guo and Lu 2010)

miRNA'nın hem 5p hem de 3p kolu RISC kompleksine bağlanabilmektedir. Şekil 1.4'e göre miRNA'nın 5p kolu RISC kompleksine bağlandığında 3p kolu parçalanmakta (A), miRNA'nın 3p kolu RISC kompleksine bağlandığında ise 5p kolu parçalanmaktadır (B). Parçalanmış miRNA kolu, miRNA star (miRNA*) olarak isimlendirilmektedir.

Hedef mRNA, RISC kompleksinin yapısında bulunan PAZ domainine 3' ucu kıvrılarak tutturulmuş miRNA tarafından tanınmaktadır. PIWI domaini ve miRNA arasındaki boşluğa yerleştirilen hedef mRNA, miRNA'nın 5' ucundaki 1-10 nükleotidlik eşlenik kısım ile kesilmektedir. Daha sonra bu ikiye ayrılmış hedef mRNA (mesajcı RNA), çoğunlukla sitoplazmada bulunan RNA-bağımlı RNA polimeraz (RdRP) aktivitesiyle ortaya çıkan ikincil küçük müdahale-edici RNA (siRNA)'da olduğu gibi XRN4 tarafından parçalanmaktadır (Kidner and Martienssen 2005).



Şekil 1.5 miRNA'nın gen ifadesini post-transkripsiyonel düzeyde inhibe etmesi (Invitrogen 2013)

miRNA'lar, aktif RISC kompleksine entegre olduktan sonra Argonot proteinleri yardımıyla ya hedef mRNA ile baz eşleşmesi yaparak onun kesilmesine ya protein translasyonunun baskılanmasına neden olmaktadır (Saydam vd. 2011) (Şekil 1.5). Ayrıca miRNA'lar, hedef mRNA'ya karşılık gelen genomik bölgelerde DNA metilasyonuna neden olabilmektedirler. miRNA'lar kendilerini tamamlayan bir grup proteinle (mikroribonükleoproteinler=miRNP) birlikte işlev görürler (Quickikiwiki 2013).

miRNA, hedef mRNA'nın 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgeye (UTR) veya hedef mRNA'nın ORF (açık okuma çerçevesi) bölgesine bağlanmaktadır. Bağlanma pozisyonu, miRNA kompleksinin mRNA'nın hangi bölgesinde eşlenik olduğuna göre değişmektedir. 3' UTR bölgesine bağlanma kusurlu, tam olmayan, eksik eşleşme gösterdiğinden dolayı translasyonun baskılanması ile sonuçlanmaktadır. ORF bölgesine bağlanma ise kusursuz, tam eşleşme gösterdiğinden dolayı Argonot 2 (AGO2) proteinleri tarafından mRNA'nın yıkımı ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca miRNA'ların her birinin birden fazla mRNA'nın ifadesini düzenleyebildiği ve mRNA'ların her birinin de birden fazla miRNA tarafından hedeflenebildiği bilinmektedir (Saydam vd. 2011).

1.3.2 Bitki miRNA ve hedef genlerinin teşhisi

Bitki miRNA'larının teşhisinde aşağıdaki kriterler dikkate alınmaktadır.

- ~ Olgun miRNA'lar 18-24 nükleotid uzunluğunda olmalı,
- ~ Aday olgun miRNA ve homoloji gösterdiği daha önce tespit edilmiş miRNA arasında en fazla 3 yanlış eşleşme olmalı,
- ~ pre-miRNA'ların minimum katlanma enerji indeksi (MFEI) ve negatif minimum katlanma enerjisi (MFE) diğer RNA çeşitlerinden daha yüksek (yaklaşık $> 0,67$) olmalı (Yin *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2006),
- ~ Olgun miRNA sekansında ilmiik veya büyük bir kırık olmamalı,
- ~ miRNA'lar sap-ilmik yapılarının kolunda bulunmalı,
- ~ pre-miRNA yapısı içinde miRNA ve eşleniği miRNA* arasında 6 nükleotidden fazla yanlış eşleşme olmamalıdır (Zhang *et al.* 2007, 2008, 2009, Yin *et al.* 2008, Unver and Budak 2009a).

Bitki miRNA'ları ve hedef mRNA'ları arasındaki yüksek dereceli eşleşme algoritmalar yardımı ile tespit edilebilmektedir (Rhoades *et al.* 2002). miRNA:hedef mRNA eşleşmeleri birkaç deneysel metot ile de tespit edilebilmektedir.

- ~ *Agrobacterium tumefaciens* ile bitki yapraklarının inoküle edilmesiyle miRNA ve tahmini hedef geni taşıyan konstrakların birlikte ifade edilmesi,
- ~ Hedef mRNA'ların radyoaktif işaretlenmesi,
- ~ 5' cap ucu olmayan mRNA'lara T4 RNA ligaz ile RNA adaptörünün takılmasıdır (Yang *et al.* 2007).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Periyodisitenin karakteristik özelliği oldukça fazla ürünli yılı takip eden yılda çok az veya hiç ürünün olmamasıdır. Bu duruma antep fıstığı, armut, elma, mango, pıkan cevizi, portakal ve zeytin gibi birçok türde rastlanmaktadır. Çünkü bunlarda meyvenin çok olduğu yılda ertesini yılın ürününi oluşturacak çiçek tomurcukları oluşmamaktadır (Monselise and Goldschmidt 1982).

Fernandez-Escobar ve arkadaşları (1992) zeytinde yaprakların N, P, K ve Mg içeriklerinin meyve yüklerinden etkilendiğini, var yılını takip eden yıl düştüğünü, mikro elementlerin ürün yükünden etkilenmediğini, bunun da zeytinin bu elementlere olan ihtiyacının az olmasından kaynaklandığını bildirmektedir. Yaprak yaşının yaprağın besin içeriğine etki ettiği, genç yapraklarda N, P, K, Zn, B konsantrasyonlarının, yaşlı yapraklarda ise Ca, Mg, Mn, Cu, Fe konsantrasyonlarının yüksek olduğu belirtilmiştir.

Ülger ve arkadaşlarının (1999) periyodisite ile ilgili yapmış oldukları araştırma sonucunda Memecik ve Tavşan yüreği zeytin çeşitlerinde var ve yok yıllarındaki içsel ABA, gibberellik asit (GA₃) ve IAA miktarlarının istatistiksel olarak % 5 seviyesinde önemli derecede farklı olduğu görülmüştür. ABA ve GA₃, çiçek tomurcuğu oluşumunda doğrudan bir etkiye sahipken, IAA ve benzeri hormonların yıllık sürgün oluşumunu teşvik ederek çiçek tomurcuğu oluşumunda dolaylı bir etkiye sahip olduğu ortaya çıkmıştır.

Zeytinde karbohidratları inceleyen Seyyednejat ve arkadaşları (2001), meyvelerdeki indirgen şekerlerin meyve gelişimi sırasında azaldığını renk değişimi döneminde geçici olarak arttığını, yapraklardaki indirgen şekerlerin ise verim yılının başında biraz arttıktan sonra azaldığını ancak verim olmayan yılda değişik bir yol izlediğini belirtmiştir. Ayrıca meyvelerdeki ve yapraklardaki polisakkaritlerin, verimsiz yılda daha fazla seviyede bulunduğu bildirilmiştir.

Shimon (2007) zeytin bitkisinde periyodisitenin nedenlerinin anlaşılabilmesi için iki yıl boyunca davranış ve gelişmesini incelemiştir. Sonuç olarak gübreleme, budama, bilezik alma ve sulama gibi kültürel işlemlerle periyodisitenin kontrol altına alınabileceğini belirtmiştir. Ancak bitki genetiği ve çevresel koşullar nedeniyle tamamen ortadan kaldırılamayacağını bildirmiştir. Moleküler düzeyde genetik çalışmaların periyodisite durumuna karşı koymaya ışık tutabileceğini belirtmiştir.

Doran ve arkadaşları (2008) Derik yöresi zeytinliklerinin beslenme durumlarına yönelik yaptıkları çalışma sonucunda, ürünlü ve ürünsüz yılda yapraklardaki P, K, Ca, Mg, Fe, Mn seviyelerinin yeterli olduğunu ancak N, Zn, Cu, B seviyelerinin yetersiz olduğunu belirlemiştir.

Günümüze kadar zeytin bitkisinde periyodisite ile ilgili daha çok fizyolojik çalışmalar yapılmıştır. Bu tez kapsamında zeytin miRNA'ları ve tahmini hedef genlerinin periyodisitenin moleküler mekanizması ile ilgili olası rollerinin araştırılmış olması literatürdeki önemli bir boşluğu doldurmuş ve daha ileri düzeydeki moleküler çalışmalara temel oluşturmuştur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

Tez kapsamında Edremit Zeytin Yetiştirme İstasyonu'nun Gömeç meyve bahçesinden zeytin bitkisinin Ayvalık çeşidi (*Olea europaea* var. Ayvalık)'ne ait yaprak-meyve örnekleri toplanmıştır. Çizelge 3.1'de gösterildiği gibi zeytin ağaçlarından meyve oluşumunun olduğu var yılının Temmuz ayından yaprak-ham meyve örnekleri, Kasım ayından yaprak-olgun meyve örnekleri ve meyve oluşumunun hiç olmadığı ya da çok az olduğu yok yılının Temmuz ve Kasım aylarından sadece yaprak örnekleri alınmıştır. Temmuz ayı meyvelerin görünmeye başladığı, Kasım ayı ise sofralık zeytinler için meyvelerin toplandığı aydır.

Çizelge 3.1 Var ve yok yıllarında toplanan zeytin bitkisi örnekleri

Var yılı		Yok yılı	
Temmuz	Kasım	Temmuz	Kasım
yaprak + ham meyve	yaprak + olgun meyve	yaprak (meyve yok)	

miRNA tanımlama ve saptama çalışmalarında biyoinformatik (bilgisayar tabanlı) ve deneysel yaklaşımlar olmak üzere genel olarak iki ana stratejiden yararlanılır. Bilgisayar tabanlı miRNA saptama stratejilerinde bir takım kısıtlamalar bulunmaktadır. Örneğin bazı miRNA'lar belli dokuda belli zamanda ve/veya belli faktörler altında ifade edilmektedirler. Bir diğer kısıtlama ise, her bitki için genomun yeterince dizilenmemiş olması ve şu ana kadar saptanan miRNA'ların sayısının belli sınırlarda olmasıdır. Dolayısıyla bu kısıtlamaları aşmak için deneysel yöntemlere başvurulmaktadır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Total RNA izolasyonu

Zeytin bitkisinin yaprak ve meyve örneklerinin toplam Ribonükleik asit (RNA) izolasyonları, TRIzol (Invitrogen) kimyasalı kullanılarak ve Budak (2009a) tarafından tarif edildiği gibi yapılmıştır. Kısaca 100 mg bitki örnekleri, sıvı azot ile parçalanarak 1 mL TRIzol reaktifi içeren 2 mL'lik steril tüplerde homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler 5 dk oda ısısında bekletilerek nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrışması sağlanmıştır. 1 mL TRIzol reaktifi için tüplerin içine 0,2 mL kloroform ilave edilmiştir. Tüpler 15 sn boyunca elle kuvvetlice çalkalanıp 2-3 dk oda ısısında bekletildikten sonra 15.000 rpm'de 20 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Üstteki sıvı faz yeni bir tüpe aktarılıp isopropil alkolle karıştırılarak RNA'nın çökmesi sağlanmıştır. Homojenizasyon esnasında kullanılan TRIzol reaktifinin yarısı kadar isopropil alkol ilave edilmiştir. Örnekler oda ısısında 10 dk bekletildikten sonra 15.000 rpm'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir. RNA çökeltisi, kullanılan her 1 mL TRIzol reaktifi için % 75'lik etanol ile yıkanmıştır. Örnekler vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10.000 rpm'de 5 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir. RNA çökeltisi 5-10 dk kurumaya bırakıldıktan sonra 30 µl steril deiyonize su (ddH₂O) ile çözülüp 10 dk 55-60 °C'de bekletilmiştir.

3.2.2 mirVana ile miRNA izolasyonu

10²-10⁷ hücre ya da 0,5-250 mg doku soğuk fosfat tampon çözeltisi (PBS)'de yıkanmıştır. Örnekler 300-600 µl Liziz/bağlanma tamponu içinde parçalanmıştır. 1/10 miRNA homojenat ilave edilip iyice vorteks edildikten sonra 10 dk buzda bekletilmiştir. miRNA homojenat ilave etmeden önce, lizat hacmini eşitlemek için asit-fenol:kloroform eklenmiştir. Karışım 30-60 sn vorteks edilmiştir. Organik ve sıvı fazları ayırmak için 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Dikkatlice sıvı faz kurtarıldıktan sonra yeni tüpe aktarılmıştır. sRNA'ları zenginleştirme yöntemi ile işleme devam edilmiştir. Organik ayırmadan sıvı fazı kurtarmak için 1/3 hacminde % 100 etanol ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır. Örneklerin her biri toplama tüplerinden birinin içindeki filtre zarfına yerleştirilmiştir.

Lizat/etanol karışımı filtre zarfının üzerine pipet ile aktarılmıştır. Karışımın filtreden geçmesi için 10.000 rpm'de 15 sn santrifüj edilmiştir. Süzüntüye 2/3 hacminde % 100 etanol eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Örneklerin her biri toplama tüplerinden birinin içindeki filtre zarfına yerleştirilmiştir. Süzüntü/etanol karışımı ikinci filtre zarfı üzerine pipet ile aktarılmıştır. Karışımın filtreden geçmesi için 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Tüm süzüntü/etanol karışımı süzgeçten geçene kadar sıvı fazı akıtma işlemi tekrarlanmıştır. Filtre zarfı 700 µl miRNA yıkama çözeltisi 1 ile yıkandıktan sonra 5-10 sn santrifüj edilmiştir. Sıvı faz akıtma işlemi yapılmıştır. 500 µl yıkama çözeltisi 2/3 ile yıkandıktan sonra 5-10 sn santrifüj edilmiştir. Sıvı faz akıtma işlemi yapılmıştır. Tekrar 500 µl yıkama çözeltisi 2/3 ile son kez yıkandıktan sonra 5-10 sn santrifüj edilmiştir. Sıvı faz akıtma işleminden sonra filtre zarfı aynı toplama tüpünün içine yerleştirilmiş ve sıvı atığı süzgeçten uzaklaştırmak için 1 dk santrifüj edilmiştir. Filtre zarfı yeni tüpe aktarılmıştır. Filtrenin tam merkezine önceden ısıtılmış (95 °C) 100 µl akıtma çözeltisi ya da nükleazsız su ilave edilmiştir. RNA'yı ayırmak için 20-30 sn en yüksek hızda santrifüj edilmiştir. Akıtılan RNA -20 °C veya -80 °C'de kullanılıncaya kadar saklanmıştır.

3.2.3 RNA'nın saflaştırılması

RNA izolasyonları tamamlandıktan sonra RNA örneklerinden 10 µg alınarak 10 ünite RNase ihtiva etmeyen Turbo DNase I (Ambion, Inc., TX, USA) ile 20 µl'lik reaksiyon hacminde toplanmış ve 37 °C'de 30 dk bekletilmiştir. 65 °C'de 10 dk ek inkübasyon ile toplam RNA örnekleri DNA'dan arındırılmıştır. RNA'ların kalitesi ve miktarı NanoDrop ölçümü ve jel elektroforezi ile belirlenmiştir.

3.2.4 sRNA kütüphanesinin oluşturulması

T4 RNA Ligaz (Promega ya da GE Amersham, FPLC pure) kullanılarak 3' adaptör ligasyonu yapılmıştır. Bunun için 2 µl 5X Ligasyon tampon çözeltisi, 2 µl 100 µM App17.91x, 5 µl purifiye edilmiş sRNA'lar ve 1 µl T4 RNA ligaz tüpe konularak 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Reaksiyon 15 µl 2X Urea yükleme boyası ile durdurulmuştur. Denatüre poliakrilamid jel [% 10 (0,5 mm)] hazırlanmış ve adaptör

bağlanmış RNA'lar jelden kesilerek yukarıda anlatıldığı gibi elüsyon yapılmıştır. 5' ucu adaptör ligasyonu ise 2 µl 5X Ligasyon tampon çözeltisi, 2 µl 200 µM 17.93R, 1 µl 4 mM ATP, 1 µl T4 RNA Ligaz, 3' adaptör bağlanmış 5 µl sRNA'ların bir araya getirilip 6 saat oda sıcaklığında bekletilmesiyle gerçekleştirilmiştir. 15 µl 2X Urea yükleme boyasıyla reaksiyon durdurulmuştur.

Ligasyondan sonra RNA'lar reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile komplementer DNA (cDNA)'ya çevrilerek, ardından çoğaltılmıştır. Bu işlem için; 5 µl bağlanmış RNA, 1 µl 100 µM 15.22, 10 µl ddH₂O bir tüpte birleştirilmiş ve 80 °C'de 2 dk ısıtılarak hemen buza alınmıştır. 6 µl 5X First Strand tampon çözeltisi (Invitrogen), 7 µl 10X deoksinükleotid trifosfat (dNTP) karışımı, 3 µl 100 mM dithiothreitol (DTT), 1 µl SuperScript III RT (200 U/µl) bir tüpte toplanarak 48 °C'de 1 saat inkübe edilmiş ve 1 µl RNase H ilave edilerek 37 °C'de 30 dk bekletilmiştir. Hazırlanan cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak 1 µl 100 µM 17.92, 1 µl 100 µM 17.93D primerleri ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) programlanmıştır. sRNA'ların cDNA kütüphanesi bu şekilde çoğaltılarak % 15 denatüre poliakrilamid jelde analiz edilmiştir. RT-PCR ürünleri EtBr yerine daha hassas olduğu için SYBR Gold boyasıyla boyanmıştır.

Çoğaltılan cDNA kütüphanesi jelden kesilip izole edilmiş ve elüsyonu yapılmıştır. Bu işlem iki kez fenol ve iki kez kloroform ekstraksiyonu ve NaCl ilave edilerek 0,3 M/EtOH çöktürülmesi ile tamamlanmıştır. Pellet çöktürülüp tekrar sulandırılmıştır. Sonrasında ise BanI (0,67 U) ile konkatamerizasyon sağlanmıştır. BanI kesim ürünleri yukarıdaki gibi purifiye edildikten sonra T4 DNA ligaz ile ligasyonu yapılmıştır. Ligasyon ürünlerinin % 2'lik GTG Nusieve Agaroz jelde 1X Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tamponu ile yürütülmesinden sonra kesilen > 300 baz çifti (bp) konkatamerler, 5 dk 65 °C'de eritilmiştir. Konkatamerlerin elüsyonu eşit hacimde fenol ile yapılmıştır. Oluşan karışım 5 dk buzda bekletilip 5.000 g'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Sonra sulu faz uzaklaştırılarak ayrışım tekrar 1:1'lik fenol-kloroform ile karıştırılmış ve tekrar bir ayrışım sadece kloroform ile tabi tutulmuştur. 0,06 hacim 5 M NaCl ve 2,5 hacim EtOH karıştırılarak -20 °C'de glikojen ile en az 2 saat çöktürülmüştür.

3.2.4.1 RNA kütüphanesinin klonlanması

RNA kütüphanesini klonlamak için önce 1X ligaz tampon çözeltisi, 5 ng pGEM-T Easy vektör (Promega), 3 ünite DNA ligaz enzimi (Promega) ve hazırlanan cDNA bir tüpe konularak hacim 10 µl'ye tamamlanmıştır. Bağlanma işlemi için 4 °C'de bir gece inkübe edilmiştir. Klonlama için bir koloniden elde edilmiş *E. coli* Dh5-α hücreleri kullanılmıştır. Bu deneyle beraber “*E.coli* ‘competent’ yani klonlamaya hazır hücrelerin elde edilmesi ve hücrelerin ligasyon ürünü ile transformasyonu”, “kolonilerden plazmid izolasyonu”, “izole edilen plazmidin kontrol edilmesi” işlemleri Unver (2008)'in doktora tezinde ayrıntılı olarak anlatılan yöntemlere göre yapılmıştır. DNA dizi analizleri ve homoloji çalışmaları ise seçilen klonlardan, biyoinformatik yaklaşımlar ile yapılmıştır (Unver and Budak 2009a).

3.2.4.2 Klonlama için ‘competent’ hücre hazırlanması

Bir koloniden elde edilmiş *E. coli* Dh5-α hücreleri 2 mL LB besiyerine konularak bir gece 37 °C, 250 rpm'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Bu hücrelerden 1 mL alınarak steril koşullarda yeni 100 mL LB'ye transfer edilmiş ve OD₆₀₀ 0,375 olana kadar bu hücreler büyütülmüştür. Hücreler steril 50 mL'lik falkon tüplerine aktarılıp 30 dk buzda bekletildikten sonra 4 °C, 4.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Toplanan hücrelerin üzerine 100 mM 10 mL CaCl₂ konularak buz üzerinde 30 dakika inkübe edildikten sonra 4 °C, 4.000 rpm'de tekrar santrifüj edilerek hücreler toplanmıştır. Toplanan hücreler 100 mM 1 mL CaCl₂'de çözüldükten sonra bir gece 4 °C'de bekletilip transformasyon için kullanılmıştır.

3.2.4.3 *E. coli* ‘competent’ hücrelerinin ligasyon ürünü ile transformasyonu

E. coli Dh5-α ‘competent’ hücrelerinden 50 µl alınarak 2 mL'lik steril tüpe aktarılmış ve üzerine 5 µl ligasyon ürünü konulduktan sonra 30 dk buzda inkübe edilmiştir. Daha sonra 42 °C'de 60 sn sıcaklık şoku uygulanıp, üzerine 150 µl SOC besiyeri konularak 45 dk 37 °C, 250 rpm'de sallanarak büyütülmüştür. Büyüyen hücreler ampisilin, X-gal

ve IPTG içeren LB agar kültür tabaklarına ekilerek 37 °C’de bir gece inkübe edildikten sonra beyaz koloniler seçilmiştir. Seçilen tek koloniler, steril tüpün içine 500 µl LB (ampisilinli) konularak bir gece 37 °C, 250 rpm’de sallanarak büyütülmüş ve 500 µl % 50 gliserol konularak -80 °C’de depolanmıştır. Seçilen kolonilerin içinde istediğimiz DNA parçasının olup olmadığını test etmek için tekrar gene özgü primerler ile PCR yapılmıştır (PCR koşulları ilk amplifikasyon ile aynı olmuştur). Bu bantlar da % 1’lik agaroz jelde görüntüledikten sonra stoklanan hücreler tekrar 2 mL LB (ampisilinli)’de bir gece 37 °C, 250 rpm’de sallanarak büyütülmüş ve plazmid izolasyonu yapılmıştır (Unver 2008).

3.2.4.4 Kolonilerden plazmid izolasyonu

Kolonilerden plazmid izolasyonu, QIAGEN QIAprep Spin Miniprep Kit protokolünde yazıldığı gibi yapılmıştır.

3.2.5 Yüksek verimli dizileme tekniği ile sRNA analizi

Düşük kaliteli parçaların süzülmesi, adaptör-adaptör ligasyonu ile oluşan kontaminasyonun temizlenmesi ve adaptör/alıcı dizilerinin kaldırılmasından sonra her bir benzersiz dizi okumalarının oluşumu dizi parçaları olarak sayılmıştır. Sonra kodlanmayan RNA’ların bozulmuş parçalarını sınıflandırmak için Rfam’de (Griffiths-Jones *et al.* 2005) ve GenBank’da mevcut olan kodlanmayan RNA’lar (rRNA, tRNA, snRNA, snoRNA) ile karşılaştırılmıştır. Buna ek olarak *Olea europaea*’da bilinen miRNA’ları tanımlamak için miRBase 18.0 (Griffiths-Jones *et al.* 2008) kullanılarak tüm diziler araştırılmıştır. Ardından *Olea europaea* ve diğer bitkilerde bilinen miRNA’ların evrimsel açıdan korunma ilişkileri araştırılmıştır. *Olea europaea* ve diğer bitkilerde bilinen bir miRNA’nın ikiden az uyumsuzluk ile homoloji göstermesi evrimsel açıdan korunmuş kabul edilmiştir. Bütün sRNA’lar ve miRBase’de bilinen miRNA’ların tanımlanmış ortologları SOAP 2.0 programı (Li *et al.* 2009) kullanılarak ifade edilmiş dizi parçaları (EST) taranmıştır.

3.2.5.1 Yeni miRNA'ların tahmini

Zeytin miRNA'larının tahmini önceden geliştirilmiş bitki miRNA tahminleri kriter olarak kullanılarak yapılmıştır (Allen *et al.* 2005). Geriye doğru katlanmış karakteristik özelliğe sahip miRNA öncülleri, yeni miRNA'ların tahmininde kullanılmıştır. Tahminler, Beijing Genom Enstitüsü (BGI) tarafından geliştirilmiş olan Mireap <<http://sourceforge.net/projects/mireap>> programında yapılmıştır. Zeytin miRNA'larının atipik ve yeni dizilerini tanımlamak için aşağıdaki yöntemler izlenmiştir. İlk olarak sRNA'ların haritalanmasıyla kesme noktalarından tanımlanmış aday miRNA bölgeleri taranmıştır. Daha sonra miRNA adaylarını seçmek için bilinen miRNA'ların kurtarılmış dizilerinin çoğunluğunu sağlayan sınırlayıcı önemli kriterler kullanılmıştır. Son olarak RNA ikincil yapıları, Mfold (Zuker 2003) kullanılarak kontrol edilmiştir.

3.2.5.2 miRNA hedef genlerinin tahmini

miRNA adaylarının tahmini hedef bölgeleri, özel Perl yazılım dilinde geliştirilen program kullanılarak zeytin EST ve miRNA'larının sıralanmasıyla tanımlanmıştır. Hedef gen tahminleri için Allen ve arkadaşları (2005), Schwab ve arkadaşları (2005) tarafından önerilen kurallar uygulanmıştır.

- ~ sRNA ve hedef arasında uyumsuzluk 4'den fazla olmamalı (G-U bazları yaklaşık 0,5 uyumsuzluk içerir),
- ~ miRNA ve hedef arasında 2 bitişik uyumsuzluktan fazla olmamalı,
- ~ Hedef ile miRNA'nın 2-12 pozisyonları arasında bitişik uyumsuzluk olmamalı (5' miRNA),
- ~ Hedef ile miRNA'nın 10-11 pozisyonları arasında uyumsuzluk olmamalı,

- ~ Hedef ile miRNA'nın 1-12 pozisyonları arasında uyumsuzluk 2,5'dan fazla olmamalı,
- ~ Hedef ile miRNA'nın MFE'si arasında onun mükemmel tamamlayıcılığı için miRNA bağlarının MFE'si % 74'den daha büyük olmalıdır.

3.2.6 miRNA'ların ölçülmesi

Özel doku ya da hücre tipinde miRNA'ların işlevlerinin anlaşılması için miRNA tanımlama ve sayısal olarak miktarlarını ölçme uygulamaları çok önemlidir. Bunun için Northern hibridizasyonu, klonlama ve mikroarray analizleri gibi metodlar oldukça yaygın kullanılmaktadır. Ne var ki, bu metodların etkinliği ve hassasiyeti düşük olup çok miktarda örnekleme için de uygun değildir. Bunların yerine daha etkin, hassasiyeti yüksek, göreceli ve sayısal olarak ölçüm sağlayan qRT-PCR metodu kullanılmaktadır. miRNA saptamak ve ölçmek için uygulanan metod temelde iki aşamadan oluşur. İlk aşamada, tasarlanan sap-ilmik RT primerinin, ölçülmesi amaçlanan miRNA'ya yapışarak onun üzerinden cDNA sentezini gerçekleştirmesi sağlanmıştır. İkinci aşamada ise özel olarak miRNA için hazırlanan ileri primeri ve sap-ilmige uygun olan evrensel geri primeri ile özel bir qRT-PCR reaksiyonu yapılmıştır (Cheen *et al.* 2005).

3.2.6.1 miRNA'lara özgü cDNA sentezi

Zeytin bitkisinde var yılının Temmuz ve Kasım aylarının yaprak-meyve örneklerinden, yok yılının Temmuz ve Kasım aylarının sadece yaprak örneklerinden izole edilen RNA'lardan miRNA cDNA sentezi yapılmıştır. Ardından miRNA ifade düzeylerini tespit etmek için qRT-PCR metodu uygulanmıştır. miRNA'lara ait cDNA sentezlemek için kullanılacak olan toplam RNA'ların kolondan geçirilerek temizlenme aşamasına tabi tutulmaması gerekmektedir. Çünkü kolonda temizleme yapılırken sRNA'lar (miRNA, siRNA, snRNA vb) kaybedilmektedir. miRNA'lara özgü cDNA sentezlemek amacıyla "sap-ilmik" denilen yapıyı da içinde barındıran ve miRNA'nın 3' ucundaki son 6 nükleotide eşlenik olan diziye sahip primerler tasarlanmıştır. cDNA sentezlemek amacıyla hazırlanan primerlerin listesi Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 miRNA cDNA sentezi için tasarlanan RT primerler

Oeu-miR159-RT 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGG-3'
Oeu-miR164-RT 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGG-3'
Oeu-miR166-RT 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGG-3'
Oeu-miR168-RT 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACATTCAC-3'
Oeu-miR171-RT 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGG-3'
Oeu-miR395-RT 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGG-3'
Oeu-miR396-RT 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAGTTCA-3'
Oeu-miR156-RT 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACGTGCTC-3'
Oeu-miR172-RT 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCAGCAG-3'

miRNA'ya özgü cDNA sentezlemek için öncelikle zeytin bitkisinden toplanan örneklerden izole edilen toplam RNA'ların reaksiyona 1,5 µg'da eşitlenerek başlaması sağlanmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 1.500 ng RNA için toplam RNA'lardan alınması gereken hacim

sRNA kütüphanesi	RNA yoğunluğu (ng/µl)	1.500 ng RNA (µl)
Ham meyve (HM)	541,4	2,77
Olgun meyve (OM)	560,4	2,68
Var kasım (VK)	398,6	3,76
Yok kasım (YK)	575,5	2,61
Var temmuz (VT)	337,7	4,44
Yok temmuz (YT)	474,6	3,16

miRNA cDNA sentezi ve qRT-PCR deneyleri için farklı kontrol cDNA sentez reaksiyonları da yapılmıştır. Bunlar NoRT, NoRNA ve NoSSIII'dir. NoRT, kalıp RNA'nın ve SSIII revers transkriptaz enziminin ve diğer gerekli bileşenlerin bulunduğu [SSIII tamponu, dNTP mix, Ribonükleaz inhibitör (RNaz out), DTT] fakat özgün RT primerinin bulunmadığı kontrol cDNA reaksiyonudur. NoRNA, bütün gerekli sentez kimyasallarının bulunduğu fakat RNA'nın bulunmadığı negatif kontrol reaksiyonudur. NoSSIII ise RNA kalıbı da dahil olmak üzere bütün kimyasalların bulunduğu fakat revers transkriptaz enziminin bulunmadığı kontrol reaksiyonudur. miRNA cDNA sentezi ve qRT-PCR işlemlerinde, Varkonyi-Gasic ve arkadaşları (2007) tarafından geliştirilen protokoller esas alınmıştır. miRNA cDNA sentezinin ilk aşaması için Çizelge 3.4'de gösterilen bileşenler, numaralandırılan tüplere ilave edilmiştir.

Çizelge 3.4 miRNA cDNA sentezi için ilk aşama

Tüp numarası	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Kütüphane ismi	HM	OM	VK	YK	VT	YT	NoRT	NoRNA	NoSSIII
Toplam RNA	2,77	2,68	3,76	2,61	4,44	3,16	2,61	-	2,61
1 pmol RT primeri	1	1	1	1	1	1	-	1	1
10 mM dNTP	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
ddH₂O	9,38	9,47	8,39	9,54	7,71	8,99	9,54	12,15	9,54
Toplam hacim	13,65 µl								

PCR cihazında tüpler önce 65 °C'de 5 dk bekletilmiş ve hemen buza alınmıştır. miRNA cDNA sentezinin ikinci aşamasında her bir tüpe; 4 µl 5X First strand tampon çözeltisi, 2 µl 0,1 M DTT, 0,1 µl RNase out (40 U/µl), 0,25 µl SSIII (200 U/µl) karışımı ilave edilmiştir. 9. tüpe 0,25 µl SSIII yerine 0,25 µl ddH₂O ilave edilmiştir. Tüm tüpler tekrar PCR cihazına konularak istenilen sıcaklık programı uygulanmıştır (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 miRNA cDNA sentezi PCR programı

Sıcaklık	Süre	
16 °C	30 dk	} 60 döngü
30 °C	30 sn	
42 °C	30 sn	
50 °C	1 sn	
85 °C	5 dk	

3.2.6.2 miRNA'ların qRT-PCR ile miktar ölçümü

qRT-PCR işlemleri, Roche SYBER Green Master karışımı kullanılarak Roche LightCycler 480 Real-Time PCR cihazı'nda gerçekleştirilmiştir. qRT-PCR deneyleri için RT primerinde bulunan diziden yararlanılarak her miRNA için ortak olan evrensel geri “universal reverse” primeri kullanılmıştır. Her miRNA için özgün olarak tasarlanan ileri “forward” primerleri ise Çizelge 3.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6 miRNA miktar analizi için tasarlanan ileri primerler

Oeu-miR159-F 5'-GCGGCGGTATTGGAGTGAAGGGA-3'
Oeu-miR164-F 5'-TCGCTTGGAGAAGCAGGGCA-3'
Oeu-miR166-F 5'-GCGGCGGTCGGACCAGGCTTCAT-3'
Oeu-miR168-F 5'-TTCCTTGATCCCGCCTTGCACCAA-3'
Oeu-miR171-F 5'-TTCCTTATTGAGCCGTGCC-3'
Oeu-miR395-F 5'-CGGCGGCTGAAGTGTTGGGGG-3'
Oeu-miR396-F 5'-TCGCGTTCCACAGCTTTCT-3'
Oeu-miR156-F 5'-TCGCGTGACAGAAGAGAGA-3'
Oeu-miR172-F 5'-CGGCGGAGGATCTTGATGATG-3'
Evrensel geri primer 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'

6 farklı kütüphanenin üç farklı cDNA seyreltmesi (1/2, 1/4 ve 1/8) ile üç tekrarlı ölçüm yapılmıştır. Hazırlanan kontrol cDNA (NoRT, NoSSIII, NoRNA)'ların bir seyreltmesi (1/10) ile üç tekrarlı ölçüm yapılmıştır. qRT-PCR'in kontrolü için negatif kontrol (NTC) hazırlanmıştır. qRT-PCR işlemi için bir tabakta bulunan 96 kuyucuğun 64'ü kullanılmıştır. 64 kuyucuk için Çizelge 3.7'de gösterilen oranlarda bir karışım hazırlanmıştır.

Çizelge 3.7 6 farklı kütüphanede miRNA miktar analizi için qRT-PCR karışımı

Bileşenler	1X	64X
2X SYBR master karışım	10	640
100 pmol ileri primer	0,1	6,4
100 pmol geri primer	0,1	6,4
ddH ₂ O	7,8	499,2
Toplam hacim	18 µl	1.152 µl

Bu kapsamda hazırlanan qRT-PCR deney planı Şekil 3.1'de gösterilmiştir. 64 kuyucuğun her birine hazırlanan SYBER master karışımından 18'er µl dağıtıldıktan sonra 2'şer µl cDNA seyreltmeleri ilavesi ile toplam hacim 20 µl olmuştur. NTC'nin hazırlandığı H kuyucuğuna cDNA yerine 2 µl ddH₂O ilave edilmiştir.

	1/2			1/4			1/8					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ham meyve	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○
Olgun meyve	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○
Var kasım	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○
Yok kasım	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○
Var temmuz	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○
Yok temmuz	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○
No RT-No RNA-No ssIII	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○
Negatif Kontrol (NTC)	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Şekil 3.1 miRNA'nın qRT-PCR deney planı

miRNA qRT-PCR deneylerinde her farklı miRNA primeri için en uygun bağlanma sıcaklığı belirlenmiştir. Çizelge 3.8’de bağlanma sıcaklığı örnek olarak 56 °C gösterilmiştir. Erime (melting) eğrisi analizi için ise örnekler 95 °C’de denatüre edilip 65 °C’de bekletilmiştir. Floresan sinyalleri 530 nm’de 65 °C’den 95 °C’ye kadar her bir saniyede, 0,5 °C derece artışta alınmıştır. Sonuçlar LightCycler®480 Software yazılımı aracılığı ile analiz edilmiştir (Unver and Budak 2009a, Unver *et al.* 2009b).

Çizelge 3.8 miRNA qRT-PCR programı

Reaksiyon aşaması	Sıcaklık	Süre	
Ön ısıtma (parçalama)	95 °C	5 dk	
Çoğalma	95 °C	5 sn	} 40-45 döngü
	56 °C	10 sn	
	72 °C	1 sn	

3.2.7 miRNA hedef genlerinin biyoinformatik yöntemlerle saptanması

İfade seviyelerinde farklılık olan miRNA’ların tahmini hedeflemiş olduğu genler, ilk aşamada biyoinformatik yaklaşımlar kullanılarak saptanmıştır. Unver ve Budak (2009a) tarafından vurgulanan hedef gende aranan çeşitli kriterler göz önünde bulundurularak BLASTn ve BLASTX algoritmaları ile hedef genlere ulaşılmıştır. Bu algoritmaların eksik kaldığı yerde daha etkin ve hassas miRU <<http://bioinfo3.noble.org/miRNA/miRU.htm>> yazılımı kullanılmıştır. miRU, seçilen olgun miRNA dizisinin programa yüklenmesi ile potansiyel miRNA’ya eşlenik hedef diziyi içeren genleri tarar (Zhang *et al.* 2005). Olgun miRNA dizisi (19-28 nt uzunluğunda) 5’den 3’ yönüne doğru yazılıma yüklenerek *P. trichocarpa* veri tabanlarında olası hedef genler taranmıştır. Olgun miRNA ile hedef gen arasında izin verilecek uyumsuzluklar 1 ile 3 şeklinde ayarlanmıştır. Program çıktıları arasında olgun miRNA dizisinin hangi olası hedef genler ile eşleştiği, aralarında varsa kaç yanlış eşleşme olduğu, olgun miRNA dizisinin hedef transkriptteki kesim bölgesi bulunmuştur.

3.2.7.1 miRNA hedef genlerinin cDNA sentezi

Biyoinformatik olarak tespit edilen hedef genlerin qRT-PCR ile miktarını ölçmek için öncelikle her bir kütüphane için izole edilen toplam RNA'lar kolondan geçirilerek temizlenmiştir. Daha sonra temizlenen RNA'lara Çizelge 3.9'da gösterilen bileşenlerin ilave edilmesiyle oluşan karışım, 65 °C'de 5 dk bekletilip hemen buza alınmıştır.

Çizelge 3.9 miRNA hedef gen cDNA sentezinin ilk aşaması

Bileşenler	1X
50 pmol/µl Oligo dT (20) primeri	1 µl
Toplam RNA	1 µg-5 µg
10 mM dNTP	1 µl
ddH ₂ O	-
Toplam hacim	12 µl

Daha sonra tüpün içerisine 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNaz out ilave edilmiştir. 42 °C'de 2 dk bekletildikten sonra 1 µl (200 U/µl) Superscript III reverse transkriptaz enzimi ilave edilmiştir. 1,5 saat 50 °C'de reaksiyon gerçekleştirilmiş ve 70 °C'de 15 dk bekletilerek reaksiyon sonlandırılmıştır.

3.2.7.2 miRNA hedef genlerinin qRT-PCR ile miktar ölçümü

Biyoinformatik yöntemlerle saptanan hedef genler için tasarlanan ileri (F) ve geri (R) primerleri Çizelge 3.10'da gösterilmiştir. Primerler, hedef genin en fazla 200 baz çifti uzunluğunda bir bölgeyi çoğaltacak şekilde tasarlanmıştır.

Çizelge 3.10 miRNA hedef gen miktar analizi için tasarlanan ileri ve geri primerler

Hedef gen primerleri	İleri (F) primerler (5' > 3')	Geri (R) primerler (5' > 3')
Oeu-Tar-miR159	AGGTAACGGCAGGGTGGAA	CAATAGCATGACCCCAACGAG
Oeu-Tar-miR164	TCAGCCACGCTCACAGGCCT	GTCGGTCAGGAGGCTCTCCG
Oeu-Tar-miR166	GCTCAATGAAGGCCTTGCCCG	GCACGCGAAGCCCTGTTGCA
Oeu-Tar-miR168	CGCCCGATAGATCGAGAAA	AGCCTCAACAGAAGCCAGAG
Oeu-Tar-miR171	GCCGTCAACGCCAACCTCGA	AGCCTCTACTGGCGTCCGT
Oeu-Tar-miR395	TGTTGGTCGCGATCCTGCCG	CGCCAACCCACGCATCTTGGT
Oeu-Tar-miR396	CTGCAGTGGATCATGGTGT	GCCCTTCTCTCCCCATTTAG

Her bir hedef genin miktar analizi için Çizelge 3.11'de gösterilen bileşenler ilave edilerek özgün karışım hazırlanmıştır. 6 farklı kütüphane için izole edildikten sonra temizlenen toplam RNA'lardan sentezlenen cDNA'ların 1/20 seyreltmeleri 3 tekrarlı olarak kullanılmıştır. 18S rRNA geni baz alınarak her bir kütüphanedeki cDNA yoğunluğu eşitlendikten sonra deneye başlanmıştır.

