KIRGIZİSTAN-TÜRKİYE MANAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Fritillaria Cinsine ait Diğer Türlerde ve Kırgızistanda Yetişen Endemik *Fritillaria eduardii* Bitkilerinde miRNA Analizleri

Hazırlayan
Daniel KİMSANALİEV

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Yılmaz KAYA
Eş Danışman
Doç. Dr. Sevgi MARAKLI

Yüksek Lisans Tezi

Haziran 2022
KIRGIZİSTAN/ BİŞKEK

KIRGIZİSTAN-TÜRKİYE MANAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Fritillaria Cinsine ait Diğer Türlerde ve Kırgızistanda Yetişen Endemik *Fritillaria eduardii* Bitkilerinde miRNA Analizleri

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Daniel KİMSANALİEV

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Yılmaz KAYA
Eş Danışman
Doç. Dr. Sevgi MARAKLI

Bu çalışma: Kırgızistan-Türkiye Manas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından KTMU-BAP-2022.FB.01 kodlu projesi ile desteklenmiştir

Haziran 2022
KIRGIZİSTAN/ BİŞKEK

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Daniel KİMSANALİEV

İmza:

ПЛАГИАТ ЖАСАЛБАГАНДЫГЫ ТУУРАЛУУ БИЛДИРҮҮ

Мен бул эмгекте алынган бардык маалыматтарды академиялык жана этикалык эрежелерге ылайык колдондум. Тагыраак айтканда, бул эмгекте колдонулган, бирок мага тиешелүү болбогон маалыматтардын баардыгына шилтеме бердим жана аларды колдонулган адабият тизмесинде көрсөттүм. Эч кайсы жерден плагиат жасалбагандыгына ынандырып кетким келет.

Даниел Кимсаналиев

Колу:

YÖNERGEYE UYGUNLUK

Kırgızistanda Yetişen Endemik *Fritillaria eduardii* Bitkilerinde ve *Fritillaria* Cinsine ait Diğer Türlerde miRNA Analizleri adlı Yüksek Lisans tezi, Kırgızistan-Türkiye Manas Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Tez Hazırlama ve Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan:
Daniel KİMSANALİEV

Danışman:
Yrd. Doç. Dr. Yılmaz KAYA
Eş danışman:
Doç. Dr. Sevgi MARAKLI

Biyoteknoloji ABD Başkanı

Doç. Dr. Kadırbay ÇEKİROV

ЭРЕЖЕЛЕРГЕ БАШ ИЙҮҮ

“*Fritillaria* тукумуна таандык түрлөрдүн жана Кыргызстандын эндемик өсүмдүгү *Fritillaria eduardii* нин микроРНК анализдери” – аттуу магистрдик иш, Кыргыз-Түрк “Манас” университетинин магистрдик диссертация долбоору жана диссертацияны жазуу эрежелерине туура келгендей болуп даярдалды.

Даярдаган:
Даниел Кимсаналиев

Илимий жетекчи:
Ph.D., доцент м.а. Йылмаз Кайа
Экинчи илимий жетекчи:
Ph.D., доцент Севги Маракли

Биотехнология билим багытынын башчысы

Б.и.к., доцент Кадырбай Чекиров

KABUL VE ONAY

Yrd. Doç. Dr. Yılmaz KAYA danışmanlığında Daniel KİMSANALİEV tarafından hazırlanan "Kırgızistanda Yetişen Endemik *Fritillaria eduardii* Bitkilerinde ve *Fritillaria* Cinsine ait Diğer Türlerde miRNA Analizleri" adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Kırgızistan-Türkiye Manas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalında oybirliği ile/ oyçokluğu ile **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

…….. /…… / ……..

JÜRİ:

Komisyon Başkanı	: Prof. Dr. Camila KARABEKOVA
Danışman	: Yrd. Doç. Dr. Yılmaz KAYA
Eş danışman	: Doç. Dr. Sevgi MARAKLI
Üye	: Prof. Dr. Tinatin DÖÖLÖTKELDİYEVA
Üye	: Prof. Dr. Ali ASLAN
Üye	: Doç. Dr. Ahmet AYGÜN
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Yılmaz KAYA

ONAY:
Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ……...… tarih ve ……..…… sayılı kararı ile onaylanmıştır.

……. /……../ ……

Doç. Dr. İsmet ALTINTAŞ

Enstitü Müdürü

КАБЫЛ АЛУУ ЖАНА ЧЕЧИМ

Доценттин милдетин аткаруучу Йылмаз Кайанын жетекчилигинде Даниел Кимсаналиев тарабынан даярдалган "*Fritillaria* тукумуна таандык түрлөрдүн жана Кыргызстандын эндемик өсүмдүгү *Fritillaria eduardii* нин микроРНК анализдери" темасындагы магистрдик иш коммисия тарабынан Кыргыз-Түрк "Манас" университетинин Табигый илимдер институтунун биотехнология билим багытында магистрдик иш болуп кабыл алынды

…….. /…… / ……..

КОМИССИЯ:

Комиссиянын төрайымы	: Б.и.д., профессор Жамила Карабекова
Илимий жетекчиси	: Ph.D., доцент м.а. Йылмаз Кайа
Илимий жетекчиси	: Ph.D., доцент Севги Маракли
Мүчө	: Б.и.д., профессор Тинатин Дөөлөткелдиева
Мүчө	: Ph.D., профессор Али Аслан
Мүчө	: Ph.D., доцент Ахмет Айгүн
Мүчө	: Ph.D., доцент м.а. Йылмаз Кайа

ЧЕЧИМ:
Бул магистрдик иштин кабыл алынышы Институт башкаруу кеңешинин

..... датасына жана санындагы чечими менен бекитилди.

……. /……../ ……

Ph.D., доцент Исмет Алтынташ

Институттун мүдүрү

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca farklı bakış açıları ve bilimsel katkılarıyla beni aydınlatan, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve bu günlere gelmemde en büyük katkı sahibi sayın hocalarım Yrd. Doç Dr. Yılmaz KAYA ve Doç. Dr. Sevgi MARAKLI'ya teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında karşılaştığım zorlukları aşmamda yardımlarından dolayı hocalarıma, arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasına maddi destek veren Kırgızistan-Türkiye Manas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: KTMU-BAP-2022.FB.01) teşekkür ederim.

Ayrıca; çalışmalarım süresince sabır göstererek beni daima destekleyen aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Daniel KİMSANALİEV

Bişkek, 2022

KIRGIZİSTANDA YETİŞEN ENDEMİK *FRİTİLLARİA EDUARDİİ* BİTKİLERİNDE VE *FRİTİLLARİA* CİNSİNE AİT DİĞER TÜRLERDE MİRNA ANALİZLERİ

Daniel KİMSANALİEV

Kırgızistan-Türkiye Manas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2022

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Yılmaz KAYA

Eş danışman: Doç. Dr. Sevgi MARAKLI

ÖZET

Aygül bitkisi (*F. eduardii*), güzelliğinden dolayı Batken bölgesinin tanınmış bir endemik bitkisinden öte tüm Kırgızistan için önemli ve değerlidir. Günümüzde, bu bitki doğal ortamında sınırlı sayıda bulunmakta ve kaçak sökümler nedeniyle nesli tükenme tehdidi altındadır. Aygül bitkisi yerel yönetim kurumların koruması altındadır ve çiçek açtığı alanda otlatma yasağı getirilmiştir. Bu bitkinin doğada çoğaltılarak neslinin korunmaya alınması günümüzün güncel problemlerindendir.

Bu tez çalışmasının amacı; *in siliko* yöntemler kullanılarak Aygül lalesinde ve *Fritillaria* cinsine ait diğer türlerde farklı metabolik yolaklarla ilişkili yeni miRNA dizilerinin belirlenmesidir. Tez çalışmasında kullanılan veri tabanları ve programlar; NCBI veri tabanı, miRBase veri tabanı, BLASTN programı, RNAfold Web Server, RNA Hybrid, Clustal Omega, MEGA11'dir. Tezin amacına ulaşmak için, miRBase veri tabanında bulunan farklı bitkilere ait referans 10 494 miRNA dizileri elde edildi. Elde edilen referans miRNA dizileri kullanılarak tezde uygulanan metodlara göre eleme aşamaları gerçekleştirildi. NCBI veri tabanında bulunan BLASTN programı kullanılarak aynı bitkiye ait nt veri tabanında karşılaştırıldı. Uygun olan miRNA dizilerinin ikincil yapıları (pre-miRNA) "RNAfold Web Server" programı kullanılarak belirlendi. Ayrıca yeni miRNA dizileri ile referans miRNA'lar arasındaki evrimsel ilişki, hizalama (Clustal Omega) ve filogenetik ağaç analizleri (MEGA11) ile incelendi. Bu miRNA dizilerinin hedef genleri, "RNA Hybrid" programı ile tanımlandı. Sonuç olarak *Fritillaria* cinsine ait diğer türlerde miR399, miR169, miR391, miR1432 ve miR8602 olmak üzere ilk defa 5 miRNA dizisi ve bu dizilerin hedef genleri belirlendi. Bununla birlikte Aygül lalesinde herhangi bir miRNA tanımlanmadı. Aygül bitkisi ile

ilgli detaylı genom bilgisi bulunmadığı için sonuçların bu şekilde çıktığı düşünülmektedir. Bu tez, *Fritillaria* cinsinde, farklı miRNA ailelerinin ve onların hedeflerinin belirlendiği ilk detaylı incelemedir. Elde edilen sonuçların bu cinsin üyelerinde yapılacak biyoteknolojik analizler için temel bilgi oluşturması beklenmektedir.

Anahtar kelimeler: Aygül bitkisi, endemik bitki, epigenetik, kısa kodlama yapmayan RNA'lar

FRITILLARIA ТУКУМУНА ТААНДЫК ТҮРЛӨРДҮН ЖАНА КЫРГЫЗСТАНДЫН ЭНДЕМИК ӨСҮМДҮГҮ *FRITILLARIA EDUARDII* НИН МИКРОРНК АНАЛИЗДЕРИ

Даниел Кимсаналиев

Кыргыз-Түрк "Манас" Университети, Табигый илимдер институту

Магистрдик иш, Июнь 2022

Илимий жетекчи: Ph.D., доцент м.а. Йылмаз Кайа

Экинчи илимий жетекчи: Ph.D., доцент Севги Маракли

КЕҢИРИ АНОТАЦИЯ

Кыргызстан аянты боюнча дүйнөнүн бир топ өлкөсүнө салыштырмалуу кичинекей болгондугуна карабастан, көптөгөн өсүмдүктөрдүн жана жаныбарлардын биологиялык ар түрдүүлүгүнө бай болуп саналат. Кыргызстандын тоолуу аймагы, деңиз деңгээлинен бийиктиги жана климаттык шарттардын уникалдуулугу болсо, жүздөгөн эндемик түрлөрдүн Кыргызстанда байырлоосуна себеп болгон. Айгүл гүлү (*Fritillaria eduardii*) борпоң карбонат топурактуу, ири ным корумдуу, акиташтуу, шагылдуу токой алкагында, бадалдардын арасында, даректардын алдында, аска - зоолордун алдында (негизинен батыш жана тескей жагында), ортоңку тоо беттеринде деңиз деңгээлинен 700-2500 метр бийиктиктерде (Кыргызстанда- 1550-2000 м, тик ылдый түндүк-тескей беттеринде) өсөт. Марттын башынан апрелдин аягына чейин гүлдөйт. Көчөттөр 7 жашка толгондон кийин гана гүл ачат. Гүлдөрүнүн санына карап Айгүл гүлүнүн жашын аныктоого да болот. Айгүл гүлүнүн жаратылышта башка өсүмдүктөрдөн айырмалап турган мүнөздүү белгиси – гүлдөрүндө эч кандай спецификалык жыты жок. Нектарынын курамында канттын саны өтө аз, гүлдөрүндө курт-кумурскалардын 13 түрү аныкталган жана чаңдашуусу курт-кумурскалар аркылуу ишке ашат. Майдын аяк чендеринде Айгүл гүлүнүн топурактын үстүнкү бөлүгүндө жайгашкан органдары куурап калат. Жаратылышта уругу аркылуу гана көбөйөт, уругунун өнүмдүүлүгү 60% дан кем. Пияз түбү шар сымал, 4 - 9 см калыңдыкта. Сабагы тик, бийиктиги 37-95 смге чейин жетет. Жалбыректары сабагынын жарымын курчаган, төмөнкү жалбыректарынын узундугу 10-15 см, туурасы 5-12 см. Гүл тобунда 15 ке чейин

гүл болот. Гүл коргону ачык - кызыл, кара - кочкул-кызыл, жазы коңгуроодой, узундугу 4,5-6,5 см. Мөмөсү кургак кутуча формада, узундугу 6-7 см, уругу болсо майда күрөң түстө.

Айгүл гүлү (*F. eduardii*) өзүнүн кооздугу менен бир гана Баткен облусунун белгилүү эндемик өсүмдүгү катары таанылбастан бүткүл Кыргызстан үчүн маанилүү жана баалуу өсүмдүк болуп эсептелет. Бүгүнкү күндө бул өсүмдүк жоголуу коркунучундагы пияз түптүү өсүмдүктөрдүн катарына кирет. Айгүл гүлү өскөн жерлер атайын коргоого алынып, аны жулууга, башка жакка алып кетүүгө тыюу салынган.

Магистрдик иштин максаты – *in silico* ыкмаларын колдонуу менен Айгүл гүлүндө жана *Fritillaria* тукумуна кирген башка түрлөрдө ар кандай метаболизм процесстери менен байланышы болгон жаңы микроРНКды аныктоо болуп саналат. Колдонулган программалар; NCBI маалымат базасы, miRBase маалымат базасы, BLASTN программасы, RNAfold Web Server, RNA Hybrid, Clustal Omega жана MEGA11.

Изилдөөнүн алкагында алгач miRBase маалымат базасына киргизилген жалпы өсүмдүктөрдөн 10 494 микроРНК тизмектери алынды. miRBase маалымат базасында бир гана өсүмдүктүктөрдүн эмес, адамдарда, жаныбарларда жана вирустарда бул мезгилге чейин изилдөөлөрү, анализдери жүргүзүлүп, бул жандуу организмдерде табылган микроРНК тизмектери жайгашкан. Ар түрдүү өсүмдүктөрдөн алынган микроРНКлардын нуклеотид тизмектери менен *Fritillaria* тукумуна кирген өсүмдүк түрлөрүнүн нуклеотид тизмектери NCBI маалымат базасында жайгашкан BLASTN программасын колдонуу аркылуу салыштырылды. Салыштыруу адабияттарда көрсөтүлгөн нормаларга жана эрежелерге ылайык жүргүзүлдү. Нормага туура келбеген микроРНК тизмектери кийинки этаптагы анализдерге өткөрүлгөн жок. МикроРНКлар белоктун синтезинде ар түрдүү ролдорду ойногондугуна карабастан, белоктун синтезинде коддолбойт б.а белок синтездебеген тизмектер болуп саналат. Экинчи этапта нуклеотид тизмектеринин салыштырууларынан кийин, окшоштугу болгон пре-микроРНК тизмектери белокту коддоп же коддобогондугу текшерилди. Белок коддобогон микроРНК тизмектери болсо, кийинки этапка өткөрүлдү. Белок коддобогондугу аныкталган pre-miRNA (прекурсор микроРНК) ырааттуулугунун

экинчилик структуралары "RNAfold Web Server" программасы аркылуу аныкталды. Жаңы аныкталган микроРНКлар менен miRBase маалымат базасындагы башка өсүмдүктөрдө аныкталган тизмектердин ортосундагы эволюциялык байланыш Clustal Omega жана филогенетикалык дарак анализдери (MEGA11) менен каралды. Бул микроРНК тизмектеринин бута (мишень) гендери "RNA Hybrid" программасы аркылуу аныкталды. Натыйжада алгачкы жолу *in silico* методдорду колдонуу аркылуу *Fritillaria* тукумунда 5 микроРНК тизмеги жана бута (мишень) гендер аныкталды.