Çizelge 3.11 miRNA hedef genlerinin miktar analizi için qRT-PCR karışımı

Bileşenler	1X	18S rRNA (19X)	tar 396 (19X)	tar 395 (19X)	tar 164 (19X)
2X SYBR master karışım	10	190	190	190	190
100 pmol ileri primer	0,1	1,9	1,9	1,9	1,9
100 pmol geri primer	0,1	1,9	1,9	1,9	1,9
ddH ₂ O	7,8	148,2	148,2	148,2	148,2
Toplam hacim	18 µl	342 µl	342 µl	342 µl	342 µl

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
18S rRNA	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
A		HM (1/20)		OM (1/20)		VK (1/20)		YK (1/20)				
B	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○
		VT (1/20)		VT (1/20)		NTC						
tar 396	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
C		HM (1/20)		OM (1/20)		VK (1/20)		YK (1/20)				
D	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○
		VT (1/20)		VT (1/20)		NTC						
tar 395	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
E		HM (1/20)		OM (1/20)		VK (1/20)		YK (1/20)				
F	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○
		VT (1/20)		VT (1/20)		NTC						
tar 164	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
G		HM (1/20)		OM (1/20)		VK (1/20)		YK (1/20)				
H	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○
		VT (1/20)		VT (1/20)		NTC						

Şekil 3.2 tar396, tar395 ve tar164 hedef genlerinin qRT-PCR deney planı

Bu kapsamda hazırlanan qRT-PCR deney planı Şekil 3.2’de gösterilmiştir. 76 kuyucuğun her birine hedef gene özgün olarak hazırlanan SYBER master karışımından 18’er µl dağıtıldıktan sonra 2’şer µl 1/20 cDNA seyreltmeleri ilavesi ile toplam hacim 20 µl olmuştur. NTC’nin hazırlandığı kuyucuklara cDNA yerine 2 µl ddH₂O ilave edilmiştir. Her farklı hedef gen primeri için en uygun bağlanma sıcaklığı belirlenmiştir. Çizelge 3.12’de verilen qRT-PCR programında tar395, tar396 ve tar164’ün bağlanma sıcaklığı 55 °C olarak gösterilmiştir.

Çizelge 3.12 miRNA hedef geni qRT-PCR programı

Reaksiyon aşaması	Sıcaklık	Süre	
Ön ısıtma (parçalama)	95 °C	5 dk	
Çoğalma	95 °C	10 sn	} 41 döngü
	55 °C	20 sn	
	72 °C	10 sn	

4. BULGULAR

Sistemik olarak bitki miRNA'larını tanımlamak için yüksek verimli dizileme tekniğinin son yıllarda başarılı bir şekilde uygulanmasıyla miRNA fonksiyonları hakkındaki bilgiler büyük ölçüde artmaktadır (Wang *et al.* 2011). Bu tez çalışmasında zeytinde periyodisite ile ilişkili miRNA'ların ve hedef genlerinin biyoinformatik ve deneysel analizleri yapılmıştır.

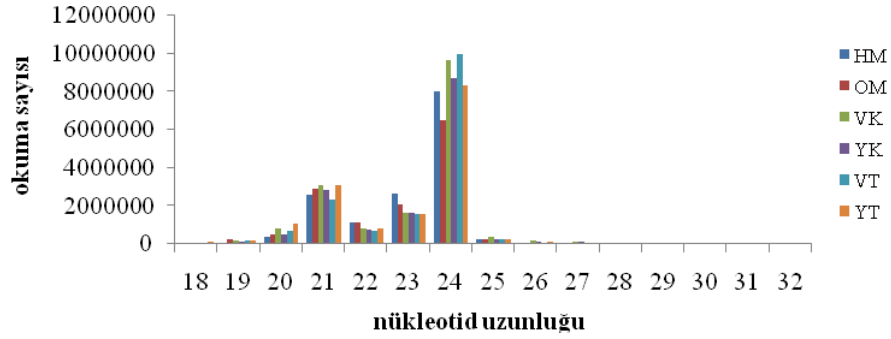
4.1 Biyoinformatik Analizler

Zeytin bitkisinin periyodisite ile ilişkili sRNA'larının belirlenmesi için var ve yok yıllarında toplanan örneklerden oluşturulan yaprak-meyve kütüphanelerine ait okuma istatistikleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Illumina HiSeq 2000 yüksek verimli dizileme tekniği ile toplamda yaklaşık 94 milyon, her bir kütüphanede ise yaklaşık 15 milyon ham okuma elde edilmiştir. Her bir kütüphanede okumaların yaklaşık % 99,4'ünü sadece temiz okumalar oluşturmaktadır (Yanik *et al.* 2013).

Çizelge 4.1 6 farklı kütüphanedeki sRNA'ların okuma istatistikleri

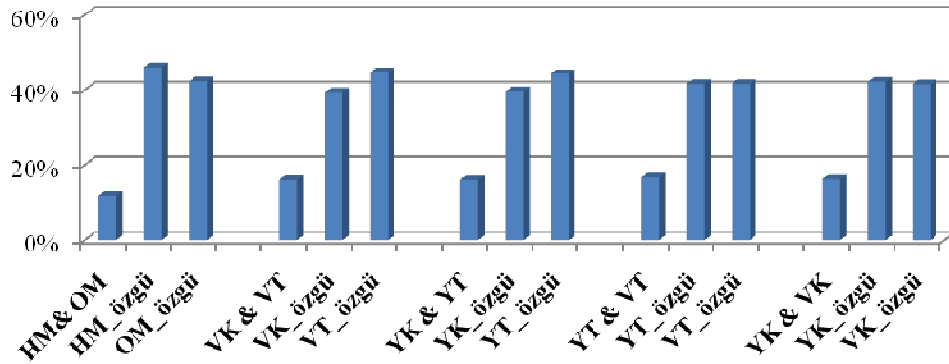
	HM		OM		VK		YK		VT		YT	
	okuma sayısı	%	okuma sayısı	%	okuma sayısı	%	okuma sayısı	%	okuma sayısı	%	okuma sayısı	%
Toplam okuma	15364727		13895311		15310134		15849260		17043189		16064294	
Yüksek verim	15340544	100	13868830	100	15288291	100	15825515	100	17018648	100	16041414	100
Boş 3'adaptör	4407	0,03	4141	0,03	3703	0,02	4334	0,03	3941		3937	0,02
Boş okuma	6029	0,04	1148	0,01	3681	0,02	2995	0,02	2750	0,02	4423	0,03
Boş 5'adaptör	46316	0,3	12104	0,09	93196	0,61	40797	0,26	18866	0,11	38204	0,24
<18 nt okuma	23051	0,15	33526	0,24	32945	0,22	66057	0,42	42170	0,25	62461	0,39
A kuyruğu	727	0	590	0	1298	0,01	911	0,01	712	0	529	0
Temiz okuma	15260014	99,48	13817321	99,63	15153468	99,12	15710421	99,27	16950209	99,6	15931860	99,32

Okumaların uzunlukları, kütüphanelerin her birinde oldukça benzer görülmüştür. 18-32 nt uzunluğundaki miRNA'lar arasında en fazla yoğunlukta 24 nt uzunluğundaki miRNA'lara rastlanmıştır (Şekil 4.1) (Yanik *et al.* 2013).



Şekil 4.1 6 farklı kütüphanedeki miRNA'ların nükleotid uzunlukları

HM-OM, VK-VT, YK-YT, YT-VT, YK-VK kütüphaneleri arasındaki ortak ve özgün benzersiz diziler tanımlanmıştır. Benzersiz dizilerin yaklaşık % 12'si meyve kütüphaneleri, yaklaşık % 16'sı yaprak kütüphaneleri arasında paylaşılmıştır. Kütüphaneler arasındaki özgün okuma oranları karşılaştırıldığında en çok HM-OM kütüphaneleri arasında fark bulunurken, bunu sırasıyla VK-YK, VT-YT kütüphaneleri izlemiştir. Yaprak kütüphanelerinin her birinde hemen hemen eşit okuma olmuştur (Şekil 4.2) (Yanik *et al.* 2013).



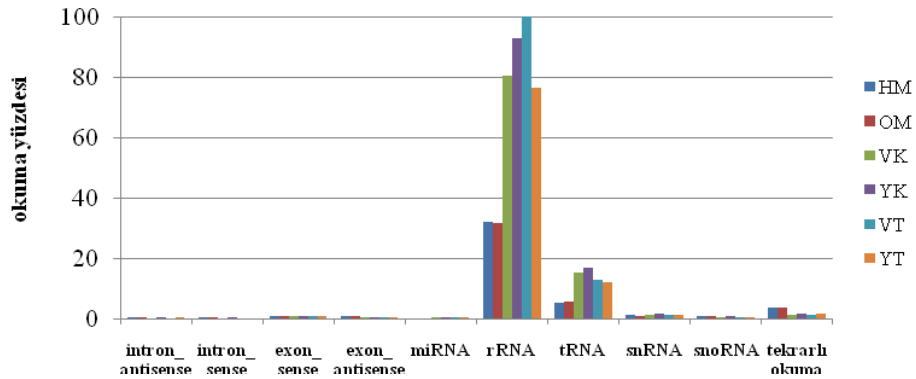
Şekil 4.2 Benzersiz okumaların ortak ve özgü yüzdesi

Her bir kütüphanede benzersiz dizi olarak gruplandırılan sRNA'lar, *P. trichocarpa* genomu referans alınarak SOAP2 programı ile haritalanmıştır. Referans genom belirlenmeyen okumalara sahip olduğundan benzersiz sRNA okumalarının çok düşük yüzdesi referans genom ile eşleşmiştir (Çizelge 4.2). Örneğin; HM kütüphanesinde 7.933.475 milyon benzersiz sRNA okumalarından sadece 26.242 (% 0,33)'si haritalanmıştır (Yanik *et al.* 2013).

Çizelge 4.2 6 farklı kütüphanedeki benzersiz sRNA'ların istatistiği

Kütüphane	Benzersiz sRNA	Yüzde (%)	Toplam sRNA	Yüzde (%)
HM	26.242	0,33	850.744	5,57
OM	26.711	0,36	1.219.147	8,82
VK	22.769	0,42	1.353.664	8,93
YK	27.589	0,5	2.126.303	13,53
VT	26.735	0,45	1.876.682	11,07
YT	28.383	0,47	1.412.100	8,86

sRNA okumaları, GenBank ve Rfam veri tabanları taranıp Şekil 4.3'de gösterildiği gibi farklı kategorilerde (miRNA, rRNA, tRNA, snRNA, snoRNA) sınıflandırılmıştır. Her bir kütüphanede bilinmeyen sRNA'ların haricinde çoğunluğu rRNA, takibinde ise tRNA oluşturmaktadır.



Şekil 4.3 6 farklı kütüphanedeki farklı sRNA gruplarının sınıflandırılması

Bazı bitki türlerinde farklı miRNA'lar tanımlanmasına rağmen zeytin miRNA'ları, miRBase versiyon 18.0 <<http://www.mirbase.org>> ve PMRD <<http://bioinformatics.cau.edu.cn/PMRD>> veri tabanlarında mevcut değildir. Son zamanlarda zeytinde RNA susturma ile ilişkili sRNA'lar raporlanmıştır. Zeytin sRNA'ları, korunmuş ve yeni miRNA'ları tanımlamak için 52 bitki türüne ait 4.014 Viridiplantae miRNA'sı içeren miRBase versiyon 18.0 kullanılarak BLASTn <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MLACourse/Modules/BLAST/nucleotide_blast.html> veri tabanında taranmıştır (Yanik *et al.* 2013).

Akraba türler arasındaki korunmuş miRNA ailelerinden dolayı zeytin miRNA'ları, dizisi bilinen kavak (*Populus trichocarpa*) referans genomu içinde değerlendirilmiştir. Yapılan karşılaştırma sonucunda 22 miRNA ailesine ait 136 korunmuş miRNA tanımlanmıştır (Ek 1). Belirlenen miRNA aileleri, çeşitli bitki türleri için de korunmuş bulunmuştur. miRNA'ların kütüphanelerdeki okuma sayıları Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Bazı miRNA'lar her kütüphanede eşit miktarda bulunmasına rağmen çoğunun okuma sayısı kütüphaneler arasında çeşitlilik göstermiştir. Ayrıca bazı miRNA'lar her ne kadar özgün ifade edilmiş olsa da çok düşük sayıda bulunmuştur. Örneğin; miR319e, miR319f, miR319g, miR319h sadece YK ve YT kütüphanelerinde görülmüştür (Çizelge 4.3) (Yanik *et al.* 2013).

Belirlenen miRNA'ların çoğu, yaprak kütüphaneleri ile karşılaştırıldığında meyve kütüphanelerinde ya bulunamamış ya da az sayıda tespit edilmiştir. HM kütüphanesinde, OM'ye göre önemli derecede fazla sayıda miRNA ifade edilmiştir. Örneğin; miR395'in ifadesi, HM kütüphanesinde OM'ye göre 4 kat fazla olmuştur (Çizelge 4.3). Yaprak kütüphaneleri arasındaki miRNA profili de farklı olmuştur. VT-YT yaprak kütüphaneleri arasında özgün miRNA profili gözlemlenirken, kasım kütüphaneleri arasında YK daha fazla miRNA profiline sahip olmuştur. VT kütüphanesinde VK'ya göre daha fazla miRNA ifade edilmiştir (Yanik *et al.* 2013).

Çizelge 4.3 6 farklı kütüphanede belirlenen miRNA'ların okuma sayıları

miRNA	HM	OM	VK	YK	VT	YT
Oeu_miR156a	90292	39031	124269	643286	339746	311706
Oeu_miR156b	90252	39016	124180	643040	339621	311629
Oeu_miR156c	90292	39031	124269	643286	339746	311706
Oeu_miR156d	90218	39076	124178	643011	339606	311576
Oeu_miR156e	90218	39076	124178	643011	339606	311576
Oeu_miR156f	90292	39031	124269	643286	339746	311706
Oeu_miR156g	24167	16890	100442	172856	193886	130260
Oeu_miR156h	24044	16818	100233	172426	193558	129940
Oeu_miR156i	24167	16890	100442	172856	193886	130260
Oeu_miR156j	24167	16890	100442	172856	193886	130260
Oeu_miR156k	78	31	135	691	337	306
Oeu_miR159a	605	363	2593	3673	1908	7809
Oeu_miR159b	605	363	2591	3673	1909	7808
Oeu_miR159c	605	363	2593	3673	1908	7809
Oeu_miR159d	1	0	0	2	2	0
Oeu_miR160a	4	2	4	83	18	109
Oeu_miR160b	2	2	1	69	11	98
Oeu_miR160c	2	2	1	69	11	98
Oeu_miR160d	4	2	4	83	18	109
Oeu_miR160g	0	0	0	1	0	0
Oeu_miR164a	63	28	1577	2050	3133	4902
Oeu_miR164b	63	28	1575	2046	3136	4896
Oeu_miR164c	63	28	1575	2046	3131	4895
Oeu_miR164d	63	28	1577	2050	3133	4902
Oeu_miR164e	64	28	1602	2066	3166	4955
Oeu_miR164f	1	2	0	0	0	1
Oeu_miR166a	127248	52310	419523	491358	542522	306999
Oeu_miR166b	127229	52256	419792	491598	543180	307541
Oeu_miR166c	127212	52264	419434	491303	542458	306940
Oeu_miR166d	127249	52247	419941	491769	543446	307715
Oeu_miR166e	127229	52256	419792	491598	543180	307541
Oeu_miR166f	127249	52247	419941	491769	543446	307715
Oeu_miR166g	130974	55055	435594	510783	560419	317070
Oeu_miR166h	130974	55056	435594	510783	560419	317070
Oeu_miR166i	127266	52249	419710	491618	542907	307162
Oeu_miR166j	127334	52402	419709	491540	542715	307163
Oeu_miR166k	127334	52402	419709	491540	542715	307163
Oeu_miR166l	127266	52249	419710	491618	542907	307162
Oeu_miR166m	130970	55036	435737	510951	560657	317213
Oeu_miR166n	8529	6286	18521	23769	21358	15080
Oeu_miR166o	8529	6285	18521	23769	21358	15080

Çizelge 4.3 6 farklı kütüphanede belirlenen miRNA'ların okuma sayıları (devam)

Oeu_miR166p	2	0	3	13	11	10
Oeu_miR166q	8538	6292	18512	23768	21362	15078
Oeu_miR167a	19	13	359	141	318	412
Oeu_miR167b	7	7	349	133	302	404
Oeu_miR167c	19	13	360	141	318	412
Oeu_miR167d	7	7	349	133	302	404
Oeu_miR167e	31	7	204	200	492	427
Oeu_miR167f	57	40	18541	22195	41904	26123
Oeu_miR167g	57	40	18598	22204	41915	26140
Oeu_miR168a	221292	157636	163173	198720	108056	95642
Oeu_miR168b	221753	158132	163292	198885	108320	95878
Oeu_miR169a	4	7	2	5	3	13
Oeu_miR169b	4	7	2	5	3	13
Oeu_miR169c	4	7	2	5	3	13
Oeu_miR169d	0	0	48	41	42	59
Oeu_miR169e	0	0	48	41	42	59
Oeu_miR169f	0	0	50	41	41	59
Oeu_miR169g	0	0	48	41	42	59
Oeu_miR169h	0	0	48	41	42	59
Oeu_miR169i	0	0	0	0	1	1
Oeu_miR169j	0	0	0	0	1	1
Oeu_miR169k	0	0	0	0	1	1
Oeu_miR169l	0	0	0	0	1	1
Oeu_miR169m	0	0	0	0	1	1
Oeu_miR169r	0	0	0	0	2	10
Oeu_miR169s	0	0	48	41	42	59
Oeu_miR169v	0	0	0	0	1	1
Oeu_miR169w	0	0	0	0	1	1
Oeu_miR171a	33	17	12	12	9	12
Oeu_miR171b	33	17	12	12	9	12
Oeu_miR171c	0	0	4	0	3	3
Oeu_miR171d	0	0	4	0	3	3
Oeu_miR171e	33	17	12	12	9	11
Oeu_miR171f	33	17	12	12	9	11
Oeu_miR171g	33	17	13	12	9	12
Oeu_miR171h	33	17	13	12	9	12
Oeu_miR171i	33	17	12	12	9	11
Oeu_miR172a	359	201	5070	3060	3372	2545
Oeu_miR172b	359	202	5070	3060	3373	2545
Oeu_miR172c	359	201	5070	3060	3372	2545
Oeu_miR172d	3	1	6	12	14	9
Oeu_miR172e	3	1	6	12	14	9

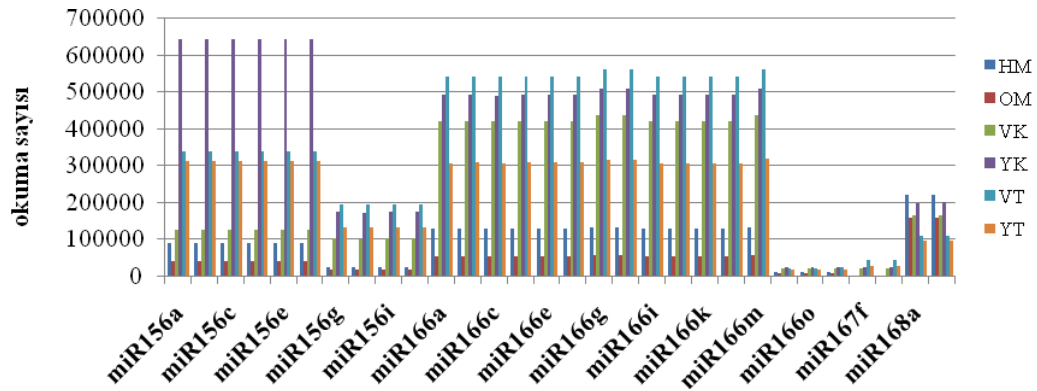
Çizelge 4.3 6 farklı kütüphanede belirlenen miRNA'ların okuma sayıları (devam)

Oeu_miR172f	359	202	5070	3060	3373	2545
Oeu_miR172g	0	0	3	2	1	4
Oeu_miR172h	0	0	3	2	1	4
Oeu_miR172i	11	6	121	67	89	66
Oeu_miR319a	0	0	0	1	2	6
Oeu_miR319b	0	0	0	1	2	5
Oeu_miR319c	0	0	1	2	2	7
Oeu_miR319d	0	0	1	2	2	7
Oeu_miR319e	0	0	0	2	0	5
Oeu_miR319f	0	0	1	3	0	8
Oeu_miR319g	0	0	1	3	0	8
Oeu_miR319h	0	0	0	2	0	5
Oeu_miR390a	114	109	87	176	105	97
Oeu_miR390b	113	108	87	176	105	97
Oeu_miR390c	114	109	87	176	105	97
Oeu_miR390d	113	108	87	176	105	97
Oeu_miR393a	0	7	2	1	2	4
Oeu_miR393b	0	7	2	1	2	4
Oeu_miR393c	16	57	132	215	341	509
Oeu_miR393d	16	57	132	215	341	509
Oeu_miR394a-5p	0	0	0	9	5	4
Oeu_miR394b-5p	0	0	0	9	5	5
Oeu_miR395b	16	1	2	13	96	39
Oeu_miR395c	16	1	2	13	96	39
Oeu_miR395d	16	1	2	13	96	39
Oeu_miR395e	16	1	2	13	96	40
Oeu_miR395f	16	1	2	13	96	40
Oeu_miR395g	16	1	2	13	96	39
Oeu_miR395h	16	1	2	13	96	39
Oeu_miR395i	16	1	2	13	96	39
Oeu_miR395j	16	1	2	13	96	39
Oeu_miR396a	36	36	1367	786	1051	832
Oeu_miR396b	36	36	1367	786	1051	832
Oeu_miR396c	39	73	296	171	276	278
Oeu_miR396d	39	73	296	171	276	278
Oeu_miR396e	39	74	296	172	276	278
Oeu_miR396f	0	0	222	61	90	357
Oeu_miR396g	0	0	269	95	116	525
Oeu_miR397a	6	6	71	163	246	300
Oeu_miR397b	0	0	0	1	0	2
Oeu_miR398b	0	1	2	9	9	10
Oeu_miR398c	0	1	2	9	9	10

Çizelge 4.3 6 farklı kütüphanede belirlenen miRNA'ların okuma sayıları (devam)

Oeu_miR399b	0	0	0	0	0	1
Oeu_miR399c	0	0	0	0	0	1
Oeu_miR399f	0	0	0	0	0	2
Oeu_miR399g	0	0	0	0	0	1
Oeu_miR399i	9	10	2	7	23	39
Oeu_miR403a	121	105	945	968	1360	1130
Oeu_miR403b	121	105	941	966	1359	1125
Oeu_miR403c	121	105	941	966	1357	1124
Oeu_miR408	1	2	5	60	70	97
Oeu_miR530a	0	0	0	1	1	0

Kütüphanelerdeki çoğu dizinin az sayıda bulunmasının, düşük yoğunluktaki cDNA'dan ve zeytin bitkisindeki geniş sRNA çeşitliliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak 4 miRNA (miR156, miR166, miR167 ve miR168) her bir kütüphanede çok fazla sayıda görülmüştür. En fazla sayıdaki miRNA'lar Şekil 4.4'de gösterilmiştir. miR156, miR159 ve miR166, yaprak kütüphanelerinde meyve kütüphanelerine oranla daha fazla bulunmuştur. miR159, yok yılı kütüphanelerinde var yılı kütüphanelerine göre daha fazla ifade edilmiştir. Ancak miR156, VK-YK kütüphaneleri arasında benzer bulunmuştur. miR166, yaprak kütüphanelerinin her birinde biraz farklılık göstererek aynı oranda ifade edilmiştir. miR168 ise kütüphaneler arasında önemli derecede değişiklik göstermiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.4) (Yanik *et al.* 2013).



Şekil 4.4 6 farklı kütüphanede en fazla sayıda ifade edilen miRNA'lar

Zeytin bitkisinde tahmini yeni miRNA'ları tanımlamak için miRNA'ların ikincil yapıları ve en düşük serbest enerji düzeyi hesaplanmıştır. Bu tahminlere dayalı olarak yeni olduğu düşünülen 38 miRNA, Mfold 3.2 kullanılarak oluşturulmuştur. Tahmini yeni miRNA'lardan miR1 ve miR2'nin ikincil yapıları Şekil 4.5'de gösterilmiştir. Aynı zamanda 38 yeni miRNA'nın ikincil yapıları ayrıntılı bir şekilde Ek 2'de yer almaktadır (Yanik *et al.* 2013).

Oeu_miR_1

```

          10          20          30
uuuaaaaa|          a          cc          aa
          aaagaaga gaagaacgaug ucauuc \
          uuuuuuucu uuuuuugcuac aguaag u
gcuauuaa^          g          uc          ag
          70          60          50

```

Oeu_miR_2

```

          10          20          30          40
uccggu|          au          c          -          uucu ug
          uugg ucgguu gguucgguu cgguuuu gu \
          aacc agccaa ccaagccaa gccaaaa cg u
uuuuuu^          --          a          a          uauu uu
          80          70          60          50

```

Şekil 4.5 Tahmini yeni miRNA'lardan miR1 ve miR2'nin ikincil yapısı

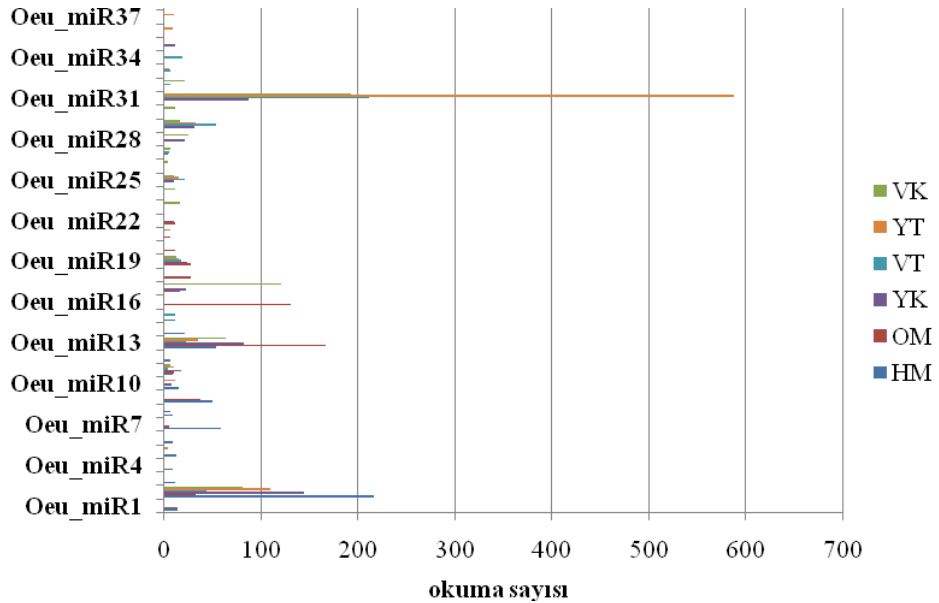
Tahmini yeni miRNA'lar, ortalama 15 okuma sayısı ile korunmuş miRNA'lardan daha az ifade edilmiştir. Tahmini yeni miRNA'ların bazıları belli kütüphanelere özgün ifade edilmiştir (Çizelge 4.4). Örneğin; 10 tahmini yeni miRNA, HM ve OM kütüphanelerine özgü ifade edilmiştir. miR3, miR4, miR6, miR12, miR14 sadece HM kütüphanelerinde bulunurken miR16 ve miR20 sadece OM kütüphanelerinde tespit edilmiştir. miR7 meyve kütüphanelerinin her ikisinde de olmasına rağmen, HM kütüphanesinde üç kat daha fazla ifade edilmiştir. miR1 ve miR9 her iki kütüphanede aynı seviyede bulunmuştur (Çizelge 4.4 ve Şekil 4.6) (Yanik *et al.* 2013).

Çizelge 4.4 miRNA öncülünün her iki kolundan tahmin edilen 38 yeni miRNA

Yeni miRNA kodu	Yerleşim	Zincir	Enerji	HM		OM		VK		YK		VT		YT	
				(miktar)		(miktar)		(miktar)		(miktar)		(miktar)		(miktar)	
				5p	3p	5p	3p	5p	3p	5p	3p	5p	3p	5p	3p
Oeu_miR_1	scaffold_10:17226129:17226207	+	-27.20	15	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oeu_miR_2	scaffold_10:20223072:20223157	-	-36.30	100	117	-	33	32	50	74	71	-	45	53	58
Oeu_miR_3	scaffold_14:15500470:15500726	-	-49.71	-	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oeu_miR_4	scaffold_16:5755707:5756007	-	-69.50	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oeu_miR_5	scaffold_16:12916010:12916345	-	-42.40	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
Oeu_miR_6	scaffold_19:8213709:8214023	+	-50.83	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oeu_miR_7	scaffold_19:15701744:15701856	+	-32.20	59	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oeu_miR_8	scaffold_1:34545837:34545992	+	-37.10	10	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-
Oeu_miR_9	scaffold_1:387325:387591	-	-88.20	51	-	39	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oeu_miR_10	scaffold_1:12533361:12533445	-	-25.40	16	-	-	-	-	-	9	-	-	-	13	-
Oeu_miR_11	scaffold_2:18857579:18857663	+	-34.80	10	-	11	-	8	-	18	-	5	-	11	-
Oeu_miR_12	scaffold_3:16233511:16233599	-	-31.52	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oeu_miR_13	scaffold_4:16304187:16304406	+	-44.80	55	-	167	-	64	-	83	-	24	-	36	-
Oeu_miR_14	scaffold_5:13476318:13476427	+	-40.21	-	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oeu_miR_15	scaffold_7:6284292:6284592	-	-46.40	13	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-	-
Oeu_miR_16	scaffold_11:6066546:6066885	+	-81.90	-	-	-	132	-	-	-	-	-	-	-	-
Oeu_miR_17	scaffold_12:2050403:2050549	-	-60.20	-	-	12	5	86	36	12	12	-	-	-	-
Oeu_miR_18	scaffold_1362:5405:5632	-	-48.92	-	-	-	28	-	-	-	-	-	-	-	-
Oeu_miR_19	scaffold_14:13968161:13968276	+	-32.40	-	-	-	28	-	14	-	25	-	18	-	16
Oeu_miR_20	scaffold_19:13198720:13199053	+	-107.50	-	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-
Oeu_miR_21	scaffold_1:30807164:30807488	-	-87.40	-	-	-	7	-	8	-	-	-	-	-	-
Oeu_miR_22	scaffold_5:4584254:4584466	+	-39.20	-	-	-	12	-	-	-	11	-	-	-	-
Oeu_miR_23	scaffold_136:423:565	+	-38.90	-	-	-	-	7	10	-	-	-	-	-	-
Oeu_miR_24	scaffold_13:1053462:1053647	+	-46.84	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-
Oeu_miR_25	scaffold_16:12933922:12934079	-	-56.90	-	-	-	-	11	-	11	-	22	-	16	-
Oeu_miR_26	scaffold_18:1471946:1472262	-	-66.60	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-
Oeu_miR_27	scaffold_1:29385469:29385555	-	-37.30	-	-	-	-	7	-	5	-	6	-	-	-
Oeu_miR_28	scaffold_1:31083890:31083975	-	-35.80	-	-	-	-	-	26	-	22	-	-	-	-
Oeu_miR_29	scaffold_1:34445830:34445942	-	-27.10	-	-	-	-	17	-	32	-	54	-	34	-
Oeu_miR_30	scaffold_204:28760:28841	-	-32.55	-	-	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-
Oeu_miR_31	scaffold_3:15576344:15576447	-	-51.20	-	-	-	-	194	-	88	-	212	-	588	-
Oeu_miR_32	scaffold_4:14314575:14314936	-	-48.55	-	-	-	-	-	22	-	-	-	8	-	-
Oeu_miR_33	scaffold_16:2089550:2089717	+	-34.00	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	6	-
Oeu_miR_34	scaffold_4:13969966:13970214	+	-57.51	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-
Oeu_miR_35	scaffold_1:42369615:42369709	-	-23.90	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-	-	-
Oeu_miR_36	scaffold_13:1053462:1053647	+	-46.84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-
Oeu_miR_37	scaffold_16:11530564:11530665	-	-26.60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	5
Oeu_miR_38	scaffold_4:14079438:14079535	-	-39.30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-

Özellikle yaprak kütüphanelerinde 16 tahmini yeni miRNA farklı ifade seviyelerinde görülmüştür (Şekil 4.6). Ek 3’de tahmini yeni miRNA’ların miRNA* dizileri ayrıntılı bir şekilde verilmiştir. Bunlardan bazıları yaprak gelişim aşaması ile ilişkili bulunmuştur. miR28 VK-YK kütüphanelerinde olmasına rağmen, miR35 sadece YK kütüphanesinde bulunmuştur. miR33 sadece VT-YT kütüphanelerinde ifade olmuştur. miR23, miR24, miR26 ve miR30 özellikle VK kütüphanesinde tespit edilmiştir. Bununla birlikte miR36, miR37 ve miR38 yalnızca YT kütüphanesinde ifade olmuştur. miR31 var-yok yılı kütüphanelerinde tanımlanmasına rağmen, miR32 ve miR34 sadece VT kütüphanesinde bulunmuştur. Son olarak miR25, miR27 ve miR29 tüm yaprak kütüphanelerinde belirlenmiştir (Yanik *et al.* 2013).

miR16 ve miR20 OM kütüphanelerinde bulunurken, miR3, miR4, miR6, miR12 ve miR14 sadece HM kütüphanelerinde tespit edilmiştir. miR35 sadece YK kütüphanesinde, miR28 VK-YK kütüphanelerinde tespit edilmiştir. miR36, miR37, miR38 yalnızca YT kütüphanelerine özgü iken, miR31 VT-YT kütüphanelerinde ifade edilmiştir (Şekil 4.6) (Yanik *et al.* 2013).



Şekil 4.6 6 farklı kütüphanede önemli derecede ifade edilen yeni miRNA’lar

Zeytin bitkisinde periyodisitenin moleküler mekanizmasını anlamada daha ileri bir bakış açısı elde etmek için elde edilen kütüphanelerin, Gen Ontoloji (GO) ve Genom ve Genlerin Kyoto Ansiklopedisi (KEGG) yolak analizleri yapılmıştır. Böylece miRNA'nın farklı hedef genleri Allen ve arkadaşlarının (2005) belirlediği gibi tahmin edilmiştir. 135 bilinen ve 32 tahmini yeni miRNA'nın sırasıyla 1.616 ve 1.288 mRNA'yı hedeflediği tahmin edilmiştir. miRNA hedef genlerinin biyolojik ve moleküler fonksiyonlarının gen ontoloji analizi Çizelge 4.5'de özetlenmiştir. Çoğu durumda tek gen birkaç miRNA tarafından hedeflenmektedir. Örneğin; POPTR_0003s18900.1|PACid:18216192 kodu içeren gen hem miR159 hem de miR319 tarafından hedeflenmiştir. Ancak bazı durumlarda birçok hedef gen aynı miRNA tarafından regüle edilmektedir. Örneğin; miR167e 15 farklı geni hedeflemiştir. Bu ölçüde fonksiyon benzerlik özellikleri esas alınarak 280 grup tanımlanmıştır. Hedef genlerin % 80'den fazlası, bağlama fonksiyonunu takiben oksidoredüktaz aktivitesinde yer almıştır. En önemli yoğunluktaki gruplar (p değeri < 0,05) detaylı olarak Ek 4'de gösterilmiştir. Belirlenen hedef genler geniş oranda biyolojik fonksiyonları kapsamaktadır (Yanik *et al.* 2013).

Ontoloji işlemleri sonucunda 341 GO terimi belirlenmiştir. mir156 ailesi üyelerinin toplam hedeflediği gen sayısı 306, özgün olarak hedeflediği gen sayısı 50 olarak bulunmuştur. Hedeflenen genlerin daha çok biyolojik düzenleme, metabolik süreç, sinyal iletimi gibi biyolojik süreçlerde, oksidoredüktaz, kinaz, transferaz aktiviteleri ve bağlama gibi moleküler fonksiyonlarının olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.5). Zeytin bitkisinde tahmin edilen hedef genlerin gen ontoloji analizi sonucunda toplamda belirlenen 341 gruptan 108'i istatistiksel olarak anlamlı (p değeri < 0,05) bulunmuştur. Önemli yoğunlukta bulunan 108 grubun çoğunu metabolik işlev (> % 70), gelişim işlevi (% 33) ve biyolojik düzenleme (% 30) oluşturmaktadır. 108 grubun bütün GO terimleri Ek 5'de gösterilmiştir. Bazı hedef genler transkripsiyon, üreme ve anatomik yapı onarımı gibi diğer genel işlevleri kapsamaktadır. Hedef genlerin yaklaşık olarak % 1'i eşleşmedi. Hedef genlerin yaklaşık % 19, % 12 ve % 6'sı periyodisite ile ilişkili olduğu düşünülen sırasıyla organ gelişimi, hormon aracılı sinyal iletimi ve çiçek gelişim işlevi grupları ile bir arada yer almıştır. Örneğin; miR166'nın hedef geni çiçek gelişimi ile ilişkilidir ve ilginçtir ki miR166, HM kütüphanesinde OM kütüphanesine göre daha fazla ifade edilmiştir. Benzer olarak filum gelişmesinden sorumlu gen, meyve

kütüphanelerinde yaprak kütüphanelerine göre daha az ifade edilen miR164 tarafından hedeflenmiştir. Ayrıca tahmini yeni miRNA'nın tahmini hedef genleri de fizyolojik rollerini daha iyi anlamak için analiz edilmiştir. Ancak belirlenen tahmini hedef genler bilinmeyen proteinleri kodlamıştır (Yanik *et al.* 2013).

Çizelge 4.5 miRNA hedef genlerinin GO analizi

miRNA	Toplam hedef gen sayısı	Özgün hedef gen sayısı	GO Biyolojik fonksiyon	GO Moleküler fonksiyon
Oeu_miR156 a/b/c/d/e/f/g/h/i/j/k	306	50	Biyolojik düzenleme, metabolik süreç, hücrel süreç, sinyal iletimi, uyarılara cevap, strese cevap, organizma gelişimi, taşınım, yerleşim, üreme gelişim süreci,pyhlome gelişim	Bağlama, oksidoredüktaz aktivitesi, kinaz aktivitesi, transferaz aktivitesi, katalitik aktivitesi, fosfataz düzenleme aktivitesi, enzim düzenleme aktivitesi
Oeu_miR159 a/b/c/d	65	19	Organizma gelişimi, üreme gelişim süreci, biyolojik düzenleme, gelişimsel süreç, hormon sinyallerine hücrel cevap, metabolik süreç, transkripsiyon	Bağlama, oksidoredüktaz aktivitesi,katalitik aktivitesi, hidrolaz aktivitesi, ligaz aktivitesi
Oeu_miR160 a/b/c/d/e/f/g	45	10	Biyolojik düzenleme, metabolik süreç, transkripsiyon,uyarılar cevap, organizma gelişimi, üreme gelişimi	Bağlama
Oeu_miR164 a/b/c/d/e/f	46	12	Biyolojik düzenleme, metabolik süreç, transkripsiyon,uyarılar cevap, organizma gelişimi, üreme gelişimi, taşınım, yerleşim, pyhlome gelişimi	Bağlama, oksidoredüktaz aktivitesi, kinaz aktivitesi, transferaz aktivitesi, katalitik aktivitesi, hidrolaz aktivitesi
Oeu_miR166 a/b/c/d/e/f/g/h/i/j /k/l/m/n/o/p/q	159	16	Organizma gelişimi, üreme gelişim süreci, metabolik süreç, biyolojik düzenleme	Bağlama, taşıyıcı aktivitesi, oksidoredüktaz aktivitesi, proteaz aktivitesi, peptidaz aktivitesi, katalitik aktivite, hidrolaz aktivitesi
Oeu_miR167 a/b/c/d/e/f/g	83	25	Organizma gelişimi, biyolojik düzenleme, metabolik süreç	Bağlama, oksidoredüktaz aktivitesi, katalitik aktivite, kinaz aktivitesi, transferaz aktivitesi, fosfataz aktivitesi, hidrolaz aktivitesi
Oeu_miR168 a/b	14	7	Organizma gelişimi, biyolojik düzenleme	Bağlama
Oeu_miR169 a/b/c/d/e/f/g/h/i /j/k/l/m/r/s/v/w	84	18	Taşınım, yerleşim	Bağlama, taşınım aktivitesi
Oeu_miR171 a/b/c/d/e/f/g/h/i	96	24	Organizma gelişimi, metabolik süreç, gen ifadesi	Bağlama,oksidoredüktaz aktivitesi, katalitik aktivite, taşıyıcı aktivitesi
Oeu_miR172 a/b/c/d/e/f/g/h/i	153	30	Organizma gelişimi, üreme gelişim süreci, metabolik süreç, taşınım, yerleşim, biyolojik düzenleme, transkripsiyon	Bağlama, oksidoredüktaz aktivitesi, sinyal dönüştürücü aktivitesi, hidrolaz, taşıyıcı aktivitesi, protein kinaz aktivitesi
Oeu_miR319 a/b/c/d/e/f/g/h	128	22	Organizma gelişimi, üreme gelişim süreci	Bağlama
Oeu_miR390 a/b/c/d	84	21	Biyolojik düzenleme, metabolik süreç, organizma gelişimi, inorganik anyon taşınımı	Bağlama, oksidoredüktaz aktivitesi, fosfotransferaz aktivitesi, protein kinaz aktivitesi

Çizelge 4.5 miRNA hedef genlerinin GO analizi (devam)

Oeu_miR393 a/b	12	12	Organizma gelişimi, üreme gelişim süreci, çiçek gelişimi, metabolik süreç, uyarılara cevap, strese cevap, taşınım, yerleşim	Bağlama, fosfotransferaz aktivitesi, protein kinaz aktivitesi
Oeu_miR394 a/b	30	15	-	-
Oeu_miR395 b/c/d/e/f/g/h/i/j	72	8	Metabolik süreç, kimyasal uyarılara cevap, iyon taşınımı	Bağlama, katalitik aktivite, taşıyıcı aktivitesi, adeniltransferaz aktivitesi
Oeu_miR396 a/b/c/d/e/f	98	34	Biyolojik düzenleme, moleküler fonksiyonun negatif düzenlenmesi, metabolik süreç, organizma gelişimi, üreme gelişim süreci, çiçek gelişimi	Bağlama, katalitik aktivite, hidrolaz aktivitesi, metiltransferaz aktivitesi
Oeu_miR397 a/b	59	35	Organizma gelişimi, gelişim, üreme gelişim süreci, lignin metabolik süreci, biyolojik düzenleme	Bağlama, oksidoredüktaz aktivitesi, sinyal dönüştürücü aktivitesi
Oeu_miR399 b/c/f/g/i	18	7	Taşınım, yerleşim	Taşıyıcı aktivitesi
Oeu_miR408	13	13	Lignin metabolik süreci, biyolojik düzenleme	Bağlama, oksidoredüktaz aktivitesi, transferaz aktivitesi
Oeu_miR530 a	39	39	-	-

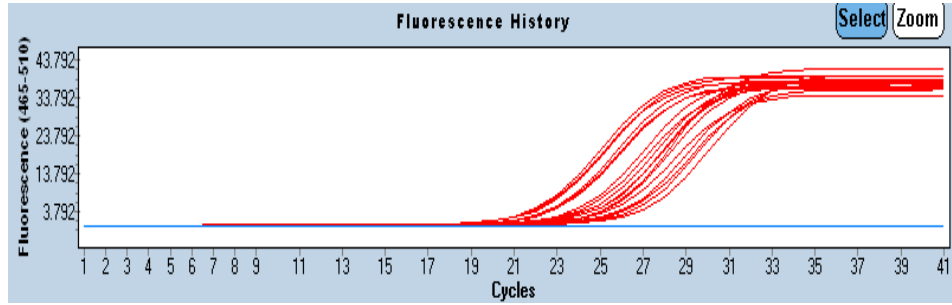
Hedef genlerin KEGG analizi sonucunda belirlenen 133 metabolik yoldan önemli derecede yoğun olarak (p değeri $< 0,05$) 3 ana grup tespit edilmiştir. Hedef genlerin çoğunun askorbik ve aldehit metabolizması, bitki hormonu sinyal iletimi ve brassinosteroid biyosentezi metabolik yollarında rol aldığı Çizelge 4.6’da gösterilmiştir. KEGG analizi sonucunda belirlenen metabolik yolların zenginleştirilmiş listesi Ek 6’da verilmiştir (Yanik *et al.* 2013).

Çizelge 4.6 miRNA’ların hedeflediği genlerin metabolik yolları

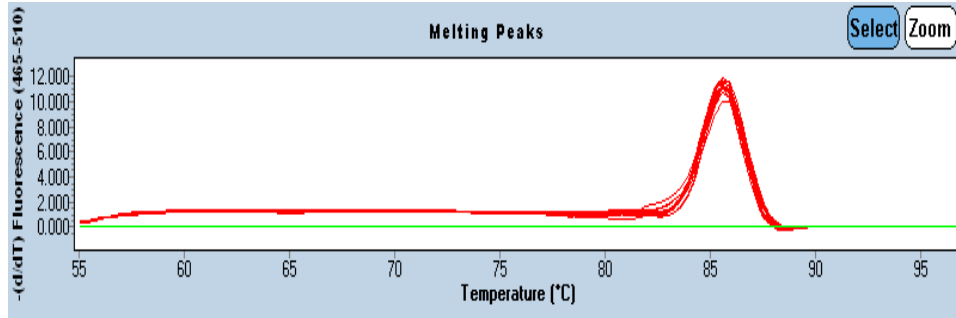
Metabolik yolak	HM	OM	VK	YK	VT	YT
	p-değeri	p-değeri	p-değeri	p-değeri	p-değeri	p-değeri
Askorbik ve aldehit metabolizması	1,46E-34	8,73E-35	4,65E-34	5,72E-32	9,92E-32	1,38E-32
Bitki hormon sinyal iletimi	1,12E-06	7,59E-07	3,81E-07	1,67E-07	2,74E-07	2,16E-06
Brassinosteroid biyosentezi	7,05E-06	6,48E-06	8,54E-06	1,90E-05	2,08E-05	1,50E-05

4.2 Deneysel Analizler

Zeytin bitkisinde 6 farklı kütüphanede önemli derecede ifade edilen miR159, miR164, miR166, miR168, miR171, miR395, miR396, miR156 ve miR172 korunmuş miRNA'larına özgün ileri (F)-RT ve bu miRNA'ların hedef genlerine özgün ileri (F)-geri (R) primerleri tasarlanarak qRT-PCR ile ifade düzeyleri ölçülmüştür. Deneysel olarak ölçülen miRNA miktarları, yüksek verimli dizileme tekniği ile elde edilen miRNA sayıları ile karşılaştırılmıştır. miR156 ve miR172 korunmuş miRNA'larına özgün primerler tasarlanmasına rağmen analizi yapılamamıştır. miRNA ve hedef gen arasındaki ters orantılı ilişki deneysel olarak doğrulanmıştır. Hedef genlerin qRT-PCR analizlerinde, 18S rRNA geni referans alınarak zeytin cDNA'ları eşit yoğunlukta reaksiyona başlatılmıştır (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8).



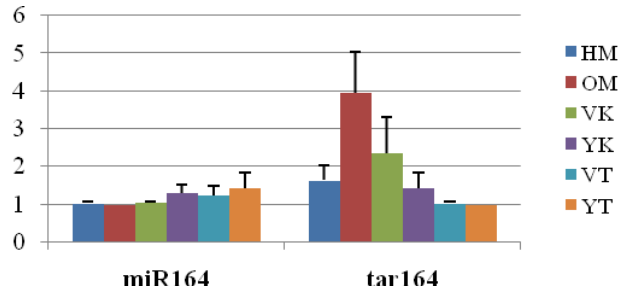
Şekil 4.7 18S rRNA normalizasyonunun çoğalma grafiği



Şekil 4.8 18S rRNA normalizasyonunun erime sıcaklığı grafiği

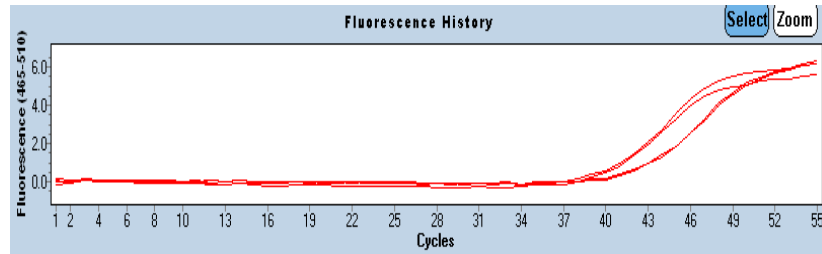
4.2.1 miR164 ve tar164

miR164'ün, potansiyel olarak miR164a ve miR164b bölgelerinden transkript edildiği (Juarez *et al.* 2004) ve NAC-domain transkripsiyon faktörü gen ailesindeki alt set genleri hedeflediği tahmin edilmektedir (Rhoades *et al.* 2002). Yapılan qRT-PCR analizi sonucunda miR164 yoğun olarak sırasıyla YT, YK, VT, VK, HM, OM kütüphanelerinde tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Yüksek verimli dizileme analizi sonucundan farklı olarak miR164 miktarı, VT kütüphanesinde YK kütüphanesine göre daha az miktarda ölçülmüştür.



Şekil 4.9 miR164 ve tar164'ün miktar analizi

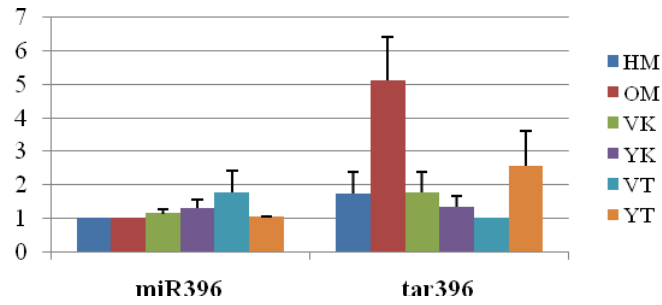
miR164'ün, YK kütüphanesinde VK kütüphanesine göre 2,39 döngü önce çoğalmaya başlaması 4,93 kat daha fazla ifade edildiğini göstermiştir (Şekil 4.10). Yüksek verimli dizileme analizi sonucundaki VK-YK arasındaki miktar sıralamasını doğrulamıştır.



Şekil 4.10 miR164'ün VK-YK kütüphanelerindeki karşılaştırmalı çoğalma grafiği

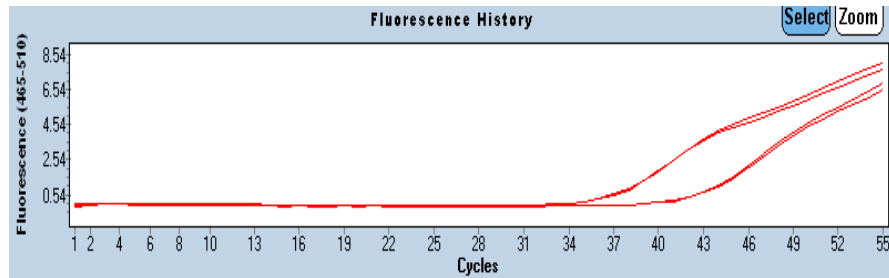
4.2.2 miR396 ve tar396

miR396'nın hedef geni, büyüme düzenleyici transkripsiyon faktörü (GRL) yani Ceramidase geni'dir (Jones-Rhoades and Bartel 2004). Yapılan qRT-PCR analizi sonucunda miR396 yoğun olarak sırasıyla VT, YK, VK, YT, HM, OM kütüphanelerinde tespit edilmiştir (Şekil 4.11). Yüksek verimli dizileme analizi ile karşılaştırıldığında sadece kasım kütüphanelerinin sıralaması ile uyum göstermemiştir.



Şekil 4.11 miR396 ve tar396'nın miktar analizi

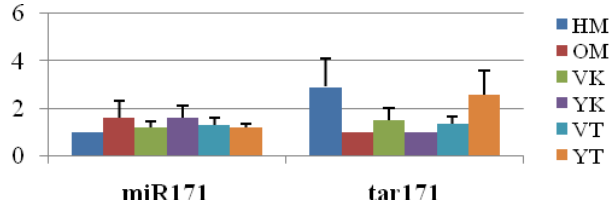
miR396'nın, YT kütüphanesinde VT kütüphanesine göre 1,2 döngü sonra çoğalmaya başlaması 2,23 kat daha az ifade edildiğini göstermiştir (Şekil 4.12). Yüksek verimli dizileme analizi sonucunda elde edilen VT-YT kütüphaneleri arasındaki sıralamayı doğrulamıştır.



Şekil 4.12 miR396'nın VT-YT kütüphanelerindeki karşılaştırmalı çoğalma grafiği

4.2.3 miR171 ve tar171

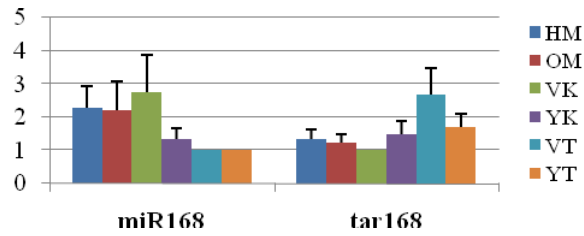
Scarecrow-like (SCL) ailesi, bitki gelişim sürecinde yaygın oranda kontrol sağlayan bitkiye özgü transkripsiyon faktörlerinin bir sınıfıdır. SCL ailesinin bir üyesi olan SCL6 geni, miR171'in potansiyel hedefidir (Llave *et al.* 2002, Reinhart *et al.* 2002). Yapılan qRT-PCR analizi sonucunda miR171 yoğun olarak sırasıyla OM, YK, VT, VK, YT, HM kütüphanelerinde tespit edilmiştir (Şekil 4.13). Yüksek verimli dizileme analizi ile karşılaştırıldığında sadece meyve kütüphanelerinin miktar sıralaması ile uyum göstermemiştir.



Şekil 4.13 miR171 ve tar171'in miktar analizi

4.2.4 miR168 ve tar168

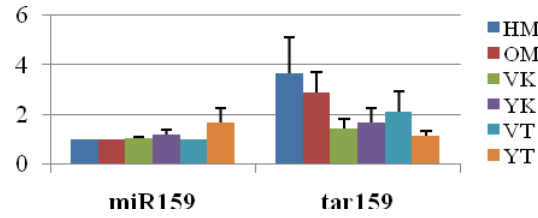
Yapılan qRT-PCR analizi sonucunda miR168 yoğun olarak sırasıyla VK, HM, OM, YK, VT, YT kütüphanelerinde tespit edilmiştir (Şekil 4.14). Yüksek verimli dizileme analizi ile karşılaştırıldığında sadece kasım kütüphanelerinin miktar sıralaması ile uyum göstermemiştir.



Şekil 4.14 miR168 ve tar168'in miktar analizi

4.2.5 miR159 ve tar159

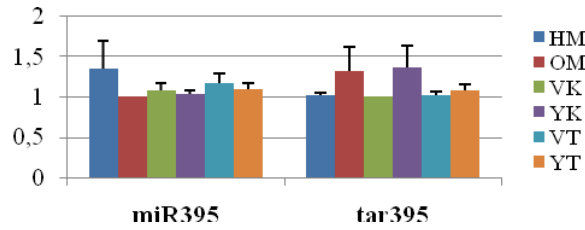
miR159'un tahmin edilen hedef geni MYB33 transkripsiyon faktörüdür. Bunun bitki yaprak gelişiminde önemli bir rolü olduğu bulunmuştur. *Arabidopsis thaliana* bitkisinde MYB33'ün aşırı ifadesinin yukarı kıvrımlı yaprak fenotipini oluşturduğu tespit edilmiştir (Palatnik *et al.* 2003). Yapılan qRT-PCR analizi sonucunda miR159 yoğun olarak sırasıyla YT, YK, VK, VT, HM, OM kütüphanelerinde tespit edilmiştir (Şekil 4.15). Yüksek verimli dizileme analizi ile karşılaştırıldığında her kütüphanenin miktar sıralaması ile uyum göstermiştir.



Şekil 4.15 miR159 ve tar159'un miktar analizi

4.2.6 miR395 ve tar395

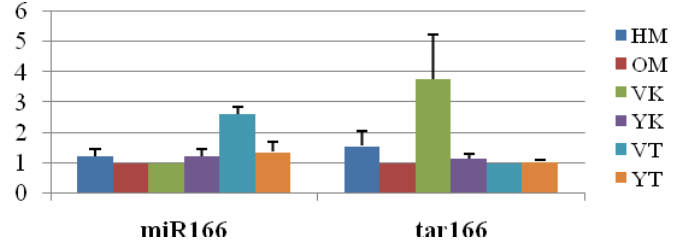
miR395 sülfat indüksiyonunda tespit edilmiştir (Jones-Rhoades and Bartel 2004). Yapılan qRT-PCR analizi sonucunda miR395 yoğun olarak sırasıyla HM, VT, YT, VK, YK, OM kütüphanelerinde tespit edilmiştir (Şekil 4.16). Yüksek verimli dizileme analizi ile karşılaştırıldığında bütün kütüphanelerin sıralaması ile uyum göstermiştir.



Şekil 4.16 miR395 ve tar395'in miktar analizi

4.2.7 miR166 ve tar166

Yapılan qRT-PCR analizi sonucunda miR166 yoğun olarak sırasıyla VT, YT, YK, HM, VK, OM kütüphanelerinde tespit edilmiştir (Şekil 4.17). Yüksek verimli dizileme analizi ile karşılaştırıldığında bütün kütüphanelerin sıralaması ile uyum göstermiştir.



Şekil 4.17 miR166 ve tar166'nın miktar analizi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Zeytin ağacı, yıldan yıla düzensiz meyve üretimi ile bilinmektedir (Bustan *et al.* 2011). Böyle bir fenomen, farklı bitki türlerinde görülse bile fizyolojik süreç genel değil, aksine türe özgü gerçekleşmektedir (Goldschmidt 2005). Ancak gelişim evresi geçişlerini tetikleyen genetik ağların, türler arasında bazı ortak faktörleri paylaştığı netlik kazanmıştır. Bu ölçüde Ulger ve arkadaşları (2004), ABA, GA₃ ve IAA gibi bazı endojen bitki büyüme hormonlarının periyodisite üzerinde önemli rolü olduğunu raporlamıştır. Ayrıca bitkilerde depolanan karbohidrat miktarının var ve yok yılları arasında farklılık göstermesi sonucunda karbohidrat değişikliğinin periyodisite ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Spann *et al.* 2008).

Zeytin ağacı, fazla sayıda çiçek ve meyve üretimine karşı doğal bir eğilime sahiptir. Ancak meyve içinde gelişmekte olan tohumlarda üretilen gibberellinler gibi moleküler mesajlar, tomurcuk oluşumunu generatif gelişim yerine vejetatif gelişime yönlendirerek çiçek indüksiyonunu azaltmaktadır. Aynı şekilde çok sayıda meyve oluşumu da, ağaçtaki karbohidrat depolarının tüketimine neden olmaktadır. Bu nedenle zeytin ağacında periyodisiteyi azaltmak ya da elimine etmek için farklı stratejiler kullanılabilir (Yanik *et al.* 2013).

- i) meyve sayısını, düzenli budama ile beklenen verimli yıldan önce azaltmak,
- ii) meyve sayısını, gelişimin çok erken aşamalarında azaltmak (çok küçük meyvelerde),
- iii) gelişmiş meyveleri, erken hasat etmek (büyük yeşil meyvelerin olduğu bu gibi aşamada çiçek inhibisyonu başlamış olsa dahi bazı etkisi vardır),
- iv) ağaçtaki karbohidrat depolarının tüketimini önlemek (örneğin; bitkinin beslenmesi ve depo birikimi için elverişli sulamayı sağlamak)'tir.

Bitkinin aşırı tüketimi önlemek için depoların bir kısmını kuraklık, besin eksikliği gibi sınırlayıcı çevresel koşulların üstesinden gelen savunma mekanizmasına ve önemli vejetatif gelişime (yaprak ve filiz tomurcukları) ayırması, periyodisitenin aslında bir adaptasyon mekanizması olduğunu göstermektedir (Barranco *et al.* 2010).

Şimdiye kadar bitkilerde tanımlanan bazı miRNA'ların çeşitli biyolojik süreçlerdeki rolleri çoğu kez kanıtlanmıştır. Bu miRNA'lar gelişim ve stres tepkileri gibi birçok fizyolojik süreçler ile ilişkilendirilmiştir (Sunkar *et al.* 2012, Eldem *et al.* 2013, Chuck *et al.* 2009). Geleneksel yöntemlerle yapılan miRNA çalışmaları karışık olsa bile son zamanlarda kullanılan yüksek verimli dizileme teknikleri mükemmel bir yaklaşım olmuştur (Li *et al.* 2011, Chen *et al.* 2012, Zhou *et al.* 2012).

Bu çalışmada zeytin bitkisinin yaprak ve meyve organlarından oluşturulan 6 sRNA kütüphanesi, periyodisite ile ilişkili miRNA'ların geniş kapsamlı setini tanımlamak için yüksek verimli dizileme tekniği ile dizilenmiştir. Daha önce Donaire ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan zeytin ağacı miRNA analizi sonucuna göre 550 kat daha fazla (93.526.915) okuma elde edilmesi, günümüze kadar yapılmış en geniş kapsamlı zeytin ağacı miRNA analizi olduğunu göstermektedir. Donaire ve arkadaşları, zeytin bitkisinde genç ve olgun gövdelerden 2 kütüphane oluşturarak 18 bilinen familya ve 5 tahmini miRNA tanımlamıştır. Buna ilaveten bulgularımızda 4 tane daha korunmuş miRNA familyası keşfedilerek toplam 22 familya tespit edilmiştir (Yanik *et al.* 2013).

miR156a, miR156b, miR156c ve miR156d hariç en fazla sayıda bulunan miRNA'ların ifade seviyelerinin, genellikle 6 kütüphanenin her birisinde birbirlerine yaklaşık sayılarda olduğu görülmüştür. Diğer çalışmalar ile benzer şekilde evrimsel olarak korunmuş olan miRNA'ların ifade seviyeleri, genellikle en fazla sayıda bulunmuştur (Yanik *et al.* 2013).

miR156, daha önce olgun zeytin ağacı gövdelerinde yapılan bir çalışmada tanımlanmasına rağmen çok düşük sayıda tespit edilmiştir (Donaire *et al.* 2011). miR156, genç-olgun ve yıllık evre geçişlerinde rol oynayan Squamosa promotör

bağlayıcı protein-benzeri (SPL) gen ifadesini düzenlemektedir (Wang *et al.* 2009, Wu *et al.* 2009, Donaire *et al.* 2011).

Shalom ve arkadaşları (2012), turunçgil ağaçlarında var ve yok yılları arasında miR156'nın ifadesinde önemli farklılıklar bulmamasına rağmen spl geninin, yok yılında var yılına göre daha fazla ifade edildiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada spl geninin negatif korelasyonu olan miR156'nın ifadesi, VT kütüphanesinde VK kütüphanesi ile karşılaştırıldığında daha fazla tespit edilmiştir (Yanik *et al.* 2013). Ayrıca Kim ve arkadaşları (2012), miR156'nın tohum gelişimi, çiçeklenme zamanı ve yaprak morfogenezinde etkili olduğunu bulmuştur.

Gelişimle ilişkili farklı fonksiyonel rol oynayan genleri hedefleyen bazı miRNA'ların ifadesi, 6 kütüphane arasında çeşitlilik göstermiştir. Zeytin ağacında yapılan önceki bir çalışmada (Donaire *et al.* 2011) miR395'in uyarılara karşı cevap oluşturan genleri hedeflediği tespit edilmiştir. Bu çalışmada miR395'in, HM kütüphanesinde OM kütüphanesine göre 4 kat daha fazla ifade edildiği belirlenmiştir. Aynı zamanda genç yapraklarda (VT, YT), yaşlı yapraklara (VK, YK) göre daha fazla olduğu da tespit edilmiştir (Yanik *et al.* 2013). Bartel (2004) tarafından *Arabidopsis thaliana* ve *Oryza sativa* bitkilerinde yapılan çalışmada miR395'in besin tüketiminde etkili olduğunu bulması bu çalışmayı desteklemiştir.

Beslenme kontrolü, periyodisitenin temel düzenleyici mekanizmalarından biri olarak düşünülmüştür (Goldschmidt 2005). Ancak bazı çalışmalarda zeytin ağacının generatif gelişme evresinde karbohidrat depolarının tutulması ile ilgili farklı sonuçlar rapor edilmiştir (Ulger *et al.* 2004, Spann *et al.* 2008, Rosecrance *et al.* 1998, De la Rosa *et al.* 2000).

Son zamanlarda Bustan ve arkadaşları (2011) tarafından yapılan çalışma, gelişmekte olan meyveler için karbohidrat ihtiyacının önemli olduğunu fakat karbohidrat eksikliğinin periyodisite için önemli bir düzenleyici olmadığını göstermektedir. Bundan

başka avokado ile yapılan bir çalışmada bor eksikliğinin periyodisitede önemli rolü olduğu ileri sürülmüştür (Minchin *et al.* 2011).

miR395'in, mısırdaki enerji kaynağı ihtiyacı gibi tuz indüklenmesine yanıt yolları ile ilgili olabileceği önceki çalışmalarda raporlanmıştır (Ding *et al.* 2009). Önceki ve şimdiki çalışmalar doğrultusunda periyodisite gösteren türlerde besin iletiminin gelişme ve olgunlaşma ile ilişkisinde miR395'in önemli rol oynadığı raporlanmıştır (Yanik *et al.* 2013).

Yaprak kütüphanelerinde, meyve kütüphanelerine göre hem bilinen miRNA sayısı hem de miRNA çeşitliliği daha fazla tespit edilmiştir. Bu sonuçlar meyve fizyolojisine göre yaprak fizyolojisi ile ilişkili daha fazla sayıda miRNA olduğunu göstermiştir. Yaprakların daha genel amaçlı, meyvenin özel amaçlı bir organ olduğu düşünüldüğünde bu sonuç hiç de şaşırtıcı değildir. Yaprakların generatif büyümeye katkısı verilerimize göre 2 kat bulunmuştur (Yanik *et al.* 2013).

Diğer çalışmalarda fazla bulunan miR156 ve miR166, bu çalışmada en fazla sayıdaki 2 korunmuş miRNA olarak tespit edilmiştir. miR156 familyası üyelerinin, 6 kütüphanede de önemli derecede farklı ifade edildiği görülmüştür. miR156 familyası üyelerinin ifadesi, VK kütüphanesinde YK kütüphanesine göre yaklaşık 2,5 kat azalmıştır. miR156 ifadesinin, yılın Kasım ayında yaprak gelişimi için özel olduğunu göstermektedir (Yanik *et al.* 2013).

Önceki çalışmalara göre miR172 ve miR156'nın, hem *Arabidopsis thaliana*'da hem de *Olea europaea*'da genç fazın kontrolünü ve genç fazdan olgun faza geçişin zamanlamasını sağlayan Squamosa promotör bağlayıcı protein-benzeri (SPL)'yi düzenlediği belirlenmiştir (Yanik *et al.* 2013). Bitkilerde bilinen en eski miRNA familyalarından biri olarak düşünülen miR172'nin, gelişim evreleri arasındaki geçişin düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Lauter *et al.* 2005, Zhu and Helliwell 2010).

Bu çalışmada miR172 familyası üyelerinin ifadesinin, yaprak kütüphanelerinde meyve kütüphanelerine göre belirgin bir şekilde daha fazla sayıda bulunmuş olması da bu miRNA'ların aktivitelerinin genç evrede olduğunu desteklemektedir. Ayrıca Aukerman ve Sakai (2003), yaptıkları bir çalışmada *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* ve *Zea mays* bitkilerinde miR172'nin çiçeklenme zamanında ve vejetatif gelişmede önem arz ettiğini bulmuşlardır. miR172d ve miR172e üyelerinin, YK kütüphanesinde VK kütüphanesine göre daha fazla ifade edilmiş olması da sonucu desteklemektedir (Yanik *et al.* 2013).

Ayrıca benzer bir örnek, miR172g ve miR172h'nin Temmuz ayı yaprak kütüphanelerindeki ifadelerinde gözlemlenmiştir. Diğer taraftan miR172d ve miR172e, VT kütüphanesinde VK kütüphanesine göre önemli derecede daha fazla ifade edilmiştir. miR172d, miR172e, miR172g ve miR172h hariç miR172 familyasının diğer üyeleri, yaprak kütüphanelerinde yaklaşık eşit sayıda ifade edilmiştir. Bu ölçüde miR172'nin, zeytin ağacının var yılındaki gelişim evre geçişlerinde önemli fakat esas olmayan bir rol oynadığı sonucu çıkartılmıştır (Yanik *et al.* 2013).

Hormon kontrolünün, periyodisitenin en önemli düzenleyici mekanizmalarından biri olduğu ileri sürülmüştür. Örneğin; miR160 ve miR319'un, zeytin ağacında periyodisiteyi önemli derecede düzenleyen hormon aracılı sinyal ile ilişkili genleri hedeflediği görülmüştür (Yanik *et al.* 2013).

miR160 familyası üyelerinin var ve yok yılları arasındaki ifade farklılıklarında 4'den 6 kata kadar değişiklik göstermesi, zeytin gövdeleri ile yapılan bir çalışmada (Donaire *et al.* 2011) genç yapraklarda olgun yapraklar ile karşılaştırıldığında biraz fazla ifade edilmiş olmasını desteklemektedir. Aynı zamanda Mallory ve arkadaşlarının (2005) mir160'ın tohum gelişiminde ve lateral kök oluşumunda görev aldığını tespitini desteklemiştir. Oysaki miR319'un ifadesi var ve yok yılları arasında yaklaşık 1,8 kat farklılık göstermiştir (Yanik *et al.* 2013).

Ayrıca meyve kütüphaneleri arasında önemli derecede değişiklik gözlemlenmiştir. Zeytin ağacının gelişim sürecinde hormon aracılı tepkiye önemli derecede katkı sağlayan genleri hedefleyen miR393, meyve kütüphanelerinde benzer şekilde dikkate değer ifade farklılığı göstermiştir (Yanik *et al.* 2013).

miRNA analizi, hedef genlerin aynı zamanda periyodisite ile ilgili olabilecek çiçek gelişimi ve organ morfogenezi gibi fonksiyonlar ile ilişkisini ortaya koymuştur. miR168 ve miR396'nın, var ve yok yılı kütüphaneleri arasındaki ifadeleri karşılaştırıldığında az fakat önemli derecede farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. miR396'nın, büyüme düzenleyici faktörlerini etkileyerek yaprak gelişimindeki rolü önceki çalışmalarda belirtilmiştir (Yanik *et al.* 2013).

Ayrıca organ morfogenezi ve gelişim süreci ile ilişkili genleri hedefleyen miR166 ve miR171'in, meyve kütüphanelerine özgü ifade edildiği görülmüştür. Bu nedenle miR166 ve miR171'in ifadesi, HM kütüphanesinde önemli derecede fazla sayıda ifade edilmiştir. Bu bir hipotez de olsa miR166 ve miR171'in hedef genlerinin baskılanmasının, meyvelerin olgunlaşmasını engelleyebileceği yorumu yapılabilir (Yanik *et al.* 2013).

KEGG analizleri, zeytin ağacı miRNA'ları tarafından hedeflenen genlerin büyük ölçüde karbohidrat metabolizması ve hormon sinyal iletim yollarını takiben brassinosteroid biyosentez metabolik yolağı ile ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır (Yanik *et al.* 2013).

Yukarıda tartışıldığı üzere beslenme ve hormon kontrolü, periyodisite ile ilişkili iki esas faktör olarak ileri sürülmüştür. Ayrıca bitki steroid hormon grubuna ait olan brassinosteroidlerin, büyüme ve gelişmeyi düzenlediği bilinmektedir. Böylece bu çalışma doğrultusunda elde edilen analizler, zeytin ağacında besin ve hormon kontrolünün periyodisitede önemli rol oynadığını desteklemektedir (Yanik *et al.* 2013).

Bu çalışmada zeytin ağacında 135 korunmuş miRNA'ya ilaveten 38 tahmini yeni miRNA'nın tanımlanması, zeytin bitkisinde önceden bilinenden daha fazla miRNA olduğunu ve miRNA ifadesinin çeşitliliğini göstermektedir. 6 farklı zeytin miRNA kütüphanesinin bu geniş çaplı genom taraması, periyodisite ile ilişkili miRNA ifade profillerinin bulunmasına ve bu fizyolojik fenomen ile ilgili süreçlerin açığa kavuşmasına katkı sağlamıştır (Yanik *et al.* 2013).

Yapılan bu analizler, zeytin ağacında periyodisite ile ilişkili olabilecek genlerin hepsinin olmasa da çoğunun tespit edilmesine imkan sağlamıştır. Dolayısıyla bu çalışmada tanımlanan miRNA'lar, bunun gibi diğer türlerde periyodisite ile ilişkili genlere yönelik daha ileri bir bakış açısı kazandırarak değerli bir kaynak olacaktır (Yanik *et al.* 2013).

KAYNAKLAR

- Abdel Rahim, A.O.S., Elamin, O.M. and Bangerth, F.K. 2011. Effects of paclobutrazol (Pbz) on floral induction and associated hormonal and metabolic changes of biennially bearing mango (*Mangifera indica* L.) cultivars during off year. *Journal of Agricultural and Biological Science*, 6(2); 55-67.
- Akıllıoğlu, M., Özen, Y.A., Akay, Z., Özen, H., Aksu, B., Dizdaroğlu, T., Özilbey, N., Arsel, H. ve Özahçı E. 2000. Zeytin Raporu, VII. Beş yıllık kalkınma planı bitkisel üretim özel ihtisas komisyonu meyvecilik grubu. Zeytincilik Araştırma Enstitüsü, İzmir.
- Aktaş, B. ve Basmacıoğlu-Malayoğlu, Hatice. 2011. Zeytinyağı işleme yan ürünlerinden zeytin yaprağı ile zeytin karasuyunun antimikrobiyal ve antioksidan etkileri. *Hayvansal Üretim*, 52(1); 49-58.
- Aktaş, E. 2008. Zeytin üretimindeki gelişmeler ve Çanakkale. Çanakkale-Küçükuyu Değerleri Sempozyumu, 12 s., Çanakkale.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A.M. and Carrington, J.C. 2005. microRNA directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 121; 207–221.
- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D.P., Burge, C.B., Carrington, J.C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G. and Tuschl, T. 2003. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, 9(3); 277-279.
- Aukerman, M.J. and Sakai, H. 2003. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell*, 15; 2730–2741.
- Barranco, D., Fernández-Escobar, R. and Rallo, L. (eds.). 2008. Olive growing. In 1st English Edition of the 5th revised and enlarged edition of *El Cultivo del Olivo*. Mundi-Prensa:Junta de Andalucía (Madrid, Spain). Australian Olive Association (Rural Industries Research and Development Corporation; RIRDC), 2010.
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs; genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116; 281–297.
- Besnard, G., Khadari, B., Baradat, P. and Bervillé, A. 2002. *Olea europaea* (Oleaceae) phylogeography based on chloroplast DNA polymorphism. *Theoretical and Applied Genetics*. 104; 1353–1361.
- Brown, P.H., Weinbaum, S.A. and Picchioni, G.A. 1995. Alternate bearing influences annual nutrient consumption and the total nutrient content of mature pistachio trees. *Trees*, 9; 158-164.
- Bustan, A., Avni, A., Lavee, S., Zipori, I., Yeselson, Y., Schaffer, A.A., Riov, J. and Dag, A. 2011. Role of carbohydrate reserves in yield production of intensively cultivated oil olive (*Olea europaea* L.) trees. *Tree Physiol.*, 31; 519–530.
- Cassin, J., Bourdeaut, B., Gougue, F., Furin, V., Gaillard, J.P., Bourdelles, J.L., Montigut, C. and Monevil, C. 1969. The influence of climate upon the blooming of citrus in tropical areas. In: Proc. 1st Int. Citrus Symp. Chapman, H.D. (ed), 1; 315-323, Riverside.
- 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. 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 33(20); e179.

- Chen, L., Ren, Y., Zhang, Y., Xu, J., Zhang, Z. and Wang, Y. 2012. Genome-wide profiling of novel and conserved populus microRNAs involved in pathogen stress response by deep sequencing. *Planta*, 235(5); 873–883.
- Chuck, G., Candela, H. and Hake, S. 2009. Big impacts by small RNAs in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12; 81–86.
- Cohen, A. 1981. Recent developments in girdling of citrus trees. In: *Proc. Int. Soc. Citriculture*. Matsumoto, K. (ed.), I; 196-199.
- Crawley, M.J. and Long, C.R. 1995. Alternate bearing, predator satiation and seedling recruitment in *Qercus robur* L. *Journal of Ecology*, 83(4); 683-696.
- Davenport, T.L. 1990. Citrus flowering. *Hort. Rew.*, 12; 249-408.
- De la Rosa, R., Rallo, L. and Rapoport, H.F. 2000. Olive floral bud growth and starch content during winter rest and spring budbreak. *Hort. Science*, 35; 1223–1227.
- De la Rosa, R., Angiolillo, A., Guerrero, C., Pellegrini, M., Rallo, L., Besnard, G., Berville, A., Martin, A. and Baldoni, L. 2003. A first linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 106; 1273-1282.
- Ding, D., Zhang, L., Wang, H., Liu, Z., Zhang, Z. and Zheng, Y. 2009. Differential expression of miRNA in response to salt stress in maize roots. *Ann. Bot.*, 103; 29–38.
- Donaire, L., Pedrola, L., de la Rosa, R. and Llave, C. 2011. High-throughput sequencing of RNA silencing-associated small RNAs in olive (*Olea europaea* L.). *PLoS One*, 6(11); e27916.
- Doran, İ., Koca, Y.K., Pekkolay, B., Mungan, M. 2008. Derik yöresi zeytinliklerinin beslenme durumunun tesbiti. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21(1); 131-138.
- Eldem, V., Okay, S. and Unver, T. 2013. Plant microRNAs; New players in functional genomics. *Turk J. Agric. For.*, 37; 1–21.
- Fernandez-Escobar, R., Benloch, C., Navarro and Martin, G.C. 1992. The time of floral induction in the olive. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 117(2); 304-307.
- Garcia, O.B., Castillo, J., Lorente, J., Ortuna, A., and Del Rio, J.A. 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, 68; 457-462.
- Garner, L.C. and Lovatt, C.J. 2008. The relationship between flower and fruit abscission and alternate bearing of ‘hass’ avocado. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 133(1); 3-10.
- Goldschmidt, E.E. and Monselise, S.P. 1972. Hormonal control of flowering in citrus and some other woody perennials. In: *Plant Growth Substances*. Carr, D.J. (ed.), Springer Verlag, pp. 758-766, New York.
- Goldschmidt, E.E. and Golomb, A. 1982. The carbohydrate balance of alternate bearing citrus trees and the significance of reserves for flowering and fruiting. *J. Amer. Hort. Sci.*, 107; 206-208.
- Goldschmidt, E.E., Aschkenazi, N., Herzano, Y., Schaffer, A.A. and Monselise, S.P. 1985. A role for carbohydrate levels in the control of flowering in citrus. *Sci. Hort.*, 26; 159-166.
- Goldschmidt, E.E. 2005. Regulatory aspects of alternate bearing in fruit trees. *Italus Hortus*, 12; 11–17.
- Greenberg, J., Goldschmidt, E.E. and Goren, R. 1993. Potential and limitations of the use of paclobutrazol in *Citrus orchards* in Israel. *Acta Hort.*, 329; 58-61.

- Griffiths-Jones, S., Moxon, S., Marshall, M., Khanna, A., Eddy, S.R. and Bateman, A. 2005. Rfam; Annotating non-coding RNAs in complete genomes. *Nucleic Acids Research*, 33; D121–D124.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S. and Enright, A.J. 2008. miRBase; tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, 36; D154–D158.
- Guo, L. and Lu, Z. 2010. The fate of miRNA* strand through evolutionary analysis: implication for degradation as merely carrier strand or potential regulatory molecule?. *PLoS ONE*, 5(6); e11387.
- Halevy, A.A. 1964. Light and autonomous induction. In: *Light and flowering process*, Vince-Pure, D., Thomas, B., Cockshull, K.E (eds), Academic Press., pp. 65-73, London.
- Harty, A.R. and Van Staden, J. 1988. The use of growth retardants in citriculture. *Israel J. Bot.*, 37; 155-164.
- He, L. and Hannon, G.J. 2004. microRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.*, 5(7); 522-531.
- Invitrogen, 2013. Web. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Ambion-Tech-Support/microrna-studies/tech-notes/micrnas-function.html>. Erişim Tarihi: 1.7.2013.
- Izadyar, A.B., Malakouti, M.J., Talaie, A.R. and Fallahi, E. 2008. Biennial bearing and protein content of apples as influenced by high concentrations of foliar nitrogen and sulfur. *Journal of Plant Nutrition*, 21(4); 649 -653.
- Jones-Rhoades, M.W. and Bartel, D.P. 2004. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol. Cell*, 14(6); 787–799.
- Juarez, M., Kui, J., Thomas, J., Heller, B. and Timmermans, M. 2004. microRNA-mediated repression of rolled leaf1 specifies maize leaf polarity. *Nature*, 428; 84-88.
- Kidner, C.A. and Martienssen, R.A. 2005. The developmental role of microRNA in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 8; 38-44.
- Kim, J.J., Lee, J.H., Kim, W., Jung, S.H., Huijser, P. and Ahn, J.H. 2012. The microRNA 156-Squamosa Promoter Binding Protein-Like3 module regulates ambient temperature responsive flowering via flowering locus T in Arabidopsis. *Plant Phys.*, 159; 461–478.
- Lang, A. 1965. Physiology of flower initiation. In: *Handbuch der Pflanzenphysiologie XV/I*, Ruhland, W. (ed.), Spriger Verlag, pp. 1380-1536, Berlin.
- Lauter, N., Kampani, A., Carlson, S., Goebel, M. and Moose, S.P. 2005. microRNA172 down-regulates glossy15 to promote vegetative phase change in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102; 9412–9417.
- Lavee, S. 2007. Biennial bearing in olive (*Olea europaea*). *Annales Ser. Hist. Nat.*, 17; 101-112.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*, 75; 843-854.
- Lenz, F. 1969. Effect of day length and temperature on the vegetative and reproductive growth of ‘washington’ navel orange. In: *Proc. 1st Int. Citrus Symp.* Chapman, H.D. (ed), 1; 333-338, Riverside.