miRBase маалымат базасынан 4 класска таандык болгон 82 өсүмдүк түрүнөн 8615 пре-микроРНК жана 10314 жетилген микроРНК тизмектери алынды. Бул тизмектердин арасынан *Chlorophyta* классына таандык 50 пре-микроРНК жана 86 жетилген микроРНК тизмеги, *Coniferophyta* классына таандык 662 пре-микроРНК жана 669 жетилген микроРНК тизмектери, *Embryophyta* классына таандык 305 пре-микроРНК жана 362 жетилген микроРНК тизектери, *Magnoliophyta* классына таандык 7598 пре-микроРНК жана 9297 жетилген микроРНК тизмектери табылды. микроРНКларды идентификациялоо үчүн микроРНК тизмектери жана *Fritillaria* тукумундагы өсүмдүк түрлөрүнүн нуклеотид ырааттуулугу BLASTN программасын колдонуу аркылуу салыштыруу жүргүзүлдү. Салыштырууда тизмектердин арасындагы нуклеотиттердин ортосунда кеминде ≤ 7 дал келбөөчүлүк болушу абзел. 7 ден көп дал келбөөчүлүк (ката) болсо, анда ал тизмек жараксыз деп табылды. Андан соң BLASTX программасынын жардамы менен бул тизмектердин белокту коддогон же коддобогону текшерилди. МикроРНК тизмектеринин экинчилик структуралары RNA Web Server программасы аркылуу текшерилип, диаграммасы тартылды. Натыйжада *Fritillaria* тукумуна кирген өсүмдүк түрлөрүндө жаңы беш түрдүү микроРНК үй-бүлөлөрү- miR399, miR169, miR391, miR1432 жана miR8602 аныкталды. Жүргүзүлгөн изилдөөдө Айгүл гүлүнө таандык жаңы микроРНК тизмектери табылган жок. Анын себеби Айгүл гүлүнүн геномунун толук кандуу изилденбегендиги деп айтууга болот. *Fritillaria* тукумунда аныкталган жаңы микроРНК үй-бүлөлөрү менен башка өсүмдүк түрлөрүндө аныкталган микроРНКлардын эволюциялык байланышы филогенетикалык дарак түзүлүп талданды. Жыйынтыгында fri-miR399 тизмегинин *Aegilops tauschii* өсүмдүгүнө

таандык болгон ata-miR399b-5p жана *Prunus persica* өсүмдүгүнө таандык ppe-miR399b тизмектери менен жакындыгы бар экендиги байкалды. Ал эми fri-miR169b-3p болсо *Medicago truncatula* (mtr-miR169f-3p) жана *Arabidopsis thaliana* (ath-miR169b-3p) менен, fim-miR391 болсо *Solanum lycopersicum* (sly-miR391) жана *Panax ginseng* (pgi-miR391) менен, fim-miR1432-5p болсо *Aegilops tauschii* (ata-miR1432-3p) жана *Vriesea carinata* (vca-miR1432-3p) менен жакын байланышы бар экендигине байкоо жүргүзүлдү. *Fritillaria* тукумунда жаңы аныкталган fim-miR8602 мындан башка бир гана *Amborella trichopoda* (atr-miR8602) өсүмдүгүндө табылгандыгы да аныкталды. *Fritillaria* түрлөрүндө аныкталган жетилген микроРНК тизмектеринин узундугу 18-23 нуклеотид узундугунда экендиги аныкталды. Жетилген микроРНК тизмектеринин нуклеотид узундуктарынын катышы төмөндөгүдөй болду: эң көп 21 нуклеотид узундугундагы тизмектер 65,65%ды, эң аз 18 нуклеотид узундугундагы тизмектер 1,30%ды, 22 нуклеотид узундугундагы тизмектер болсо 6,52% ды, 19-20 нуклеотид узундугундагы тизмектер болсо 6,95%ды, жана 23 нукеотид узундугундагылар 2,60%ды түздү. Тизмектеги G жана C катышы орточо 51,36% ды түзүп, башка өсүмдүктөрдө жасалган изилдөөлөрдүн жыйынтыктарына салыштырмалуу жогору экендиги байкалды. MFE (Minimum Free Energy) көрсөткүчтөрү болсо -20.5 kcal mol-1 менен -36.4 kcal mol-1 арасында орточо эсеп менен -26.26 kcal mol-1 экендиги аныкталды.

Акыркы жылдары өсүмдүктөрдө коддолбогон РНКнын (ncRNAs) көптөгөн түрлөрү аныкталды. Бул коддолбогон РНКлар РНКнын жетилүүсү, транскрипциянын жөнгө салынышы, посттранскрипциялык РНКнын модификациялары, гендердин экспрессиясы жана нуклеосомалардын ремоделизациясы сыяктуу ар кандай процесстерге катышат. Бул ncRNAs ар кандай зат алмашуу жолдорунда гендердин экпрессиясын жөнгө салуучу катары маанилүү ролду ойной турганы талашсыз. МикроРНКалар бир гана транскрипция стадиясында эмес, трансляция стадиясында да ген экспрессиясын жөнгө салууда маанилүү ролдорду ойногондугу көптөгөн изилдөөлөрдүн жыйынтыгында тастыкталган.

Магистирдик жумуштун алкагында жасалган изилдөөдө *Fritillaria* түрлөрүндө аныкталган микроРНКлардын өсүмдүктүн тиричилигинде, анын

өсүүсүндө, жетилүүсүндө жана температура, нымдуулук, минералдык жана органикалык заттардын жетишсиздиги, топурактын, суунун курамы, бийиктик алкактуулук сыяктуу ар түрдүү сырткы чөйрө факторлорунун таасирлерине туруштук берүүдө же болбосо ыңгайланышуусунда ар кандай ролдорду аткаргандыгы тууралуу изилдөөлөр жүргүзүлүп, бул мезгилге чейинки башка өсүмдүктөрдө жасалган изилдөөлөрдүн жыйынтыктары менен салыштырылды. *in silico* методдорун колдонуу аркылуу изилденип жаткан өсүмдүктө жаңы микроРНКлардын бар же жок экендигин алдын ала билүүгө мүмкүнчүлүк жаралат. МикроРНКлар *in silico* методдору аркылуу аныкталгандан кийин, лабораториялык шарттарда өсүмдүктөрдөн РНКларды бөлүп алып, чын эле бар же жок экендигин тастыктоого болот. Бул болсо өз учурунда лабораториялык изилдөөлөргө кеткен убакытты үнөмдөөгө мүмкүндүк түзөт.

Негизги сөздөр: Айгүл гүлү, *in silico*, эндемик өсүмдүк, miRNA (микроРНК)

МИКРОРНК АНАЛИЗ ВИДОВ ОТНОСЯЩИХ К РОДУ *FRITILLARIA* И ЭНДЕМИЧНОГО РАСТЕНИЯ КЫРГЫЗСТАНА *FRITILLARIA EDUARDII*

Даниел Кимсаналиев

Кыргызско-Турецкий Университет “Манас”, Институт естественных наук

Магистрская диссертация, Июнь 2022

Научный руководитель: Ph.D., и.о доцент Йылмаз Кайа

Соруководитель: Ph.D., доцент Севги Маракли

КРАТКАЯ АНОТАЦИЯ

Цветок Айгул (*F. eduardii*) является важным и ценным растением для всего Кыргызстана, а не только как известное растение-эндемик Баткенской области. Сегодня это растения находится под угрозой исчезновения. Земли, на которых растут цветы Айгул, особо охраняются, вырывать их с корнем и увозить запрещено.

Целью магистерской работы является выявление новых микроРНК с использованием методов in silico в цветке Айгул и видов относящих к роду *Fritillaria* которые связаны с различными метаболическими процессами. Используемые приложения; база данных NCBI, база данных miRBase, программное обеспечение BLASTN, RNAfold Web Server, RNA Hybrid, Clustal Omega и MEGA11. Первоначально в рамках исследования было получено 10 494 микроРНК различных растений из базы данных miRBase. Полученные микроРНК сравнивали с помощью программы BLASTN в базе данных NCBI. Вторичные структуры соответствующей последовательности пре-миРНК (микроРНК-предшественника) идентифицировали с помощью программы RNAfold Web Server. Эволюционная связь между недавно идентифицированными микроРНК и последовательностями, идентифицированными у других растений в базе данных miRBase, была исследована с помощью Clustal Omega и анализа филогенетического дерева (MEGA11). Гены-мишени этих последовательностей микроРНК идентифицировали с помощью программы RNA Hybrid. В результате впервые с помощью силико-методов у цветка Айгул было идентифицировано 5 микроРНК и генов-мишеней.

Ключевые слова: цветок Айгул, *in silico*, микроРНК

MIRNA ANALYSES IN ENDEMIC *FRITILLARIA EDUARDII* GROWN IN KYRGYZSTAN AND OTHER SPECIES BELONGING TO *FRITILLARIA* GENUS

Daniel KIMSANALIEV

Kyrgyzstan-Turkey Manas University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

M.Sc. Thesis, June 2022

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Yilmaz KAYA

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sevgi MARAKLI

ABSTRACT

The Aigul plant (*F. eduardii*), due to its beauty, is an important and valuable plant for the whole of Kyrgyzstan, as well as a well-known endemic plant of the Batken region. Today, this plant is found in its natural environment in a limited number and threatened with extinction due to illegal removals. Aigul plant is under the protection of local government institutions and grazing is prohibited in the area where it blooms. Reproduction of this plant in nature is one of the current problems of today.

Aim of this thesis study is to determine new miRNA sequences associated with different metabolic pathways in Aigul tulip and other species belonging to *Fritillaria* genus by using *in silico* methods. The databases and programs used in the thesis study are NCBI database, miRBase database, BLASTN program, RNAfold Web Server, RNA Hybrid, Clustal Omega, MEGA11. To achieve the aim of the thesis, reference 10 494 miRNA sequences belonging to different plants in miRBase database were obtained. The obtained reference miRNA sequences were screened according to the methods applied in the thesis. The nt database of the same plant was compared using the BLASTN program found in NCBI database. The secondary structures of suitable miRNA (pre-miRNA) sequences were determined using the “RNAfold Web Server” program. Moreover, the evolutionary relationship between the newly identified miRNA sequences and reference miRNAs were examined by alignment (Clustal Omega) and phylogenetic tree analyses (MEGA11). The target genes of these miRNA sequences were identified with the "RNA Hybrid" program. As a result, 5 miRNA sequences including miR399, miR169, miR391, miR1432 and miR8602and target genes were determined for the first time in *Fritillaria* genus. However, no miRNA was identified in

Aigul tulip. Since there is no detailed genome information about the Aigul plant. This thesis is the first detailed review of the different miRNA families and their targets in the genus *Fritillaria*. It is expected that the results obtained will form the basis for biotechnological analyzes in members of this genus.

Key words: Aygul plant, endemic plant, epigenetics, small non-coding RNAs

İÇİNDEKİLER

KIRGIZİSTANDA YETİŞEN ENDEMİK *FRİTİLLARİA EDUARDİİ* BİTKİLERİNDE VE *FRİTİLLARİA* CİNSİNE AİT DİĞER TÜRLERDE MİRNA ANALİZLERİ

Sayfa

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK i
ПЛАГИАТ ЖАСАЛБАГАНДЫГЫ ТУУРАЛУУ БИЛДИРҮҮ ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK iii
ЭРЕЖЕЛЕРГЕ БАШ ИЙҮҮ iv
KABUL VE ONAY v
КАБЫЛ АЛУУ ЖАНА ЧЕЧИМ vi
TEŞEKKÜR vii
ÖZET viii
КЕҢИРИ АНОТАЦИЯ x
КРАТКАЯ АНОТАЦИЯ xv
ABSTRACT xvi
KISALTMALAR VE SİMGELER xxi
TABLOLAR LİSTESİ xxii
ŞEKİLLER LİSTESİ xxiii

I BÖLÜM

1. GİRİŞ VE AMAÇ 1

I BÖLÜM

GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÇALIŞMASI

2. *Lilieaceae* ailesi 4
2.1 *Fritillaria* cinsi 5
2.2 *Fritillaria* yapısı ve gelişmesinin tarihsel süreci 7
2.3 *Fritillaria'nın* tıbbi ve aromatik önemi 7
2.3.1 Antibakteriyel ve antiviral etkiler 8
2.3.2 Antioksidan etki 8

2.3.3 Toksisite 9
2.3.4 Diğer etkiler 9
2.4 Aygül Lalesi (*F. eduardii*) 10
2.5 Aygül bitkisinin (*Fritillaria eduardi*) tarihçesi 12
2.6 *Fritillaria eduardii* tarihçesi 13
2.7 *Fritillaria eduardii*'nin biyolojik özellikleri 14
2.7.1 Morfolojik yapısı 15
2.7.2 Kök sistemi 15
2.7.3 Gövdesi 15
2.7.4 Yaprağı 16
2.7.5 Çiçeklenme ve tozlaşma 16
2.8 *F. eduardinin* yaşam döngüsü 18
2.7 Aygül Lalesi ve Kırmızı Kitap 19
2.10 Kodlama Yapmayan RNA (ncRNAs) 20
2.11 ncRNA'ların isimlendirilmesi ve sınıflandırılması 20
2.12 ncRNA'ların önemi 21
2.13 Mikro RNA (miRNA) 22
2.13.1 miRNA sentezi 22
2.13.2 Önemli bir epigenetik mekanizma olarak miRNA 23

III BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3. MATERYAL VE YÖNTEM 24
3.1 Referans miRNA dizilerinin elde edilmesi 24
3.2 Karşılaştrma Analizleri 24
3.3 Eleme Süreci 25
3.4 pre-miRNA Yapılarının Oluşturulması 26
3.5 Evrimsel süreç ile ilgili Analizler 26
3.6 miRNA Hedef Genlerinin Hedeflenmesi 27

IV BÖLÜM

BULGULAR

4. BULGULAR 28
4.1 Referans miRNA Dizilerinin Elde Edilmesi 28
4.2 Aday miRNA'ların belirlenmesi ve ikincil yapılarının çizilmesi 28

4.3 Evrimsel ilişkilerin analizi 33
4.3.1 miRNA399 ailesine özgü dizilerin analizi 33
4.3.2 miRNA169 ailesine özgü dizilerin analizi 37
4.3.3 miRNA391 ailesine özgü dizilerin analizi 44
4.3.4 miRNA1432 ailesine özgü dizilerin analizi 45
4.3.5 miRNA8602 ailesine özgü dizilerin analizi 48
4.6 miRNA Hedef Genlerinin Hedeflenmesi 49

V BÖLÜM

TARTIŞMA VE SONUÇ

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 51
KAYNAKÇA 57
ÖZGEÇMİŞ ..... **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

KISALTMALAR VE SİMGELER

Simgeler	Anlamı
>	Büyük
<	Küçük
%	Yüzde

Kısaltmalar	Açıklama
nt	Nükleotit
NCBI	National Center for Biotechnology Information
BLASTN	Temel Lokal Hizalama Arama Nükleotit Aracı
NGS	Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri
IUCN	Uluslararası Doğayı Koruma Birliğinin
Bç	Baz çifti
DNA	Deoksiribonükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
miRNA	mikro RNA
mRNA	Haberci RNA
ncRNA	Kodlama yapmayan RNA
siRNA	Küçük interferans RNA
snoRNA	Küçük nükleolar RNA
fRNA	Fonksiyonel RNA
snmRNA	Küçük mesajcı olmayan RNA
ENCODE	DNA Elementlerinin Ansiklopedisi

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1 Blast analizlerinde kullanılan parametreler 25
Tablo 3.2 Hedef genleri tespitinde kullanılan blast parametreleri 27
Tablo 4.1 *Fritillaria* cinsinde yeni tanımlanan pre-miRNA'ların özellikleri 32
Tablo 4.2 *Fritillaria* cinsinde tanımlanan miRNA dizilerinin hedef genleri 50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 *Fritillaria*'nın alt tür sınıflandırması 5
Şekil 2.2 Orta Asya'da var olan başlıca *Fritillaria* türleri.....6
Şekil 2.3 Aygül bitkisinin çiçekleri 16
Şekil 2.4. Aygül bitkisinin yaşam döngüsü. 18
Şekil 4.1 fri-miR399 dizisinin ikincil yapısı.....29
Şekil 4.2 fri-miR169 dizisinin ikincil yapısı.....29
Şekil 4.3 fim-miR391 dizisinin ikincil yapısı.....30
Şekil 4.4 fim-miR1432 dizisinin ikincil yapısı.....30
Şekil 4.5 fim-miR8602 dizisinin ikincil yapısı.....31
Şekil 4.6 miR399 ailesinin hizalama sonuçları.....33
Şekil 4.7 miR399 ailesinin hizalama sonuçları.....36
Şekil 4.8 miR399 ailesinin filogenetik ağaç sonuçları 37
Şekil 4.9 miR169 ailesinin hizalama sonuçları.....40
Şekil 4.10 miR169 ailesinin hizalama sonuçları.....41
Şekil 4.11 miR169 ailesinin hizalama sonuçları.....42
Şekil 4.12 miR169 ailesinin filogenetik ağaç sonuçları 43
Şekil 4.13 miRNA391 ailesinin hizalama sonuçları.....44
Şekil 4.14 miR391 ailesinin filogenetik ağaç sonuçları 45
Şekil 4.15 miRNA1432 ailesinin hizalama sonuçları.....46
Şekil 4.16 miR1432 ailesinin filogenetik agaç sonuçları 47
Şekil 4.17 miRNA8602 ailesinin hizalama sonuçları.....48

I BÖLÜM

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yerküremiz uzayda yer alan milyonlarca, milyarlarca gezegen ve yıldızların arasında hayatı barındıran tek gezegendir. Uzmanların bilgilerine göre dünyada canlı organizmaların 1.7 milyon çeşidi bulunmaktadır. Bu çeşitler (hayvanlar, bitkiler, mantarlar ve mikroorganizmalar gibi), dünyanın değişik bölgelerine dağılmıştır. İklim, sıcaklık, nem, coğrafik özellikler vb. faktörler, canlı organizmaların yaşamını sürdürebilmesi ve devam ettirebilmesi için büyük önem göstermektedir. 4.5 milyar senelik geçmişe sahip olan dünyamız zamanın geçmesiyle her türlü değişikliklere maruz kalmıştır. Ekosistemdeki meydana gelen değişikliklerden dolayı yeni şartlara adapte olamayan canlı organizmaların nesli tükenerek yok olmuştur [1].