- Li, C.Y., Weiss, D. and Goldschmidt, E.E. 2003. Girdling affects carbohydrate-related gene expression in leaves, bark and roots of alternate bearing citrus trees. *Annals of Botany*, 92; 137-143.
- Li, H., Dong, Y., Yin, H., Wang, N., Yang, J., Liu, X., Wang, Y.J. and Li, X. 2011. Characterization of the stress associated microRNAs in *Glycine max* by deep sequencing. *BMC Plant Biol.*, 11; 170.
- Li, R., Yu, C., Li, Y., Lam, T.W., Yiu, S.M., Kristiansen, K. and Wang, J. 2009. SOAP2; an improved ultrafast tool for short read alignment. *Bioinformatics*, 25(15); 1966–1967.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K.D. and Carrington, J.C. 2002. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science*, 297; 2053–2056.
- Lord, E.M. and Eckard, K.J. 1987. Shoot development in *Citrus inensis* L. (Washington navel orange). II. Alteration of Developmental Fate of Flowering Shoots after GA3 Treatment, *Bot. Gaz.*, 148; 17-22.
- Lovatt, C.J., Zheng, Y. and Kaje, K.D. 1988. Demonstration of a change in nitrogen metabolism influencing flower initiation in citrus. *Isr. J. Bot.*, 37; 181-188.
- Mallory, A.C., Bartel, D.P. and Bartel, B. 2005. MicroRNA-directed regulation of Arabidopsis Auxin Response Factor17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell*, 17; 1360–1375.
- Minchin, P.E.H., Thorp, G.T., Boldingh, H., Cooney, J.M., Negm, F.B., Focht, E., Arpaia, M.L., Hu, H. and Brown, P. 2011. Phloem transport of boron within avocado trees. *World Avocado Congress*, 1–8.
- Monselesse, S.P. and Goldschmidt, E.E. 1982. Alternate bearing in fruit trees. *Hort. Rev.*, 4; 128-173.
- Moss, G.I. 1969. Influence of temperature and photoperiod on flower induction and inflorescence development in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *J. Hort. Sci.*, 44; 311-320.
- Moss, G.I. 1970. Chemical control of flower development in sweet orange (*Citrus sinensis*). *Austr. J. Agric. Res.*, 21; 233-242.
- Moss, G.I. 1977. Major factors influencing flower formation and subsequent fruit-set of sweet orange. In: *Primera Congreso Mundial de Citricultura*. Carpena, O. (ed.), II; 215-222, Spain.
- Muñoz-Fambuena, N., Mesejo, C., González-Mas, M.C., Primo-Millo, E., Agusti, M., and Iglesias, D.J. 2011. Fruit regulates seasonal expression of flowering genes in alternate bearing ‘moncada’ mandarin. *Annals of Botany*, 108; 511-519.
- Nejad, M.S. and Niroomand, A. 2007. Carbohydrate content and its roles in alternate bearing in olive. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(16); 2744-2747.
- Öksüz, E. 1998. Ülkemizde zeytin hasat mekanizasyon düzeyi, hasat edilebilirlik kriterleri ve maliyetinin belirlenmesi üzerine bir araştırma. Yüksek lisans tezi. Çukurova Üniversitesi, 62 s., Adana.
- Öztürk, F., Yalçın, M. ve Dıraman, H. 2009. Türkiye zeytinyağı ekonomisine genel bir bakış. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 4(2); 35-51.
- Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J.C. and Weigel, D. 2003. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, 425; 257–263.
- Pharis, R.P. and King, R.W. 1985. Gibberellins and reproductive development in seed plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 36; 517-568.

- Pillay, A.E., Williams, J.R., El mardi, M.O., Hassan, S.M. and Al-Hamdi, A. 2002. Monitoring of cadmium in 'on' and 'off' date palms. *Environmental International*, 28; 273-276.
- Pillay, A.E., Williams, J.R., El Mardi, M.O., Hassan, S.M. and Al -Hamdi, A. 2005. Boron and the Alternate-bearing phenomenon in the date palm (*Phoenix dactylifera*). *Journal of Arid Environmental*, 62; 199-207.
- Poli, M. 1987. The olive's alternating production pattern. *Olivae*, 3(12); 7-27.
- Quickwiki, 2013. Web sitesi. <http://www.quickwiki.com/tr/MikroRNA>. Erişim Tarihi: 17.7.2013.
- Rallo, I. and Fernandez, E.R. 1985. Influence of cultivar and flower thinning within the inflorescence on competition among olive fruits. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 110; 303-305.
- Rallo, J. and Martin, G.C. 1991. Relationship between abnormal embryo sac development and fruitfulness in olive. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 106; 813-817.
- Rallo, L. and Suarez, M.P. 1989. Seasonal distribution of dry matter within the olive fruit-bearing limb. *Adv. Hort. Sci.*, 3; 55-59.
- Rallo, L., Torreno, P., Vargas, A. and Alvarado, J. 1994. Dormancy and alternate bearing in olive. *Acta Hort.*, 356; 127-136.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R. and Ruvkun, G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403; 901-906.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B. and Bartel, D.P. 2002. microRNAs in plants. *Genes & Dev.*, 16; 1616-1626.
- Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B. and Bartel, D.P. 2002. Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 110; 513-520.
- Rosecrance, R.C., Weinbaum, S.A. and Brown, P.H. 1998. Alternate bearing affects nitrogen, phosphorus, potassium and starch storage pools in mature pistachio trees. *Ann. Bot.*, 82; 463-470.
- Sanchez, J. 1994. Lipid photosynthesis in olive fruit. *Prog. Lipid. Res.*, 33; 97-104.
- Saydam, F., Değirmenci, İ. and Veysi Güneş, H.V. 2011. mikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Medical Journal*, 38(1); 113-120.
- Schwab, R., Palatnik, J.F., Riester, M., Schommer, C., Schmid, M. and Weigel, D. 2005. Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Developmental Cell*, 8; 517-527.
- Seyyednejat, M., Ebrahimzadeh, H. and Talaie, A. 2001. Carbonhydrate content in olive 'zard' c.v. and alternate bearing pattern. *Int. Sugar J.*, 103(1226); 84-87.
- Shalom, L., Samuels, S., Zur, N., Shlizerman, L., Zemach, H., Weissberg, M., Ophir, R., Blumwald, E. and Sadka, A. 2012. Alternate bearing in citrus; changes in the expression of flowering control genes and in global gene expression in on-versus off-crop trees. *PLoS One*, 7(10); e46930.
- Shimon, L. 2007. Biennial bearing in olive (*Olea europaea*). *Ser. Hist. Nat.*, 17(1); 101-112.
- Spann, T.M., Beede, R.H. and Dejong, T.M. 2008. Seasonal carbohydrate storage and mobilization in bearing and non-bearing pistachio (*Pistacia vera*) trees. *Tree Physiol.*, 28; 207-213.
- Suakar, Ö. 2006. Bazı zeytin çeşitlerinde SAD geninin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi ve polimorfizm analizi. Yüksek lisans tezi. Balıkesir Üniversitesi, 69 s., Balıkesir.

- Suakar, Ö. 2012. Zeytin cDNA kütüphanelerinin moleküler karakterizasyonu ve önemli genlerin tespiti. Doktora tezi. Balıkesir Üniversitesi, 288 s., Balıkesir.
- Sunkar, R., Li, Y.F. and Jagadeeswaran, G. 2012. Functions of miRNAs in plant stress responses. *Trends Plant Sci.*, 17(4); 196–203.
- Turhan, E. 2011. Bahçe bitkilerinin fizyolojik esasları. Anadolu Üniversitesi, 245 s., Eskişehir.
- Ulger, S., Sonmez, S., Karkacier, M., Ertoy, N., Akdesir, O. and Aksu, M. 2004. Determination of endogenous hormones, sugars and mineral nutrition levels during the induction, initiation and differentiation stage and their effects on flower formation in olive. *Plant Growth Regul.*, 42; 89–95.
- Unver, T. 2008. Detection and characterization of plant genes involved in various biotic and abiotic stress conditions using DDRT-PCR and isolation of interacting proteins. PhD Thesis, Middle East Technical University, 2008.
- Unver, T. and Budak, H. 2009a. Conserved microRNAs and their targets in model grass species *Brachypodium distachyon*. *Planta*, 230; 659-669.
- Unver, T., Namuth-Covert, D. and Budak, H. 2009b. Review of current methodological approaches for characterizing microRNAs in plants. *International Journal of Plant Genomics*, 2009; 1-11 pp.
- UZK (Uluslararası Zeytinyağı Konseyi), 1997. Dünya zeytin ansiklopedisi, Príncipe de Vergara, 154, 28002 Madrid, İspanya.
- Ülger, S., Baktır, İ. ve Kaynak, L. 1999. Zeytinlerde periyodisite ve çiçek tomurcuğu oluşumu üzerine içsel büyüme hormonlarının etkilerinin saptanması. *Tr. J. Of Agriculture and Forestry*, 23 (3); 619-623.
- Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E.F. and Hellens, R.P. 2007. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*, 3;12.
- Vemmos, S.N. 2010. Alternate bearing and the possible role of carbohydrates in bud abscission of pistachio (*Pistacia vera* L.). In: XIV GREMPA Meeting on Pistachio and Almonds, p. 9-18, Greece.
- Visioli, F., Poli, A. and Galli, C. 2002. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews*, 22; 65-75.
- Wang, J.W., Czech, B. and Weigel, D. 2009. miR156-Regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 138; 738–749.
- Wang, T., Chen, L., Zhao, M., Tian, Q. and Zhang, W.H. 2011. Identification of drought-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing. *BMC Genomics*, 12; 367.
- Wijnhoven, B.P., Michael, M.Z. and Watson, D.I. 2007. microRNAs and cancer. *Br. J. Surg.*, 94; 23-30.
- Wood, B.W., Conner, P.J., and Worley, R.E. 2004. Insight into alternate bearing of pecan. *Acta Hort.*, 636; 617-629.
- Wu, G., Park, M.Y., Conway, S.R., Wang, J.W., Weigel, D. and Poethig, R.S. 2009. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*, 138; 750–759.
- Yang, T., Xue, L. and An, L. 2007. Functional diversity of miRNA in plants. *Plant Science*, 172; 423-432.

- Yanik, H., Turktas, M., Hernandez, P., Dorado, G., Dundar, E. and Unver, T. 2013. Genome-wide identification of alternate bearing-associated miRNAs in the olive tree (*Olea europaea*). *BMC Plant Biology*, 13; 10.
- YAYÇEP (Televizyon Yoluyla Yaygın Çiftçi Eğitimi Projesi), 2009. Zeytin. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Yayın No; 52, Ankara.
- Yin, Z., Li, C., Han, X. and Shen, F. 2008. Identification of conserved microRNAs and their target genes in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Gene*, 414; 60–66.
- ZAE, 2010. Web sitesi. www.zae.gov.tr/yetistirme/41.asp. Erişim Tarihi: 08.11.2010.
- Zhang, B., Pan, X., Wang, Q., Cobb, G.P. and Anderson, T.A. 2005. Identification and characterization of new plant microRNAs using EST analysis. *Cell Res.*, 15(5); 336-360.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G.P. and Anderson, T.A. 2006. Plant microRNA; a small regulatory molecule with big impact. *Dev. Biol.*, 289; 3–16.
- Zhang, B., Wang, Q., Wang, K., Pan, X., Liu, F., Gou, T., Cobb, G.P. and Anderson, T.A. 2007. Identification of cotton microRNAs and their targets. *Gene*, 397; 26–37.
- Zhang, B., Pan, X. and Stellwag, E.J. 2008. Identification of soybean microRNAs and their targets. *Planta*, 229; 161–182.
- Zhang, W., Luo, Y., Gong, X., Zeng, W. and Li, S. 2009. Computational identification of 48 potato microRNAs and their targets. *Comput. Biol. Chem.*, 33; 84–93.
- Zhou, Z.S., Song, J.B. and Yang, Z.M. 2012. Genome-wide identification of *Brassica napus* microRNAs and their targets in response to cadmium. *J. Exp. Bot.*, 63(12); 4597-4613.
- Zhu, J-K. 2008. Reconstituting plant miRNA biogenesis. *PNAS*, 105(29); 9851–9852.
- Zhu, Q.H. and Helliwell, C.A. 2010. Regulation of flowering time and floral patterning by miR172. *J. Exp. Bot.*, 62(2); 487–495.
- Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31; 3406–3415.

EKLER

EK 1. Zeytin bitkisinde keşfedilen 22 miRNA familyasına ait 136 korunmuş miRNA

EK 2. 38 yeni miRNA'nın tahmini sekonder yapıları

EK 3. 6 sRNA kütüphanesinde miRNA* dizilerinin listesi

EK 4. Biyolojik fonksiyon ontolojisinde önemli derecede ($p < 0,05$) bulunan 8 ontoloji teriminin kümeleme ve genom frekansları

EK 5. Moleküler işlev ontolojisinde önemli derecede ($p < 0,05$) bulunan 108 ontoloji teriminin kümeleme ve genom frekansları

EK 5.1. Moleküler işlev ontolojisinde önemli derecede ($p < 0,05$) bulunan 108 ontoloji teriminin kümeleme frekansı

EK 5.2. Moleküler işlev ontolojisinde önemli derecede ($p < 0,05$) bulunan 108 ontoloji teriminin genom frekansı

EK 6. miRNA hedef genlerini içeren 130 KEGG metabolik yolağı

Ek 1. Zeytin bitkisinde keşfedilen 22 miRNA familyasına ait 136 korunmuş miRNA

miRNA	miRNA dizisi
Oeu_miR156a	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC
Oeu_miR156b	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC
Oeu_miR156c	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC
Oeu_miR156d	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC
Oeu_miR156e	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC
Oeu_miR156f	UGACAGAAGAGAGUGAGCAC
Oeu_miR156g	UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC
Oeu_miR156h	UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC
Oeu_miR156i	UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC
Oeu_miR156j	UUGACAGAAGAUAGAGAGCAC
Oeu_miR156k	UGACAGAAGAGAGGGAGCAC
Oeu_miR159a	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA
Oeu_miR159b	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA
Oeu_miR159c	UUUGGAUUGAAGGGAGCUCUA
Oeu_miR159d	CUUGGAUUGAAGGGAGCUCCU
Oeu_miR160a	UGCCUGGCUCCCUGUAUGCCA
Oeu_miR160b	UGCCUGGCUCCCUGUAUGCCA
Oeu_miR160c	UGCCUGGCUCCCUGUAUGCCA
Oeu_miR160d	UGCCUGGCUCCCUGUAUGCCA
Oeu_miR160g	UGCCUGGCUCCCUGGAUGCCA
Oeu_miR164a	UGGAGAAGCAGGGCACGUGCA
Oeu_miR164b	UGGAGAAGCAGGGCACGUGCA
Oeu_miR164c	UGGAGAAGCAGGGCACGUGCA
Oeu_miR164d	UGGAGAAGCAGGGCACGUGCA
Oeu_miR164e	UGGAGAAGCAGGGCACGUGCA
Oeu_miR164f	UGGAGAAGCAGGGCACAUUGCU
Oeu_miR166a	UCGGACCAGGCUUCAUUCCCC
Oeu_miR166b	UCGGACCAGGCUUCAUUCCCC
Oeu_miR166c	UCGGACCAGGCUUCAUUCCCC
Oeu_miR166d	UCGGACCAGGCUUCAUUCCCC
Oeu_miR166e	UCGGACCAGGCUUCAUUCCCC
Oeu_miR166f	UCGGACCAGGCUUCAUUCCCC
Oeu_miR166g	UCGGACCAGGCUUCAUUCCCC
Oeu_miR166h	UCGGACCAGGCUUCAUUCCCC
Oeu_miR166i	UCGGACCAGGCUUCAUUCCCC
Oeu_miR166j	UCGGACCAGGCUUCAUUCCCC
Oeu_miR166k	UCGGACCAGGCUUCAUUCCCC
Oeu_miR166l	UCGGACCAGGCUUCAUUCCCC
Oeu_miR166m	UCGGACCAGGCUUCAUUCCCC
Oeu_miR166n	UCGGACCAGGCUUCAUUCCCC

Oeu_miR166o	UCGGACCAGGCUUCAUUCCCC
Oeu_miR166p	UCGGACCAGGCUUCAUUCCCC
Oeu_miR166q	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUA
Oeu_miR167a	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUA
Oeu_miR167b	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUA
Oeu_miR167c	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUA
Oeu_miR167d	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUA
Oeu_miR167e	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUG
Oeu_miR167f	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUU
Oeu_miR167g	UGAAGCUGCCAGCAUGAUCUU
Oeu_miR168a	UCGCUUGGUGCAGGUCGGGAA
Oeu_miR168b	UCGCUUGGUGCAGGUCGGGAA
Oeu_miR169a	CAGCCAAGGAUGACUUGCCGA
Oeu_miR169b	CAGCCAAGGAUGACUUGCCGA
Oeu_miR169c	CAGCCAAGGAUGACUUGCCGA
Oeu_miR169d	CAGCCAAGGAUGACUUGCCGG
Oeu_miR169e	CAGCCAAGGAUGACUUGCCGG
Oeu_miR169f	CAGCCAAGGAUGACUUGCCGG
Oeu_miR169g	CAGCCAAGGAUGACUUGCCGG
Oeu_miR169h	CAGCCAAGGAUGACUUGCCGG
Oeu_miR169i	UAGCCAAGGAUGACUUGCCUG
Oeu_miR169j	UAGCCAAGGAUGACUUGCCUG
Oeu_miR169k	UAGCCAAGGAUGACUUGCCUG
Oeu_miR169l	UAGCCAAGGAUGACUUGCCUG
Oeu_miR169m	UAGCCAAGGAUGACUUGCCUG
Oeu_miR169r	UAGCCAAGGAUGACUUGCCUA
Oeu_miR169s	UCAGCCAAGGAUGACUUGCCG
Oeu_miR169v	UAGCCAAGGAUGACUUGCCCA
Oeu_miR169w	UAGCCAAGGAUGACUUGCCCA
Oeu_miR171a	UUGAGCCGUGCCAAUAUCACG
Oeu_miR171b	UUGAGCCGUGCCAAUAUCACG
Oeu_miR171c	AGAUUGAGCCGCGCCAAUAUC
Oeu_miR171d	AGAUUGAGCCGCGCCAAUAUC
Oeu_miR171e	UGAUUGAGCCGUGCCAAUAUC
Oeu_miR171f	UGAUUGAGCCGUGCCAAUAUC
Oeu_miR171g	UGAUUGAGCCGUGCCAAUAUC
Oeu_miR171h	UGAUUGAGCCGUGCCAAUAUC
Oeu_miR171i	UGAUUGAGCCGUGCCAAUAUC
Oeu_miR172a	AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU
Oeu_miR172b	AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU
Oeu_miR172c	AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU
Oeu_miR172d	GGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU
Oeu_miR172e	GGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU
Oeu_miR172f	AGAAUCUUGAUGAUGCUGCAU

Oeu_miR172g	GGAAUCUUGAUGAUGCUGCAG
Oeu_miR172h	GGAAUCUUGAUGAUGCUGCAG
Oeu_miR172i	GGAAUCUUGAUGAUGCUGCAG
Oeu_miR319a	UUGGACUGAAGGGAGCUCCC
Oeu_miR319b	UUGGACUGAAGGGAGCUCCC
Oeu_miR319c	UUGGACUGAAGGGAGCUCCC
Oeu_miR319d	UUGGACUGAAGGGAGCUCCC
Oeu_miR319e	UUGGACUGAAGGGAGCUCCC
Oeu_miR319f	UUGGACUGAAGGGAGCUCCU
Oeu_miR319g	UUGGACUGAAGGGAGCUCCU
Oeu_miR319h	UUGGACUGAAGGGAGCUCCU
Oeu_miR390a	AAGCUCAGGAGGGAUAGCGCC
Oeu_miR390b	AAGCUCAGGAGGGAUAGCGCC
Oeu_miR390c	AAGCUCAGGAGGGAUAGCGCC
Oeu_miR390d	AAGCUCAGGAGGGAUAGCGCC
Oeu_miR393a	UCCAAAGGGAUCGCAUUGAUC
Oeu_miR393b	UCCAAAGGGAUCGCAUUGAUC
Oeu_miR393c	UCCAAAGGGAUCGCAUUGAUC
Oeu_miR393d	UCCAAAGGGAUCGCAUUGAUC
Oeu_miR394a-5p	UUGGCAUUCUGUCCACCUC
Oeu_miR394b-5p	UUGGCAUUCUGUCCACCUC
Oeu_miR395b	CUGAAGGGUUUGGAGGAACUC
Oeu_miR395c	CUGAAGGGUUUGGAGGAACUC
Oeu_miR395d	CUGAAGGGUUUGGAGGAACUC
Oeu_miR395e	CUGAAGGGUUUGGAGGAACUC
Oeu_miR395f	CUGAAGGGUUUGGAGGAACUC
Oeu_miR395g	CUGAAGGGUUUGGAGGAACUC
Oeu_miR395h	CUGAAGGGUUUGGAGGAACUC
Oeu_miR395i	CUGAAGGGUUUGGAGGAACUC
Oeu_miR395j	CUGAAGGUGUUUGGGGAACUC
Oeu_miR396a	UUCCACAGCUUUCUUGAACUG
Oeu_miR396b	UUCCACAGCUUUCUUGAACUG
Oeu_miR396c	UUCCACAGCUUUCUUGAACUG
Oeu_miR396d	UUCCACAGCUUUCUUGAACUG
Oeu_miR396e	UUCCACAGCUUUCUUGAACUG
Oeu_miR396f	UUCCACAGCUUUCUUGAACUG
Oeu_miR396g	UUCCACAGCUUUCUUGAACUG
Oeu_miR397a	UCAUUGAGUGCAGCGUUGAUG
Oeu_miR397b	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG
Oeu_miR398b	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG
Oeu_miR398c	UGUGUUCUCAGGUCGCCCCUG
Oeu_miR399b	UGCCAAAGGAGAUUUGCCCCG
Oeu_miR399c	UGCCAAAGGAGAUUUGCCCCG
Oeu_miR399f	UGCCAAAGGAGAAUUGCCCCG

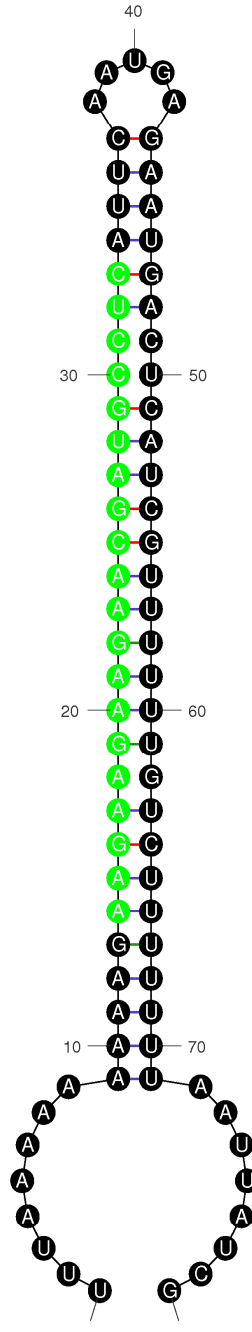
Oeu_miR399g	UGCCAAAGGAGAAUUGCCCUG
Oeu_miR399i	UGCCAAAGGAGAGUUGCCCUA
Oeu_miR403a	UUAGAUUCACGCACAAACUCG
Oeu_miR403b	UUAGAUUCACGCACAAACUCG
Oeu_miR403c	UUAGAUUCACGCACAAACUCG
Oeu_miR408	AUGCACUGCCUCUUCCCUGGC
Oeu_miR530a	UGCAUUUGCACCUGCACCUU

Ek 2. 38 yeni miRNA'nın tahmini sekonder yapıları

Oeu_miR_1

Output of sit_graph (©)
mfold_v4.6

Created Sat Jul 6 10:09:53 2013

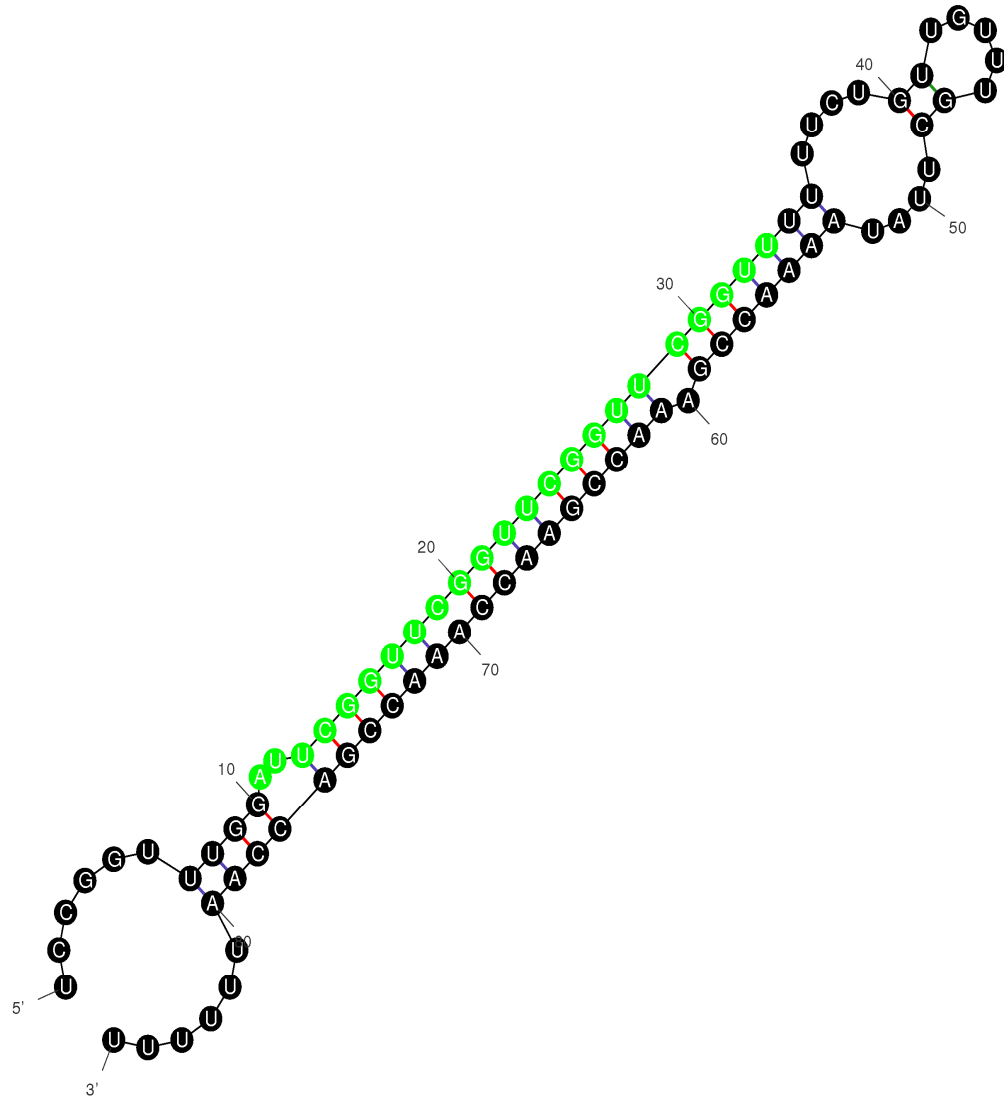


$dG = -27.20$ [initially -27.20] Oeu_miR_1

Oeu_miR_2

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 10:10:58 2013

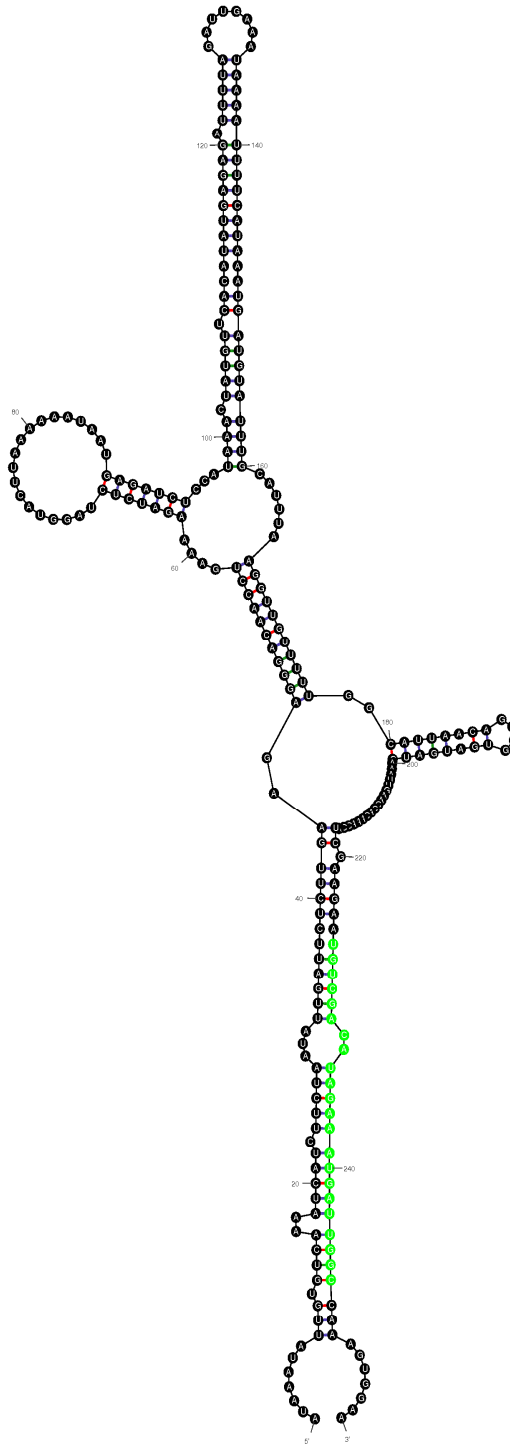


dG = -36.30 [Initially -36.30] Oeu_miR_2

Oeu_miR_3

Output of air_graph (©)
mfold_util 4.6

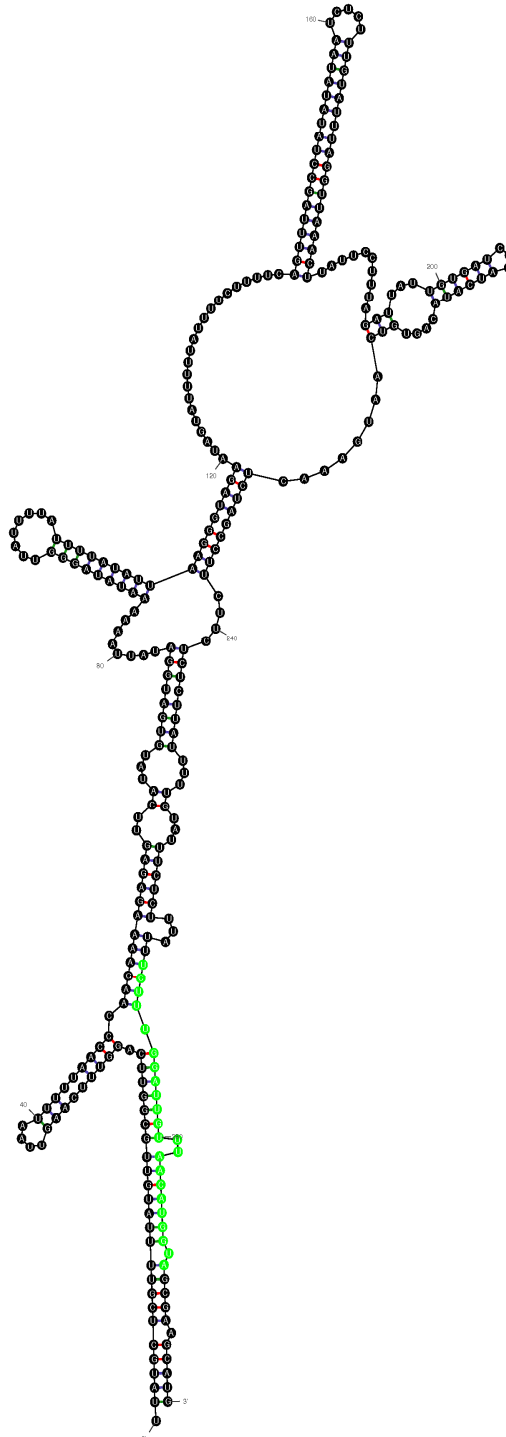
Created Sat Jul 6 09:02:07 2013



Oeu_miR_4

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 09:06:48 2013

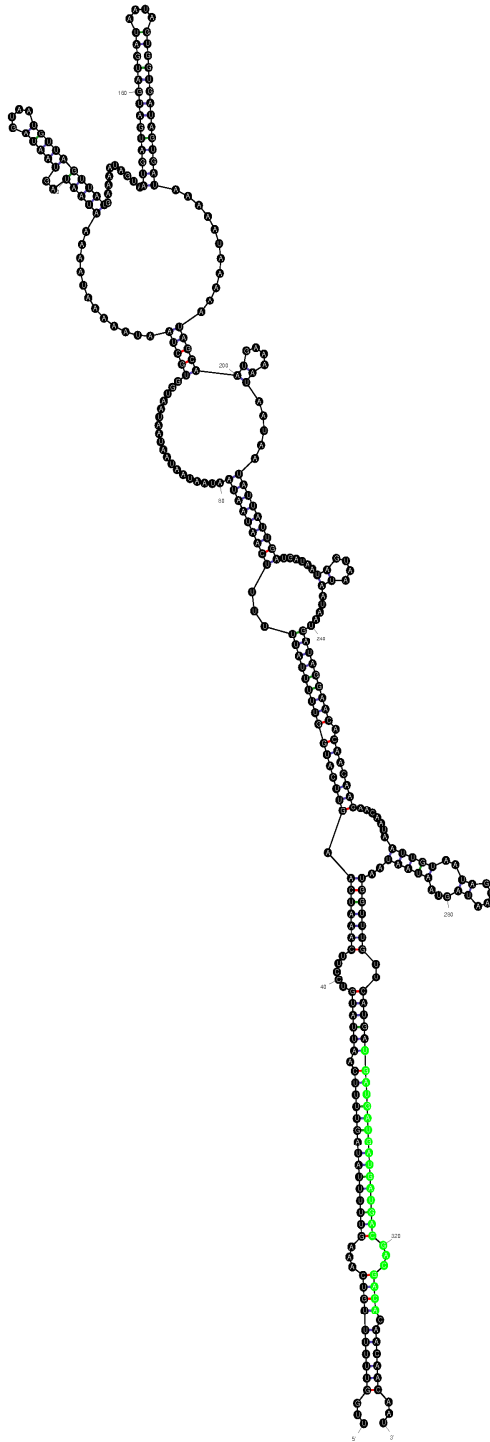


dG = -59.35 [Initially -68.40] Oeu_miR_4

Oeu_miR_5

Output of sirl_graph (©)
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 09:08:59 2013