Bitkiler ekosistemin ve yaşamın meydana gelmesinde büyük rol oynamaktadır. Canlıların yaşamını devam ettirebilmesi için olmazsa olmaz maddelerden biri olan oksijenin (O_2) büyük kısmı, bitkilerin kloroplastlarında gerçekleşen fotosentez reaksiyonunun ürünüdür. Ekosistemdeki canlıları gıda tüketimine göre ototrof ve heterotrof olarak sınıflandırmaktayız. Ototroflar, su (H_2O), karbondioksit (CO_2) ve inorganik tuzlardan organik maddeler oluşturan, enerjiyi bu organik bileşiklerde depolayan ve kendi besinlerini kendileri sentezleyen canlı organizmalardır. Heterotroflar ise besinlerini diğer türlü organizmaların biyokütlelerinden sağlayan canlı organizmalardır. Bitkiler de ototrof olarak diğer sınıflara ait canlılar için gerekli olan besin (enerji) üretmektedir bu da bitkilerin ekosistemin besin zincirindeki önemini vurgulamaktadır [1].

Uluslararası Doğayı Koruma Birliğinin (IUCN) verdiği bilgilere göre dünyada 320 000 den fazla bitki türü vardır. Botanikçiler ve araştırmacıların yeni bulgularıyla bitki türlerinin sayısının çoğalmasına rağmen bitkilerin biyoçeşitliliği tehlike altındadır. Endemik bitkiler, genellikle floranın en savunmasız ve hassas bileşenlerindendir. Çünkü bunlardan herhangi birinin kaybı, genel olarak biyoçeşitlilik için telafi edilemez bir kayıp anlamına gelmektedir. Bu nedenle, endemik bitkilerin korunması hayati önem taşımaktadır [2].

Fritillaria L. (*Liliaceae*) 100'den fazla türden oluşur. Jeofitik çok yıllık olan bu bitkiler genelde Avrupa (çoğunluk Akdeniz bölgesinde), Orta Asya, Çin, Japonya ve Kuzey Amerika'da yayılmıştır. *F. chitralensis, F. eduardii, F. imperialis* ve *F. raddeane* olmak üzere dört türden oluşur. *F. chitralensis* Afganistan ve Pakistan'ın kuzey bölgelerinde bulunmaktadır. *F. eduardii (Regel ex Lozinsk.*) ise nadir görülmektedir. *F. imperialis* türü, Anadolu'dan Himalaya dağlarına kadar yer alan geniş bir bölgede yer almaktadır. *F. raddeana (Regel) Vved. ex Pazij* türü ise Kopetdag (Aşhabat, Türkmenistan) bölgesinde bulunan endemik bir bitkidir. Bu türün öbürlerinden farkı çiçeklerinin yeşil sarımtırak renginde olmasıdır [3].

Aygül bitkisi (*Fritillaria eduardii*) Kırgızistan'ın endemik bitkisi olarak sadece sınırlı bir bölgede değil dünyaca meşhur süs bitkisi olarak tanınmaktadır. Günümüzde, bu bitki doğal ortamında sınırlı sayıda bulunmakta ve kaçak sökümler nedeniyle nesli tükenme tehdidi altındadır. Buna karşılık, Aygül bitkisi yerel yönetim kurumların koruması altındadır ve çiçek açtığı alanda otlatma yasağı getirilmiştir. Geleneksel çoğaltım yöntemlerinin çoğaltım katsayısı ve hızı bakımından yetersiz kaldığı bilinmektedir. Bu nedenle bitki biyoteknolojisi yöntemlerini kullanarak Aygül bitkisinde de etkin bir çoğaltım tekniğini geliştirmek ve genomunda detaylı analizleri gerçekleştirmek büyük önem taşımaktadır [4].

Gelişen NGS (Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri) sayesinde canlıların genomları kısa sürede dizilenebilmekte ve kullanılan farklı biyoinformatik araçlar ile elde edilen diziler anlamlandırılmaktadır. Bu teknoloji, omik teknolojilerinin çağını başlatmış ve genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi sistem biyolojisinin anlaşılmasına katkı sağlayacak farklı molekülleri inceleyen bilim dalları oluşmuştur [5]. DNA dizisinde herhangi bir farklılık olmadan meydana gelen kalıtsal olabilen ya da kalıtsal olmayan değişikliklerin adı olarak tanımlanan Epigenetik ile ilgili araştırmalar da Epigenomik bilim dalı altında yürütülmeye başlanmıştır. Bu dal, diğer omik teknolojilerinden farklı olarak sadece tek bir molekül ya da yapı üzerinde çalışmaz. Yukarıda birkaç tanesi verilen omik teknolojilerinin herbirinin de kendi içinde epigenomları vardır yani epigenomik tüm omik teknolojilerini kapsayan geniş bir çalışma konusuna sahiptir [6]. Histon asetilasyonu/deasetilasyonu, DNA metillenmesi ve transpozonlar, epigenetik mekanizmalar içinde yaygın olarak çalışılan araştırma konularıdır [7]. Bu alanlara ek olarak özellikle son zamanlarda kodlama yapmayan

RNA (Non-coding RNA - ncRNA) dizilerinin de farklı canlılardaki etkileri yaygın olarak çalışılmaktadır [8]. Kodlama yapmayan RNA'lar (ncRNA'lar), herhangi bir protein kodlamamasına karşın fonksiyonu olan dizilerdir. Bu diziler arasında; siRNA (küçük interferans RNA), snoRNA (küçük nükleolar RNA), fRNA (fonksiyonel RNA) ve snmRNA (küçük mesajcı olmayan RNA) dizileri sayılabilir [9]. Bu farklı RNA çeşitlerinin farklı yapısal özellikleri vardır ve genel olarak hepsi gen anlatımının düzlenlenmesinde görevlidir [10]. Gen anlatımının post-transkripsiyonel ya da post-translasyonel aşamalarında görev alan yaklaşık 22 nt uzunluğunda olan miRNA (micro RNA) dizileri de son yıllarda farklı bitki ve hayvan türlerinde yaygın olarak çalışılan kısa ncRNA sınıfında olan dizilerdir. Mesajcı RNA (mRNA) dizisine tamamlayıcı olarak bağlanır, mRNA dizinin yıkılmasına ve/veya inhibisyonuna neden olarak gen anlatımını düzenler [11]. Bununla birlikte farklı olarak miRNA'ların genlerin promotör dizilerine bağlanarak gen anlatımını arttırdığı da bilinmektedir [12].

Bu tez çalışmasının amacı; Aygül lalesinde ve *Fritillaria* cinsine ait diğer türlerde farklı metabolik yolaklarda rol oynayan yeni miRNA dizilerinin farklı *in siliko* yöntemler kullanılarak belirlenmesidir. Bu amaçla, miRBase veri tabanında bulunan referans miRNA dizileri indirildi. Bu miRNA dizileri, BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide - Temel Lokal Hizalama Arama Nükleotit) programında kullanıldı. Bu programda, *Fritillaria* (taxid:59070) bitkisine ait nükleotit (nucleotide collection nr\nt) veri tabanı kullanılarak karşılaştırma gerçekleştirildi. Belirlenen kriterlere uygun olan pre-miRNA (öncül miRNA) dizilerinin ikincil yapıları ise "RNAfold Web Server" programı kullanılarak çizildi. Filogenetik analizler kapsamında *Fritillaria* bitkisinde tanımlanan miRNA dizileri ile referans miRNA dizileri arasındaki evrimsel ilişki, hizalama (Clustal Omega) ve filogenetik ağaç analizleri (MEGA11) ile analiz edildi. Hedef genlerin belirlenmesinde de hem BLASTN hem "RNA Hybrid" programları kullanıldı.

II BÖLÜM
GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÇALIŞMASI

2. *Lilieaceae* ailesi

Zambakgiller ailesi (*Liliaceae*) *Lilales* takımına ait bitkidir. 16 dan fazla cinse ve 635 ten fazla türe sahiptir. Genelde ılıman ve suptropikal bölgelerde yetişir, esas olarak sıcak ortamlarda büyür. Ailenin üyeleri genellikle altı parçalı çiçeklere ve üç odacıklı kapsüler meyvelere sahiptir. Yapraklar genellikle paralel damarlara sahiptir ve bitkinin tabanında kümelenir fakat gövde boyunca değişerek sarmallar halinde düzenlenebilir. Zambaklar sınıfı dünya çapında geniş alanlara yayılmış ve biyocoğrafik olarak yer küremizin her türlü alanlarından yer almıştır. Kök ve sürgün sistemleri gelişmiştir. Kök sistemi, bitkinin tüm kök kısmını içermektedir. Sürgün sistemi bitkinin yapraklarından, çiçeklerinden, uç tomurcuğu ve diğer toprak üstünde yer alan kısımlardan oluşmaktadır. Tohumları 2 veya 3 hücreden oluşmuştur ve endospermden büyümektedir [13].

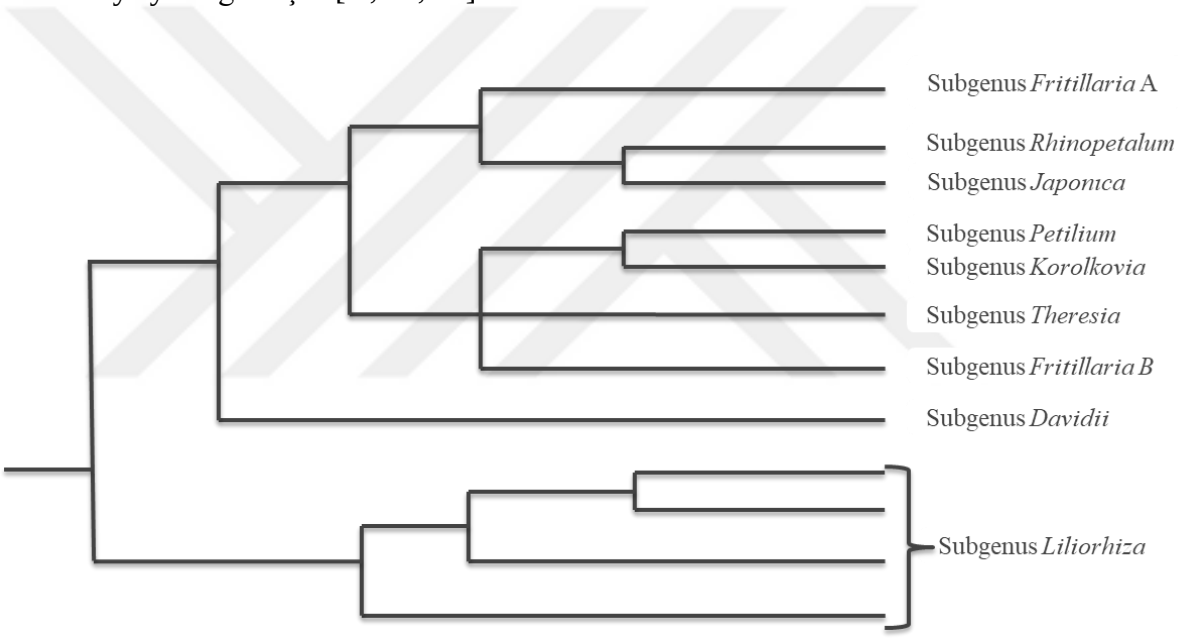
Gününmüze kadar zambakgiller *(Lilieaceae)* dekoratif, tıbbi bitki olarak ve yemek kültüründe geniş olarak kullanılmıştır ve kullanılmaktadır. Son zamanlarda çoğunluk ülkelerde ıslah ve hibridizasyon yöntemlerinin gelişmesiyle çeşitli hastalıklara ve her türlü stres faktörlerine dirençli bitkiler üretilmektedir. Böyle yöntemlerin kullanılması, nesli tükenmekte olan bitkileri korumada büyük katkı sağlamaktadır. Çünkü gün geçtikçe zambakgillerin doğada bulunan türleri tahrip olmakta ve nesli tükenme tehlikesi artmaktadır. Bu bitkileri koruma aktual problemlerin listesinden yer almaktadır. 1984 te SSCB dönemi Kırmızı Kitabında yer alan zambakgillerin 6 türü kayıt edilmiş ve zambakgillerin yetiştiği bölgeler korunma altına alınmıştır [14].

Yerküremizde zambakgiller çoğunluklu olarak küzey yarı küre – Doğu Asya, Sibirya: Himalay, Küçük Asya, Kafkaz, Avrupa ve Küzey Amerika gibi bölgelerde yaygınlaşmıştır. Doğu Asya, Güney Doğu ve Merkezi Çinde zambakların tür çeşitliliği geniş yaygınlaşmıştır. Küzey Amerika zambakgillerin memleketi olarak tanımlanır. "Zambak" kelimesi eski yunancadan tercüme edildiği zaman *leirion* - beyaz, temiz ve pak anlamına gelmektedir. *Leirion* kelimesi sonradan *lirium, lilium* olarak kullanılmaya başlanmıştır. İlk olarak bu kelimelerden *Lilium candidum* kelimesi türetilmiştir. Zambakgillerle alakalı yazılan ilk kitap D. Parkinsona aittir ve 1629 da yazılmıştır.

Kitapta zambakgillerin 5 türü (*L. canadence, L. pomponium, L. chalcedonicum, L. carniolicum, L. pyrenaicum*) tarif edilmiştir. Karl Linney ilklerden olarak zambakgilleri adlandırmış ve tarifini yazmıştır [14].