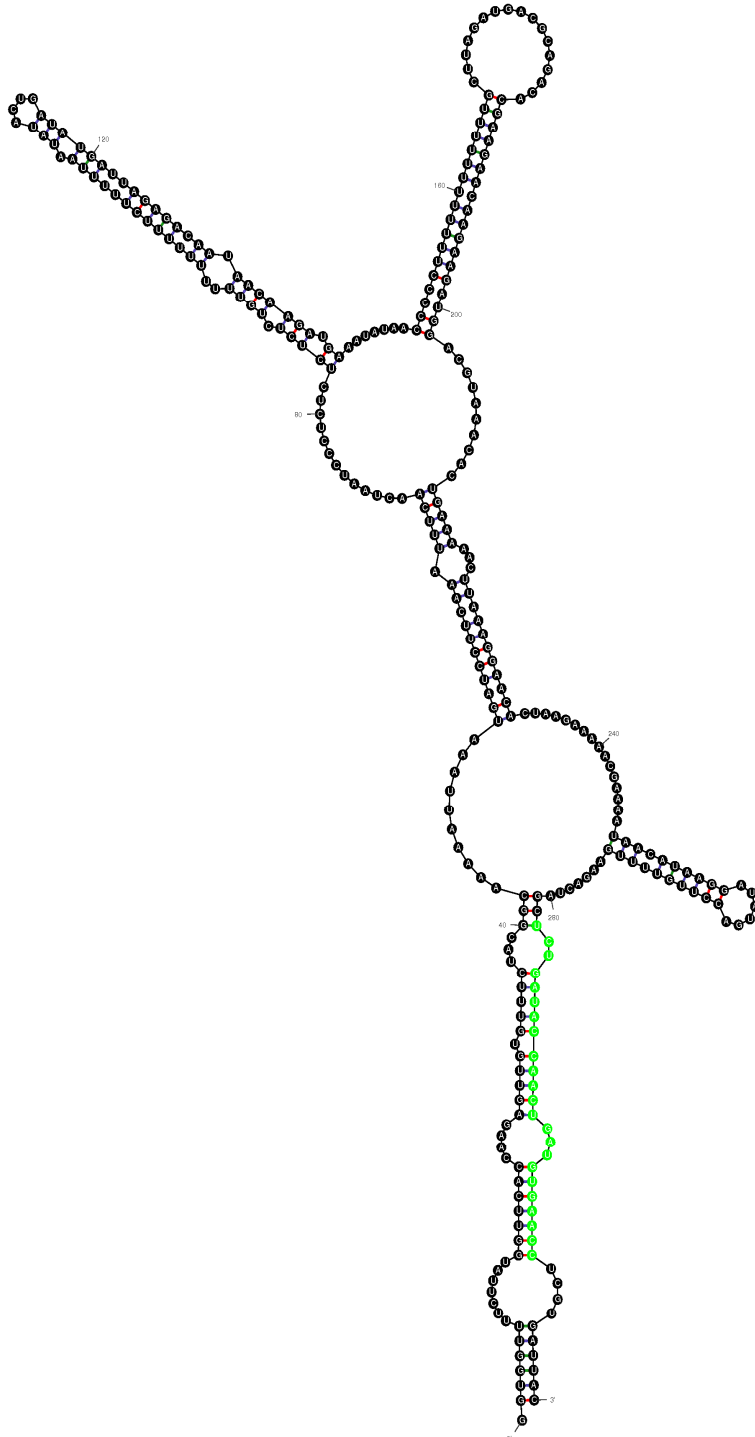


dG = -28.71 [Initially -43.10] Oeu_miR_5

Oeu_miR_6

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 09:11:30 2013

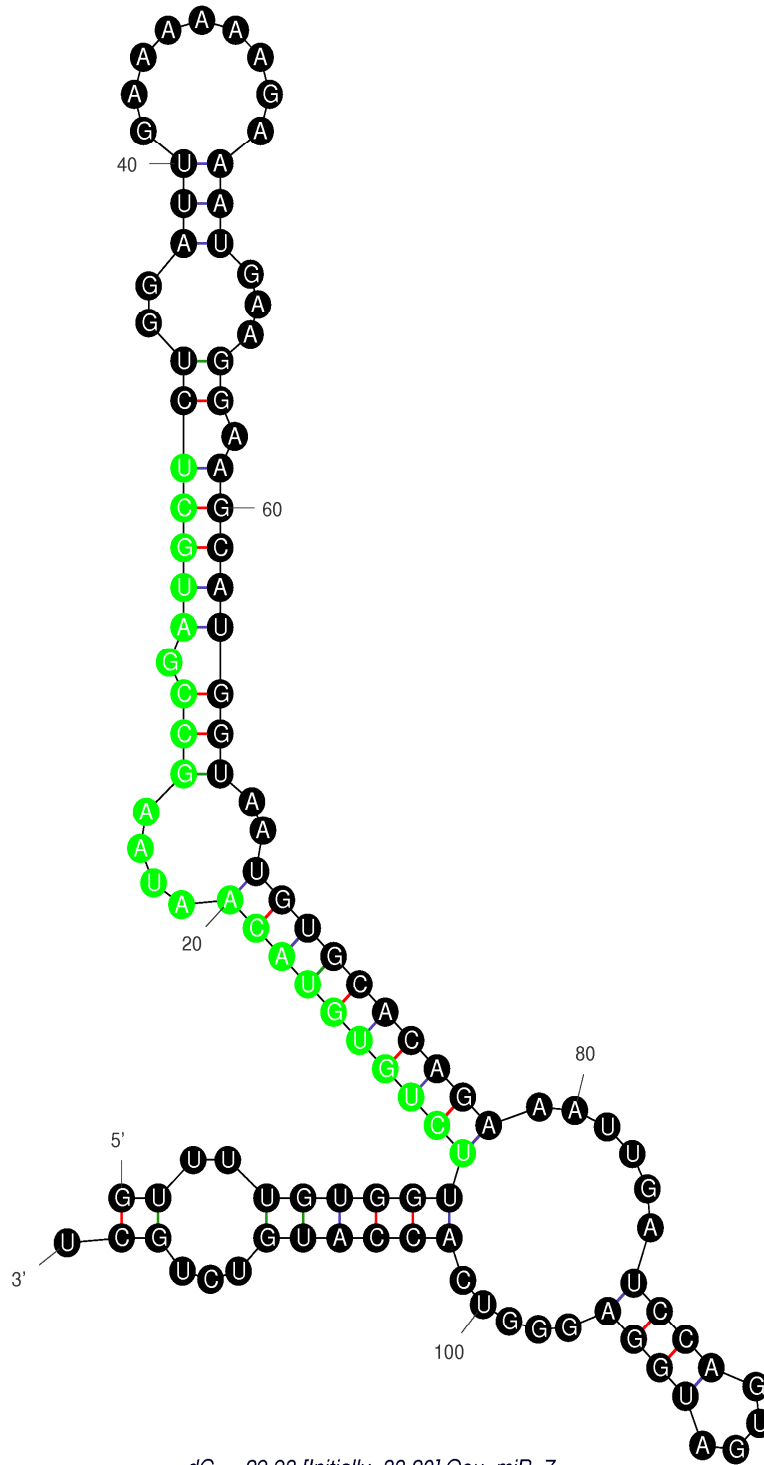


dG = -41.05 [Initially -50.80] Oeu_miR_6

Oeu_miR_7

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

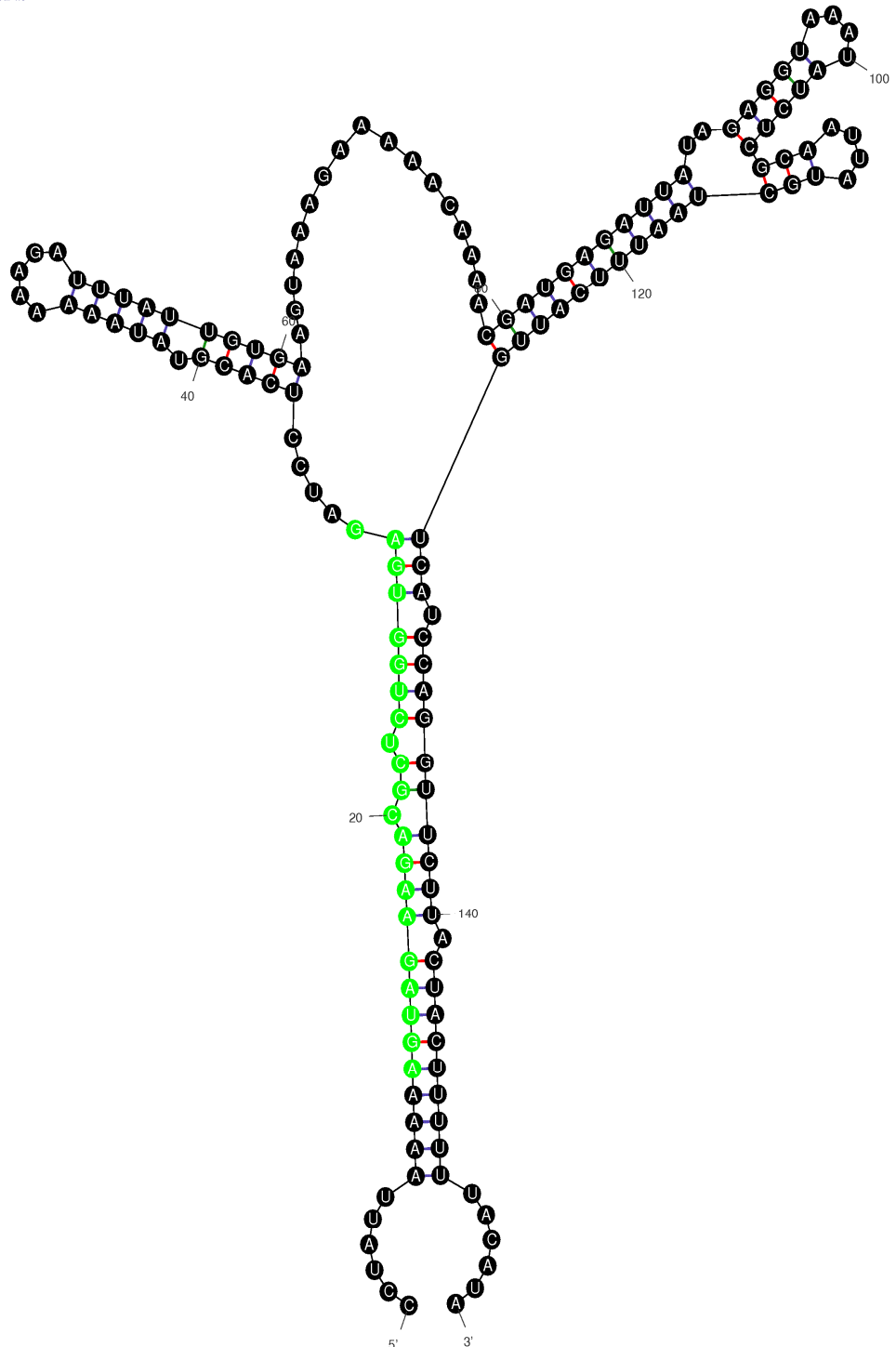
Created Sat Jul 6 09:13:06 2013



Oeu_miR_8

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 09:15:22 2013

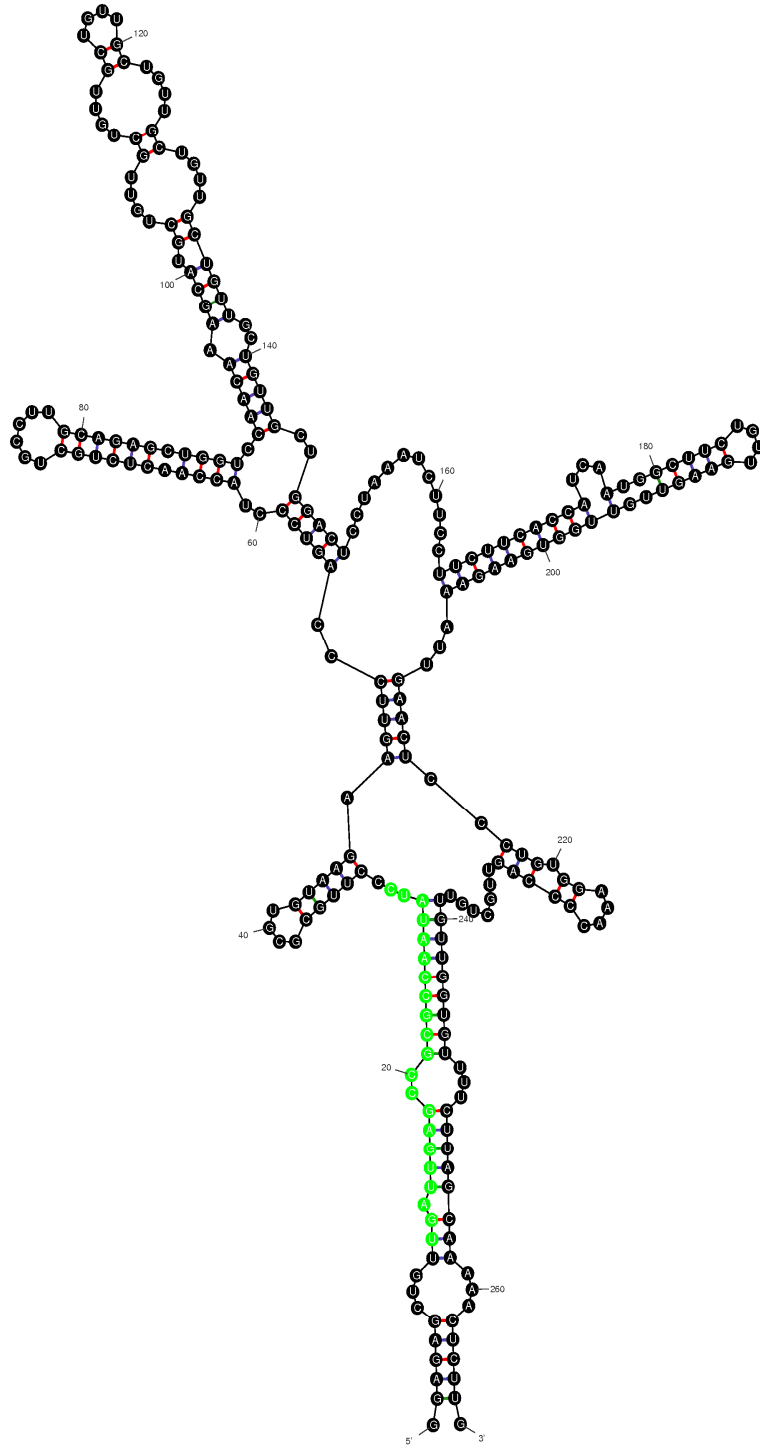


dG = -33.07 [initially -37.10] Oeu_miR_8

Oeu_miR_9

Output of sir_graph ©
mfold_util 4.6

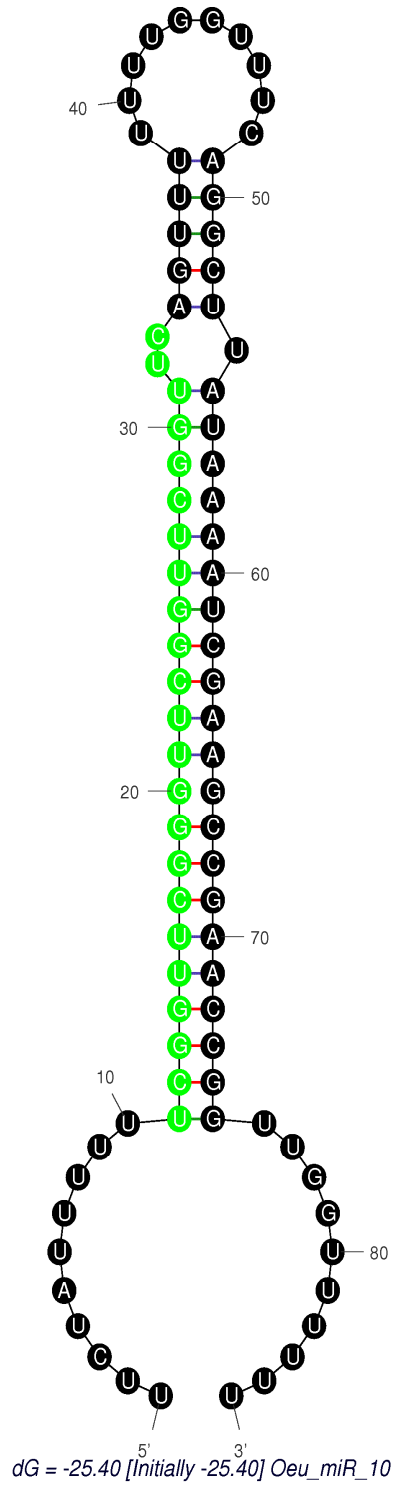
Created Sat Jul 6 09:17:19 2013



Oeu_miR_10

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

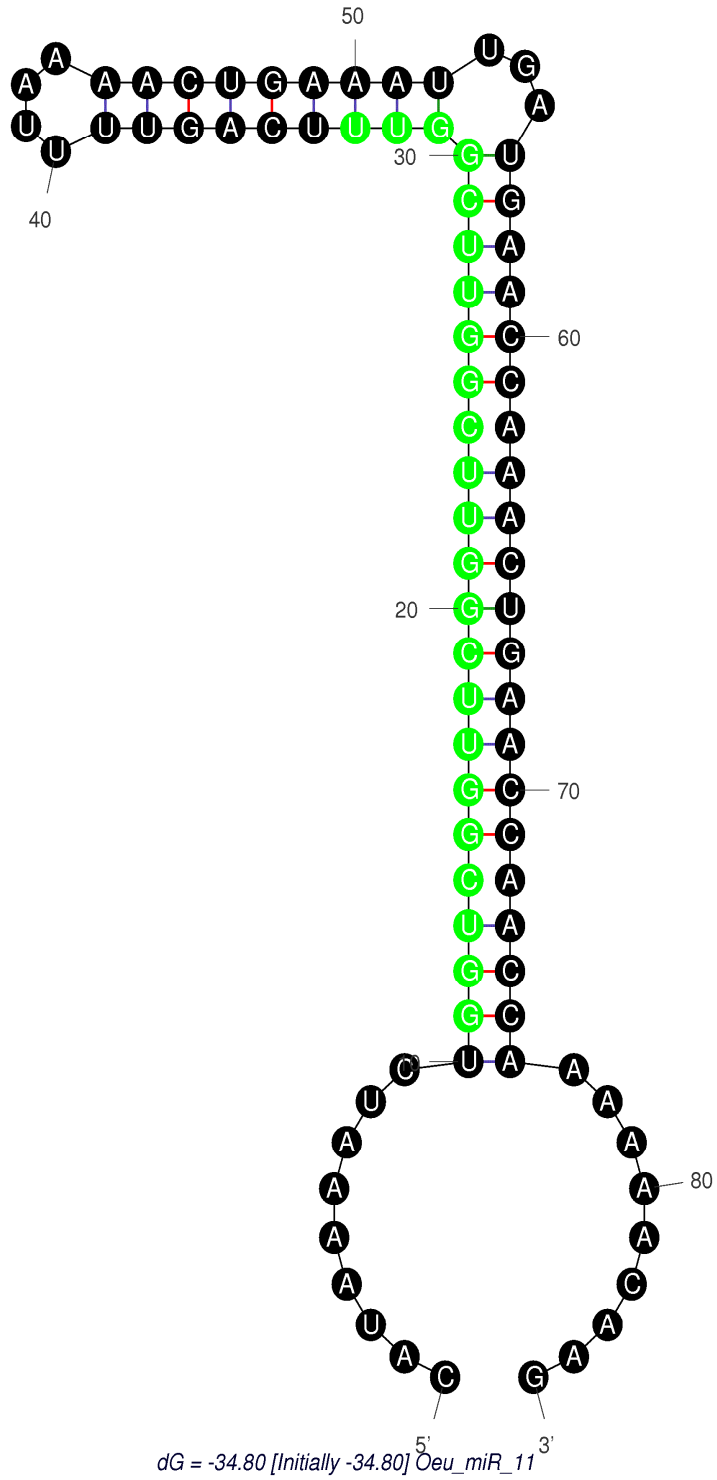
Created Sat Jul 6 09:19:11 2013



Oeu_miR_11

Output of sir_graph ©
mfold_util 4.6

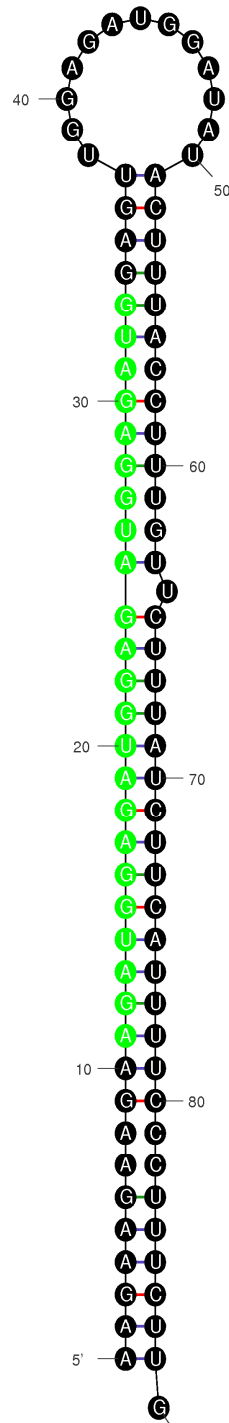
Created Sat Jul 6 09:20:40 2013



Oeu_miR_12

Output of sir_graph ©
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 09:22:10 2013

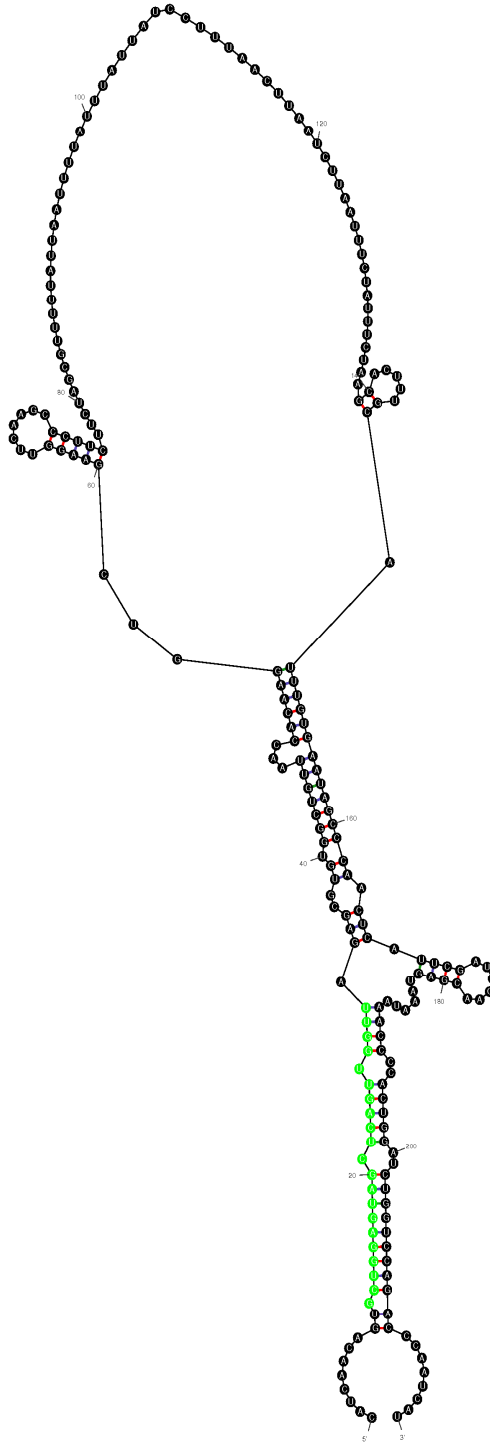


dG = -31.50 [Initially -31.50] Oeu_miR_12

Oeu_miR_13

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 09:23:48 2013

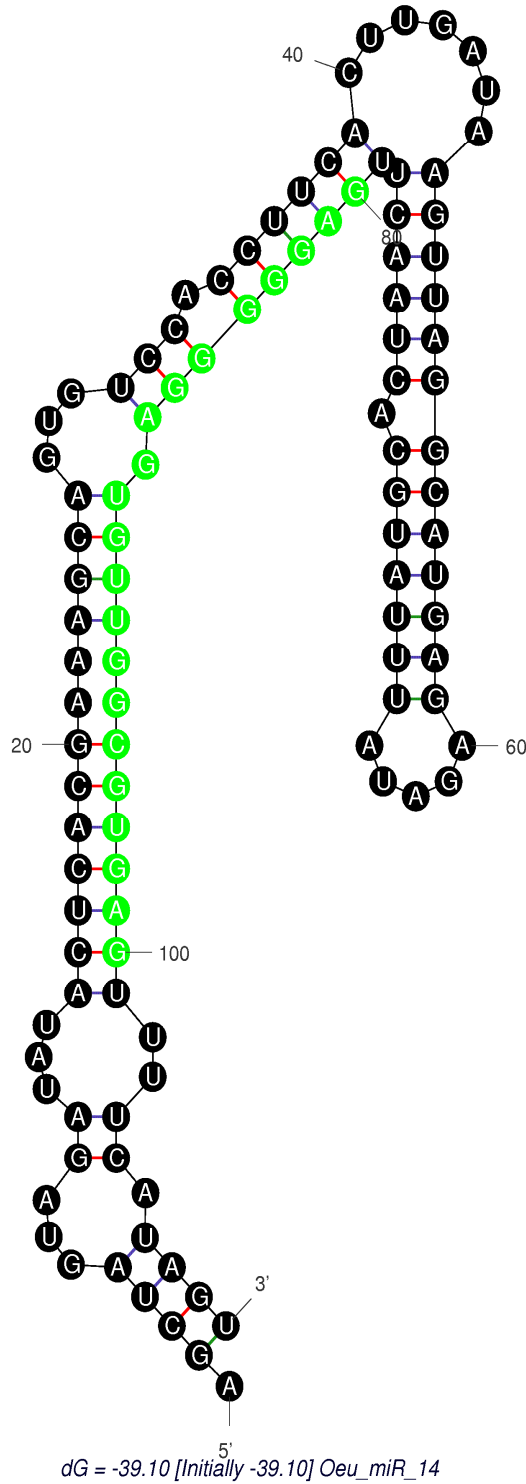


$dG = -38.74$ [Initially -44.80] Oeu_miR_13

Oeu_miR_14

Output of sirl_graph (©)
mfold_util 4.6

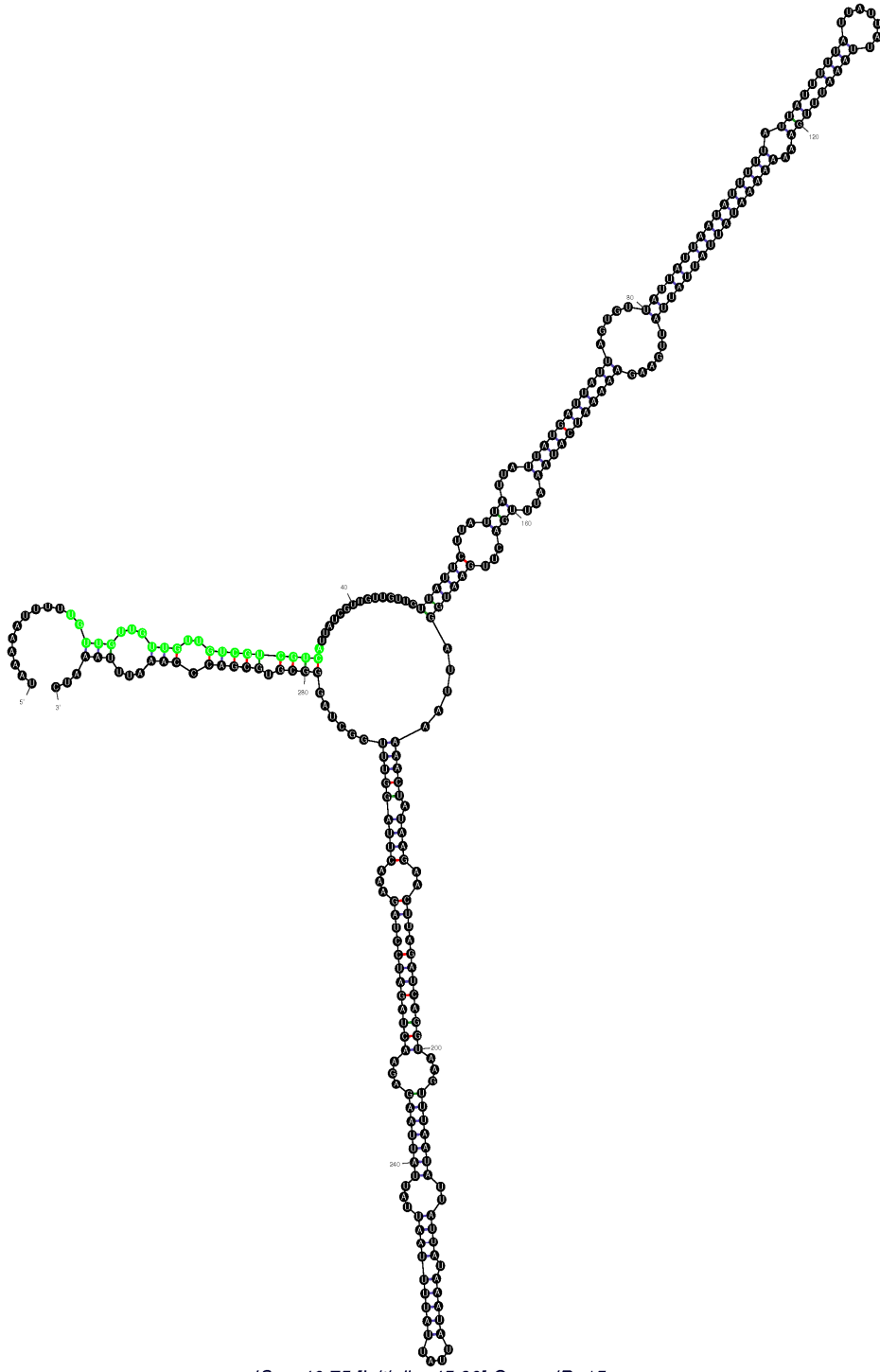
Created Sat Jul 6 09:25:19 2013



Oeu_miR_15

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 09:26:36 2013

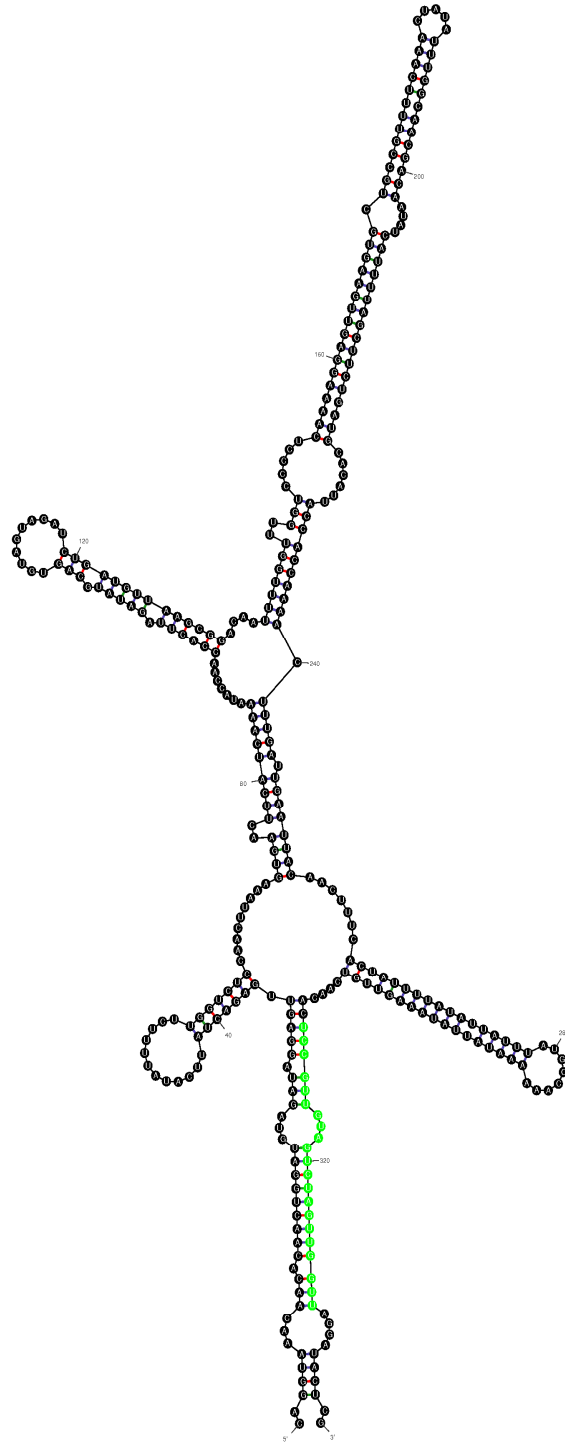


$dG = -40.75$ [Initially -45.30] Oeu_miR_15

Oeu_miR_16

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 09:29:06 2013

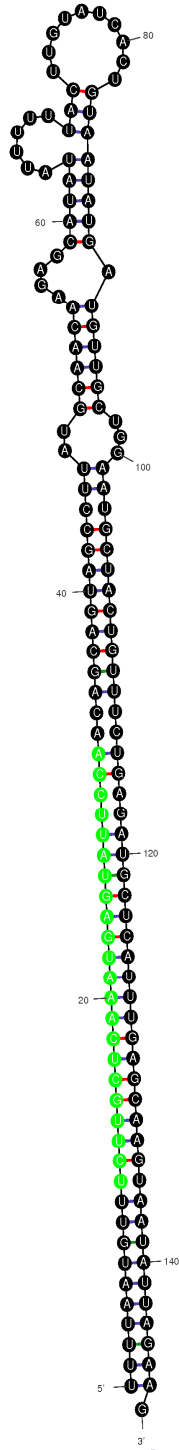


$dG = -76.16$ [Initially -79.60] Oeu_miR_16

Oeu_miR_17

Output of air_graph ©
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 09:31:21 2013

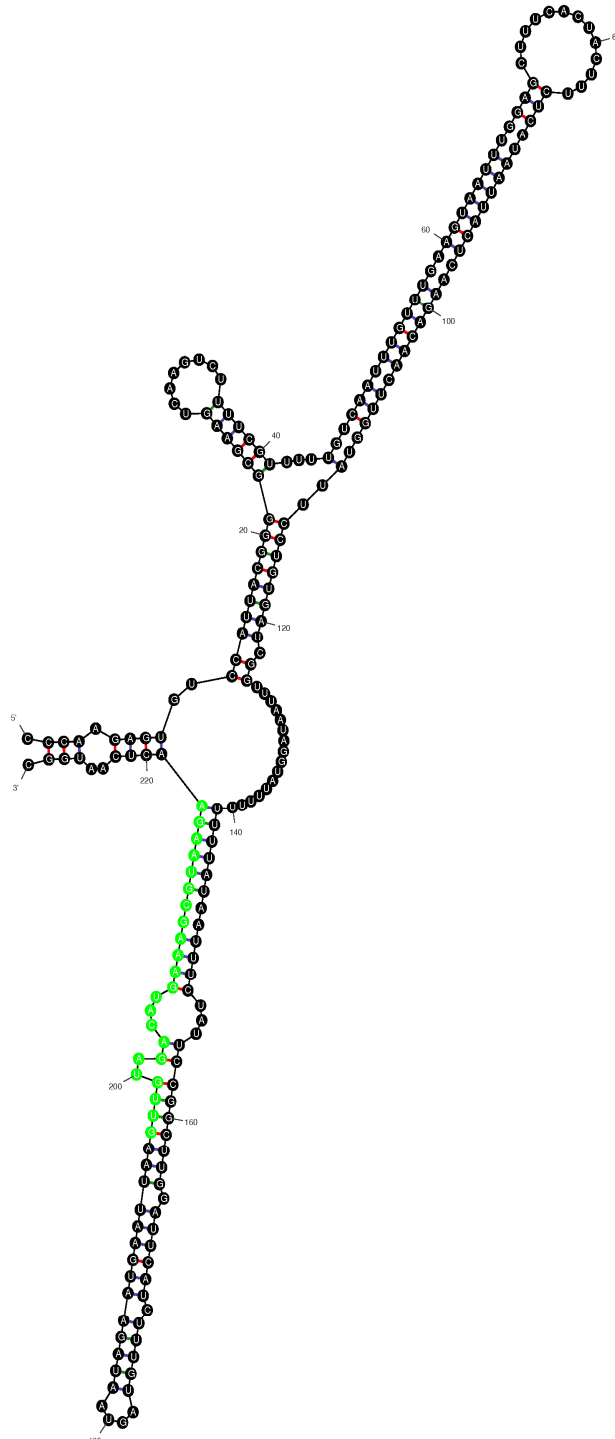


dG = -59.10 [Initially -59.10] Oeu_miR_17

Oeu_miR_18

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 09:35:30 2013

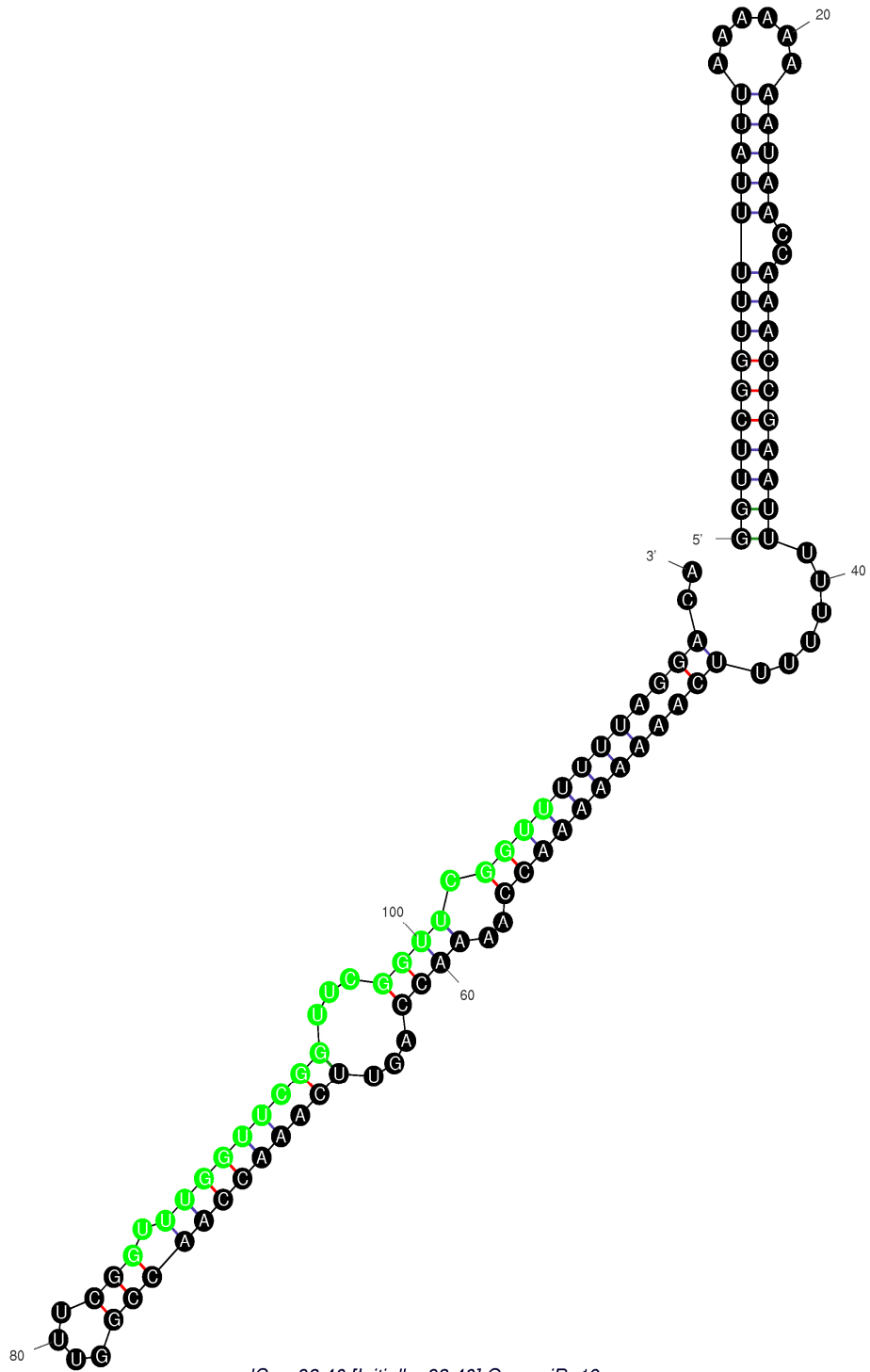


dG = -43.59 [Initially -48.90] Oeu_miR_18

Oeu_miR_19

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

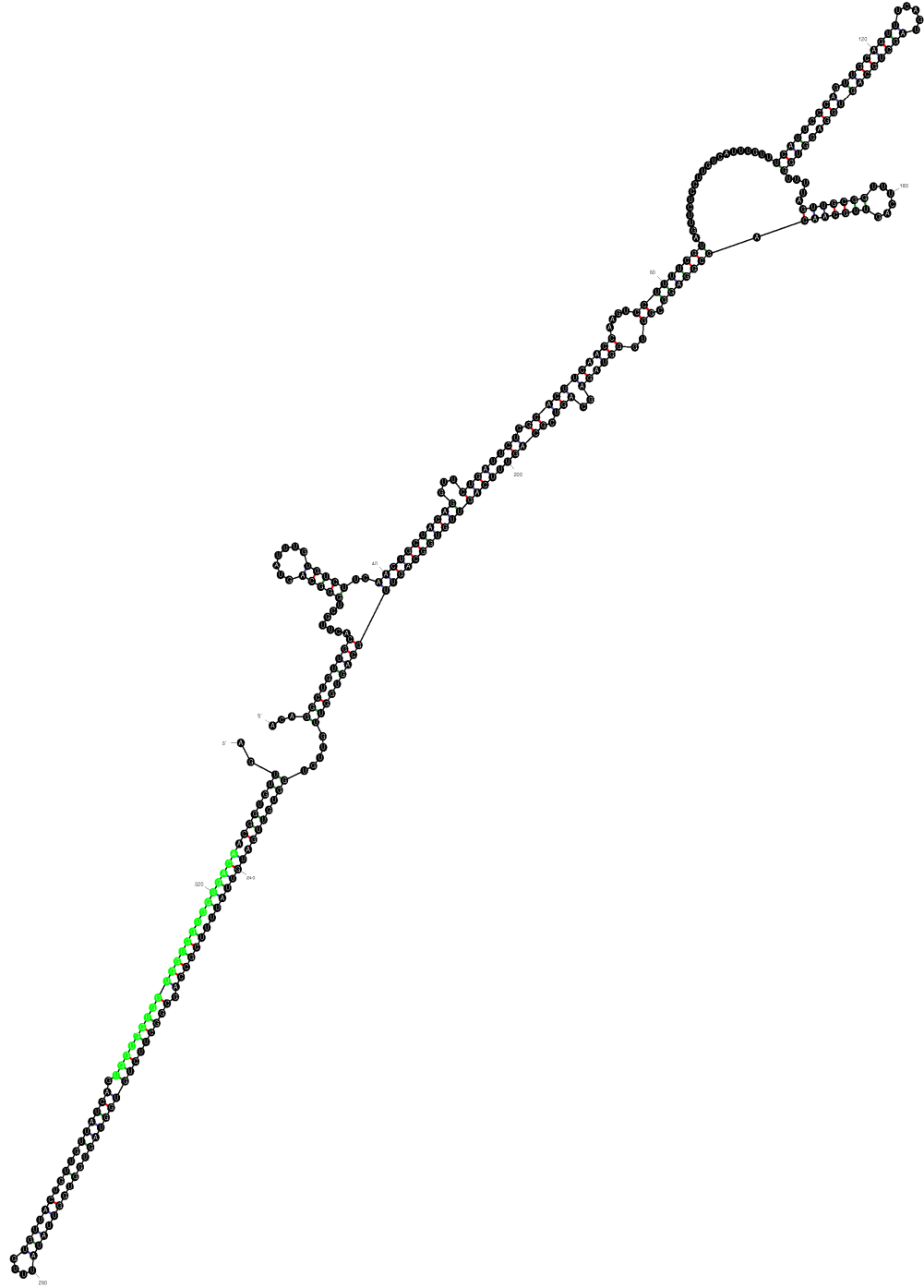
Created Sat Jul 6 09:36:58 2013



Oeu_miR_20

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 09:38:30 2013

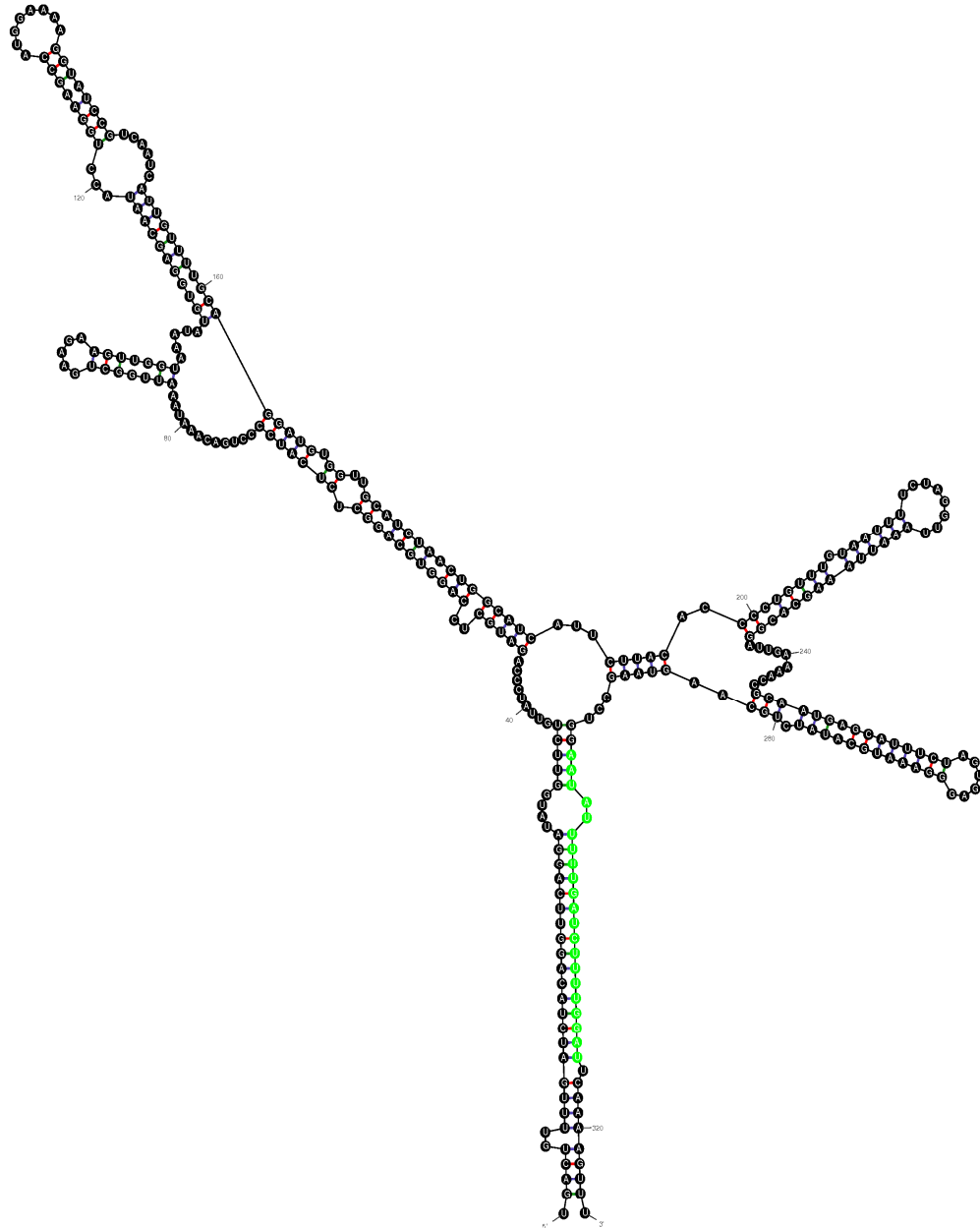


dG = -101.14 [Initially -107.50] Oeu_miR_20

Oeu_miR_21

Output of sir_graph ©
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 09:40:11 2013

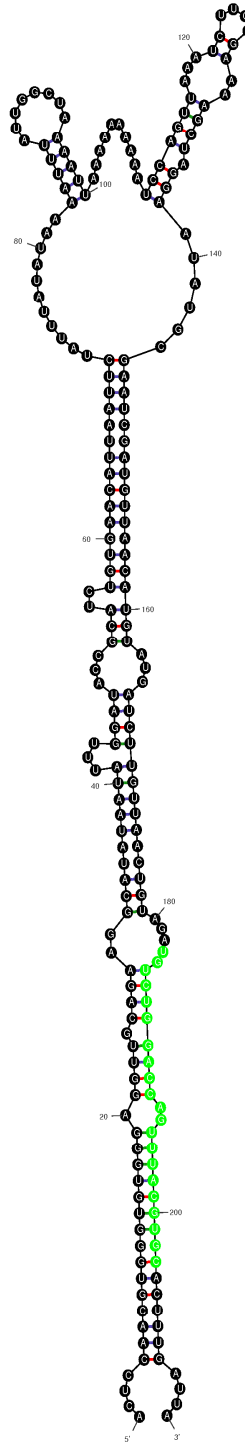


$dG = -75.01$ [Initially -86.80] Oeu_miR_21

Oeu_miR_22

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 09:41:54 2013

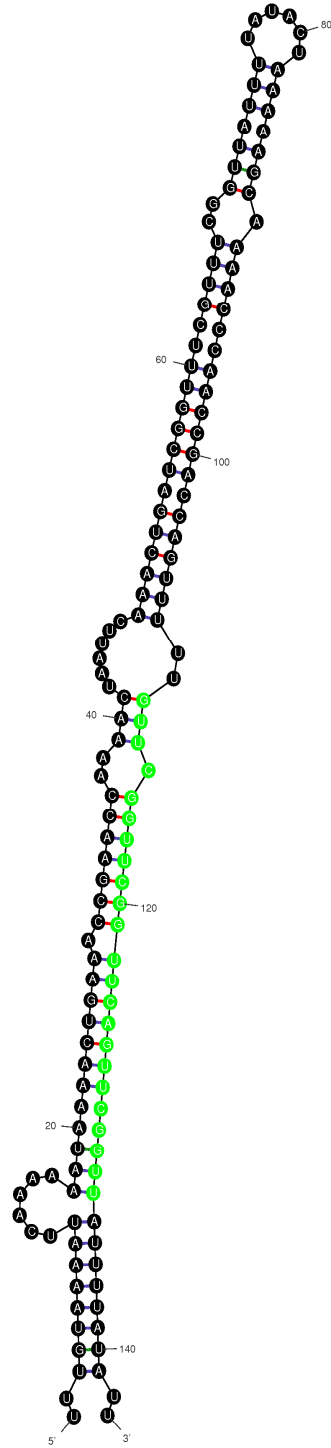


$dG = -34.35$ [Initially -39.20] Oeu_miR_22

Oeu_miR_23

Output of sirl_graph (©)
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 09:44:02 2013