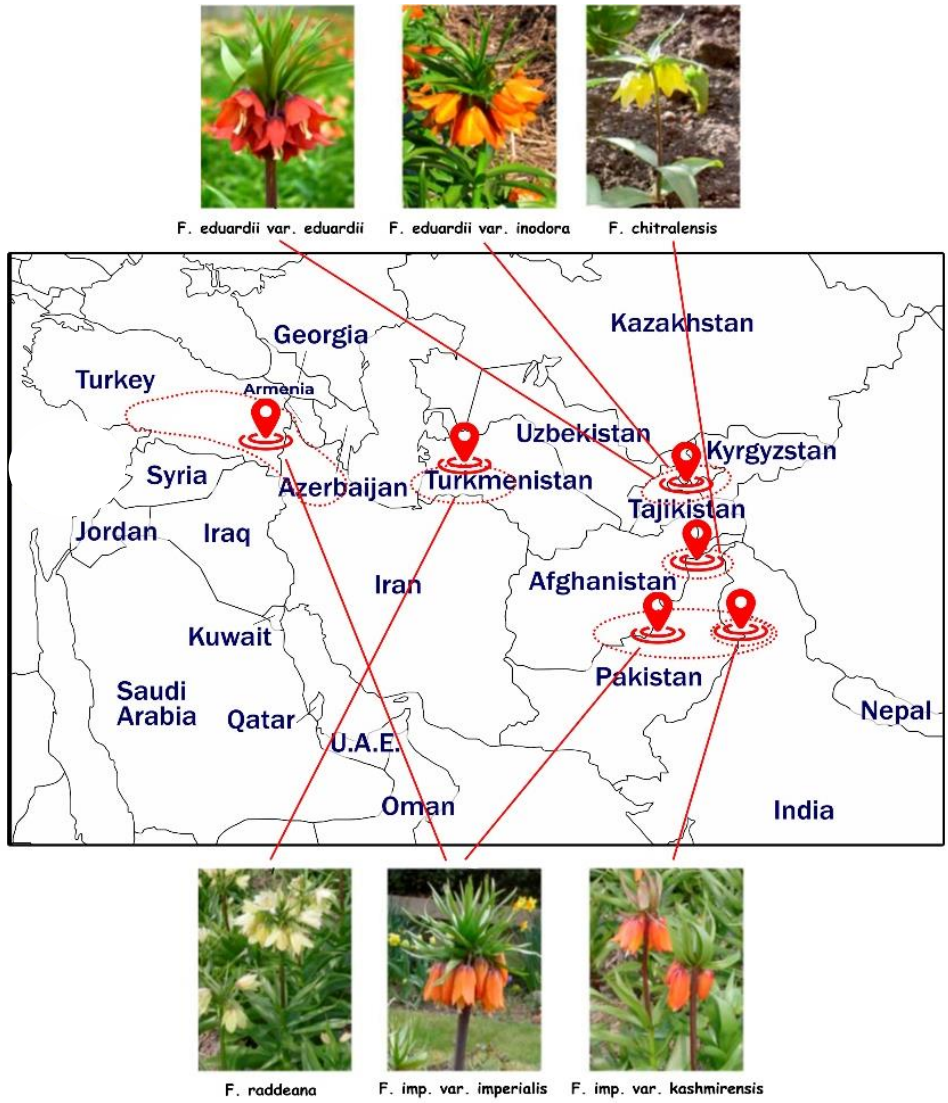
2.1 *Fritillaria* cinsi

Fritillaria cinsi, yaklaşık 140 soğanlı otsu çok yıllık türden oluşmaktadır [15, 16, 17]. Cins genel olarak iki dala ayrılmakta ve bu iki dalda *Fritillaria, Rhinopetalum, Japonica, Petilium, Korolkovia, Theresia, Davidii ve Liliorhiza* olmak üzere sekiz tür bulmaktadır (Şekil 2.1). Bir dal, ağırlıklı olarak Kuzey Amerika'nın batı bölgelerinde bulunan *Liliorhiza* alt cinsine ait türleri içerir. Diğer türler ise ikinci dalda bulunur ve Avrasya'ya dağılmıştır [3, 16, 18].



Şekil 2.1 *Fritillaria*'nın alt tür sınıflandırması [18]

Avrupa (çoğunluk Akdeniz bölgesinde), Orta Asya, Çin ve Japonya gibi bölgelerde *F. chitralensis, F. eduardii, F. imperialis* ve *F. raddeane* olmak üzere dört farklı *Fritillaria* türü bulunmaktadır (Şekil 2.2). *F. chitralensis* Afganistan ve Pakistanın kuzey bölgelerinde bulunurken *F. eduardii (Regel ex Lozinsk.*) nadir görülmesiyle özellik kazanmıştır. *F. imperialis* türü, Anadolu'dan Himalaya dağlarına kadar yer alan geniş bir bölgede yer almaktadır. *F. raddeana (Regel) Vved. ex Pazij* türü Kopetdag (Aşhabat. Türkmenistan) bölgesinin endemik bir bitkisidir. Bu türün öbürlerinden farkı çiçeklerinin yeşil sarımtırak renginde olmasıdır.



Şekil 2.2 Orta Asya'da var olan başlıca *Fritillaria* türleri

Ters lale; zambakgiller familyasının bir üyesi olan *Fritillaria* cinsinin genel adıdır. Bu isim çiçeklerinin aşağıya eğik halde olmasından dolayı verilmiştir. Türkiye'de bu bitki türlerine halk arasında ağlayan gelin, kral lalesi, şerefeli lale, Şemdinli lalesi gibi isimler verilmektedir. *Fritillaria* cinsi; Kırgızistan, Tacikistan, Özbekistan, Kuzey Irak, İran, Afganistan, Pakistan ve Keşmir gibi dünyanın değişik coğrafyalarında yayılış göstermektedir. Dağ yamaçlı yüksekliklerde ve çalılıklarda deniz seviyesinden 1200-2500 metre yüksekliklerde yetişmektedir. Ters lale bitkisinin gövdesi bir metreye kadar uzayabilmektedir. Bitkinin gövdesinin tepesinde ve çiçeklerin üstünde ince mızrak şeklindeki yaprakları bulunmaktadır. Gövdenin tepesinde yer alan çiçekleri ağzı aşağıya eğik, çan şeklinde 5-9 adettir. Çiçeklerinde nektar salgılayan bezler bulunur ve vaktiyle

nektar damlar. Bu cinse ait türlerin başka tür bitkilerden ayrıt eden karakteristiksel özelliklerinden biri de hoş olmayan kokuya sahip olması ve bazı türlerinde hiç koksunun olmamasıdır. Bu kokunun fareleri uzaklaştırıcı etkisi olduğu rapor edilmiştir [19].

2.2 *Fritillaria* yapısı ve gelişmesinin tarihsel süreci

Fritillaria cinsine ait bitkiler, dağ yamaçları ve çalılıklarda deniz seviyesinden 1200-2500 metre arasındaki yüksekliklerdeki yetişmektedirler. Batı Avrupa, İran, Afganistan ve Türkiye'nin dağlarında büyüyen bu bitkilerden Aygül lalesi gibi bazı türlerinin boyu bir metreye kadar çıkabilmektedir. Yaprakları ince mızrak şeklinde gövdelerinin tepesinde ve çiçeklerinin üstünde demet halinde bulunur. Çiçeklerin renkleri çeşitli tonlarda olur. En çok sayıda karşılaşılanları da sarı, kırmızı ve turuncu renkleridir. Bu cinsin en karakteriksel özelliklerinden birisi de hoş olmayan çiçek kokusuna sahip olmasıdır ve bazı türlerde ise hiç koku yoktur [19].

16. yüzyılda Türkiye'den Batı Avrupa'ya getirilmiştir ve süs bitkisi olarak kullanılmaya başlanmıştır. 1553'de İtalya'nın Vener padişahının bahçesinde Leyden Karl Kluziust tarafından yetiştirilmeye başlanmıştır. Bitkinin çiçekleri taca benzer bir şekilde çiçek açtığı için 1573'ten itibaren "Padişah tacı" olarak tanınmıştır. 1574'ten itibaren ise botanik literatürlerinde *Corona imperialis* olarak adlandırılmaya başlanmıştır [20]. *Fritillaria,* 1753'te Linnaeus tarafından tanımlanan Avrupa'daki ilk bahçe bitkilerinden biriydi. Bu tarihten itibaren bitki, çeşitli taksonomik sınıflandırmalar altında yer almıştır [21]. Türkiye'deki en büyük dördüncü geofit bitki cinsidir. Türkiyede, %36,53 endemizm oranı ile *Fritillaria*'nın 41 taksonu bulunmaktadır ve cins için çeşitlilik merkezi olarak kabul edilebilir [22].

2.3 *Fritillaria'nın* tıbbi ve aromatik önemi

Fritillaria soğanları Uzakdoğu başta olmak üzere yayılış gösterdiği ülkelerde, binlerce yıldan beri geleneksel tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır. *Fritillaria* türlerinin soğanlarından; öksürük ve boğaz ağrısı giderici, balgam söktürücü, ateş düşürücü, akciğeri nemlendirici, yüksek tansiyon düşürücü, astım, sıraca, ve bronşit tedavi edici olarak yararlanıldığı bilinmektedir. *Fritillaria* türlerinden alınan doğal ürünler, öksürük tedavisinde kullanılan ilaçlarla karşılaştırıldığında avantajlarının çok olduğu ve daha az

yan etki gösterdiği veya hiç yan etki göstermediği görülmektedir [23, 24, 25]. *Fritillaria* türlerinin en büyük fotokimyasal bileşeni olan ve tüm bileşenlerin yaklaşık %42,32'sini oluşturan alkaloidler, çeşitli yollarla indüklenen akciğer hasarını azaltan potansiyel ajanlar olarak kabul edilmektedir [26]. İçerdiği steroidal alkaloitler nedeniyle *Fritillaria*'ların, modern tıpta ilaç sanayinde de kullanım alanı söz konusudur. *Fritillaria* türlerinde alkaloitlerin dışında ayrıca saponin, sterol, polisakkarit, nişasta, flavonoit, yağ asitleri, organik asitler ve uçucu yağların bulunduğu da belirlenmiştir [27].

2.3.1 Antibakteriyel ve antiviral etkiler

Bakterilere, mantarlara ve virüslere karşı biyoaktif bileşenleri tanımlamak için dünya çapında şifalı bitkiler üzerinde yapılan farmakolojik araştırmalar, antibiyotik direnciyle mücadele için alternatif hale gelebilir [28]. *Fritillaria* cinsine ait bitkilerden alınan ekstrakların bakteri ve virüslere karşı etkisinin olduğu tespit edilmiştir. *F. thunbergii* ile ilgili yapılan çalışmalarda, bu bitkiden elde edilen ekstraktların altı *Helicobacter pylori* suşuna karşı oldukça inhibe edici olduğunu görülmüştür [29]. Bu bitkinin antibakteriyel etkisinin yanı sıra *in vitro, in ovo* veya *in vivo* toksisiteyi indüklemeden antiviral etkisinin de olduğu H1N1 virüsünde yapılan araştırmalar sonucunda belirlenmiştir [30]. Ayrıca, *Fritillaria verticillata* bitkisinin; *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus* ve *Micrococcus luteus* dahil olmak üzere üç bakteriye karşı antibakteriyal aktivite sergilediği de rapor edilmiştir [31].

2.3.2 Antioksidan etki

Antioksidan etkinin *Fritillaria* cinsinde türe bağlı olarak farklı olduğu bildirilmiştir. Li *et al*. [32] yaptıkları çalışmada, *F. ussuriensis* ekstraktlarının antioksidan aktivitesinin farklı polarite ile azaldığını rapor etmiştir (ham favonoid ekstraktı>ham saponin ekstraktı>etanol ekstraktı). *Fritillaria* soğanlarında bol miktarda üç izosteroidal alkaloidin (peimisine, peimine ve peiminine) bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *F. pallidifora*'dan elde edilen FPSP-H2-1 molekülünün de DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), hidroksil ve ABTS (2,2′-azinobis-(3- etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)) radikallerine karşı güçlü antioksidan özellik gösterdiği de rapor edilmiştir [33, 34, 35]. *F. cirrhosa*'dan elde edilen farklı kimyasal yapılara sahip altı izosteroidal alkaloidin

(vertisinon, vertisin, imperyalin-3-β-D-glikozid, delavin, imperyalin ve peimisin) karşılaştırma analizleri; bitkide bulunan bu kimysalların antioksidan etkilerinin olduğu ve bu alkaloidlerin arasından vertisinon, vertisin, imperiyalin-3-β-D-glikozid, delavin ve peimisinin oksidatif strese karşı imperyaline göre daha güçlü etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu bulgular ilk kez *F. cirrhosa*'nın, Nrf2 aracılı antioksidan yolağını aktive ederek hücresel oksidatif streste koruyucu bir rol oynayabileceğini göstermiştir. Bu araştırmada, *F. cirrhosa*'nın oksidatif stresle ilişkili hastalıkların önlenmesi için umut verici bir terapötik tedavi olabileceği de rapor edilmiştir [36].

2.3.3 Toksisite

Fritillaria cinsine ait türlerin kurutulmuş soğanlar, son derece düşük bir toksisite sergiler. Li *et al*. [37], *Fritillaria* cinsinin başlıca şifalı bitkilerinden biri olan *F. thunbergii*'nin toksisite özelliklerini araştırmıştır. Farklı bir çalışmada da *F. thunbergii*'nin su ekstraktının tahmini öldürücü dozu (LD_{50}) 52.2 $mg\,kg^{-1}$ olarak bildirilmiştir [38]. *F. cirrhosae* ve *F. pallidiflora* özleri arasındaki toksisite ve geleneksel farmakolojik etkilerin karşılaştırmalı bir değerlendirmesinde ise farelerde (LD_{50}) değeri 213.57g kg^{-1} ve maksimum uygulanabilir doz değeri ise 452.14g kg^{-1} olarak hesaplanmıştır [39]. *Fritillaria* türleri, çeşitli tümör hücrelerine belirli sitotoksisiteye sahiptir. *F. cirrhosa*'nın sulu özütünün, mitotik kontrol noktasını işlevsiz hale getirerek insan kolon epitelyal NCM460 hücrelerinde mitotik sapmaları, anormallikleri ve kromozomal kararsızlığı indüklediği rapor edilmiştir [40, 41]. *F. imperialis*'in sulu ve alkollü özlerinin ise insan karaciğer kanseri hücrelerine ve meme kanseri hücrelerine karşı sitotoksik, sitostatik ve proapoptotik etkilere sahip olduğu ve ayrıca alkollü özütün sulu özütten daha etkili olduğu da kanıtlanmıştır [42].

2.3.4 Diğer etkiler

Antihipertansif etki, *Fritillaria* türlerinin geleneksel etnofarmakolojik özelliklerinden farklı olan yeni bir farmakolojik etkidir. *F. ussuriensis*'in su ektraktının, sistolik kan basıncının artışını önleyebildiği rapor edilmiştir [43]. Ticari tür olan *F. cirrhosa* ve *F. pallidifora'*dan elde edilen etanol ekstraklarının kulak ödemi gelişimini engellediği de tespit edilmiştir [44]. Başka bir çalışmada; *F. unibracteata* ve *F. yuminensis* kaynaklı perimisin-3-O-β-d-glikopiranozidinin, rotenondan etkilenen PC12

hücrelerinde nörotoksisiteye karşı orta koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir [45]. *F. ussuriensis*'in etanolden elde edilen özütünün sıçan mast hücrelerindeki pasif anafilaksi tepkisini ve histamin salınımını önemli ölçüde inhibe ettiği görülmüştür [46]. *Fritillaria* türlerinden ekstrakte edilen ve tanımlanan vertikinonun, muhtemelen periferik ve merkezi mekanizmalar yoluyla inflamatuvar ve kansere bağlı nöropatik ağrıda iyi bir antinosiseptif etkiye sahip olabildiği de rapor edilmiştir [47]. Bununla birlikte, *F. imperialis*'in soğanlarından izole edilen beş izosteroidal alkaloidin (imperiyalin, fortisin, persikanidin, imperisin ve delavin) arasından fortisin, persikanidin, imperisinin anti-asetilkolinesteraz ve anti-butirilkolinesteraz inhibe edici etki gösterdiği de tespit edilmiştir [48].

2.4 Aygül Lalesi (*F. eduardii*)

Zambakgiller ailesine ait *Fritillaria* cinsinin bir türü olan Aygül lalesinin bilimsel adı "*Fritillaria eduardii*"– Eduard çiçeğidir. *F. eduardii*; karbonat içeren topraklarda, nemli, kireç ve taşlı toprağa sahip olan orman bölgelerinde, çalıların arasında, ağaçların altında, bazen çalıların ve ağaçların bulunmadığı açık alanlarda, dağların genelde batı ve kuzey kısımlarında deniz seviyesinden 700-2500 metre yükseklikte yetişir. Kırgızistanda da deniz seviyesinden 1550-2000 m yükseklikteki dağların güneş görmeyen küzey kısımlarında bulunur. Çiçek açma zamanı mart ayının başından mayıs ayının sonuna kadardır. Çiçeklerinin kokusu vardır ama çok fark edilmez. Nektarının içeriğinde şekerin konsantrasyonu çok yüksektir. Bitkinin tozlaşmasında böceklerin, kelebeklerin ve haşerelerin yeri büyüktür. Bazı kaynaklar, 13 çeşit haşerenin tozlaştırmada görev aldığını bildirilmektedir. Bununla birlikte kuşlar da tozlaşmaya katkıda bulunmaktadır. Meyve verme zamanı mayıs ve haziran aylarıdır. Yaz mevsiminin sonuna doğru Aygül bitkisinin toprağın üst kısmında yer alan gövdesi kurur [49].