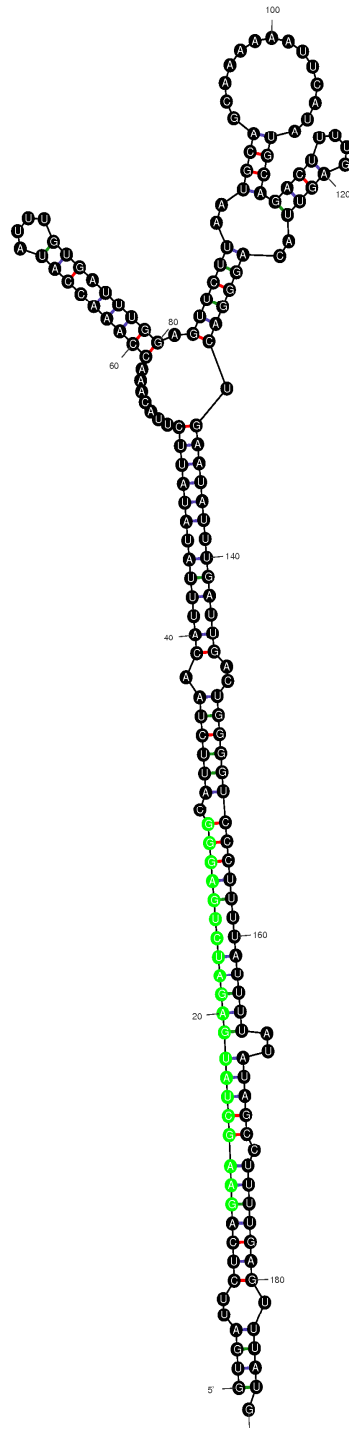


dG = -38.90 [Initially -38.90] Oeu_miR_23

Oeu_miR_24

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 09:45:38 2013

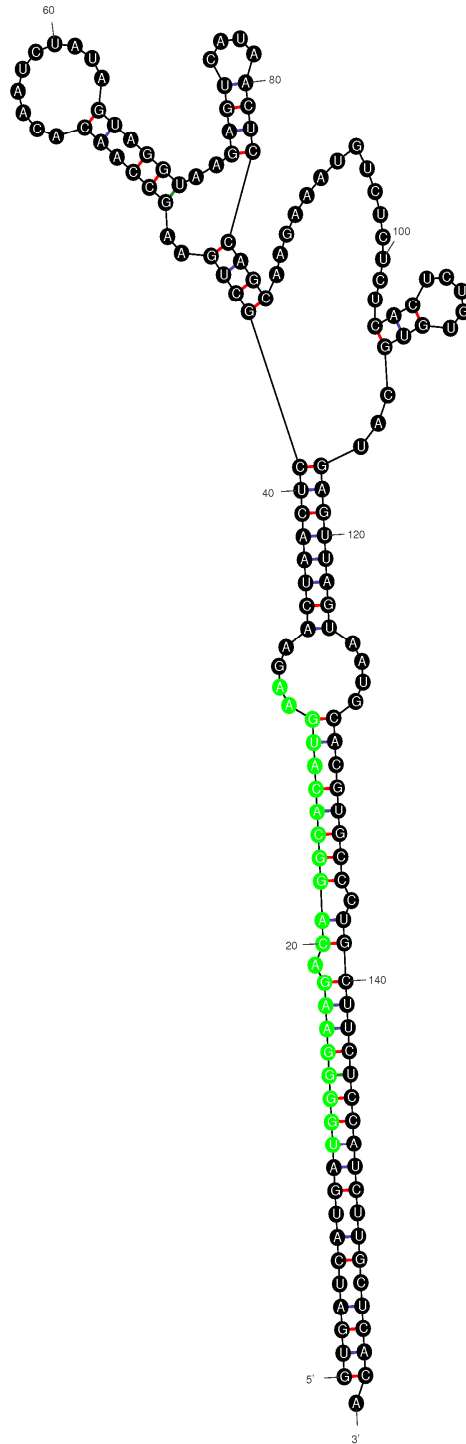


$dG = -41.25$ [Initially -46.80] Oeu_miR_24

Oeu_miR_25

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

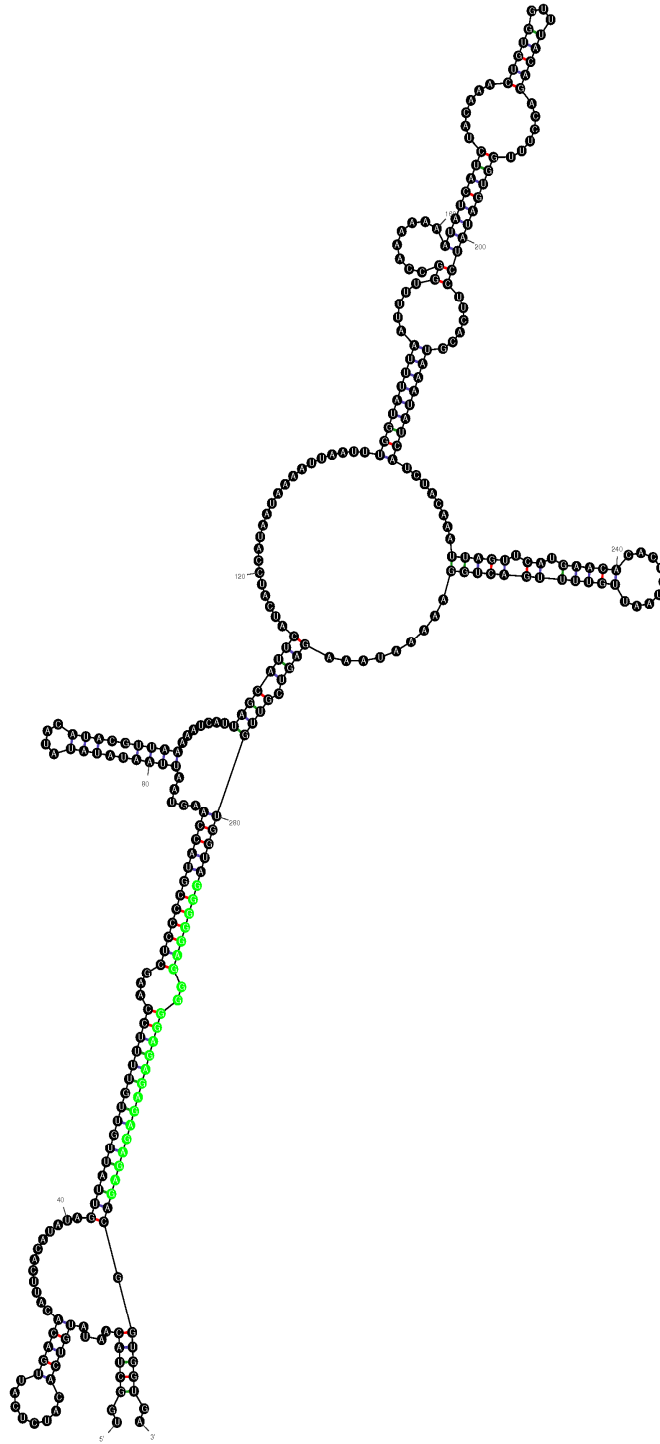
Created Sat Jul 6 09:47:19 2013



Oeu_miR_26

Output of sir_graph ©
mfold_util 4.6

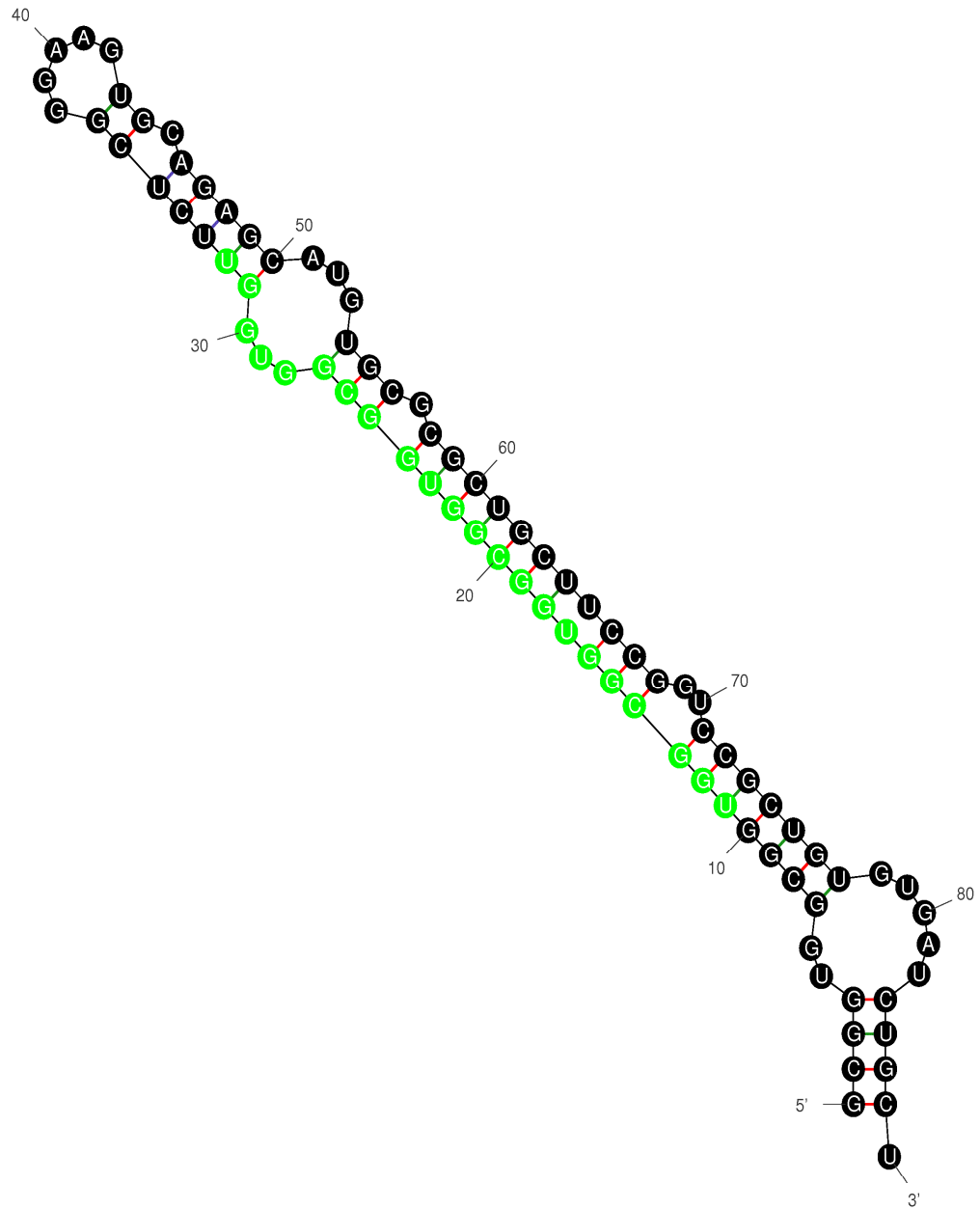
Created Sat Jul 6 09:48:44 2013



Oeu_miR_27

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 09:50:27 2013

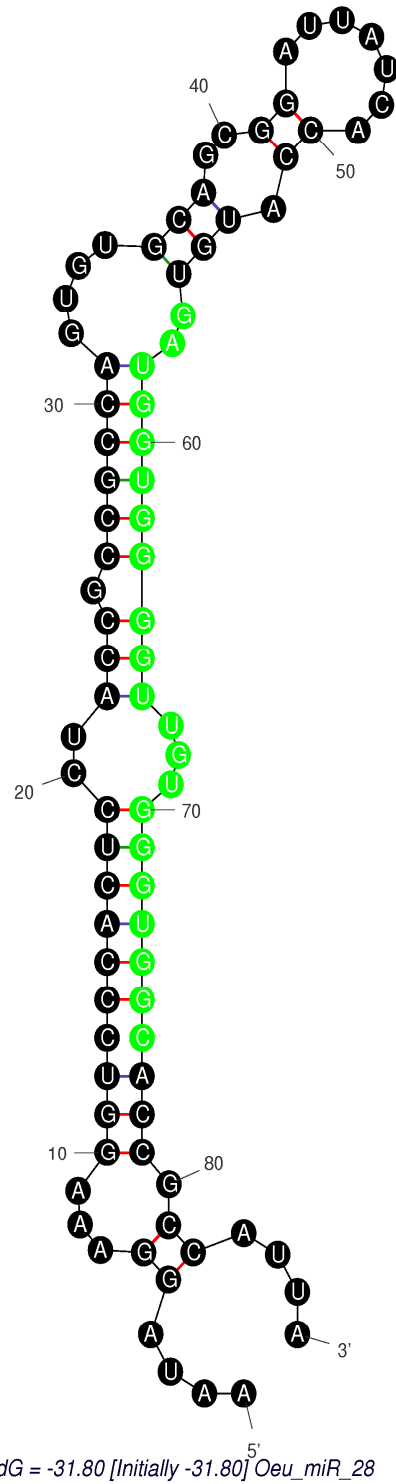


$dG = -37.30$ [Initially -37.30] Oeu_miR_27

Oeu_miR_28

Output of sirl_graph (©)
mfold_util 4.6

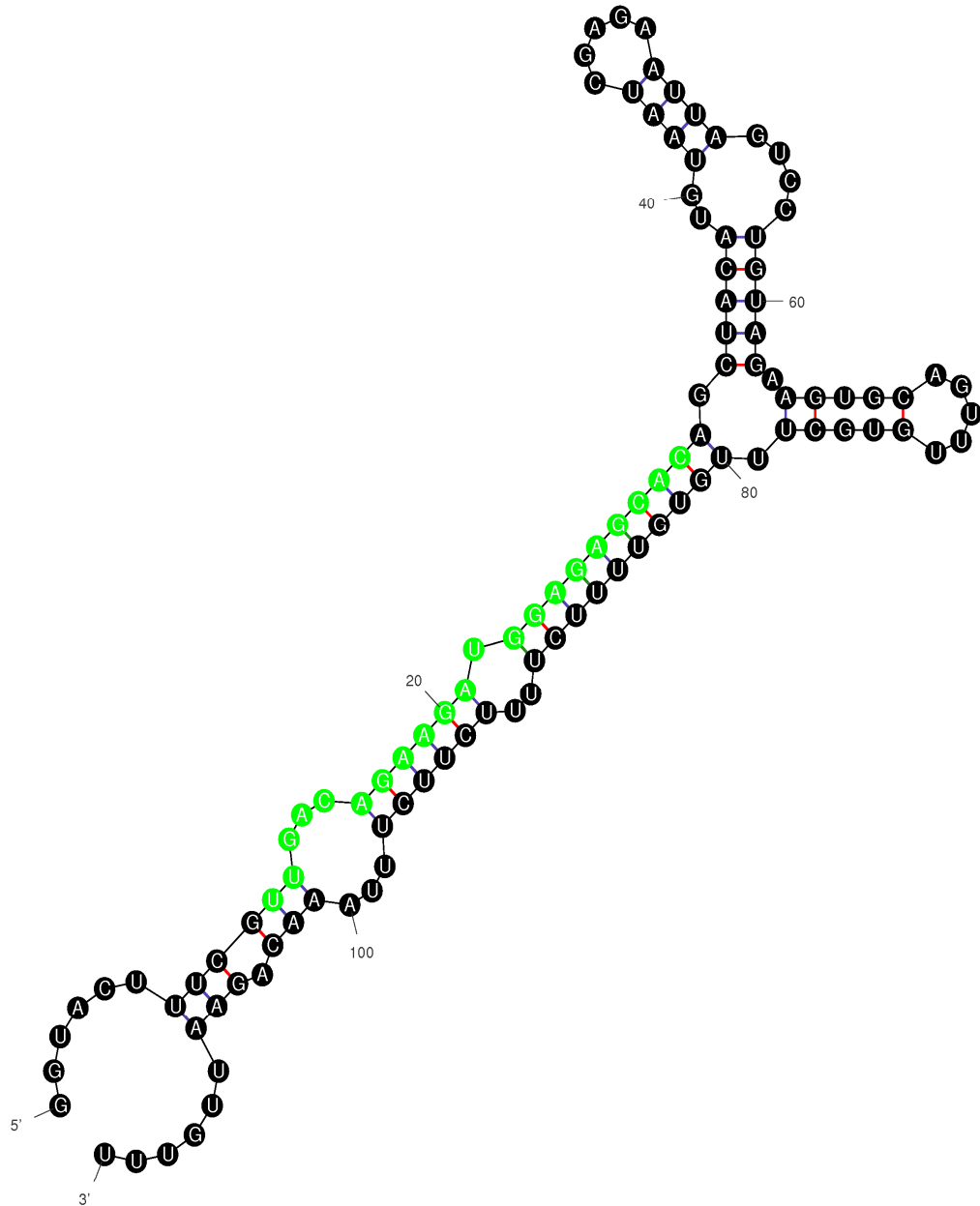
Created Sat Jul 6 09:51:53 2013



Oeu_miR_29

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 09:53:14 2013

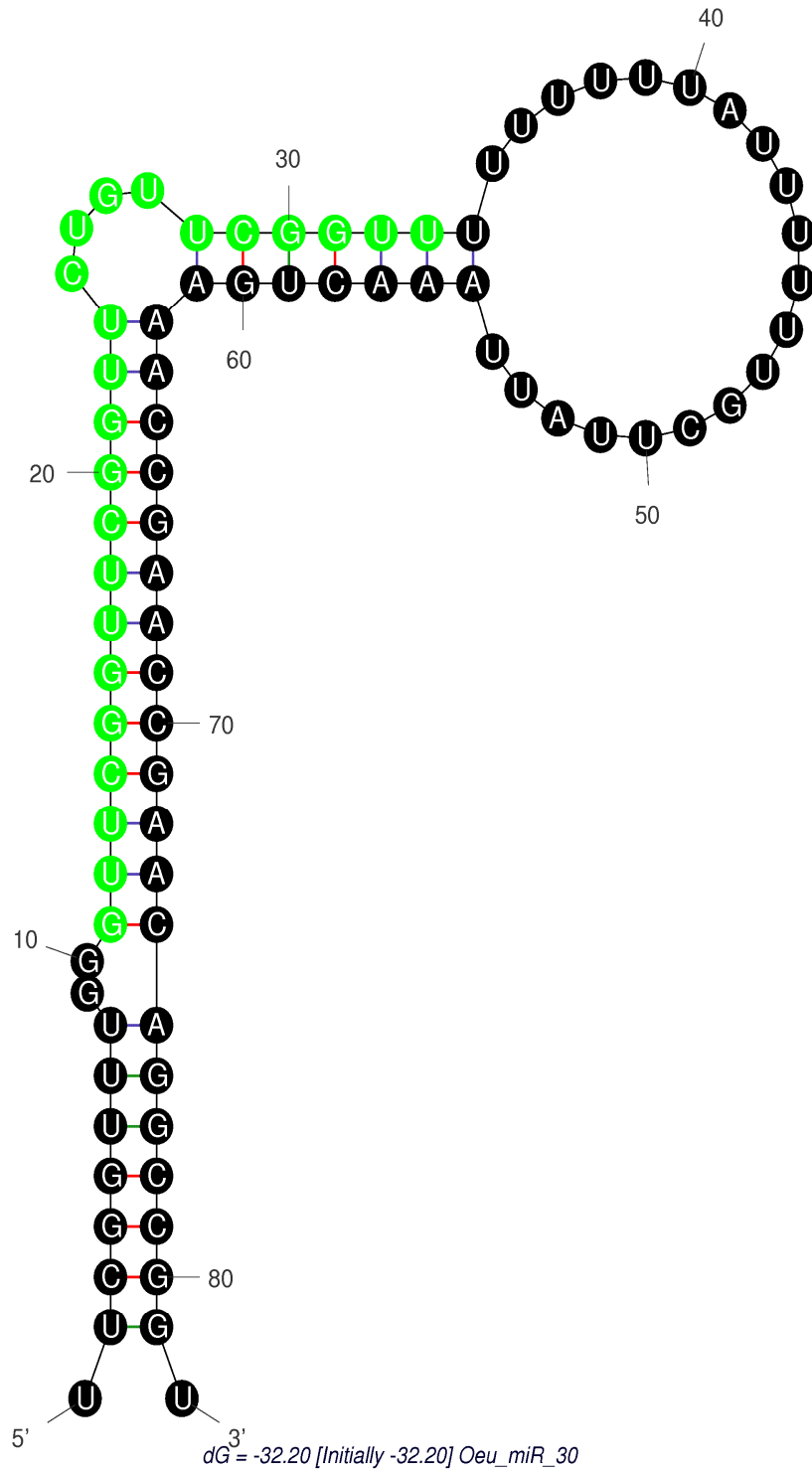


$dG = -26.20$ [Initially -27.00] Oeu_miR_29

Oeu_miR_30

Output of sir_graph ©
mfold_util 4.6

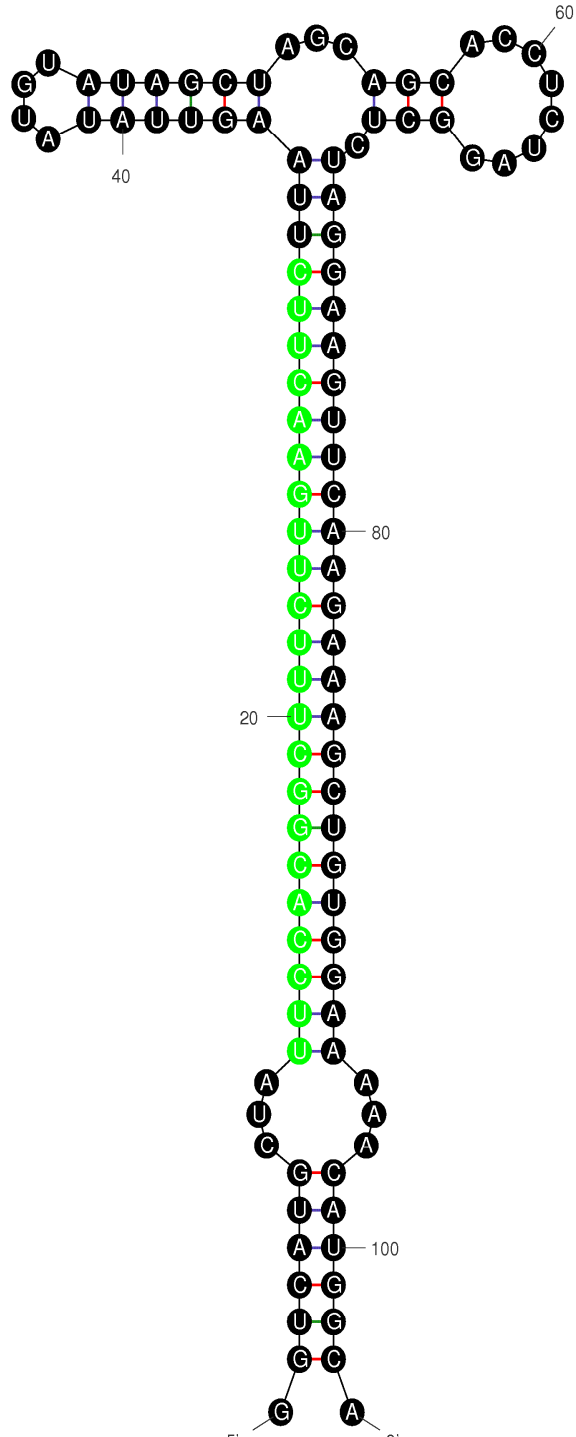
Created Sat Jul 6 09:54:31 2013



Oeu_miR_31

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 09:56:09 2013

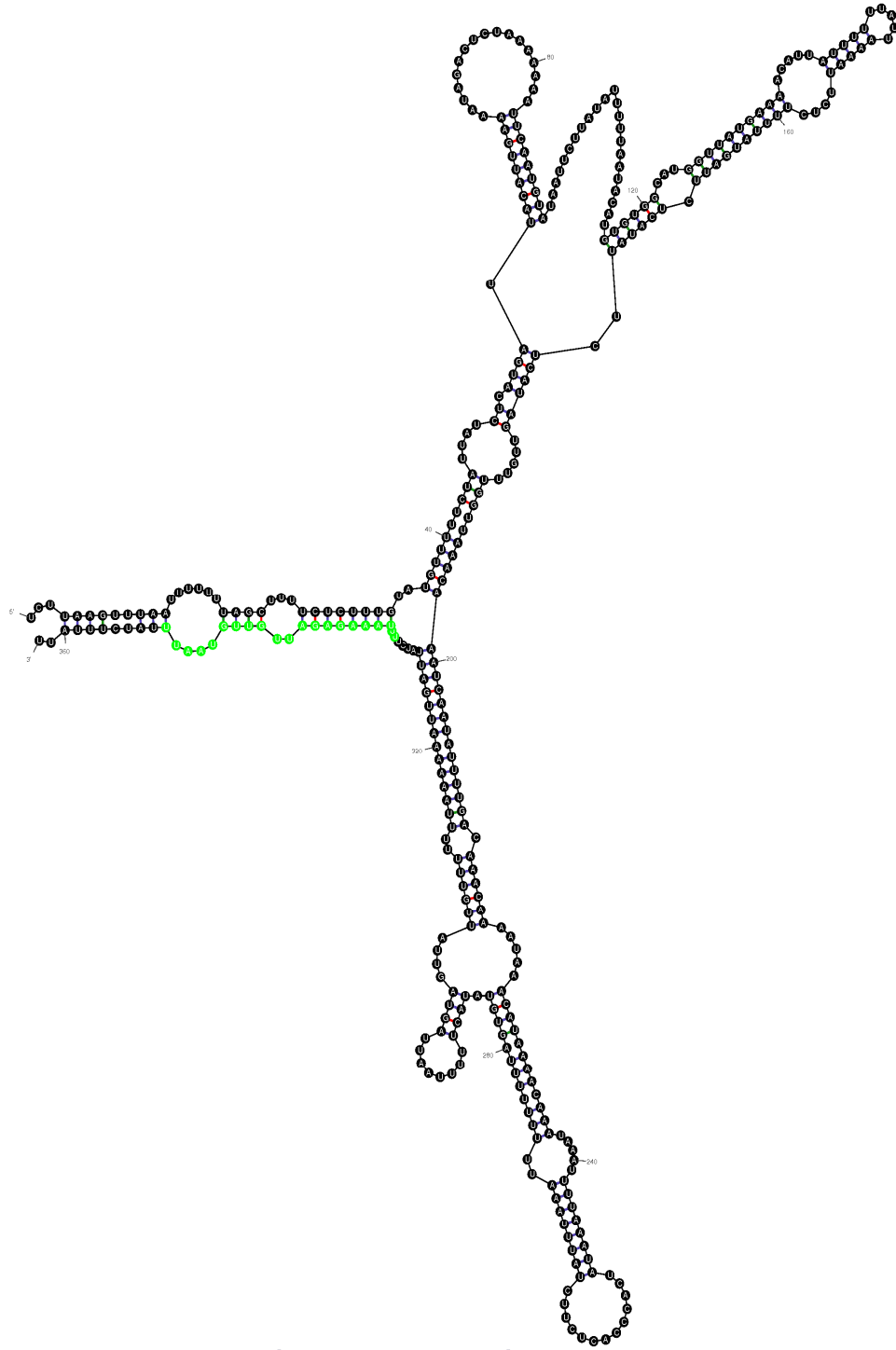


dG = -48.70 [Initially -51.20] Oeu_miR_31

Oeu_miR_32

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 09:57:42 2013

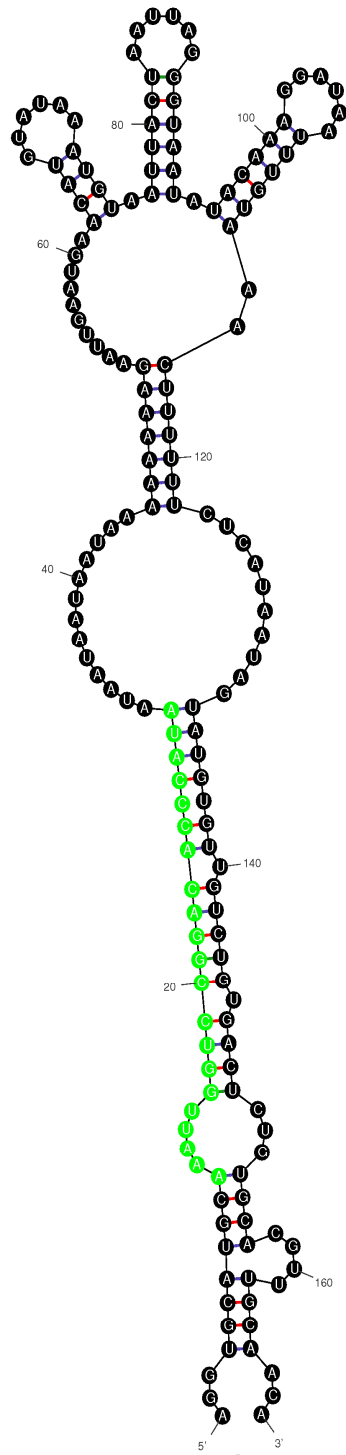


$dG = -39.91$ [Initially -47.80] Oeu_miR_32

Oeu_miR_33

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 09:59:07 2013

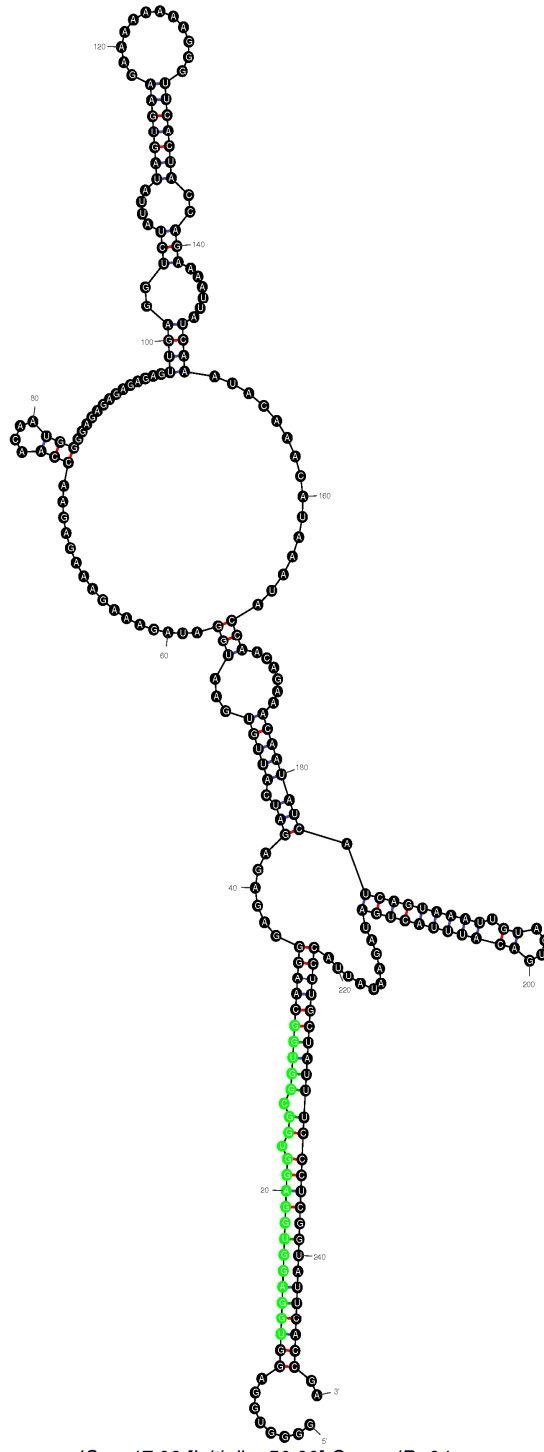


$dG = -30.57$ [Initially -33.20] Oeu_miR_33

Oeu_miR_34

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

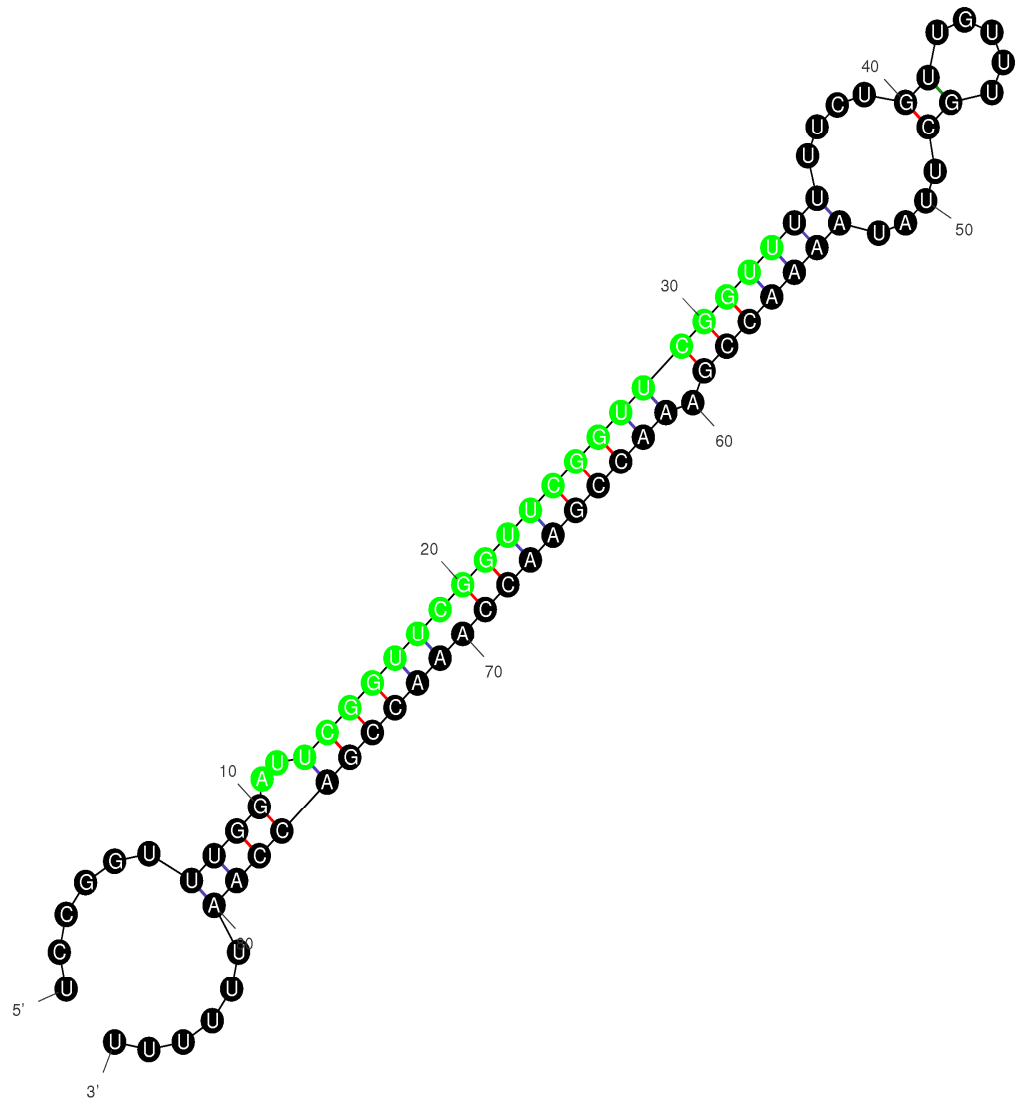
Created Sat Jul 6 10:00:46 2013



Oeu_miR_35

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 10:02:07 2013

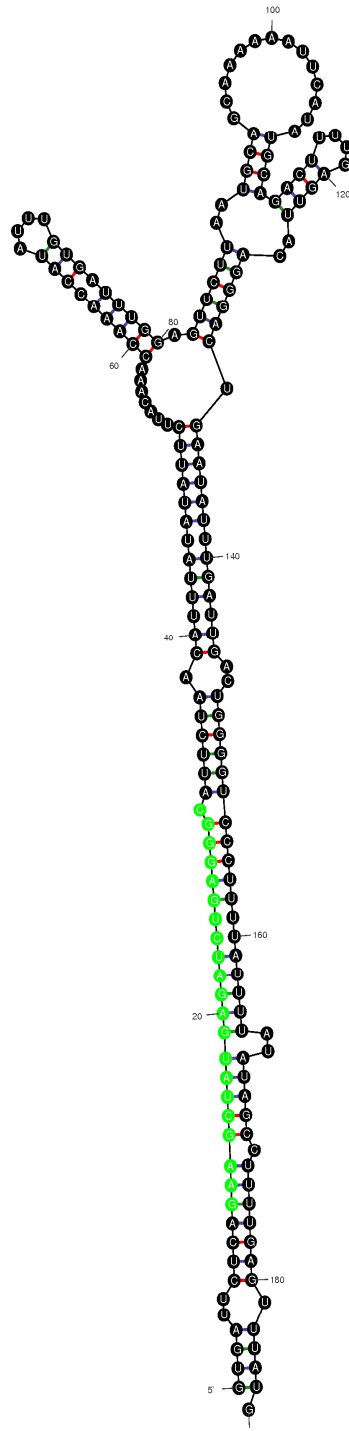


$dG = -36.30$ [Initially -36.30] Oeu_miR_35

Oeu_miR_36

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 10:03:29 2013

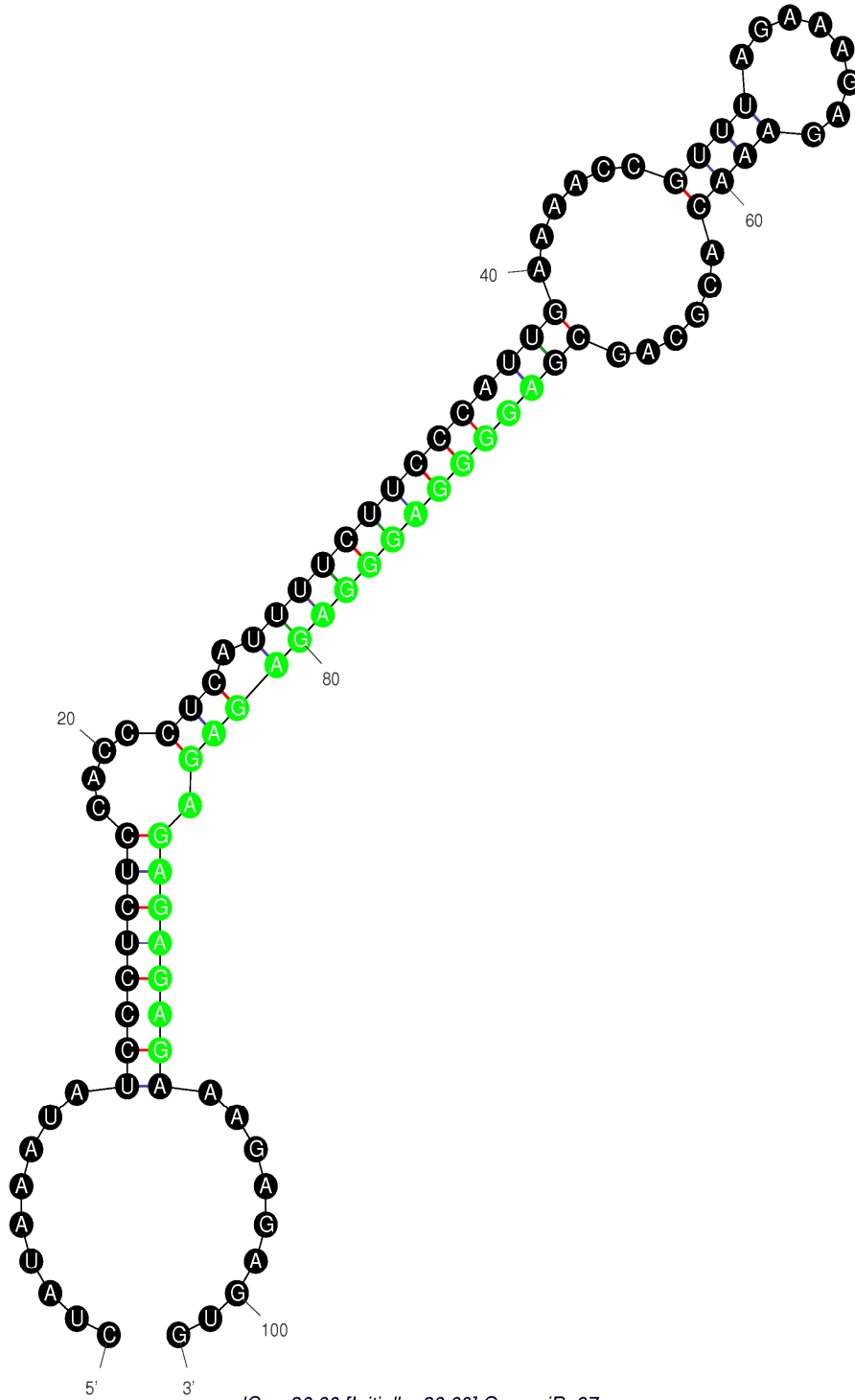


$dG = -41.25$ [Initially -46.80] Oeu_miR_36

Oeu_miR_37

Output of sir_graph (©)
mfold_util 4.6

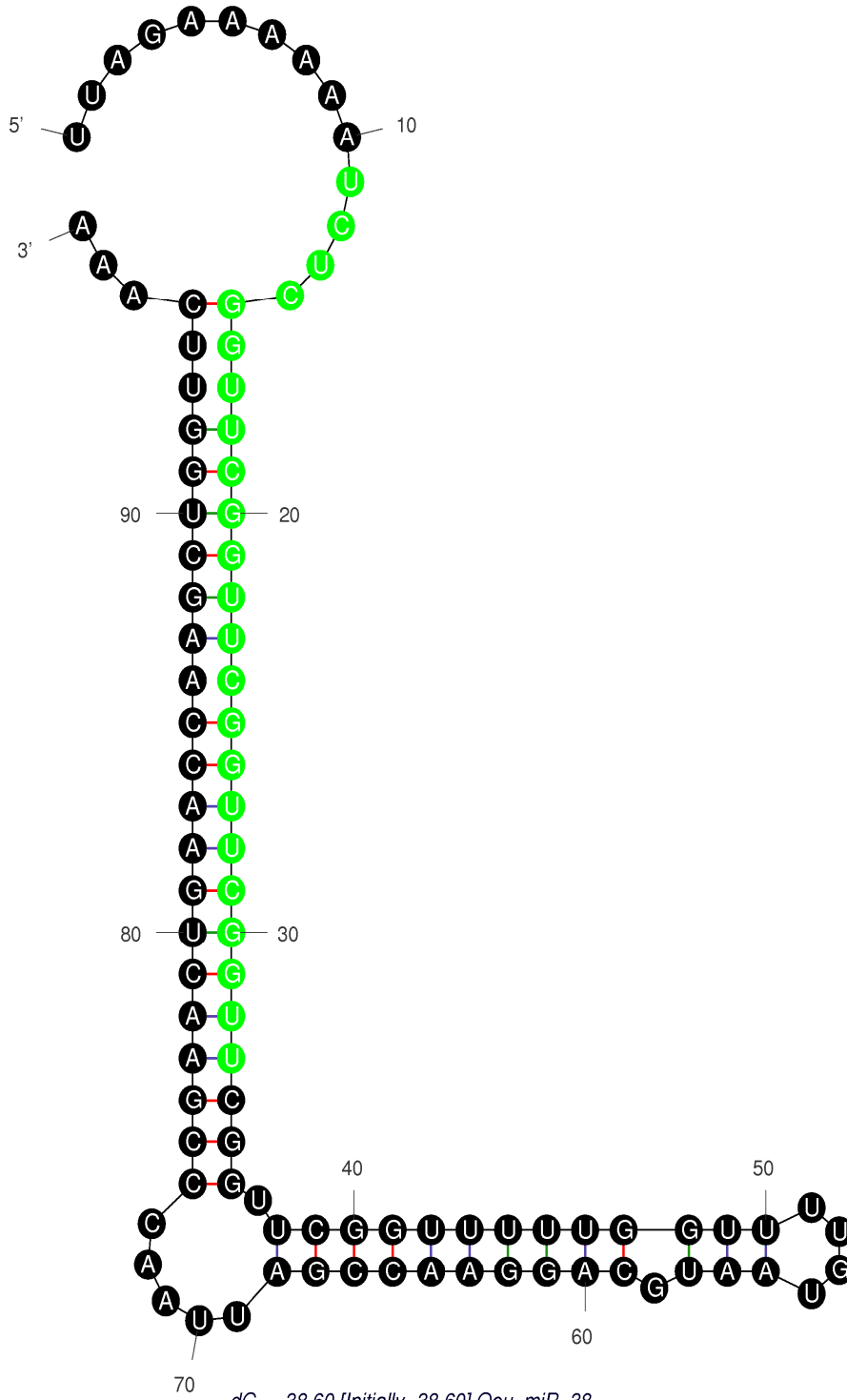
Created Sat Jul 6 10:04:41 2013



Oeu_miR_38

Output of air_graph ©
mfold_util 4.6

Created Sat Jul 6 10:05:46 2013



Ek 3. 6 sRNA kütüphanesinde miRNA* dizilerinin listesi

HM kütüphanesi		
Yeni miRNA	miRNA* dizisi	Yeni miRNA dizisi
Hm1-m0001 (5p)	GACUCAUCGUUUUUUGUCUUUUU	AAGAAGAAGAAGAACGAUGCCUC
Hm1-m0002 (5p)	AACCGAAACCGAACCAAACCGA	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
Hm1-m0003 (3p)	GUCAAAAUCAUCUUCUAAUUAUUGAU	UGUCGACAUAGAAAUGAUUGGC
Hm1-m0004 (3p)	UUUAUGUUGCGGUUCAGGUUU	UCUUUGGAUUGUUUACAUGGUA
Hm1-m0006 (5p)	AACCGAACCCGAACCGAAUCGGU	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
Hm1-m0007 (3p)	AACCGAAACCGAACCGAACCGGU	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
Hm1-m0008 (3p)	GGUUCACCAAGAGUUGUUUUCUACG	UCUGAUACCAACUGAUGUGAACCC
Hm1-m0009 (5p)	AGCAUGGUAUUGUGCACAGA	UCUGUGUACAUAAGCCGAUGCU
Hm1-m0010 (5p)	UCAUCCAGGUUCUUACUACU	AGUAGAAGACGCUCUGGUGAG
Hm1-m0011 (5p)	GUUGUUGGUGUUUUUCUAGCA	UGAUUGAGCCGCGCCAUAUAC
Hm1-m0012 (5p)	UAUAAAUCGAAGCCGAACCGG	UCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
Hm1-m0013 (5p)	AAUCACAUUUUGUGUUUAGAU	UCUGAUACCAACUGAUGUGAACCC
Hm1-m0014 (5p)	AAUUGAUGAACCAACUGAACCAACC	GGUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
Hm1-m0015 (5p)	UACCUUUGUUCUUUAUCUUCAUUU	AGAUGGAGAUGGAGAUGGAGAUG
Hm1-m0016 (3p)	UUUUGAACCGAACCGAACCGAAA	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
Hm1-m0017 (3p)	UUUGAACCGAACCGAACCGAAA	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
Hm1-m0018 (5p)	AACCCACUGGAUCUGGUCCAG	GCUGGAGUAGCUCAGUUGGUU
Hm1-m0019 (3p)	CUCACGAAAGCAGUGUCCACCUUC	GAGGGGGAGUGUUGGCGUGAG
Hm1-m0020 (3p)	UUUGAACCGAACCGAACCGAAA	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
Hm1-m0021 (5p)	AACCGAAACAGAACCGAACCGGU	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
Hm1-m0022 (5p)	UGGCUAGGGCGUGCGACCCA	UGUUGUUGUUGUUGUCGUCGUCA
OM kütüphanesi		
Yeni miRNA	miRNA* dizisi	Yeni miRNA dizisi
Om1-m0001 (5p)	GACUCAUCGUUUUUUGUCUUUUU	AAGAAGAAGAAGAACGAUGCCUC
Om1-m0002 (3p)	AACACAACUGGAUGUAGAUAG	UCCGUUGUAGUCUAGUUGGUU
Om1-m0003 (5p)	UGAGAUGCUCAUUUUGAGCAAGUA	UCUUGCUCAAAUGAGUAUUGCA
Om1-m0004 (3p)	UUUUUAUAAUUUCUUAUUCGGC	GUUGUAGACAUGAAAGCGUAAGA
Om1-m0005 (3p)	AACCAAAACCGAUUCAACCAAC	GUUUGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
Om1-m0006 (5p)	UGAGAUGCUCAUUCGAGCAAGA	UCUUGCUCAAAUGAGUAUUGCA
Om1-m0007 (3p)	UGUUUUUUUCGCCAGCGGUUCU	UGGUGGUGGUGGUGGUGGUGACA
Om1-m0008 (5p)	AGCAUGGUAUUGUGCACAGA	UCUGUGUACAUAAGCCGAUGCU
Om1-m0009 (5p)	UUGUUGGUGUUUUUCUAGCA	UGAUUGAGCCGCGCCAUAUAC
Om1-m0010 (3p)	GCAUGAAGCAAUAGGAGCCUAC	GUUUGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
Om1-m0011 (3p)	UCUACAGGUUCAGGAUAUGGUU	AAUAAUUUUUGAUCUUUUGGAU
Om1-m0012 (3p)	AACCAAAACCGGUUCAACCAAC	GUUUGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
Om1-m0013 (5p)	UUGAUGAACCAACUGAACCAACC	GGUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
Om1-m0014 (3p)	UUUGAACCGAACCGAACCGAAA	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
Om1-m0015 (3p)	UUUGAACCGAACCGAACCGAAA	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
Om1-m0016 (5p)	ACCCACUGGAUCUGGUCCAGA	GCUGGAGUAGCUCAGUUGGUU
Om1-m0017 (3p)	AAUUAACUGGGCUCAAUACAG	UCCGUUGUAGUCUAGUUGGUU
Om1-m0018 (3p)	GGGUGUGGGAGGUUGCAGAA	UGUCUGGACCAGUUUACGUGC
Om1-m0019 (3p)	CAACACCAACCGCCACCCAACA	UGGUGGUGGUGGUGGUGGUGACA
Om1-m0020 (3p)	UUUGAACCGAACCGAACCGAAA	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
Om1-m0021 (3p)	UGGGAUUGUACUGGGUUGAGUUG	UCUUGCUCAAAUGAGUAUUGCA

VK kütüphanesi

Yeni miRNA	miRNA* dizisi	Yeni miRNA dizisi
VK1-m0001 (5p)	AACCGAAACCGAACCAAACCGACC	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
VK1-m0002 (3p)	AACCGAACCGAACCGAACCGAA	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
VK1-m0003 (5p)	UGAGAUGCUCAUUUGAGCAAGU	UCUUGCUCAAAUGAGUAUCCA
VK1-m0004 (3p)	AAUAAAACUGAAACCGAACCAAAA	GUUCGGUUCGGUUCAGUUCGGUU
VK1-m0005 (5p)	CCUUUUUAUUUUUAUAGCCUU	GAAGCUAUGAGAUUCUGAGGG
VK1-m0006 (3p)	AACCAAAACCAGUUCAAACCAA	GUUUGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
VK1-m0007 (5p)	UGAGAUGCUCAUUCGAGCAA	UCUUGCUCAAAUGAGUAUCCA
VK1-m0008 (5p)	UGCACGUGCCCUGCUUCUCCA	UGGGGAAGACAGGCACAUGAA
VK1-m0009 (3p)	UUAUUGUUGUUUCCAAGCUCCC	GGGGGAGGGGGAGAGAGAGAGAG
VK1-m0010 (5p)	AACCGGACCGGACCGACCGAGUU	GUUCGGUUCGGUUCAGUUCGGUU
VK1-m0011 (5p)	CGCGCUGCUUCCGGUCCGCUG	UGGCGGUGGCGGUGGCGGUGGU
VK1-m0012 (3p)	AUCUACAGGUUCAGGAUAUGGU	AAUAAUUUUGAUCUUUUGGAU
VK1-m0013 (3p)	CCCACUCCUACCGCCGCCAGU	GAUGGUGGGGUUGUGGGUGGC
VK1-m0014 (5p)	GUGUUUUUUUUUCUUCUUUAA	UUGACAGAAGAUGGAGAGCAC
VK1-m0015 (5p)	UAUUAAACUGAAACCGAACCGAAC	GUUCGGUUCGGUUCUGUUCGGUU
VK1-m0016 (3p)	AACCAAAACCGGUUCAACCAACC	GUUUGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
VK1-m0017 (5p)	UGAUGAACCAAACUGAACCAACC	GGUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
VK1-m0018 (5p)	GAAGUUCAAGAAAGCUGUGGAA	UUCCACGGCUUUCUUGAACUUC
VK1-m0019 (3p)	AACCGAACCGAACCGAACCGGUU	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
VK1-m0020 (3p)	UUUUGAACCGAACCGAACCGAAA	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
VK1-m0021 (5p)	GCCCAACUCAUUCGAUCCAAC	GCUGGAGUAGCUCAGUUGGUU
VK1-m0022 (3p)	AGUAGUUUUUUUUUUUUAAA	UUUAAAGAGAUUGUUGUAAU
VK1-m0023 (3p)	AACCGAACCGAACCGAACCGAAA	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
VK1-m0024 (3p)	AACCGAACCGAACCGAACCGGUU	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
VK1-m0025 (3p)	UGGGAUACUGGGUUGAGUUGAG	UCUUGCUCAAAUGAGUAUCCA
VK1-m0026 (5p)	AACCGAAACAGAACCGAACCGGUC	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
VK1-m0027 (3p)	AAUAAAACUGAAACCGAACCAAAA	GUUCGGUUCGGUUCAGUUCGGUU

YK kütüphanesi

Yeni miRNA	miRNA* dizisi	Yeni miRNA dizisi
yK1-m0001 (5p)	AACCGAAACCGAACCAAACCGACC	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
yK1-m0002 (3p)	AACCAAAACCAGUUCAAACCAACC	GUUUGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
yK1-m0003 (5p)	UGAGAUGCUCAUUCGAGCAAGA	UCUUGCUCAAAUGAGUAUCCA
yK1-m0004 (5p)	UGCACGUGCCCUGCUUCUCCA	UGGGGAAGACAGGCACAUGAA
yK1-m0005 (5p)	AACCGAACCCGAACCGAAUCGGUC	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
yK1-m0006 (3p)	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
yK1-m0007 (5p)	GUCAUCCAGGUUCUACUACU	AGUAGAAGACGCUCUGGUGAG
yK1-m0008 (3p)	AGCAUGAAGCAAUAGGAGCCUAAC	GUUUGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
yK1-m0009 (5p)	UUAAUAAAUCGAAGCCGAACCGG	UCGGUUCGGGUUCGGUUCGGUUC
yK1-m0010 (5p)	CGCGCUGCUUCCGGUCCGCUG	UGGCGGUGGCGGUGGCGGUGGU
yK1-m0011 (3p)	CCCACUCCUACCGCCGCCAGU	GAUGGUGGGGUUGUGGGUGGC
yK1-m0012 (5p)	GUGUUUUUUUUUCUUCUUUAA	UUGACAGAAGAUGGAGAGCAC
yK1-m0013 (3p)	AACCGAAUCAAUCGACUAGUUU	GUUCAGUUCGGUUCGGUUCGGUU
yK1-m0014 (3p)	AACCAAAACCGGUUCAACCAACC	GUUUGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
yK1-m0015 (5p)	UGAUGAACCAAACUGAACCAA	GGUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
yK1-m0016 (5p)	GAAGUUCAAGAAAGCUGUGGAA	UUCCACGGCUUUCUUGAACUUC
yK1-m0017 (3p)	AACCGAACCGAACCGAACCGGUU	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
yK1-m0018 (3p)	UUUUGAACCGAACCGAACCGAAA	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU

yK1-m0019 (5p)	GCCCAACUCAUUCGAUCCAAC	GCUGGAGUAGCUCAGUUGGUU
yK1-m0020 (3p)	AUAUGCGAAUCGAUGUUAACA	UGUCUGGACCAGUUUACGUGC
yK1-m0021 (3p)	AACCGAACCGAACCGAACCGGUU	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
yK1-m0022 (3p)	UGGGAUUGUACUGGGUUGAGUUGAG	UCUUGCUCAAAUGAGUAUCCA
yK1-m0023 (5p)	AACCGAAACAGAACCGAACCGGUC	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU

VT kütüphanesi

Yeni miRNA	miRNA* dizisi	Yeni miRNA dizisi
VT1-m0001 (3p)	AACCGAACCGAACCGAACCGAAA	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
VT1-m0002 (3p)	AACCAAAACCAGUUCAAACCAACC	GUUUGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
VT1-m0003 (5p)	AAAUUGGUCCGGACACCCAUA	AAAUUGGUCCGGACACCCAUA
VT1-m0004 (5p)	UGCACGUGCCCUGCUUCUCCA	UGGGGAAGACAGGCACAUGAA
VT1-m0005 (3p)	AGCAUGAAGCAAUAGGAGCCUAAC	GUUUGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
VT1-m0006 (5p)	CGCGCUGCUUCCGGUCCGUCG	UGGCGGUGGGCGGUGGGCGUGGU
VT1-m0007 (5p)	GUGUUUUCUUUCUUCUUUUA	UUGACAGAAGAUGGAGAGCAC
VT1-m0008 (3p)	AACCAAAACCGGUUCAAACCAACC	GUUUGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
VT1-m0009 (5p)	UGAUGAACCAAAACUGAACCAACC	GGUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
VT1-m0010 (5p)	GAAGUUCAAGAAAGCUGUGGAA	UUCCACGGCUUUCUUGAACUUC
VT1-m0011 (3p)	AACCGAACCGAACCGAACCGGUU	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
VT1-m0012 (3p)	UUUUUGAACCGAACCGAACCGAAA	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
VT1-m0013 (5p)	ACCUUGCUAUUUCCCUCGGUA	UGGAGGUGGAGGUGGGCGUGG
VT1-m0014 (5p)	GCCCAACUCAUUCGAUCCAAC	GCUGGAGUAGCUCAGUUGGUU
VT1-m0015 (3p)	AGUAGUUUUUUUUUUUUAAA	UUUAAAGAGAUUGUUGUAAUU
VT1-m0016 (3p)	AACCGAACCGAACCGAACCGAAA	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
VT1-m0017 (3p)	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
VT1-m0018 (5p)	UGAAUGGAUUAAAAACUAUAAGA	UGUUGUUGUUGUUGUCGUCUCA

YT kütüphanesi

Yeni miRNA	miRNA* dizisi	Yeni miRNA dizisi
yT1-m0001 (5p)	AACCGAAACCGAACCAAAACCGACC	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
yT1-m0002 (5p)	GCUAUGAGAUCUGAGGGCAUU	GAAGCUAUGAGAUCUGAGGGC
yT1-m0003 (3p)	AACCAAAACCAGUUCAAACCAACC	GUUUGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
yT1-m0004 (5p)	UAUAAAUGUAAUACUAAUUA	AAAUUGGUCCGGACACCCAUA
yT1-m0005 (3p)	CUCUCCACCCUCAUUUUCUCCCA	AGGGGAGGGAGAGAGAGAGAGAG
yT1-m0006 (3p)	UGUCAAGUUUUUAUAGUUUUA	UGAUGAUGAUGAUGACGACGACA
yT1-m0007 (5p)	UGCACGUGCCCUGCUUCUCCA	UGGGGAAGACAGGCACAUGAA
yT1-m0008 (5p)	AACCGAACCCGAACCGAAUCGGUC	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
yT1-m0009 (3p)	AACCGAACCGAACCGGGUCAAAC	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
yT1-m0010 (3p)	AGCAUGAAGCAAUAGGAGCCUAAC	GUUUGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
yT1-m0011 (5p)	UUUAAAAUCGAAGCCGAACCGG	UCGGUUCGGUUCGGUUCGGUUC
yT1-m0012 (5p)	GUGUUUUCUUUCUUCUUUUA	UUGACAGAAGAUGGAGAGCAC
yT1-m0013 (3p)	AACCAAAACCGGUUCAAACCAACC	GUUUGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
yT1-m0014 (5p)	UGAUGAACCAAAACUGAACCAACC	GGUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
yT1-m0015 (5p)	AACUCCUUUCAUUUAGGUCCUUU	AGGGGAGGGAGAGAGAGAGAGAG
yT1-m0016 (5p)	GAAGUUCAAGAAAGCUGUGGAA	UUCCACGGCUUUCUUGAACUUC
yT1-m0017 (3p)	AACCGAACCGAACCGAACCGGUU	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
yT1-m0018 (3p)	UUUUGAACCGAACCGAACCGAAA	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
yT1-m0019 (5p)	GCCCAACUCAUUCGAUCCAAC	GCUGGAGUAGCUCAGUUGGUU
yT1-m0020 (5p)	GAUUAACCCGAACUGAACCAAGC	UCUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
yT1-m0021 (3p)	AACCGAACCGAACCGAACCGGUU	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
yT1-m0022 (5p)	AAUUGAACCGAACCGUUAACC	UCUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU
yT1-m0023 (5p)	AACCGAAACAGAACCGAACCGGUC	AUUCGGUUCGGUUCGGUUCGGUU

Ek 4. Biyolojik fonksiyon ontolojisinde önemli derecede ($p < 0,05$) bulunan 8 ontoloji teriminin kümeleme ve genom frekansları

Gen Ontoloji Terimi	Kümeleme (Cluster) frekansı					
	HM	OM	VK	YK	VT	YT
oksidoredüktaz aktivitesi, difenol ve ilgili maddelerin vericisi, oksijen alıcısı	% 14,5	% 15,3	% 13,7	% 11,9	% 11,8	% 12,5
okdisoredüktaz aktivitesi, difenol ve ilgili maddelerin vericisi	% 14,5	% 15,3	% 13,7	% 11,9	% 11,8	% 12,5
okdisoredüktaz aktivitesi	% 31,1	% 32,4	% 29	% 26,3	% 26,1	% 27,4
alkol bağlama	% 1,8	% 1,9	% 1,7	% 1,4	% 1,4	% 82,9
bağlama	% 82	% 81,9	% 83	% 80,9	% 80,7	% 1,5
hormon bağlama	% 1,8	% 1,9	% 1,7	% 1,4	% 1,4	% 1,5
nükleik asit bağlama	% 25,9	% 27,3	% 28,2	% 27	% 26,1	% 26,6
geçiş metal iyonlarını bağlama	% 24,6	% 24,1			% 22,1	
Gen Ontoloji Terimi	Genom frekansı					
	HM	OM	VK	YK	VT	YT
oksidoredüktaz aktivitesi, difenol ve ilgili maddelerin vericisi, oksijen alıcısı	% 0,4	% 0,4	% 0,4	% 0,4	% 0,4	% 0,4
okdisoredüktaz aktivitesi, difenol ve ilgili maddelerin vericisi	% 0,4	% 0,4	% 0,4	% 0,4	% 0,4	% 0,4
okdisoredüktaz aktivitesi	% 12,4	% 12,4	% 12,4	% 12,4	% 12,4	% 12,4
alkol bağlama	% 0	% 0	% 0	% 0	% 0	% 67,5
bağlama	% 67,5	% 67,5	% 67,5	% 67,5	% 67,5	% 0
hormon bağlama	% 0	% 0	% 0	% 0	% 0	% 0
nükleik asit bağlama	% 15,3	% 15,3	% 15,3	% 15,3	% 15,3	% 15,3
geçiş metal iyonlarını bağlama	% 14,5	% 14,5		% 14,5		

Ek 5. Moleküler işlev ontolojisinde önemli derecede ($p < 0,05$) bulunan 108 ontoloji teriminin kümeleme ve genom frekansları

Ek 5.1. Moleküler işlev ontolojisinde önemli derecede ($p < 0,05$) bulunan 108 ontoloji teriminin kümeleme frekansı

Gen Ontoloji Terimi	Kümeleme (Cluster) frekansı					
	HM	OM	VK	YK	VT	YT
HücreSEL metabolik işlev	151/206 % 73,3	148/197 % 75,1	165/220 % 75,0	191/257 % 74,3	191/255 % 74,9	174/242 % 71,9
Temel metabolik işlev	152/206 % 73,8	146/197 % 74,1	167/220 % 75,9	196/257 % 76,3	194/255 % 76,1	178/242 % 73,6
HücreSEL işlev	162/206 % 78,6	159/197 % 80,7	180/220 % 81,8	208/257 % 80,9	207/255 % 81,2	194/242 % 80,2
Biyopolimer metabolik işlevi	102/206 % 49,5	97/197 % 49,2	118/220 % 53,6	140/257 % 54,5	140/255 % 54,9	124/242 % 51,2
HücreSEL biyopolimer metabolik işlevi	95/206 % 46,1	94/197 % 47,7	111/220 % 50,5	132/257 % 51,4	132/255 % 51,8	117/242 % 48,3
HücreSEL makromolekül metabolik işlevi	95/206 % 46,1	94/197 % 47,7	111/220 % 50,5	133/257 % 51,8	133/255 % 52,2	117/242 % 48,3
Biyolojik düzenleme	64/206 % 31,1	61/197 % 31,0	72/220 % 32,7	77/257 % 30,0	73/255 % 28,6	73/242 % 30,2
Gelişimsel işlev	66/206 % 32,0	66/197 % 33,5	75/220 % 34,1	82/257 % 31,9	82/255 % 32,2	84/242 % 34,7
Çok hücreli organizmanın gelişimi	55/206 % 26,7	55/197 % 27,9	63/220 % 28,6	69/257 % 26,8	65/255 % 25,5	68/242 % 28,1
Çok hücreli organizmanın işlevi	57/206 % 27,7	57/197 % 28,9	65/220 % 29,5	71/257 % 27,6	67/255 % 26,3	70/242 % 28,9
HücreSEL işlevin düzenlenmesi	41/206 % 19,9	41/197 % 20,8	42/220 % 19,1	45/257 % 17,5	45/255 % 17,6	42/242 % 17,4
Üreme	41/206 % 19,9	41/197 % 20,8	43/220 % 19,5	43/257 % 16,7	41/255 % 16,1	43/242 % 17,8
Üreme gelişimi işlevi	41/206 % 19,9	41/197 % 20,8	43/220 % 19,5	43/257 % 16,7	41/255 % 16,1	43/242 % 17,8
Üreme işlevi	41/206 % 19,9	41/197 % 20,8	43/220 % 19,5	43/257 % 16,7	41/255 % 16,1	43/242 % 17,8
Kimyasal uyarılara yanıt	43/206 % 20,9	42/197 % 21,3			32/255 % 12,5	
Anatomik yapı gelişimi	44/206 % 21,4	44/197 % 22,3	53/220 % 24,1	59/257 % 23,0	59/255 % 23,1	62/242 % 25,6
RNA biyosentez işlevi	45/206 % 21,8	45/197 % 22,8	51/220 % 23,2	65/257 % 25,3	65/255 % 25,5	55/242 % 22,7
Transkripsiyon	45/206 % 21,8	45/197 % 22,8	51/220 % 23,2	65/257 % 25,3	65/255 % 25,5	55/242 % 22,7
Transkripsiyon, DNA bağlı	45/206 % 21,8	45/197 % 22,8	51/220 % 23,2	65/257 % 25,3	65/255 % 25,5	55/242 % 22,7
Biyopolimer biyosentez işlevi	47/206 % 22,8	47/197 % 23,9	55/220 % 25,0	71/257 % 27,6	71/255 % 27,8	60/242 % 24,8
HücreSEL biyopolimer biyosentez işlevi	47/206 % 22,8	47/197 % 23,9	55/220 % 25,0	71/257 % 27,6	71/255 % 27,8	60/242 % 24,8
HücreSEL makromolekül biyosentez işlevi	47/206 % 22,8	47/197 % 23,9	55/220 % 25,0	71/257 % 27,6	71/255 % 27,8	60/242 % 24,8
Makromolekül biyosentez işlevi	47/206 % 22,8	47/197 % 23,9	55/220 % 25,0	71/257 % 27,6	71/255 % 27,8	60/242 % 24,8

RNA metabolik işlev	47/206 % 22,8	47/197 % 23,9	53/220 % 24,1	69/257 % 26,8	69/255 % 27,1	58/242 % 24,0
Biyolojik işlevin düzenlenmesi	48/206 % 23,3	48/197 % 24,4	55/220 % 25,0	58/257 % 22,6	54/255 % 21,2	55/242 % 22,7
Hücrel haberleşme	30/206 % 14,6	30/197 % 15,2	31/220 % 14,1	34/257 % 13,2	34/255 % 13,3	31/242 % 12,8
Hormon uyarılarına yanıt	30/206 % 14,6	30/197 % 15,2	30/220 % 13,6		31/255 % 12,2	31/242 % 12,8
Sinyal iletimi	30/206 % 14,6	30/197 % 15,2	31/220 % 14,1	33/257 % 12,8		31/242 % 12,8
Endojenik uyarılara yanıt	31/206 % 15,0	31/197 % 15,7	31/220 % 14,1			32/242 % 13,2
Lignin metabolik işlevi	32/206 % 15,5	32/197 % 16,2	32/220 % 14,5	32/257 % 12,5	32/255 % 12,5	32/242 % 13,2
Hücrel aminoasit türevlerinin metabolik işlevi	34/206 % 16,5	34/197 % 17,3	34/220 % 15,5	34/257 % 13,2	34/255 % 13,3	34/242 % 14,0
Fenilpropanoid metabolik işlevi	34/206 % 16,5	34/197 % 17,3	34/220 % 15,5	34/257 % 13,2	34/255 % 13,3	34/242 % 14,0
Hücrel aminoasit ve türevlerinin metabolik işlevi	35/206 % 17,0	35/197 % 17,8	35/220 % 15,9	37/257 % 14,4	37/255 % 14,5	36/242 % 14,9
İkincil metabolik işlev	35/206 % 17,0	35/197 % 17,8	35/220 % 15,9	35/257 % 13,6	35/255 % 13,7	35/242 % 14,5
Hücrel aromatik bileşiklerin metabolik işlevi	37/206 % 18,0	37/197 % 18,8	37/220 % 16,8	39/257 % 15,2	39/255 % 15,3	37/242 % 15,3
Organ gelişimi	37/206 % 18,0	37/197 % 18,8	45/220 % 20,5	49/257 % 19,1	45/255 % 17,6	50/242 % 20,7
Sistem gelişimi	37/206 % 18,0	37/197 % 18,8	45/220 % 20,5	49/257 % 19,1	45/255 % 17,6	50/242 % 20,7
Biyolojik kalitenin düzenlenmesi	21/206 % 10,2	21/197 % 10,7	21/220 % 9,5	23/257 % 8,9	23/255 % 9,0	22/242 % 9,1
Hücrel gelişim işlevi	22/206 % 10,7	22/197 % 11,2	27/220 % 12,3	29/257 % 11,3	31/255 % 12,2	33/242 % 13,6
Post-embriyonik gelişim	23/206 % 11,2	23/197 % 11,7	23/220 % 10,5	25/257 % 9,7	25/255 % 9,8	23/242 % 9,5
Doku gelişimi	23/206 % 11,2	23/197 % 11,7	23/220 % 10,5	27/257 % 10,5	27/255 % 10,6	28/242 % 11,6
Hormon uyarılarına hücrel tepki	24/206 % 11,7	24/197 % 12,2	24/220 % 10,9	24/257 % 9,3	24/255 % 9,4	24/242 % 9,9
Hormon aracılı sinyalleşme	24/206 % 11,7	24/197 % 12,2	24/220 % 10,9	24/257 % 9,3	24/255 % 9,4	24/242 % 9,9
Hücre içi sinyalleşme basamağı	24/206 % 11,7	24/197 % 12,2	24/220 % 10,9	24/257 % 9,3	24/255 % 9,4	24/242 % 9,9
Uyarılara hücrel tepki	28/206 % 13,6	28/197 % 14,2	30/220 % 13,6	31/257 % 12,1	31/255 % 12,2	30/242 % 12,4
Anatomik yapı morfogenezi	29/206 % 14,1	29/197 % 14,7	36/220 % 16,4		42/255 % 16,5	45/242 % 18,6
Meristem onarımı	11/206 % 5,3	11/197 % 5,6	11/220 % 5,0	14/257 % 5,4	14/255 % 5,5	14/242 % 5,8
Bölgeselleşme	11/206 % 5,3	11/197 % 5,6	11/220 % 5,0	12/257 % 4,7	12/255 % 4,7	12/242 % 5,0
Hücre farklılaşmasının düzenlenmesi	10/206 % 4,9	10/197 % 5,1	10/220 % 4,5	11/257 % 4,3	11/255 % 4,3	10/242 % 4,1
Hücrel işlevin negatif düzenlenmesi	10/206 % 4,9	10/197 % 5,1	10/220 % 4,5	11/257 % 4,3	11/255 % 4,3	10/242 % 4,1
Hücre morfogenezi	12/206 % 5,8	12/197 % 6,1	13/220 % 5,9	14/257 % 5,4	18/255 % 7,1	18/242 % 7,4
Şekil özelleşme süreci	12/206 % 5,8	12/197 % 6,1	12/220 % 5,5	13/257 % 5,1	13/255 % 5,1	13/242 % 5,4
Çiçek gelişimi	13/206 % 6,3	13/197 % 6,6	13/220 % 5,9	13/257 % 5,1	13/255 % 5,1	13/242 % 5,4
Biyolojik işlevin negatif düzenlenmesi	13/206 % 6,3	13/197 % 6,6	13/220 % 5,9	14/257 % 5,4	14/255 % 5,5	13/242 % 5,4

Homeostatik işlev	15/206 % 7,3	15/197 % 7,6	15/220 % 6,8	15/257 % 5,8	15/255 % 5,9	15/242 % 6,2
Üreme yapı gelişimi	15/206 % 7,3	15/197 % 7,6	15/220 % 6,8	15/257 % 5,8	15/255 % 5,9	15/242 % 6,2
Meristem gelişimi	19/206 % 9,2	19/197 % 9,6	19/220 % 8,6	22/257 % 8,6	22/255 % 8,6	22/242 % 9,1
Simetri tespiti	6/206 % 2,9	6/197 % 3,0	6/220 % 2,7	6/257 % 2,3	6/255 % 2,4	6/242 % 2,5
Uyuşma özelliği	5/206 % 2,4	5/197 % 2,5	5/220 % 2,3	5/257 % 1,9	5/255 % 2,0	5/242 % 2,1
Morfogenez ile ilgili hücresel bileşenlerin bir araya getirilmesi	5/206 % 2,4	5/197 % 2,5	5/220 % 2,3	5/257 % 1,9	5/255 % 2,0	5/242 % 2,1
Fitosteroidlerin biyosentez işlevi	5/206 % 2,4	5/197 % 2,5	5/220 % 2,3	5/257 % 1,9		5/242 % 2,1
Fitosteroid metabolik işlevi	5/206 % 2,4	5/197 % 2,5	5/220 % 2,3	5/257 % 1,9	5/255 % 2,0	5/242 % 2,1
Polen duvarı yapımı	5/206 % 2,4	5/197 % 2,5	5/220 % 2,3	5/257 % 1,9	5/255 % 2,0	5/242 % 2,1
Steroid biyosentez işlevi	5/206 % 2,4	5/197 % 2,5	5/220 % 2,3	5/257 % 1,9	5/255 % 2,0	5/242 % 2,1
Eksene yakın/uzak uyuşma özelliği	4/206 % 1,9	4/197 % 2,0	4/220 % 1,8			4/242 % 1,7
Eksene yakın/uzak model oluşumu	4/206 % 1,9	4/197 % 2,0	4/220 % 1,8			
Annot edilmemiş	4/206 % 1,9	2/197 % 1,0	2/220 % 0,9	3/257 % 1,2	3/255 % 1,2	2/242 % 0,8
Morfogenez ile ilgili anatomik yapı oluşumu	7/206 % 3,4	7/197 % 3,6	7/220 % 3,2	8/257 % 3,1		7/242 % 2,9
Hücre duvarı biyogenezi	7/206 % 3,4	7/197 % 3,6	7/220 % 3,2			8/242 % 3,3
Çiçek organ gelişimi	7/206 % 3,4	7/197 % 3,6	7/220 % 3,2	7/257 % 2,7	7/255 % 2,7	7/242 % 2,9
Bitki türüne göre hücre duvarı biyogenezi	7/206 % 3,4	7/197 % 3,6	7/220 % 3,2	7/257 % 2,7	7/255 % 2,7	7/242 % 2,9
Post-embriyonik organ gelişimi	7/206 % 3,4	7/197 % 3,6	7/220 % 3,2	7/257 % 2,7	7/255 % 2,7	7/242 % 2,9
Anatomik yapı homeostazisi	8/206 % 3,9	8/197 % 4,1	8/220 % 3,6	40/257 % 15,6	8/255 % 3,1	8/242 % 3,3
Meristem onarımı	8/206 % 3,9	8/197 % 4,1	8/220 % 3,6	8/257 % 3,1	8/255 % 3,1	8/242 % 3,3
Hücre farklılaşmasının negatif düzenlenmesi	8/206 % 3,9	8/197 % 4,1	8/220 % 3,6	9/257 % 3,5	9/255 % 3,5	8/242 % 3,3
Gelişimsel işlevin negatif düzenlenmesi	8/206 % 3,9	8/197 % 4,1	8/220 % 3,6	9/257 % 3,5	9/255 % 3,5	8/242 % 3,3
Hücre farklılaşmasının düzenlenmesi	8/206 % 3,9	8/197 % 4,1	8/220 % 3,6	9/257 % 3,5	9/255 % 3,5	8/242 % 3,3
Kök gelişimi	8/206 % 3,9	8/197 % 4,1	10/220 % 4,5	10/257 % 3,9	10/255 % 3,9	10/242 % 4,1
Kök sistemi gelişimi	8/206 % 3,9	8/197 % 4,1	10/220 % 4,5	10/257 % 3,9	10/255 % 3,9	10/242 % 4,1
Kök hücre gelişimi	8/206 % 3,9	8/197 % 4,1	8/220 % 3,6	8/257 % 3,1	8/255 % 3,1	8/242 % 3,3
Kök hücre farklılaşması	8/206 % 3,9	8/197 % 4,1	8/220 % 3,6	8/257 % 3,1	8/255 % 3,1	8/242 % 3,3
Kök hücre oluşumu	8/206 % 3,9	8/197 % 4,1	8/220 % 3,6	8/257 % 3,1	8/255 % 3,1	8/242 % 3,3
Gelişimsel işlevin düzenlenmesi	9/206 % 4,4	9/197 % 4,6	13/220 % 5,9	14/257 % 5,4	12/255 % 4,7	13/242 % 5,4
Anatomik yapının düzenlenmesi	9/206 % 4,4	9/197 % 4,6	9/220 % 4,1	12/257 % 4,7	12/255 % 4,7	12/242 % 5,0
Meristem yapı organizasyonu	9/206 % 4,4	9/197 % 4,6	9/220 % 4,1	12/257 % 4,7	12/255 % 4,7	12/242 % 5,0