F. eduardii tüm *Fritillaria* cinsine ait türler gibi soğanlı bir polikarpiktir ve bitki örtüsünün doğası gereği tipik bir efemeroiddir. *F. eduardii*'nin soğanı büyük, küresel veya ovaldir. Soğanı 8 cm çapında, kökleri ise 15-30 cm derinlikte bulunur. En büyük soğanlı bitkilerden biri olarak kabul edilmiştir [13]. Bazı bitkileri, çiçeklenme dönemindeyken yaklaşık 15 çiçek açabilir. Genel olarak çiçek açma mart ayında başlar ve Mayıs ayına kadar sürebilmektedir. Bu bitki, deniz seviyesinden 2500 metre

yüksekliklere kadar doğal olarak bulunabilir. Tohum verme zamanı ise mayıs-haziran aylarındadır. Tohumu, küçük yassı ve kahverengidir [50, 51, 52]. Doğada sadece tohumla çoğalır. Fideler 7-9 yaşlarında çiçek açar [13, 51] ve tohumun çimlenme oranı %60'a kadar çıkabilmektedir.

İmanberdieva'nın [20] verilerine göre 2015 yılında, "United Nations Development Programme" ve yerel bölge idaresinin desteğiyle, *P. eduardii* endemik türlerin korunması ve çoğaltılmasına yönelik çalışmaların yapıldığı Aygul-Tash dağında 253 hektarlık bir doğa rezervi kurulmuştur. Bu program kapsamında her yıl çevre düzenlemesi amacıyla ağaç ve çalı fidanları (*Prunus dulcis, Pistacia vera, Prunus armeniaca, Picea* vb.) kendi topraklarında dikilir. İmanberdieva'nın araştırmalarına göre Bişkek şehri Alamedin bölgesi, deney ve gözlemlerinin başlangıç yeri olmuştur. Soğanlar yerel bir üreticinin bahçesinden alınmıştır. Bu bitki, 2001 yılında, şiddetli yağmurun neticesinde dağ yamaçların aşağıya yuvarlanan bitkilerin yerel halk tarafından alınarak kendi bahçelerine ekilmiştir. Halk dilinde "Aygül" çiçeği, insanların basabileceği veya arabalarla geçebileceği, yoldan geçen hayvanların çiğnenebileceği yerlerde yetişebilmektedir. Bitki daha sonra 2018 yılında Kırgız Cumhuriyeti'nin diğer bölgelerinde yeniden yetiştirmek ve korumak için Chuy vadisine getirilmiştir [20].

Genellikle bitkileri tüketmemek için ilk yıl çıkan tomurcukların çıkarılması gerekir ama her birine birer tomurcuk bırakılmıştır. Parlak renkli büyük bir çiçek yerine küçük, açık sarı ve turuncu çiçekler ortaya çıkmıştır. Çiçeklenme dönemi, doğal koşullarda olduğu gibi iki hafta kadar sürmüştür. Yerel halkın uzun vadeli gözlemlerine göre, *P. eduardii*'de büyüme mevsimi boyunca hiçbir hastalık gözlenmemiştir. Bununla birlikte, literatür verilerine göre aşağıdaki bu bitkiyi etkileyen organizmalar *Phyllopertha horticola, Melolontha melolontha* ve *Amphimallon solstitialis* olarak sıralanabilir. Bu canlılar, kökleri ve toprak üstü aksamını kemirir ve içlerinde delikler açar. 2018 yılına kıyasla büyüme süreçleri normal ilerlemiştir. Sap uzunluğu 30 cm, ortalama yaprak uzunluğu 15-20 cm, yapraklar sırayla dizilmiştir. Mart ayının son haftasında Aygül tamamen çiçek açmıştır. Kokusu yoktur ama güzelliğiyle başkalarını cezbeder [53].

2.5 Aygül bitkisinin (*Fritillaria eduardii*) tarihçesi

Batken ilçesinin Kara-Bulak köyü, deniz seviyesinden 1500 m yükseklikte yer alan, ilçe merkezinden 17 km uzaklıkta bulunan tarihsel bir köydür. Bölgede, yaklaşık 4000 kişi yaşamaktadır. Yerel halk genellikle hayvancılık ve tarlacılıkla gün geçirmektedir. Köyün küzey tarafı dağ ve düzlüklerle çevrili. Güney tarafında sıcaklık yüksek ve nemlilik az olduğundan dolayı kserofit bitkiler yetişmektedir. Türkiye'de ters laleye halk arasında ağlayan gelin, şah tuğu, kral lalesi, şerefeli lale, Şemdinli lalesi gibi çeşitli isimler de verilmektedir. Doğal olarak dünyada geniş bir alana yayılmış olup Kırgızistan, Tacikistan, Özbekistan, Kuzey Irak, İran, Afganistan, Pakistan ve Keşmir gibi dünyanın değişik coğrafyalarında bulunmaktadır. Aygül Lalesi Batken'de sadece sosyal hayatta değil halk inancında da önemli rol oynamaktadır. Halk inancına göre bu çiçek kutsal, her türlü hastalıklara deva ve kerametli kabul edilmektedir. Çiçeğin sadece bu bölgede yetişmekte olduğuna ve soğanı alınıp başka yere götürülerek ekilse de yetişmediğine inanılmaktadır [54]. 1977'den bu yana mart ayından mayıs ayına kadar okul öğrencileriyle birlikte halk çiçeklerin yetiştiği bölgede gönüllü olarak bekçilik yapmaktadır. Her yıl nisan ayının son haftasında "Aygül Çiçeği Bayramı" kutlanarak dünyanın çeşitli yerlerinden Aygül lalesinin güzelliğini görmek için turistler gelmektedir [55, 56]. Halk dilinde Aygül bitkisi hakkında aşağıdaki gibi efaneleri konuşur:

"Geçmiş zamanların birinde Batken bölgesinde çok zengin bir adam yaşarmış. Onun Aygül isminde bir kızı varmış. Kızın eşsis güzelliği, güzel ahlakı ve çalışkanlığı dillere destan olmuş. Vakitlerin birinde Aygül boy atıp genç bir kız yaşına ulaştığında Kozulan isimli bir bahadıra gönlünü kaptırıp, aşık olmuş. İki aşığın anne babaları da çocuklarının duygularını fark ederek onlardan gizli düğün hazırlıklarına başlamışlar. Fakat Kozulan baskıncı düşmanlarla gerçekleşen sert çarpışmaların birinde yenilerek hayatını kaybetmiş. Kozulan son nefesini vermeden önce yoldaşlarına kalbini aşığı olan Aygüle götürmelerini vasiyet etmiş. Aygül, sevgilisini kaybetme acısına dayanamayarak kendini yüksek bir kayadan, uçurumdan aşağı bırakmış. Dağın eteğinde yetişen sarı çiçekler de Aygül'ün kızıl kanına bulanmış. Sonradan Aygül'ün bedeni aşığı Kozulan'ın kalbiyle birlikte aynı yere defnedilmiş. Aygül'ün kanına bulanan çiçekler ise o günden itibaren kırmızı renkte çıkmış. Bu olaydan sonra o çiçeklere "Aygül Çiçeği", kızın

kendini aşağıya bırakan dağa "Aygül Taş" ve karşısındaki dağa ise "Kozulan Dağı" denilmektedir" [57, 58].

2.6 *Fritillaria eduardii* tarihçesi

F. eduardii ve çeşitlerinin isimlendirme tarihi 1884 senesine dayanmaktadır. Eduard Regel 1884'te *F. eduardii*'yi tanımlamış olmasına karşın o zamandan beri bitkinin adı üzerinde farklılıklar bulunmaktadır. 1884'te Eduard Regel tarafından bu yeni *Fritillaria*'ların tartışıldığı dört makale yayınlanmıştır. İlk üçü Gartenflora'da ve dördüncüsü Acta Horti Petropolitani'de yayınlanmıştır. Yeni keşfedilen tür, 30-60 cm yüksekliğe, çok yapraklı bir gövdeye ve büyük mor renkli çiçeklere sahip, iyi bilinen *F. imperialis*'in yakın akrabası olarak kayıt altına alınmıştır. Eduard Regel, bu yeni bitkiyi *F. imperialis* türüne benzer olarak görmedi. Bunun nedeni hem soğanlarda hem de çiçeklerinde *F. imperialis*'e has olan bir kokusunun olmaması ve daha kısa, yapraksız gövdesinin olması olarak açıklamıştır. 1884'te yayınlanan sonraki makalelerde aynı bitkiden tekrar bahsedilmiş, ancak makalede kokusu olmayan *Fritillaria*'nın bu türleri *Fritillaria imperialis inodora* ve *Fritillaria imperialis* L. var. *inodora purpurea Rgl* olarak *F. imperialis*'in bir varyetesi olarak sınıflandırılmıştır. Bu yeni keşfedilen kahverengi-mor çiçekli *Fritillaria* bitkisi, *F. imperialis*'e kıyasla daha kısa, yapraksız bir gövdeye sahiptir ve çiçekleri başlangıçta, tomurcuk aşamasında daha dik olarak gelişim göstermektedir. Acta Horti Petropolitani'deki son yayında, biri safran sarısı aşağıya eğik haldeki çiçeklere sahip ve diğeri mor, dik veya yatay çiçekleri olan iki renk çeşidi olan bitki ayırt edilmiştir. Makale, "*Fritillaria Eduardi A. Rgl*." olarak kaydedilmiştir, ancak Regel'in kendisi bu ismin kaldırılması gerektiğini belirtmiştir [59, 60, 61, 62]. 1878 ve 1879 yılları arasında ise Albert Regel, Tacikistan'daki Darwas ve Baldschuan dağlarında ve Özbekistan'daki Doğu Buhara dağlarında *Fritillaria* bitkisini toplamıştır ve onları Rusya'nın Saint Petersburg kentine ekim için getirmiştir. *F. eduardii* adı Albert Regel tarafından babasının onuruna önerilmiştir. Bitkinin kokusuz bir soğana, parlak kırmızı bir çiçek örtüsü ile dik veya incelmiş çiçeklere (*F. imperialis*'teki gibi başını sallamadan) sahip olduğu belirlenmiştir [63]. Flora Uzbekistanika'da Vvedensky, *F. eduardii*'yi Petilium cinsindeki bir tür olarak bahsetmiştir. Bitkinin üç çeşit çiçek renginden bahsedilir: turuncu-kırmızı, tuğla kırmızısı ve mor-kahverengi. Sonradan Wietsma *et al*. [64], *F. eduardii* adını yeniden

kabul etmiştir. Önce yayınlanan çalışmalarda bahsedilen bitkinin isimlerinin *Fritillaria eduardii* ve önceden kullanılan isimlerin de eş anlamlı isimler olduğunu belirtmiştir.

Eduard Regel tarafından bahsedilen kokusuz *Fritillaria* bitkilerinin de *Fritillaria eduardii* var. *eduardii* ve *F. eduardii* var. *inodora* olan iki varyetesi olduğu belirtilmiştir. *Fritillaria eduardii* var. *eduardii* bitkisinin; çan şeklinde ve sarkık mor-kırmızı veya kırmızı çiçeklere sahip olduğu, yaklaşık 60-70 cm yüksekliğinde olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte *F. eduardii* var. *inodora* bitkisinin ise yaklaşık 50-70 cm yüksekliğinde sarıdan turuncuya, geniş çapta çan şeklinde, dik veya sarkık çiçeklere sahip olduğu belirtilmiştir. *Fritillaria eduardii* türünün Orta Asya'ya, özellikle Tacikistan, Özbekistan, Kırgızistan ve muhtemelen Afganistan'ın dağlık bölgelerine özgü olduğu da vurgulanmıştır [64].

2.7 *Fritillaria eduardii*'nin biyolojik özellikleri

Aygül lalesi, zambakgiller ailesinin bir üyesi olan çok senelik bir bitkidir. Çiçek tablası ve taç yapraklarının çeşitli renklerde olması ve ayrıca gelişmiş kök ve sürgün sistemleri Aygül lalesinin bilinen özellikleridir. Bitkinin karakteriksel özelliklerinden bir de çiçeklerinde koku olmamasıdır [13]. Bu çiçeğin filizleri, tohumları toprağa düştükten yedi yıl sonra yüzeye çıkar ve yedi yıl sonra, üzerinde parlak turuncu renkli ilk çiçek tomurcuğu belirir. Bitkide yılda birden fazla tomurcuk görünmez, bu nedenle bitkinin yaşı çiçek sayılarına göre belirlenebilir [65]. Mart ayından itibaren yeşillenmeye başlar, nisan ve mayıs aylarında çiçeklenir.

Milko [66] tüm popülasyon alanı boyunca 200'den fazla çiçek açan ve rastgele seçilen *F. eduardii* bireylerinde bitki boylarını ve çiçek sayılarını eşit kriterlere göre ölçmüştür. Bu çalışmada, bitki yüksekliği 65 cm ve bir bireydeki/örnekteki çiçek sayısı 4 olacak şekilde ortalama değerler kaydedilmiştir. Rapor edilen en küçük örnek ile ilgili veriler şu şekildedir: yükseklik 37 cm, çiçek sayısı 1 adet, apikalde 5 ve gövdede 20 adet yaprak. En uzun örneğin değerleri ise yükseklik 95 cm, çiçek sayısı 13, apikalde 27 ve gövdede 38 adet yaprak olacak şekilde belirlenmiştir. İncelenen popülasyondaki *F. eduardii*'nin alt yapraklarının genişliği 5-12 cm ve orta kısımları ise (yukarı doğru boyut olarak küçülme gözlemleniyor) 2,5-4 cm'dir. Gölgede büyüyen bitkilerde yaprak laminanın maksimum uzunluğu 22,5 cm, çiçeğin çapı 10 cm ve taç yaprağının uzunluğu ise 6,5 cm olarak belirlenmiştir [66].

Büyük, parlak renkli çiçekleri, bu bitkinin entomofil olmasının bir işaretidir ve tozlaştırıcı böceklerin yaşam döngülerinin kütlesi ve eşzamanlılığı, tohum yenilenmesinin önemli sınırlayıcı faktörlerinden biridir. Çiçeklenmenin başlangıcında, açıldıktan sonraki 2-3 gün içinde çiçeklerin dibinde büyük nektar damlaları belirlenir. Nektarı çok sıvıdır (şeker içeriği yaklaşık %8'dir), bu nedenle beslenme için değil susuzluğu gidermek için daha uygundur. Özel nektarofajlarıyla birlikte ara sıra damlayan su (çiğ), tüketicilerini (arı, böcek ve sinekleri) çeker. Nektar damlaları ve üzerlerinde toplanan böcekler ile bazen kuşları da çektiği belirlenmiştir [14].

2.7.1 Morfolojik yapısı

Aygül lalesinin kök ve gövde yapısı iyi gelişmiştir. Toprak altındaki yapısı kökleri ve soğanı içermektedir. Toprak üst kısmı ise gövde, yaprak, çiçek ve meyvesini içermektedir. Tüm zambakgiller gibi jeneratif ve vejetatif organları olarak ikiye ayrılır. Vejetatif organları: kökleri, gövdesi, soğanları ve yapraklarıdır. Vejetatif organları ise: çiçekleri, meyvesi ve tohumlarıdır [66].

2.7.2 Kök sistemi

Bitkinin kökleri toprak altında ağ şeklinde yayılmıştır. Aygül lalesinin kökleri saçak kök sistemini oluşturmaktadır. Bitkinin kökleri çok derine inmemektedir. Kök sisteminin büyümesi için en uygun sıcaklık 25-30°C'dir. Gevşek karbonat topraklı, nemli, kireç taşlı toprak köklerin en iyi yetiştiği topraktır. Sonbaharda havaların soğuması ile birlikte Aygül lalesinin kökleri çürüyerek büyümesi durmaktadır [67].

2.7.3 Gövdesi

Gövdesi bitkinin vejetatif organıdır. Bitkinin toprak üstündeki tüm organları (yaprak, çiçek, meyve) gövdeye yerleşmiştir. Kökleri topraktan absorbe olan su ve diğer besin elementleri gövde üzerinden yaprak ve diğer organlara taşınır. Fotosentez sonucu oluşan şeker de gövde yardımıyla diğer organlara taşınır. Gövdenin önemli fonksiyonları; transport, direnç ve bitkinin beslenmesidir [52]

Bitki gövdesinin yapısındaki özelliklere göre farklılıklar aşağıdaki gibidir.

F. imperiale L. Jaume – gövdesi çiçek sapıyla aynı uzunluktadır ve 150 cm'ye kadar büyümektedir.

F. eduardii (Regel ex Lozinsk.) – gövdede çiçek sapları aşağıya eğilmiş haldedir.

F. raddeana (Regel) – Kopedağın endemik bitkisi olan bu bitkinin diğer türlerden farklılığı, gövdesinin kısalığıdır.

2.7.4 Yaprağı

Aygül lalesinin 20 cm uzunlukta ve 10 cm genişlikte olan yaprakları almaşıklı yaprak dizilişine sahiptir. Bitkinin alt kısmında yer alan yapraklar, kalın yapıya sahiptir, uç kısmındaki yaprakları incedir ve çevrel dizilişli olduğundan "taça" benzemektedir. İncelenen popülasyondaki *P. eduardii*'nin alt yapraklarının genişliği 5-12 cm ve orta kısımları ise (yukarı doğru boyut olarak küçülme gözlemleniyor) 2,5-4 cm'dir. Gölgede büyüyen bitkilerde yaprak laminanın maksimum uzunluğu 22,5 cm, çiçeğin çapı 10 cm ve taç yaprağının uzunluğu ise 6,5 cm olarak belirlenmiştir [68].

2.7.5 Çiçeklenme ve tozlaşma

Bazı örneklerde, çiçeklenme dönemindeyken yaklaşık 15 çiçek açılabilir. Genel olarak çiçek açma mart ayı itibarıyla mayıs ayına kadar 20 gün sürebilmektedir (Şekil 2.3). Aygül bitkisi sabah saat 6-7 den 11'e kadar çiçek açar. Bu bitki deniz seviyesinden 2500 metre yüksekliklere kadar doğal olarak bulunabilir [69]. Tohum verme zamanı ise mayıs-haziran aylarındadır. Tohumu, küçük yassı ve kahverengidir [50, 51, 52]. Doğada üreme sadece tohumladır, fideler 7-9 yaşlarında çiçek açar [13, 51] ve tohum çimlenme oranı %60'a kadar çıkabilmektedir [69].



Şekil 2.3 Aygül bitkisinin çiçekleri

Çiçekleri 4-6 gün arasında tozlaşır ve tohumlanır. Tohumlandıkdan bir gün geçtikten sonra dişi organını tepeciği kuruyarak kahverengi hale gelir. Yağmurlu

günlerde de bitkinin çiçek taçları dökülmez. Genelde çiçeklerinin %40-60'ı dökülmektedir, bu da bitkinin biyolojik özelliğidir.

Milko [66] tüm popülasyon alanı boyunca 200'den fazla, çiçek açan *P. eduardii* bireyinde (rastgele seçilen) bitki boylarını ve çiçek sayılarını eşit olarak ölçmüştür. Elde edilen ortalama değerler şu şekildedir: bitki yüksekliği 65 cm, bir bireydeki/örnekteki çiçek sayısı 4'tür. Kaydedilen en küçük örneğin değerleri, yüksekliği 37 cm, 1 çiçek, 5 adet apikalde ve gövdede yer alan 20 adet yaprak olarak kaydedilmiştir. En uzun örneğin değerleri ise 95 cm, 13 çiçek, 38 gövdede ve 27 apikal yapraktır. İncelenen popülasyondaki *P. eduardii*'nin alt yapraklarının genişliği 5-12 cm ve orta kısımları ise (yukarı doğru boyut olarak küçülme gözlemleniyor) 2,5-4 cm'dir. Gölgede büyüyen bitkilerde yaprak laminanın maksimum uzunluğu 22,5 cm, çiçeğin çapı 10 cm ve taç yaprağının uzunluğu ise 6,5 cm olarak belirlenmiştir.

Büyük, parlak renkli çiçekler, bu bitkinin entomofil olmasının bir işaretidir ve tozlaştırıcı böceklerin yaşam döngülerinin kütlesi ve eşzamanlılığı, tohum yenilenmesinin önemli sınırlayıcı faktörlerinden biridir. Çiçeklenmenin başlangıcında, açıldıktan sonraki 2-3 gün içinde çiçeklerin dibinde büyük nektar damlaları belirlenir. Nektarı çok sıvıdır (şeker içeriği yaklaşık %8'dir), bu nedenle beslenme için değil susuzluğu gidermek için daha uygundur ve hem özel nektarofajları hem de ara sıra damlayan su (çiğ), tüketicilerini (arı, böcek ve sinekleri) çeker. Nektar damlaları ve üzerlerinde toplanan böcekler ile bazen kuşları da çekerler. Bazı baştankara türlerinin bu çiçekler üzerinde tozlayıcı rol oynadığına dair kanıtlar vardır [70, 71].

2.8 *F. eduardinin* yaşam döngüsü

Çiçeklenme dönemindeyken yaklaşık 15 adet çiçek açılabilir. Tohum verme zamanı ise mayıs-haziran aylarıdır (Şekil 2.4). Çiçekleri 4-6 gün arasında tozlaşır ve tohumlanır. Tohumlandıkdan bir gün sonra dişi organını tepeciği kuruyarak kahverengi hale gelir. Yağmurlu günlerde de bitkinin çiçek taçları dökülmez [20].



Şekil 2.4. Aygül bitkisinin yaşam döngüsü.

01, soğan, havaların sıcak olmaya başladığı mart ayından itibaren büyümeye başlar; 02-03-04, mart ayında bitkinin soğanlarından gövde kısmı yetişir; 05, yaprakları gövdelerinin tepesinde ve çiçeklerinin üstünde ince mızrak şeklinde bulunur; 06-07, çiçek açma genel olarak mart ayı ile başlar ve mayıs ayına kadar sürebilmektedir.

2.7 Aygül Lalesi ve Kırmızı Kitap

Aygül bitkisi *Fritillaria eduardii* 1978'de Sovyetlerin Kırmızı Kitabına eklenmiştir. 1980'de ise bitkiyi koruma çalışmaları aksamaya başlamış ve bitki nesli tükenme tehdidi ile karşı karşıya kalmıştır. Daha sonra halk tarafından karşılık gösterilerek 1982'de Kara-Bulak köyünün okul öğrencilerinden oluşan gönüllüler ve öğretmenler, Murzapar Üsön hocanın yönetimi altında bitkiyi korunma altına almaya başlamıştır. Yaz mevsiminin nisan ve mayıs ayları, Aygül bitkisinin çiçek açma mevsimi olduğundan bitkinin nadire güzelliğine şahit olmak için gelen ziyaretçilerin sayısı artmaktadır. Gönüllüler gelen misafirlere nesli tükenmekte olan bitkiye dikkatli davranmalarını ve doğa ile dengeyi sağlamayı hatırlatarak bitkinin az da olsa korunmasına, topraktan koparılarak götürülmesine engel olmaya ve önlemeye çalışmışlardır. 1989'da Kara-Bulak köyünde ilk olarak Nevruz bayramı kutlanarak 16 Nisan "Çiçek Bayramı" olarak kabul edilmiştir. Bugünden itibaren her yıl 16 Nisan Çiçek Bayramı olarak kutlanmaktadır. Bir tek Kırgızistanın diğer bölgelerinden değil dünyanın her türlü ülkelerinden çiçek bayramını kutlamak ve Aygül bitksinin nadire güzelliğini görmek için binlerce turist gelmektedir. Gelen misafirlere uygun şartlar yapılmış ve bitkinin korunması için her türlü önlemler alınmıştır [20].

2001'de şiddetli yağan yağmur nedeniyle dağ kenarında yetişen çiçeklerin sayısı azalmıştır. Bununla birlikte bitkiler, yağmurla birlikte oluşan sel nedeniyle dağın kenarına yakın yerdeki düzlüklerde dağınık bir şekilde yetişmeye başlamıştır. Böylelikle sel nedeniyle dağılan bitkinin soğanlarını yerel halk toplayarak kendi bahçelerine ekmişlerdir. Aygül bitkisi, 2004'de Kırgızistanın Kırmızı Kitabında kayıt altına alınmıştır ve bitkinin yetiştiği dağın 300 hektar alanı çevresi, çitle çevrilerek yerel halk ve devlet tarafından koruma altına alınmıştır. Bununla birlikte ülkece öneme sahip olan "Aygül-Taş Dağı", devlet botanik koruma alanını (bahçesi) oluşturma hakkında Kırgız Cumhuriyetinin 9 Kasım 2009'da № 628 numaralı uyruğu ile koruma altına alınmıştır. Uyruğa binaen Batken ilinin Batken ilçesinde ülkece öneme sahip olan "Aygül-Taş Dağı" botanik koruma alanı (bahçesi) olacak şekilde 10 senelik mühlet ile yapılanmıştır [72].

2.10 Kodlama Yapmayan RNA (ncRNAs)

Çok hücreli ökaryot canlıların genomları çoğunlukla protein kodlamayan DNA'dan oluşmaktadır. Bu genomların küçük bir bölümünün önemli biyolojik fonksiyonlara sahip olduğu konusunda çok fazla fikir birliği olmasına rağmen geri kalanının gelişime veya homeostaza katkıda bulunup bulunmadığı konusunda birçok tartışma meydana gelmiştir. Spekülasyonların çoğu, bazı düşük seviyelerde RNA'ya kopyalanan genomik bölgelere odaklanmıştır [9]. Uzun bir süre boyunca, bu kodlama yapmayan bölgeler, çöp 'junk' DNA olarak adlandırılmıştır. ENCODE projesi ile genomun neredeyse (%98) tamamına yakın bir bölgenin gen anlatımının düzenlenmesinde rol oynadığı belirlenmiştir [73]. Bu bölgelerin daha da detaylı analizleri ile 'RNA Dünyası' karşımıza çıkmıştır [74, 75]. Gen anlatımı ve gen anlatımının düzenlenmesinde kilit noktada önemli rolleri olan RNA molekülleri iki gruba ayrılabilir. İlk grupta, protein kodlayan genler tarafından kodlanan ve genomda %2'den daha az bulunan RNA molekülleri yer alır. İkinci grupta ise kodlama yapamayan ve genomun neredeyse tamamını %98'ni oluştıran RNA'lar bulunur [76].

2.11 ncRNA'ların isimlendirilmesi ve sınıflandırılması

Kodlama yapmayan ncRNA'lar, bir protein kodlamayan ama işlevi olan dizilerdir. ncRNA'ların isimlendirilmesinde; tanımlandıkları organizma, büyüklükleri ve yerleşim yerleri temel alınır. Bu RNA çeşitleri arasında; miRNA, siRNA, snoRNA, fRNA ve snmRNA dizileri sayılabilir [9]. Bu farklı RNA çeşitlerinin farklı yapısal özellikleri olsa da genel olarak hepsinin gen anlatımının düzlenlenmesinde görevli oldukları ve böylece epigenetik alanında yaygın olarak çalışıldıkları söylenebilir [10]. RNA moleküllerinin toplam sayısının her bir hücre için kabaca 10^7 olduğu tahmin edilir. Diğer ncRNA'lar; snRNA, snoRNA ve miRNA olarak sayılabilir. Oldukça büyük kütlelerinden dolayı rRNA, mRNA ve lncRNA diğerlerine kıyasla genomda daha fazla yer kaplar. Kütle ve molekül sayılarına göre sınıflandırılan ncRNA'lar uzunluklarına göre de çeşitlere ayrılabilir. Uzunlukları karşılaştırıldığında 200 nt uzunluğundakiler uzun kodlama yapmayan RNA olarak adlandırılır [77].

2.12 ncRNA’ların önemi

Gen anlatımı, yaşamın tüm yönleri için gerekli olan merkezi bir süreçtir ve onun doğru bir şekilde düzenlenmesi, tüm hücre ve dokuların gelişimini ve homeostazını tanımlar. Bu sürecin merkezi bir bileşeni ise hücre çekirdeğinde lokalize olan, haberci RNA'ların transkripsiyonu için bir şablon görevi gören ve sitoplazmaya translokalize olarak proteinlerin translasyonunda en önemli rol oynayan genomik DNA'dır. Bu süreçlerin çalışması için birkaç protein kodlamayan RNA sınıfına (ncRNA'lar) ihtiyaç vardır. Küçük nükleer RNA'lar (snRNA'lar), mRNA'ların alternaif kırpılma (splicing) olaylarında yer alır. Transfer RNA'ları (tRNA'lar), mRNA'ların üç nükleotit (nt) dizilerini spesifik olarak tanıyarak ve amino asitleri doğru sırayla ribozoma alarak mRNA dizisini peptid veya proteine dönüştürür. Ribozomal RNA'lar (rRNA'ların) hücrede en bol bulunan RNA molekülleridir ve protein translasyonu için gerekli makromoleküler yapılar olan ribozomların yapısına katılır. RNA’ların bu çeşitlerinin olması ve doğru bir şekilde fonksiyonlarını tamamlaması hücrenin normal bir şekilde yaşamını devam etmesi ve sürdürebilmesi için çok önemlidir. Son yıllarda düzenleyici küçük RNA’ların yeni sınıfları keşfedilerek literarürde onlar hakkında bilgiler zaman geçtikçe çoğalmaktadır [78].

Kodlama yapmayan bu diziler, farklı metabolik yolaklarda rol oynayan genlerin anlatımlarının düzenlenmesinde görev alır [79]. Bununla birlikte kromozom dinamiğinin kontrolünde, RNA düzeltiminde [80], makromoleküllerin oluşumunda [81], kanser [82] ve şeker hastalığı [83] gibi birçok hastalık olmak üzere genetik ve epigenetik kökenli mekanizmalar da önemli rollere sahiptir. Son yıllarda epigenetik faktörlerin farklı metabolik yolaklar üzerindeki etkilerinin daha detaylı anlaşılması ile birlikte önemli epigenetik mekanizmalardan biri olan ncRNA’lar ile yapılan çalışmalarda artış görülmektedir. Bu kadar fazla çalışmaya karşın ncRNA’ların işlevleri hala detaylı olarak bilinmemektedir.

2.13 Mikro RNA (miRNA)

miRNA'lar, gen anlatımının düzenlenmesinde post-transkripsiyonel veya posttranslasyonel aşamalarda görev alan yaklaşık 22 nt uzunluğunda ncRNA moleküllerinden biridir. mRNA dizisine tamamlayıcı olarak bağlanır ve bu şekilde gen anlatımını düzenler [11]. Bununla birlikte tam tersi olarak miRNA'ların, genlerin promotör dizilerine bağlanarak gen anlatımını arttırdığı da bilinmektedir [84]. miRNA'ların, ökaryot ile virüs genomlarının %1-3'ünü, insanda ise protein kodlayan genlerin %60'dan fazlasını düzenlediği düşünülmektedir [85]. Organizmada miRNA dizilerinin sayısının çok olmaması, bu dizilerin birden fazla mRNA dizisinin düzenlenmesinde görev aldığını düşündürmektedir [11].

İlk miRNA dizisi model organizma olan *C. elegans*'ta 1993 yılında tanımlanmıştır [86]. Fire *et al*. [87] tarafından yapılan dsRNA dizisinin gen susturma mekanizmasına sahip olduğunun belirlendiği çalışma ile birlikte bu alan, daha fazla ilgi çekmeye başlamıştır. Daha sonra, RNAi mekanizmasını tanımlayan Fire ve Mello, 2006 yılında Fizyoloji veya Tıp alanında Nobel Ödülü almışlardır. Bu diziler daha sonra miRNA olarak isimlendirilmiştir [88]. RNA dünyasının önemli üyeleri olan miRNA'lar, hastalıkla ilgili genlerin belirlenmesi, biyomarkırların tanımlanması ve evrimsel ilişkilerin belirlenmesi gibi alanlarda daha detaylı bilgilerin elde edilmesini sağlamaktadır [85, 88, 89].

2.13.1 miRNA sentezi

Gen içinde ve genler arasında olarak bulunan miRNA genleri, RNA polimeraz II/III ile transkribe edilir. Önce birincil transkript (primiRNA) oluşur. primiRNA birkaç kb (kilobaz) büyüklüğünde olabilir. Bu dizi; insanda Drosha ve DGCR8 proteini ile *Drosophila*'da ise Pasha olarak isimlendirilen mikroişlemci kompleksi ile kesilir. Kesim sonucunda pre-miRNA'lar oluşur. Bu diziler ise 60-120 nt uzunluğundadır [90]. Oluşan pre-miRNA, Exportin-5 ve Ran-GTP nüklear por kompleksi ile nükleustan sitoplazmaya taşınır. Dicer ile tekrar kesildikten sonra 22 nt uzunluğunda dsRNA oluşur. Çift zincir denatüre olur ve bir zincirden olgun miRNA meydana gelir [86, 90]. İnsan, hayvan ve bitkilerde miRNA sentezinde bazı farklılıklar görülür. Temel mekanizma aynı olmasına karşın birbirinin ortologu olan diziler kesimde ve taşınmada rol oynar [91].