Polen gelişimi	9/206 % 4,4	9/197 % 4,6	9/220 % 4,1	9/257 % 3,5	9/255 % 3,5	9/242 % 3,7
Gelişimsel sürecin düzenlenmesi	9/206 % 4,4	9/197 % 4,6	13/220 % 5,9	14/257 % 5,4		13/242 % 5,4
Besinlere karşı hücre sel tepki	2/206 % 1,0	2/197 % 1,0	2/220 % 0,9	2/257 % 0,8	2/255 % 0,8	2/242 % 0,8
Dorsa-ventral şekil oluşumu	2/206 % 1,0	2/197 % 1,0	2/220 % 0,9	2/257 % 0,8	2/255 % 0,8	2/242 % 0,8
Karbon katabolitleriyle transkripsiyonun negatif düzenlenmesi	2/206 % 1,0	2/197 % 1,0	2/220 % 0,9	2/257 % 0,8	2/255 % 0,8	2/242 % 0,8
Karbon katabolitleriyle transkripsiyonun düzenlenmesi	2/206 % 1,0	2/197 % 1,0	2/220 % 0,9	2/257 % 0,8	2/255 % 0,8	2/242 % 0,8
Makromolekül metabolik işlevinin düzenlenmesi		12/197 % 6,1				
Biyosentetik işlev			61/220 % 27,7	77/257 % 30,0	77/255 % 30,2	66/242 % 27,3
Hücre gelişimi		11/197 % 5,6			16/255 % 6,3	16/242 % 6,6
Hücre farklılaşması		13/197 % 6,6			19/255 % 7,5	19/242 % 7,9
Farklılaşma ile ilişkili hücre morfogenezini					12/255 % 4,7	12/242 % 5,0
Hücre çoğalması			6/220 % 2,7	6/257 % 2,3	6/255 % 2,4	6/242 % 2,5
Hücre sel biyosentetik işlev			61/220 % 27,7	77/257 % 30,0	77/255 % 30,2	66/242 % 27,3
Hücre sel bileşen morfogenezini			13/220 % 5,9		18/255 % 7,1	18/242 % 7,4
Gen ifadesi				73/257 % 28,4	73/255 % 28,6	62/242 % 25,6
Makromolekül metabolik işlevi			119/220 % 54,1	142/257 % 55,3	142/255 % 55,7	
Metabolik işlev			183/220 % 83,2	213/257 % 82,9	211/255 % 82,7	
Nitrojen bileşiklerinin metabolik işlevi				84/257 % 32,7	84/255 % 32,9	73/242 % 30,2
Nükleobaz, nükleosid, nükleotid ve nükleik asitlerin metabolik işlevi			61/220 % 27,7	80/257 % 31,1	80/255 % 31,4	69/242 % 28,5
Filum gelişimi			12/220 % 5,5	12/257 % 4,7	5/255 % 2,0	12/242 % 5,0
Heterokronik, gelişimin düzenlenmesi			6/220 % 2,7	6/257 % 2,3	12/255 % 4,7	6/242 % 2,5
Gövde gelişimi			12/220 % 5,5	12/257 % 4,7	33/255 % 12,9	12/242 % 5,0
Gövde sistem gelişimi			12/220 % 5,5	12/257 % 4,7		12/242 % 5,0

Ek 5.2. Moleküler işlev ontolojisinde önemli derecede ($p < 0,05$) bulunan 108 ontoloji teriminin genom frekansı

Gen Ontoloji Terimi	Genom frekansı					
	HM	OM	VK	YK	VT	YT
Hücrel metabolik işlev	11088/22088 % 50,2	11088/22088 % 50,2	11088/22088 % 50,2	11088/22088 % 50,2	11088/22088 % 50,2	11088/22088 % 50,2
Temel metabolik işlev	11478/22088 % 52,0	11478/22088 % 52,0	11478/22088 % 52,0	11478/22088 % 52,0	11478/22088 % 52,0	11478/22088 % 52,0
Hücrel işlev	14561/22088 % 65,9	14561/22088 % 65,9	14561/22088 % 65,9	14561/22088 % 65,9	14561/22088 % 65,9	14561/22088 % 65,9
Biyopolimer metabolik işlevi	7973/22088 % 36,1	7973/22088 % 36,1	7973/22088 % 36,1	7973/22088 % 36,1	7973/22088 % 36,1	7973/22088 % 36,1
Hücrel biyopolimer metabolik işlevi	7128/22088 % 32,3	7128/22088 % 32,3	7128/22088 % 32,3	7128/22088 % 32,3	7128/22088 % 32,3	7128/22088 % 32,3
Hücrel makromolekül metabolik işlevi	7213/22088 % 32,7	7213/22088 % 32,7	7213/22088 % 32,7	7213/22088 % 32,7	7213/22088 % 32,7	7213/22088 % 32,7
Biyolojik düzenleme	2546/22088 % 11,5	2546/22088 % 11,5	2546/22088 % 11,5	2546/22088 % 11,5	2546/22088 % 11,5	2546/22088 % 11,5
Gelişimsel işlev	2689/22088 % 12,2	2689/22088 % 12,2	2689/22088 % 12,2	2689/22088 % 12,2	2689/22088 % 12,2	2689/22088 % 12,2
Çok hücreli organizmanın gelişimi	1714/22088 % 7,8	1714/22088 % 7,8	1714/22088 % 7,8	1714/22088 % 7,8	1714/22088 % 7,8	1714/22088 % 7,8
Çok hücreli organizmanın işlevi	1922/22088 % 8,7	1922/22088 % 8,7	1922/22088 % 8,7	1922/22088 % 8,7	1922/22088 % 8,7	1922/22088 % 8,7
Hücrel işlevin düzenlenmesi	1537/22088 % 7,0	1537/22088 % 7,0	1537/22088 % 7,0	1537/22088 % 7,0	1537/22088 % 7,0	1537/22088 % 7,0
Üreme	1237/22088 % 5,6	1237/22088 % 5,6	1237/22088 % 5,6	1237/22088 % 5,6	1237/22088 % 5,6	1237/22088 % 5,6
Üreme gelişimi işlevi	1054/22088 % 4,8	1054/22088 % 4,8	1054/22088 % 4,8	1054/22088 % 4,8	1054/22088 % 4,8	1054/22088 % 4,8
Üreme işlevi	1214/22088 % 5,5	1214/22088 % 5,5	1214/22088 % 5,5	1214/22088 % 5,5	1214/22088 % 5,5	1214/22088 % 5,5
Kimyasal uyarılara yanıt	2432/22088 % 11,0	2432/22088 % 11,0			1359/22088 % 6,2	
Anatomik yapı gelişimi	1523/22088 % 6,9	1523/22088 % 6,9	1523/22088 % 6,9	1523/22088 % 6,9	1523/22088 % 6,9	1523/22088 % 6,9
RNA biyosentez işlevi	1924/22088 % 8,7	1924/22088 % 8,7	1924/22088 % 8,7	1924/22088 % 8,7	1924/22088 % 8,7	1924/22088 % 8,7
Transkripsiyon	1924/22088 % 8,7	1924/22088 % 8,7	1924/22088 % 8,7	1924/22088 % 8,7	1924/22088 % 8,7	1924/22088 % 8,7
Transkripsiyon, DNA bağlı	1924/22088 % 8,7	1924/22088 % 8,7	1924/22088 % 8,7	1924/22088 % 8,7	1924/22088 % 8,7	1924/22088 % 8,7
Biyopolimer biyosentez işlevi	2500/22088 % 11,3	2500/22088 % 11,3	2500/22088 % 11,3	2500/22088 % 11,3	2500/22088 % 11,3	2500/22088 % 11,3
Hücrel biyopolimer biyosentez işlevi	2500/22088 % 11,3	2500/22088 % 11,3	2500/22088 % 11,3	2500/22088 % 11,3	2500/22088 % 11,3	2500/22088 % 11,3
Hücrel makromolekül biyosentez işlevi	2574/22088 % 11,7	2574/22088 % 11,7	2574/22088 % 11,7	2574/22088 % 11,7	2574/22088 % 11,7	2574/22088 % 11,7
Makromolekül biyosentez işlevi	2574/22088 % 11,7	2574/22088 % 11,7	2574/22088 % 11,7	2574/22088 % 11,7	2574/22088 % 11,7	2574/22088 % 11,7
RNA metabolik işlev	2452/22088 % 11,1	2452/22088 % 11,1	2452/22088 % 11,1	2452/22088 % 11,1	2452/22088 % 11,1	2452/22088 % 11,1
Biyolojik işlevin düzenlenmesi	1766/22088 % 8,0	1766/22088 % 8,0	1766/22088 % 8,0	1766/22088 % 8,0	1766/22088 % 8,0	1766/22088 % 8,0
Hücrel haberleşme	1329/22088 % 6,0	1329/22088 % 6,0	1329/22088 % 6,0	1329/22088 % 6,0	1329/22088 % 6,0	1329/22088 % 6,0
Hormon uyarılarına yanıt	1274/22088 % 5,8	1274/22088 % 5,8	1274/22088 % 5,8		1274/22088 % 5,8	1274/22088 % 5,8

Sinyal iletimi	1162/22088 % 5,3	1162/22088 % 5,3	1162/22088 % 5,3	1162/22088 % 5,3	1162/22088 % 5,3	1162/22088 % 5,3
Endojenik uyarılara yanıt	1359/22088 % 6,2	1359/22088 % 6,2	1359/22088 % 6,2	1359/22088 % 6,2	1359/22088 % 6,2	1359/22088 % 6,2
Lignin metabolik işlevi	55/22088 % 0,2	55/22088 % 0,2	55/22088 % 0,2	55/22088 % 0,2	55/22088 % 0,2	55/22088 % 0,2
Hücrel aminoasit türevlerinin metabolik işlevi	430/22088 % 1,9	430/22088 % 1,9	430/22088 % 1,9	430/22088 % 1,9	430/22088 % 1,9	430/22088 % 1,9
Fenilpropanoid metabolik işlevi	288/22088 % 1,3	288/22088 % 1,3	288/22088 % 1,3	288/22088 % 1,3	288/22088 % 1,3	288/22088 % 1,3
Hücrel aminoasit ve türevlerinin metabolik işlevi	921/22088 % 4,2	921/22088 % 4,2	921/22088 % 4,2	921/22088 % 4,2	921/22088 % 4,2	921/22088 % 4,2
İkincil metabolik işlev	515/22088 % 2,3	515/22088 % 2,3	515/22088 % 2,3	515/22088 % 2,3	515/22088 % 2,3	515/22088 % 2,3
Hücrel aromatik bileşiklerin metabolik işlevi	512/22088 % 2,3	512/22088 % 2,3	512/22088 % 2,3	512/22088 % 2,3	512/22088 % 2,3	512/22088 % 2,3
Organ gelişimi	869/22088 % 3,9	869/22088 % 3,9	869/22088 % 3,9	869/22088 % 3,9	869/22088 % 3,9	869/22088 % 3,9
Sistem gelişimi	869/22088 % 3,9	869/22088 % 3,9	869/22088 % 3,9	869/22088 % 3,9	869/22088 % 3,9	869/22088 % 3,9
Biyolojik kalitenin düzenlenmesi	777/22088 % 3,5	777/22088 % 3,5	777/22088 % 3,5	777/22088 % 3,5	777/22088 % 3,5	777/22088 % 3,5
Hücrel gelişim işlevi	646/22088 % 2,9	646/22088 % 2,9	646/22088 % 2,9	646/22088 % 2,9	646/22088 % 2,9	646/22088 % 2,9
Post-embriyonik gelişim	669/22088 % 3,0	669/22088 % 3,0	669/22088 % 3,0	669/22088 % 3,0	669/22088 % 3,0	669/22088 % 3,0
Doku gelişimi	348/22088 % 1,6	348/22088 % 1,6	348/22088 % 1,6	348/22088 % 1,6	348/22088 % 1,6	348/22088 % 1,6
Hormon uyarılarına hücrel tepki	473/22088 % 2,1	473/22088 % 2,1	473/22088 % 2,1	473/22088 % 2,1	473/22088 % 2,1	473/22088 % 2,1
Hormon aracılı sinyalleşme	473/22088 % 2,1	473/22088 % 2,1	473/22088 % 2,1	473/22088 % 2,1	473/22088 % 2,1	473/22088 % 2,1
Hücre içi sinyalleşme basamağı	676/22088 % 3,1	676/22088 % 3,1	676/22088 % 3,1	676/22088 % 3,1	676/22088 % 3,1	676/22088 % 3,1
Uyarılara hücrel tepki	1009/22088 % 4,6	1009/22088 % 4,6	1009/22088 % 4,6	1009/22088 % 4,6	1009/22088 % 4,6	1009/22088 % 4,6
Anatomik yapı morfogenezi	780/22088 % 3,5	780/22088 % 3,5	780/22088 % 3,5	780/22088 % 3,5	780/22088 % 3,5	780/22088 % 3,5
Meristem onarımı	58/22088 % 0,3	58/22088 % 0,3	58/22088 % 0,3	58/22088 % 0,3	58/22088 % 0,3	58/22088 % 0,3
Bölgeselleşme	161/22088 % 0,7	161/22088 % 0,7	161/22088 % 0,7	161/22088 % 0,7	161/22088 % 0,7	161/22088 % 0,7
Hücre farklılaşmasının düzenlenmesi	44/22088 % 0,2	44/22088 % 0,2	44/22088 % 0,2	44/22088 % 0,2	44/22088 % 0,2	44/22088 % 0,2
Hücrel işlevin negatif düzenlenmesi	66/22088 % 0,3	66/22088 % 0,3	66/22088 % 0,3	66/22088 % 0,3	66/22088 % 0,3	66/22088 % 0,3
Hücre morfogenezi	363/22088 % 1,6	363/22088 % 1,6	363/22088 % 1,6	363/22088 % 1,6	363/22088 % 1,6	363/22088 % 1,6
Şekil özelleşme süreci	176/22088 % 0,8	176/22088 % 0,8	176/22088 % 0,8	176/22088 % 0,8	176/22088 % 0,8	176/22088 % 0,8
Çiçek gelişimi	261/22088 % 1,2	261/22088 % 1,2	261/22088 % 1,2	261/22088 % 1,2	261/22088 % 1,2	261/22088 % 1,2
Biyolojik işlevin negatif düzenlenmesi	161/22088 % 0,7	161/22088 % 0,7	161/22088 % 0,7	161/22088 % 0,7	161/22088 % 0,7	161/22088 % 0,7
Homeostatik işlev	402/22088 % 1,8	402/22088 % 1,8	402/22088 % 1,8	402/22088 % 1,8	402/22088 % 1,8	402/22088 % 1,8
Üreme yapı gelişimi	361/22088 % 1,6	361/22088 % 1,6	361/22088 % 1,6	361/22088 % 1,6	361/22088 % 1,6	361/22088 % 1,6
Meristem gelişimi	165/22088 % 0,7	165/22088 % 0,7	165/22088 % 0,7	165/22088 % 0,7	165/22088 % 0,7	165/22088 % 0,7

Simetri tespiti	7/22088 % 0,0	7/22088 % 0,0	7/22088 % 0,0	7/22088 % 0,0	7/22088 % 0,0	7/22088 % 0,0
Uyuşma özelliği	34/22088 % 0,2	34/22088 % 0,2	34/22088 % 0,2	34/22088 % 0,2	34/22088 % 0,2	34/22088 % 0,2
Morfogenez ile ilgili hücrel bileşenlerin bir araya getirilmesi	37/22088 % 0,2	37/22088 % 0,2	37/22088 % 0,2	37/22088 % 0,2	37/22088 % 0,2	37/22088 % 0,2
Fitosteroidlerin biyosentez işlevi	25/22088 % 0,1	25/22088 % 0,1	25/22088 % 0,1	25/22088 % 0,1		25/22088 % 0,1
Fitosteroid metabolik işlevi	39/22088 % 0,2	39/22088 % 0,2	39/22088 % 0,2	39/22088 % 0,2	39/22088 % 0,2	39/22088 % 0,2
Polen duvarı yapımı	37/22088 % 0,2	37/22088 % 0,2	37/22088 % 0,2	37/22088 % 0,2	37/22088 % 0,2	37/22088 % 0,2
Steroid biyosentez işlevi	45/22088 % 0,2	45/22088 % 0,2	45/22088 % 0,2	45/22088 % 0,2	45/22088 % 0,2	45/22088 % 0,2
Eksene yakın/uzak uyuşma özelliği	25/22088 % 0,1	25/22088 % 0,1	25/22088 % 0,1			25/22088 % 0,1
Eksene yakın/uzak model oluşumu	27/22088 % 0,1	27/22088 % 0,1	27/22088 % 0,1			
Annot edilmemiş	254/22088 % 1,1	254/22088 % 1,1	254/22088 % 1,1	254/22088 % 1,1	254/22088 % 1,1	254/22088 % 1,1
Morfogenez ile ilgili anatomik yapı oluşumu	106/22088 % 0,5	106/22088 % 0,5	106/22088 % 0,5	25/22088 % 0,1		106/22088 % 0,5
Hücre duvarı biyogenezi	118/22088 % 0,5	118/22088 % 0,5	118/22088 % 0,5			118/22088 % 0,5
Çiçek organ gelişimi	75/22088 % 0,3	75/22088 % 0,3	75/22088 % 0,3	75/22088 % 0,3	75/22088 % 0,3	75/22088 % 0,3
Bitki türüne göre hücre duvarı biyogenezi	67/22088 % 0,3	67/22088 % 0,3	67/22088 % 0,3	67/22088 % 0,3	67/22088 % 0,3	67/22088 % 0,3
Post-embriyonik organ gelişimi	75/22088 % 0,3	75/22088 % 0,3	75/22088 % 0,3	75/22088 % 0,3	75/22088 % 0,3	75/22088 % 0,3
Anatomik yapı homeostazisi	25/22088 % 0,1	25/22088 % 0,1	25/22088 % 0,1	780/22088 % 3,5	25/22088 % 0,1	25/22088 % 0,1
Meristem onarımı	20/22088 % 0,1	20/22088 % 0,1	20/22088 % 0,1	20/22088 % 0,1	20/22088 % 0,1	20/22088 % 0,1
Hücre farklılaşmasının negatif düzenlenmesi	25/22088 % 0,1	25/22088 % 0,1	25/22088 % 0,1	25/22088 % 0,1	25/22088 % 0,1	25/22088 % 0,1
Gelişimsel işlevin negatif düzenlenmesi	40/22088 % 0,2	40/22088 % 0,2	40/22088 % 0,2	40/22088 % 0,2	40/22088 % 0,2	40/22088 % 0,2
Hücre farklılaşmasının düzenlenmesi	25/22088 % 0,1	25/22088 % 0,1	25/22088 % 0,1	25/22088 % 0,1	25/22088 % 0,1	25/22088 % 0,1
Kök gelişimi	156/22088 % 0,7	156/22088 % 0,7	156/22088 % 0,7	156/22088 % 0,7	156/22088 % 0,7	156/22088 % 0,7
Kök sistemi gelişimi	156/22088 % 0,7	156/22088 % 0,7	156/22088 % 0,7	156/22088 % 0,7	156/22088 % 0,7	156/22088 % 0,7
Kök hücre gelişimi	23/22088 % 0,1	23/22088 % 0,1	23/22088 % 0,1	23/22088 % 0,1	23/22088 % 0,1	23/22088 % 0,1
Kök hücre farklılaşması	23/22088 % 0,1	23/22088 % 0,1	23/22088 % 0,1	23/22088 % 0,1	23/22088 % 0,1	23/22088 % 0,1
Kök hücre oluşumu	23/22088 % 0,1	23/22088 % 0,1	23/22088 % 0,1	23/22088 % 0,1	23/22088 % 0,1	23/22088 % 0,1
Gelişimsel işlevin düzenlenmesi	89/22088 % 0,4	89/22088 % 0,4	89/22088 % 0,4	89/22088 % 0,4	89/22088 % 0,4	89/22088 % 0,4
Anatomik yapının düzenlenmesi	49/22088 % 0,2	49/22088 % 0,2	49/22088 % 0,2	49/22088 % 0,2	49/22088 % 0,2	49/22088 % 0,2
Meristem yapı organizasyonu	49/22088 % 0,2	49/22088 % 0,2	49/22088 % 0,2	49/22088 % 0,2	49/22088 % 0,2	49/22088 % 0,2
Polen gelişimi	85/22088 % 0,4	85/22088 % 0,4	85/22088 % 0,4	85/22088 % 0,4	85/22088 % 0,4	85/22088 % 0,4
Gelişimsel sürecin düzenlenmesi	88/22088 % 0,4	88/22088 % 0,4	88/22088 % 0,4	88/22088 % 0,4		88/22088 % 0,4
Besinlere karşı hücrel tepki	2/22088 % 0,0	2/22088 % 0,0	2/22088 % 0,0	2/22088 % 0,0	2/22088 % 0,0	2/22088 % 0,0

Dorsa-ventral şekil oluşumu	2/22088 % 0,0	2/22088 % 0,0	2/22088 % 0,0	2/22088 % 0,0	2/22088 % 0,0	2/22088 % 0,0
Karbon katabolitleriyle transkripsiyonun negatif düzenlenmesi	2/22088 % 0,0	2/22088 % 0,0	2/22088 % 0,0	2/22088 % 0,0	2/22088 % 0,0	2/22088 % 0,0
Karbon katabolitleriyle transkripsiyonun düzenlenmesi	2/22088 % 0,0	2/22088 % 0,0	2/22088 % 0,0	2/22088 % 0,0	2/22088 % 0,0	2/22088 % 0,0
Makromolekül metabolik işlevinin düzenlenmesi		381/22088 % 1,7				
Biyosentetik işlev			3786/22088 % 17,1	3786/22088 % 17,1	3786/22088 % 17,1	3786/22088 % 17,1
Hücre gelişimi		326/22088 % 1,5			326/22088 % 1,5	326/22088 % 1,5
Hücre farklılaşması		444/22088 % 2,0			444/22088 % 2,0	444/22088 % 2,0
Farklılaşma ile ilişkili hücre morfogenezi					222/22088 % 1,0	222/22088 % 1,0
Hücre çoğalması			53/22088 % 0,2	53/22088 % 0,2	53/22088 % 0,2	53/22088 % 0,2
Hücreselel biyosentetik işlev			3746/22088 % 17,0	3746/22088 % 17,0	3746/22088 % 17,0	3746/22088 % 17,0
Hücreselel bileşen morfogenezi			396/22088 % 1,8		396/22088 % 1,8	396/22088 % 1,8
Gen ifadesi				3617/22088 % 16,4	3617/22088 % 16,4	3617/22088 % 16,4
Makromolekül metabolik işlevi			9008/22088 % 40,8	9008/22088 % 40,8	9008/22088 % 40,8	
Metabolik işlev			15829/22088 % 71,7	15829/22088 % 71,7	15829/22088 % 71,7	
Nitrojen bileşiklerinin metabolik işlevi				4402/22088 % 19,9	4402/22088 % 19,9	4402/22088 % 19,9
Nükleobaz, nükleosid, nükleotid ve nükleik asitin metabolik işlevi			3768/22088 % 17,1	3768/22088 % 17,1	3768/22088 % 17,1	3768/22088 % 17,1
Filum gelişimi			164/22088 % 0,7	164/22088 % 0,7	25/22088 % 0,1	164/22088 % 0,7
Heterokronik, gelişimin düzenlenmesi			33/22088 % 0,1	33/22088 % 0,1	88/22088 % 0,4	33/22088 % 0,1
Gövde gelişimi			189/22088 % 0,9	189/22088 % 0,9	1162/22088 % 5,3	189/22088 % 0,9
Gövde sistem gelişimi			189/22088 % 0,9	189/22088 % 0,9		189/22088 % 0,9

Ek 6. miRNA hedef genlerini içeren 130 KEGG metabolik yolağı

Metabolik yolak	HM		OM		VK		YK		VT		YT	
	205	p-değeri	205	p-değeri	205	p-değeri	205	p-değeri	205	p-değeri	205	p-değeri
Askorbat ve aldehit metabolizması	33	1,46E-34	33	8,73E-35	33	4,65E-34	33	5,72E-32	33	9,92E-32	33	1,38E-32
Bitki hormonu sinyal iletimi	39	1,12E-06	39	7,59E-07	41	3,81E-07	46	1,67E-07	46	2,74E-07	42	2,16E-06
Brassinosteroid biyosentezi	6	7,05E-06	6	6,48E-06	6	8,54E-06	6	1,90E-05	6	2,08E-05	6	1,50E-05
<i>Vibrio cholerae</i> enfeksiyonu	3	0,0689052	2	0,238108	2	0,255124	2	0,30959	2	0,31636	2	0,292607
Metabolik yolaklar	52	0,0778905	50	0,114787	49	0,253701	53	0,42385	53	0,47643	52	0,354687
Selenyum metabolizması	2	0,0795101	2	0,077523	2	0,084209	2	0,1067	2	0,10961	2	0,099502
Karbohidrat sindirimi ve emilimi	1	0,126629	1	0,124889	1	0,130676	1	0,14896	1	0,15122	1	0,143283
Sülfür metabolizması	2	0,1276972	2	0,124676	2	0,134814	2	0,16838	2	0,17267	2	0,157726
Sıkı bağlantı	3	0,1463954	3	0,141909	3	0,157042	3	0,2084	3	0,21507	3	0,191932
Lizin degradasyonu	2	0,1648472	2	0,161098	2	0,173655	2	0,21476	2	0,21997	2	0,201792
Sfingolipid metabolizması	2	0,1776222	2	0,173636	2	0,186979	2	0,23049	2	0,23599	2	0,21679
Şagaz hastalığı (Amerikan trypanosomiasis)	7	0,1885664	7	0,179351	8	0,112862	8	0,19486	8	0,20654	8	0,166955
Protein salımı	2	0,2365694	2	0,231575	2	0,248246	2	0,30171	2	0,30836	2	0,285022
Nitrojen metabolizması	2	0,2664861	2	0,261032	2	0,279211	2	0,33702	2	0,34416	2	0,319055
Bitki patojen ilişkisi	27	0,2709061	27	0,24552	30	0,146375	33	0,19846	33	0,22618	31	0,242452
Toplayıcı asit salgısı	1	0,2709847										
Nişasta ve sükkroz metabolizması	7	0,2711647	7	0,259389	7	0,299157	8	0,28668	8	0,30156	7	0,390053
Baz eksizyon onarımı	2	0,2764678	2	0,270869	3	0,091965	4	0,03513	4	0,03694	4	0,030821
Pürin metabolizması	4	0,2940316	3	0,50821	3	0,540693	4	0,41172	4	0,42369	4	0,381602
İndol alkaloid biyosentezi	1	0,3094669	1	0,305698	1	0,318184	1	0,70088	1	0,70677	1	0,344885
Folik asit aracılı tek karbon transferi	1	0,3399863	1	0,335943	1	0,349328	1	0,39041	1	0,87566	1	0,377851
Zeatin biyosentezi	2	0,34904	2	0,342503	2	0,364207	2	0,43163	2	0,4398	2	0,410939
Aldosteron etkisiyle sodyum geri emilimi	1	0,3691631	1	0,364877	1	0,379055	1	0,42237	1	0,42758	1	0,409165
Diğer glikan parçalanmaları	1	0,3915775	1	0,387117	1	0,401861	1	0,44674	1	0,66548	1	0,433082
mRNA keşif yolağı	4	0,4015959	4	0,390983	3	0,649018	3	0,73941	3	0,7493	4	0,501569
<i>Helicobacter pylori</i> enfeksiyonunda epitel hücre sinyali	1	0,4024857										
Eter lipid metabolizması	1	0,4340562	1	0,429301	1	0,445001	1	0,49244	1	0,49808	1	0,478062
NOD benzeri reseptör sinyal yolağı	1	0,4442063	1	0,439387	1	0,455294	1	0,50327	1	0,50896	1	0,488741
Dorsoventral eksen oluşumu	1	0,4541753	1	0,449296	1	0,465396	1	0,51386	1	0,51961	1	0,499201
MAPK sinyal yolağı	1	0,4541753	1	0,449296	1	0,465396	1	0,51386	1	0,51961	1	0,499201
Lizozom	3	0,4661194	2	0,715179	2	0,739749	2	0,80654	2	0,81372	2	0,787496
Antijen işlenmesi ve sunumu	2	0,4704863	2	0,462865	3	0,224893	3	0,29105	3	0,29945	3	0,270136
Günlük ritim-bitki	3	0,4753381	3	0,465694	4	0,275571	4	0,36587	4	0,37722	4	0,33747
Mesane kanseri	1	0,4830271	1	0,477989	1	0,494597	1	0,54432	1	0,55018	1	0,529322
Akut miyeloid lösemi	1	0,5014133	1	0,496286	1	0,513177	1	0,56356	1	0,56948	1	0,548393
Melanoma	1	0,5147745	1	0,509589	1	0,526664	1	0,57746	1	0,58341	1	0,56219
Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri	1	0,5191486	1	0,513945	1	0,531077	1	0,58199	1	0,58796	1	0,566695
Gliksilat ve dikarboksilat metabolizması	1	0,5234835	1	0,518263	1	0,535448	1	0,58647	1	0,59245	1	0,571154

Kronik miyeloid lösemi	1	0,5277794	1	0,522542	1	0,53978	1	0,59091	1	0,59689	1	0,575567
Endoplazmik retikulumda protein işlenmesi	6	0,535236	6	0,520818	6	0,568132	7	0,55049	7	0,56774	6	0,663375
Tip II Diabetes mellitus	1	0,5362561	1	0,530988	1	0,548322	1	0,59964	1	0,60564	1	0,584258
Fc epsilon RI sinyal yolağı	1	0,5527578	1	0,547436	1	0,564935	1	0,61656	1	0,62257	1	0,601112
Hücre döngüsü-maya	4	0,5544546	4	0,542808	6	0,222082	6	0,32588	6	0,33939	6	0,292461
ErbB sinyal yolağı	1	0,5607881	1	0,555444	1	0,573012	1	0,62474	1	0,63076	1	0,609282
Uzun süreli depresyon	1	0,5647494	1	0,559395	1	0,576995	1	0,62877	1	0,63479	1	0,613304
Sitrat döngüsü (TCA)	1	0,5725654	1	0,567192	1	0,584849	1	0,6367	1	0,64271	1	0,621226
Endometriyal kanser	1	0,576421	1	0,571039	1	0,588722	1	0,6406	1	0,64661	1	0,625126
Osteoklast farklılaşması	1	0,5951855	1	0,589768	1	0,607552	1	0,65949	1	0,97709	1	0,644033
Pankreas kanseri	1	0,6095996	1	0,604164	1	0,621996	1	0,67388	1	0,67985	1	0,658474
Renal hücreli karsinom	1	0,6095996	1	0,604164	1	0,621996	1	0,67388	1	0,67985	1	0,658474
Doğal öldürücü hücre bağımlı sitotoksinite	1	0,6131226	1	0,607684	1	0,625524	1	0,67738	1	0,68334	1	0,661991
Hücre iskeleti için aktin düzenlenmesi	2	0,6142508	1	0,871944	1	0,884387	2	0,70741	2	0,71582	1	0,907687
T hücre reseptörü sinyal yolağı	1	0,616614	1	0,611173	1	0,629019	1	0,68085	1	0,6868	1	0,665473
Laymanyaz enfeksiyonu	4	0,6430006	4	0,63154	5	0,477547	5	0,60194	5	0,61628	5	0,5648
Kemer bağlantılar	1	0,6434394	1	0,637993	1	0,655834	1	0,70727	1	0,71314	1	0,692073
Yağ asit metabolizması	1	0,6434394	1	0,637993	1	0,655834	1	0,70727	1	0,71314	1	0,692073
VEGF sinyal yolağı	1	0,6434394	1	0,637993	1	0,655834	1	0,70727	1	0,71314	1	0,692073
Akson yol göstericiliği	1	0,6466584	1	0,641214	1	0,659047	1	0,71041	1	0,71627	1	0,695246
Kolorektal kanser	1	0,6466584	1	0,641214	2	0,289523	2	0,34867	2	0,35597	2	0,330322
Gliyoma (beyin tümörü)	1	0,6498485	1	0,644405	1	0,66223	1	0,71353	1	0,71937	1	0,698387
Şişelloz enfeksiyonu	1	0,6498485	1	0,644405	1	0,66223	1	0,71353	1	0,71937	1	0,698387
Aminoasit-tRNA biyosentezi	1	0,659248	1	0,653813	1	0,671604	3	0,13523	3	0,14	2	0,345264
B hücre reseptörü sinyal yolağı	1	0,659248	1	0,653813	1	0,671604	1	0,72266	1	0,72847	1	0,707617
TGF-β sinyal yolağı	1	0,659248	1	0,653813	1	0,671604	1	0,72266	1	0,72847	1	0,707617
Doymamış yağ asitlerinin biyosentezi	1	0,6653743	1	0,659946	1	0,677709	1	0,72859	1	0,73437	1	0,713613
Kemokin sinyal yolağı	1	0,671391	1	0,665971	1	0,683701	1	0,7344	1	0,74014	1	0,719487
Amino şeker ve nükleotid şeker metabolizması	2	0,6720986	2	0,664221	2	0,689899	2	0,76138	2	0,76924	2	0,740723
Alzheimer hastalığı	2	0,6741773	2	0,666309	2	0,691953	2	0,76327	2	0,77111	2	0,742673
Prostat kanseri	1	0,6773001	1	0,67189	1	0,689582	1	0,74008	1	0,74579	1	0,725241
Tiroid kanseri	1	0,685966	1	0,680574	1	0,6982	1	0,74837	1	0,75403	2	0,37846
Ara bağlantılar	1	0,6916143	1	0,686235	1	0,703812	1	0,75375	1	0,75938	1	0,739117
PPAR sinyal yolağı	1	0,6916143	1	0,686235	1	0,703812	2	0,40579	2	0,41373	2	0,385745
Gliserolipid metabolizması	1	0,6944004	1	0,689028			1	0,7564	1	0,76201	2	0,389373
Prion hastalığı	1	0,6944004	1	0,689028	1	0,70658	1	0,7564	1	0,76201	1	0,741808
Toll-benzeri reseptör sinyal yolağı	4	0,7111296	4	0,700266	5	0,557047	5	0,68008	5	0,69373	5	0,644206
Vasküler düz kas kasılması	1	0,7234424	1	0,718168	1	0,735372	1	0,78372	1	0,78911	1	0,769639
İnositol fosfat metabolizması	1	0,7259423					1	0,78605	1	0,79142		
Melanojenez	1	0,7284196	1	0,723166	1	0,740297	1	0,78835	1	0,7937	1	0,774368
GnRH sinyal yolağı	1	0,7357188	1	0,730498	1	0,747513	1	0,79511	1	0,80039	1	0,781281
Fotosentetik organizmalarda karbon fiksasyonu	1	0,7451483	1	0,739975	1	0,756825	1	0,80379	1	0,80899	1	0,790172

Fosfatidilinositol sinyal sistemi	1	0,7451483				1	0,80379	1	0,80899			
mTOR sinyal yolağı	1	0,7497367	1	0,744588	1	0,761352	1	0,80799	1	0,81314	1	0,794482
Limonen ve pinen parçalanması	2	0,75547	2	0,748202	2	0,771728	2	0,83458	2	0,84124	2	0,816839
Bisfenol parçalanması	2	0,7570967	2	0,749846	2	0,773313	2	0,83595	2	0,84258	2	0,818278
Toksoplazmoz enfeksiyonu	4	0,7693327	4	0,759347	5	0,630185	5	0,74734	5	0,75984	5	0,713992
Porfirin ve klorofil metabolizması	1	0,7714744	1	0,766462	1	0,782759	1	0,82769	1	0,83261	1	0,814742
Uzun süreli potansiyel artışı	1	0,7836041	1	0,77868	1	0,794674	1	0,83853	1	0,84331	1	0,82593
Polisiklik aromatik hidrokarbonların parçalanması	2	0,7862771	2	0,779374	2	0,801652	2	0,8601	2	0,86618	2	0,843773
Nerotrofin sinyal yolağı	4	0,7873068	4	0,777671	5	0,653856	5	0,76813	5	0,78017	5	0,735881
A-linolenik asit metabolizması	1	0,795093	1	0,790262	1	0,805939	1	0,84869	1	0,85333	1	0,836446
Fokal adezyon	1	0,8059746	1	0,801241	1	0,816588	1	0,85821	1	0,8627	1	0,846328
Pirüvat metabolizması	1	0,8094725	1	0,804772	1	0,820007	1	0,86125	1	0,8657	1	0,849489
Aminobenzoat parçalanması	2	0,8149165	2	0,808431	2	0,829292	2	0,88299	2	0,88848	2	0,868154
Progesteron aracılı oosit olgunlaşması	1	0,8244523	1	0,819905	1	0,834624	1	0,87415	1	0,87837	1	0,862928
Gliserofosfolipid metabolizması	1	0,8276186	1	0,823106	1	0,837708	1	0,87685	1	0,88102	1	0,865748
ABC taşıyıcıları	1	0,8291804	1	0,824685	1	0,839229	3	0,3465	3	0,35582	3	0,323164
Safra salgısı	1	0,8367805	1	0,832373	1	0,846622	3	0,36107	3	0,3706	3	0,337171
Apoptozis	3	0,8368086	3	0,829429	4	0,696125	4	0,79387	4	0,8041	4	0,766406
Glutasyon metabolizması	1	0,8426176										
Kızamık hastalığı	3	0,8606268	3	0,853849	4	0,732681	4	0,8246	4	0,83401	4	0,799127
Fc gama R-aracılı fagositoz	1	0,8651945	1	0,861164	1	0,874151	2	0,68649	2	0,69506	1	0,89862
Ökaryotlarda ribozom biyogenezi	2	0,8743612	2	0,869043	2	0,886006	2	0,92755	2	0,93161	2	0,916409
Oksidatif fosforilasyon	1	0,8758105							1	0,45211		
MAPK sinyal yolağı	1	0,8834885	1	0,879748	1	0,891772	1	0,92277	1	0,92596	1	0,914176
Ubikuitin aracılı proteoliz	2	0,8880384	2	0,883059	3	0,740983	4	0,64685	4	0,65937	4	0,614233
Stilbenoid, diarilheptanoid ve gingerol biyosentezi	2	0,9032014	2	0,898634	2	0,913122	2	0,94748	2	0,95073	2	0,938443
Kanser yolakları	1	0,9038016	1	0,900433	2	0,693995	2	0,76515	2	0,77296	3	0,49465
Peroksizom	1	0,9176322	1	0,914553	1	0,924393	1	0,94891	1	0,95135	1	0,942246
Pentoz ve glukuronat dönüşümü	1	0,9191233	1	0,916078	1	0,925809	2	0,79849	2	0,80581	2	0,779118
Pirimidin metabolizması	1	0,935644					1	0,96192	1	0,96392	1	0,956432
İnsülin sinyal yolağı	1	0,9412694	1	0,93877	1	0,946712	1	0,96585	1	0,9677	1	0,960754
Hücre döngüsü	1	0,9557814	1	0,953707	3	0,620283	3	0,7127	3	0,72294	3	0,685828
Oosit mayozu	1	0,9557814	1	0,953707	1	0,960268	1	0,97565	1	0,39536	1	0,97162
Mikrobiyal metabolizma	5	0,9623292	5	0,958776	5	0,969552	7	0,93646	5	0,99032	7	0,918303
Splayozom	2	0,9862985	2	0,985162	2	0,98863	2	0,99521	2	0,9957	2	0,99371
Taşıyıcı RNA	1	0,9965278	1	0,996226	1	0,95632					2	0,988216
İkincil metabolitlerin biyosentezi	11	0,9998375	11	0,999789	11	0,999913	13	0,99996	11	1	13	0,999899
Temel transkripsiyon faktörleri							4	0,06234	4	0,06536		
DNA replikasyonu					2	0,320329	3	0,14758	3	0,1527	3	0,135053
Endositoz							1	0,93853	5	0,15081	4	0,273059
Glikoliz/glikoneojenez							2	0,70966			2	0,687762
Homolog rekombinasyon											1	0,685627
İnositol alkaloid biyosentezi							1	0,35668	1	0,36134		

MAPK sinyal yolağı-maya							1	0,685627
Mayoz-maya	2	0,620558	2	0,69594	2	0,70444	2	0,673804
Yanlış eşleşme tamiri	1	0,556706	2	0,23838	2	0,24402	2	0,224328
Nükleotid eksizyon tamiri			1	0,87139			1	0,860049
Otofajinin düzenlenmesi			1	0,8059	1	0,81108		
RNA parçalanması			2	0,87364	2	0,87938	1	0,96849
Valin, lösin ve isolösin biyosentezi			1	0,51908	1	0,52484		

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Huriye YANIK

Doğum Yeri : Üsküdar/ İstanbul

Doğum Tarihi : 22.11.1988

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : huriyeyanik@gmail.com

Eğitim Durumu:

Lise : Çorlu Mehmet Akif Ersoy Anadolu Lisesi, 2006

Lisans : Sakarya Üniversitesi Biyoloji Bölümü, 2011

Yüksek Lisans : Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilimi Dalı, 2013

Yayımları (SCI ve diğer)

Yanık, H., Turktas, M., Hernandez, P., Dorado, G., Dundar, E. and Ünver, T. 2013. Genome-wide identification of alternate bearing-associated miRNAs in the olive tree (*Olea europaea*). BMC Plant Biology, 13; 10. (Highly accessed)

Ulusal Bildiriler

Yanık, H., İnal, B., Böke, H., Dünder, E., Akgün, Ş. ve Ünver, T. 2012. Zeytin (*Olea europaea*) Bitkisinde Periyodisite ile ilişkili miRNA'ların Yüksek Verimli Dizileme Tekniği ile Karakterizasyonu. 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Antalya.

Ünver, T., Erklıç, E.G., Özhüner, E., Yanık, H., Böke, H., Hajyzadeh, M., İnal, B., Eldem, V., Parmaksız, İ., İpek, A. ve Özcan, S. 2012. İşlevsel Genomiğin Yeni Oyuncusu; Bitki mikroRNA'ları. 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Antalya.

Hajyzadeh, M., Çavuşoğlu, A., Sülüőođlu, M., Yanık, H., İnal, B., Erkılıç, E.G., Ünver, T. 2012. Karayemiş (*Laurocerasus officinalis* Roemer Syn:*Prunus laurocerasus* L.) Tiplerinin SSR Tekniği ile Akrabalıklarının Ortaya Çıkarılması. 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, Antalya.

Demirhan, S., Hajyzadeh, M., Beyaz, R., Erkılıç, E.G., İnal, B., Yanık, H., Böke, H., Eldem, V., Alagöz, Y., Ünver, T. 2011. Agrobacterium ile Bitkilere Gen transferi. Fatih Üniversitesi 2. Ulusal Binotek Öğrenci Kongresi, İstanbul.