2.13.2 Önemli bir epigenetik mekanizma olarak miRNA

miRNA'ların gen anlatımının düzenlenmesini mRNA ile dizi tamamlayıcılığı sayesinde yapar. Bu tamamlayıcılığın özellikle miRNA'ların 5' ucunda yaklaşık 7 nt'lik 'seed' olarak tanımlanan bölgede olması önemlidir [92]. Bitkilerde, miRNA ile mRNA arasında %100'e yakın bir tamamlayıcılık olması görülürken hayvanlarda ise bu çoğu miRNA'nın tam tamamlayıcılık göstermeden mRNA'yı hedeflediği rapor edilmiştir [93]. Bir miRNA'nın birden fazla hedef mRNA dizisi olabilmektedir [94, 95].

Bitki, hayvan ve diğer canlılarda gen anlatımının düzenlenmesinde önemli rol oynayan miRNA'lar, genomda tanımlandıkları andan birçok alanda araştırılmaya başlanmıştır. miRNA'lar, ekonomik önemi olan çiftlik hayvanlarında kullanılan ilaçların analizinde de kullanıldığı gibi [96] bitkilerde strese karşı suyarlı/dirençli varyetelerin belirlenmesinde de araştırılmaktadır [97]. Hastalıklar için biyomarkır özelliği gösterebilmeleri de miRNA anlatım çalışmalarını arttırmıştır [98, 99].

Bu tez çalışmasının amacı endemik bir bitki olan Aygül'ün genomunda *in siliko* analizler ile yeni miRNA'ların tanımlanması, miRNA dizileri arasındaki evrimsel ilişkinin incelenmesi ve miRNA'ların hedef genlerinin belirlenmesidir.

III BÖLÜM

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında, *in siliko* yöntemler kullanılarak *Fritillaria* cinsinde bulunan bitkilerde yeni miRNA dizileri tanımlandı, bu miRNA dizlierinin hedef genleri belirlendi ve bu hedef genlerin rol oynadıkları metabolik yolaklar analiz edildi. Bu amaçla, mirBase veri tabanında bulunan farklı bitkilere ait referans miRNA dizileri indirildi. Daha sonra bu referans miRNA dizileri, NCBI veri tabanında bulunan BLASTN programı kullanılarak *Fritillaria* cinsine ait nukleotit veri tabanı ile karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonrasında elde edilen diziler, literatürde belirtilen parametrelere göre analiz edildi. pre-miRNA dizilerinin ikincil yapıları "RNAfold Web Server" programı kullanılarak belirlendi. Bu tez çalışmasında tanımlanan yeni miRNA dizileri, miRBase veri tabanında yer alan homolog diziler ile Clustal Omega programı kullanılarak hizalandı ve MEGAX programı kullanılarak diziler arasındaki evrimsel ilişki filogenetik ağaç çizilerek incelendi. Bu miRNA dizilerinin hedef genleri, "RNA Hybrid" programı ile tanımlandı.

3.1 Referans miRNA dizilerinin elde edilmesi

Çalışmada kullanılacak referans miRNA dizileri mirBase (Versiyon 22, http://www.mirbase.org) veri tabanından elde edildi. Bu veri tabanında insan, hayvan, bitki ve virüslere ait miRNA dizilerinin öncül ve olgun formlarına ait bilgiler bulunmaktadır. Olgun diziler öncül dizilere kıyasla daha korunmuş olduğu için bu tez çalışmasında olgun miRNA dizileri ile analizleri veri tabanından indirildi [95].

3.2 Karşılaştrma Analizleri

NCBI ver tabanı programında bulunan BLASTN programı kullanılarak miRNA dizileri ile *Fritillaria* cinsine ait nt dizileri karşılaştırıldı. Analizler, Tablo 3.1 de verilen parametreler kullanılarak gerçekleştirildi. Diğer parametreler ise programda belirtildiği şekilde değiştirilmeden kullanıldı [100]. Değeri ≤ 1 olan diziler, referans miRNA dizileri ile karşılaştırılarak kontrol edildi. Bu kontrol aşamasında elde edilen diziler ile *Fritillaria* cinsine ait nt dizileri arasında en fazla 7 yanlış eşleşme olanlar belirlendi [10].

Tablo 3.1 Blast analizlerinde kullanılan parametreler

Veri tabanı (Database)	Nukleotit
Organizma (Organisms)	*Fritillaria (taxid:59070)*
Program Seçeneği (Program Selection)	Somewhat similiar sequences
Beklenen Eşik Değeri (Expected threshold)	1000
Hizalanan dizi sayısı (Number of Aligned Sequences)	1000
Kelime Büyüklüğü (Word Size)	7

3.3 Eleme Süreci

Literatürde kullanılan farklı programlar ve bu programların kullanılmasında uygulanan sıkı kurallar, *in siliko* analizlerin temelini oluşturmaktadır. Yeni miRNA'ların tanımlanmasında, kullanılan ilk kural bir önceki aşamada da belirtildiği gibi referans dizi ile nt dizisi arasındaki yanlış eşleşmelerin saptanmasıdır. Diğer bir kural ise aynı gen ya da nt dizisine ait tekrarlı dizilerin elenmesidir. NCBI veri tabanında aynı gen ya da nt dizisine sahip olan ve kısmi dizi olarak farklı aksesyon numaraları şeklinde bulunan birçok dizi vardır. Aynı dizinin farklı bölgelerinin farklı aksesyon numaralarıyla analiz edilmesi, aynı miRNA dizisinin tekrar tekrar incelenmesine neden olmaktadır. Bu durum da yanlış pozitif olarak nitelendirilecek sonuçların elde edilmesine neden olmaktadır. Bu amaçla, tez çalışmasında bir önceki aşamada belirlenen aynı nt dizisine ait tekrarlı diziler, her bir miRNA dizisine ait 'single tone' oluşturulması için BLASTN programı kullanılarak elendi [100].

miRNA'lar, kodlama yapmayan dizilerdir. Elde edilen ve miRNA dizisi olma olasılığı olan sonuçlar, bir sonraki aşamada kullanıldı. Bu aşamadaki kural ise protein kodlayan dizilerin elenmesidir. Bu amaçla, miRNA dizileri NCBI'da bulunan protein veri tabanı ile BLASTX programı kullanılarak karşılaştırıldı [101]. Karşılaştırma sonrasında protein kodlayan diziler elendi.

3.4 pre-miRNA Yapılarının Oluşturulması

Protein kodlamadığı belirlenen aday miRNA dizilerinin ikincil hairpin sap-ilmek (stem-loop) yapıları, "RNAfold Web Server" (http://rna.tbi.univie.ac.at//cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi) programı kullanılarak belirlendi [102]. Elde edilen sonuçlar, aşağıdaki kriterler göz önüne alınarak değerlendirildi.

1. miRNA dizisi, 'stem-loop' hairpin yapısında uygun bir pozisyonda bulunabilmeli.
2. Olgun miRNA dizisi hairpin yapısının sadece bir kolunda bulunmalı.
3. miRNA ile miRNA* dizilerinde herhangi bir loop veya kırık olmamalı.
4. MFEI (Minimum Folding Energy Index – Minimum Katlanma Enerji İndeksi) değeri >0.85 ve MFE (Minimum Free Energy - Minimum Serbest Enerji) değeri ≤ -18 kcal mol^{-1} olmalı.
5. Olgun miRNA ile miRNA* dizileri arasında Watson-Crick ya da G/U baz çiftinden en az 12 tane olmalı [94, 103].

Elde edilen sonuçların; nt dizisi, referans dizi, nt pozisyonu, MFE değeri, miRNA nt sayısı, AMFE (Adjusted Minimal Folding Free Energy), %GC, %AT ve MFEI değerleri belirlendi. AMFE ve MFEI değerleri, aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplandı [104, 105].

$$AMFE = ((MFE/ (potansiyel\ pre\text{-}miRNA\ uzunluğu)) * 100$$

$$MFEI = (AMFE/(\%GC)$$

3.5 Evrimsel Süreç ile İlgili Analizler

Filogenetik analizler kapsamında çoklu hizalama (multiple alignment) ve filogenetik ağaç çizimi gerçekleştirildi. Bu amaçla, mirBase veri tabanında bulunan homolog referans diziler belirlendi. Daha sonra bu diziler ile bu tezde belirlenen olgun miRNA dizileri karşılaştırıldı. Hizalama analizleri, Clustal Omega programı [https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo] kullanılarak gerçekleştirildi. MEGA11 programı filogenetik ağaçlar çizildi [106]. Filogenetik ağaç çiziminde "Neighbour-Joining (NJ)" metodu [107] ve "p distance" modeli kullanıldı [108]. Ayrıca "bootstrap (BS)" analizleri 1000 tekrar ile gerçekleştirildi [109].

3.6 miRNA Hedef Genlerinin Hedeflenmesi

Fritillaria cinsinde yeni tanımlanan miRNA dizilerinin potansiyel hedefleri, iki farklı program kullanılarak belirlendi. BLASTN programı kullanılarak olgun miRNA dizileri *Fritillaria* cinsinde analiz edildi ve elde edilen mRNA dizileri arasında 'query coverage' oranı ≥ 60 olanlar seçildi. BLASTN programında kullanılan parametreler, Tablo 3.2 de gösterilmiştir [100].

Tablo 3.2 Hedef genleri tespitinde kullanılan blast parametreleri

Veri tabanı (Database)	Nucleotide Collection (nr/nt)
Organizma (Organisms)	*Fritillaria*
Program Seçeneği (Program Selection)	Highly similar sequences (megablast)

İkinci program olarak RNA Hyrbid algoritması kullanıldı. BLAST sonucunda elde edilen diziler, bu algoritma kullanılarak detaylı bir şekilde analiz edildi. Bu analizler aşağıdaki kriterler uygulanarak hedef genler belirlendi.

1. Yeni tanımlanan miRNA dizisi ile potansiyel mRNA arasında 4 nt'ten fazla yanlış eşleşme olmamalı.
2. Bu 4 yanlış eşleşme, miRNA'nın 5' ucundan itibaren 10. ve 11. pozisyonlarda olmamalı.
3. miRNA'nın 5' ucundan itibaren 1. ve 9. pozisyonlar arasında 1 nt'den fazla yanlış eşleşme olmamalı.
4. Yeni tanımlanan miRNA dizisi ile potansiyel mRNA arasında herhangi bir bölgede yan yana 2 nt'ten fazla yanlış eşleşme ve boşluk olmamalı.

miRNA'nın 5' ucundan itibaren 2-7 ve/veya 8-13 nt bölgesi için MFE değeri ≤ -20 kcal mol^{-1} olmalı [10].

IV BÖLÜM

4. BULGULAR

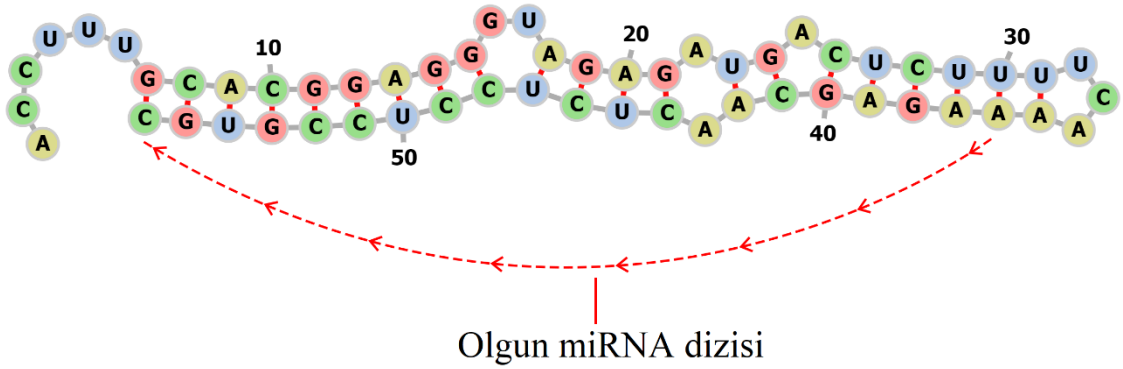
Bu tez çalışmasının amacı; Aygül lalesinde farklı metabolik yolaklarda rol oynayan yeni miRNA dizilerinin farklı *in siliko* yöntemler kullanılarak belirlenmesidir. Bu amaçla, miRBase veri tabanında bulunan referans miRNA dizileri indirildi. Bu miRNA dizileri, BLASTN programında kullanıldı. Belirlenen kriterlere uygun olan pre-miRNA dizilerinin ikincil yapıları ise "RNAfold Web Server" programı kullanılarak çizildi. Filogenetik analizler kapsamında *Fritillaria* bitkisinde tanımlanan miRNA dizileri ile referans miRNA dizileri arasındaki evrimsel ilişki, hizalama (Clustal Omega) ve filogenetik ağaç analizleri (MEGA11) ile analiz edildi. Hedef genlerin belirlenmesinde de hem BLASTN hem RNA Hybrid programları kullanıldı.

4.1 Referans miRNA Dizilerinin Elde Edilmesi

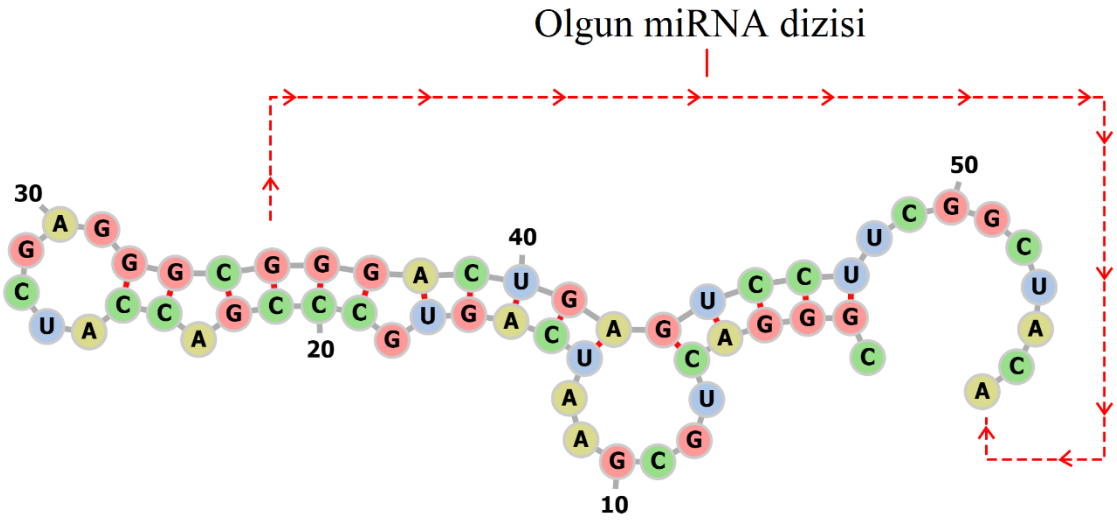
mirBase veri tabanından, 82 farklı bitki türüne ait 8615 pre-miRNA ve 10314 olgun miRNA dizisi elde edildi. Bu diziler; *Chlorophyta*'ya ait 50 pre-miRNA ve 86 olgun miRNA dizisi, *Coniferophyta*'ya ait 662 pre-miRNA ve 669 olgun miRNA dizisi, *Embryophyta*'ya ait 305 pre-miRNA ve 362 olgun miRNA dizisi, *Magnoliophyta*'ya ait 7598 pre-miRNA ve 9297 olgun miRNA dizisi bulundu.

4.2 Aday miRNA'ların Belirlenmesi ve İkincil Yapılarının Çizilmesi

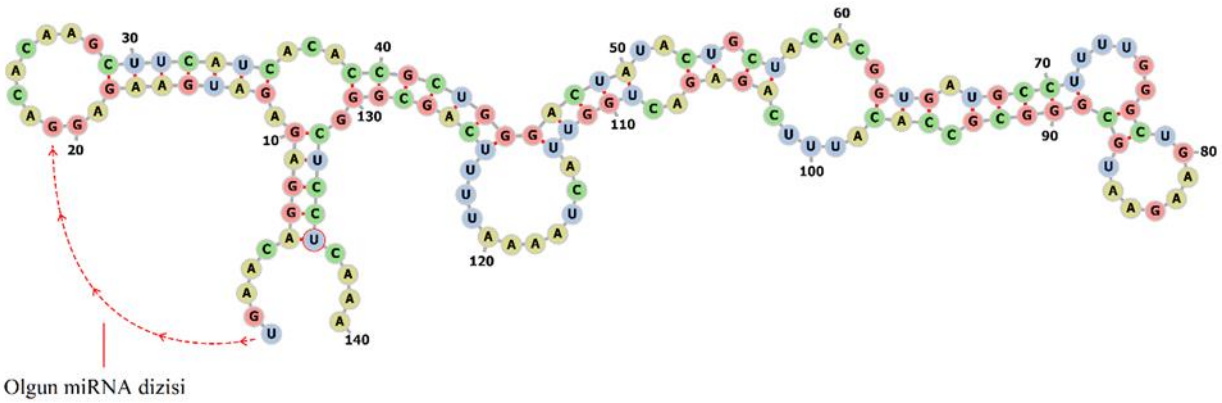
miRNA'ların belirlenmesi için referans miRNA dizileri ile *Fritillaria* cinsine ait nt dizileri BLASTN programı kullanılarak karşılaştırıldı ve en az ≤ 7 yanlış eşleşmeye sahip nt diziler belirlendi. Daha sonra BLASTX programının yardımıyla bu dizilerin protein kodladığı veya kodlamadığı kontrol edildi. Protein kodlamadığı belirlenen dizilerin ikincil yapıları RNA Web Server programı kullanılarak çizildi. *Fritillaria* cinsine ait bitkilerde miR399, miR169, miR391, miR1432 ve miR8602 olmak üzere beş farklı miRNA ailesi belirlendi (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5).



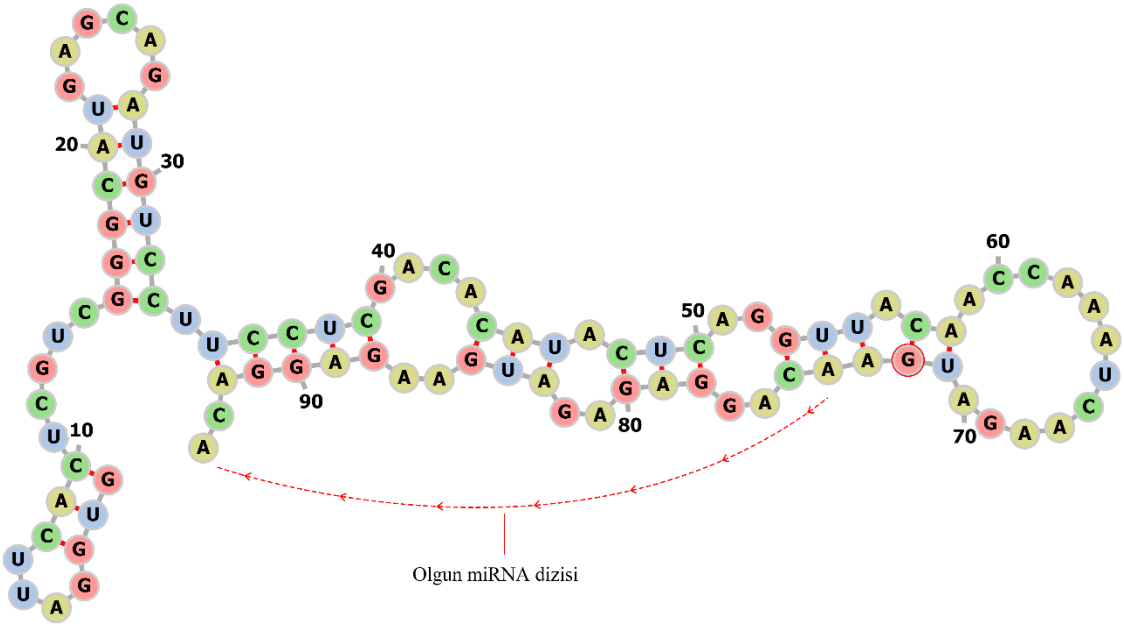
Şekil 4.1 fri-miR399 dizisinin ikincil yapısı



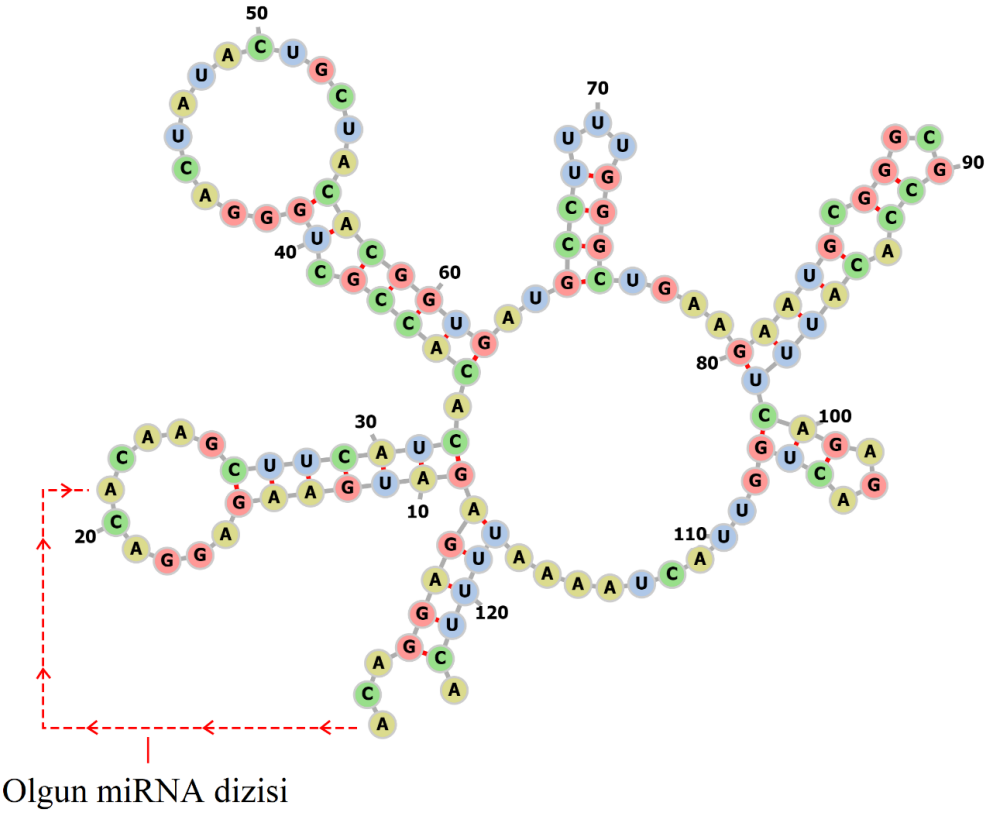
Şekil 4.2 fri-miR169 dizisinin ikincil yapısı



Şekil 4.3 fim-miR391 dizisinin ikincil yapısı



Şekil 4.4 fim-miR1432 dizisinin ikincil yapısı



Şekil 4.5 fim-miR8602 dizisinin ikincil yapısı

Pre-miRNA'ların ikincil yapıları belirlenirken miRNA-miRNA* dizileri arasında en az 12 baz eşleşmesi olanlar analiz edildi. Pre-miRNA uzunluklarının 56 ile 140 nt arasında değiştiği ve bu pre-miRNA dizilerinin ortalama 94 nt olduğu belirlendi. İkincil yapılar oluşturulurken MFE değerinin ≤ -18 kcal mol^{-1} olması gerektiği ile ilgili kural da göz önüne alındı. Elde edilen pre-miRNA dizilerinde MFE değerlerinin -21,50 ile -36,40 arasında değiştiği ve ortalama değerin -26,26 kcal mol^{-1} olduğu görüldü. Diğer önemli bir parametre olan MFEI değerlerinin ise 0,44 ile 0,98 arasında 0,60 ortalama ile değiştiği belirlendi. Dizilerin % G + C oranları incelendiğinde bu oranın %47,15 ile %62,50 aralığında ve ortalamasının da %51.36 olduğu bununla birlikte %A + C oranlarının %37,50 ile %52,85 değiştiği ve ortalamasının da %48,64 olduğu görüldü (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 *Fritillaria* cinsinde yeni tanımlanan pre-miRNA'ların özellikleri

№	miRNA	Aksesyon numarası	Dizi	MFE	nt sayısı	AMFE	G+C sayısı	A+T sayısı	%GC	%AT	MFEI
1	fri-miR399	HQ845800.1	AAGAGCAACTCTCCTCCGTGC	27,50	56	49,11	28	28	50	50	0,98
2	fri-miR169	AF037457.1	GGGACTGAGTCCTTCGGCTACA	20,50	56	36,61	35	21	62,50	37,50	0,59
3	fim-miR391	GU188681.1	TGAACAGGAGAGATGAAGAGG	36,40	140	26,00	69	71	49,29	50,71	0,53
4	fim-miR1432	GU188681.1	ACAGGAGAGATGAAGAGGACA	21,50	94	22,87	45	49	47,87	52,13	0,48
5	fim-miR8602	GU188681.1	ACAGGAGAGATGAAGAGGACA	25,40	123	20,65	58	65	47,15	52,85	0,44

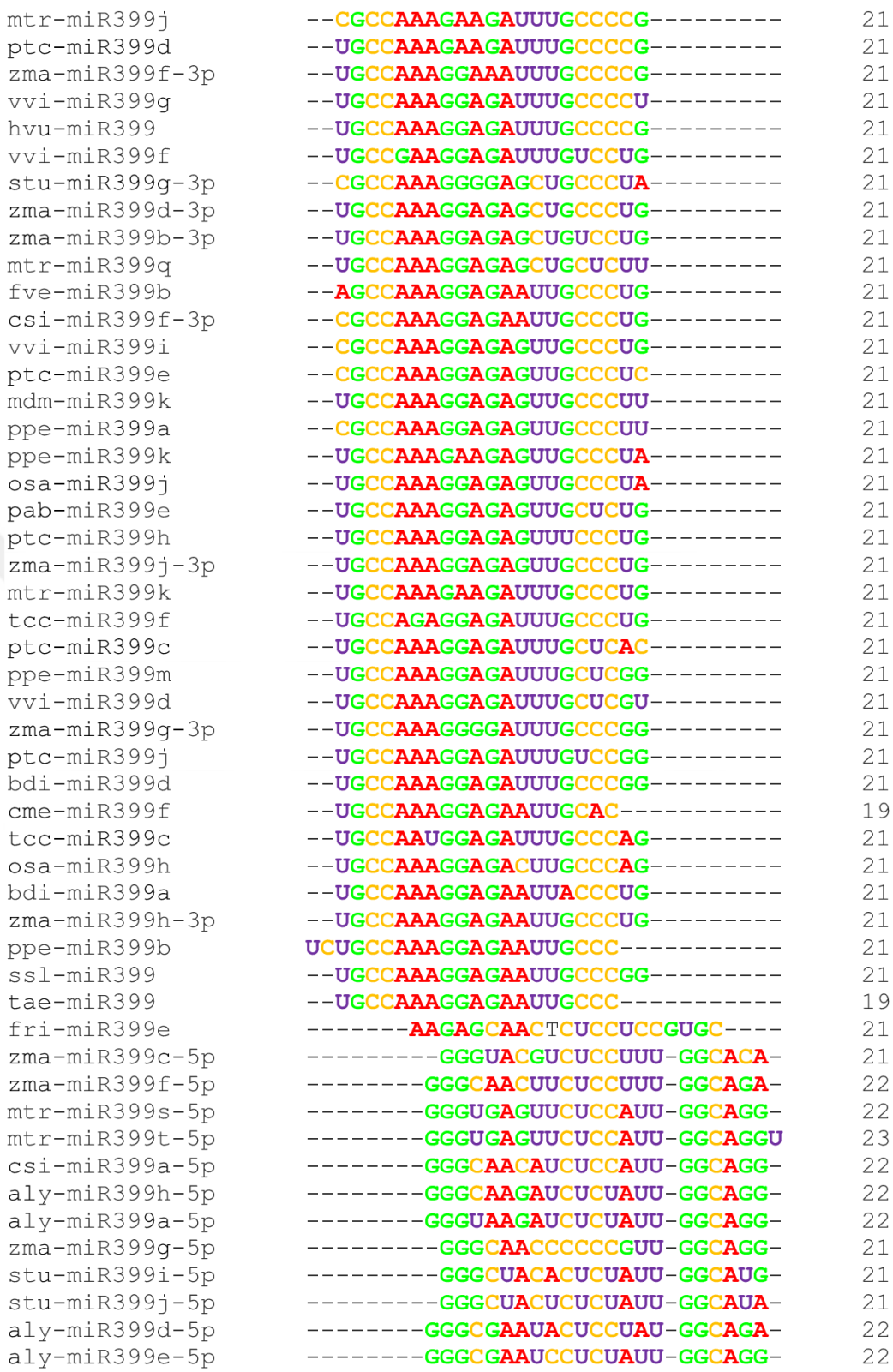
*Referans dizileri ile yapılan karşılaştırma sonucunda yeni tanımlanan miRNA dizisindeki yanlış eşleşmeler kırmızı renk ile gösterilmiştir.

4.3 Evrimsel İlişkilerin Analizi

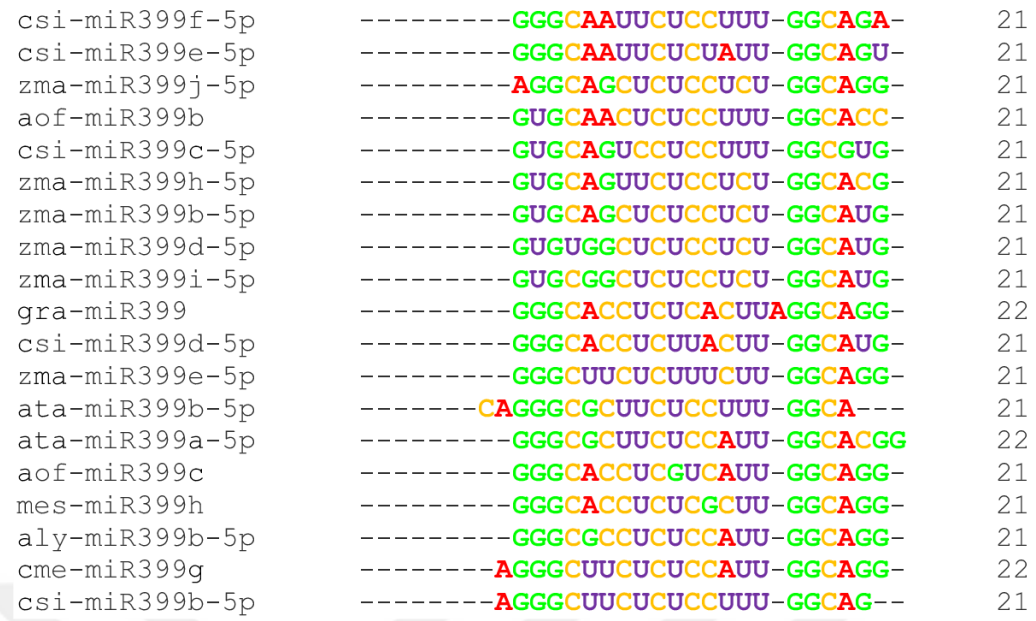
4.3.1 miRNA399 ailesine özgü dizilerin analizi

fri-miR399 dizisi ile birlikte 68 referans miR399 dizisinin hizalama analizi gerçekleştirilerek diziler arasındaki benzerlik incelendi. Bu diziler; *Medicago truncatula* (mtr-miR399j), *Populus trichocarpa* (ptc-miR399d), *Zea mays* (zma-miR399f-3p), *Vitis vinifera* (vvi-miR399g), *Hordeum vulgare* (hvu-miR399), *Vitis vinifera* (vvi-miR399f), *Solanum tuberosum* (stu-miR399g-3p), *Zea mays* (zma-miR399d-3p), *Zea mays* (zma-miR399b-3p), *Medicago truncatula* (mtr-miR399q), *Fragaria vesca* (fve-miR399b), *Citrus sinensis* (csi-miR399f-3p), *Vitis vinifera* (vvi-miR399i), *Populus trichocarpa* (ptc-miR399e), *Malus domestica* (mdm-miR399k), *Prunus persica* (ppe-miR399a), *Prunus persica* (ppe-miR399k), *Oryza sativa* (osa-miR399j), *Picea abies* (pab-miR399e), *Populus trichocarpa* (ptc-miR399h), *Zea mays* (zma-miR399j-3p), *Medicago truncatula* (mtr-miR399k), *Theobroma cacao* (tcc-miR399f), *Populus trichocarpa* (ptc-miR399c), *Prunus persica* (ppe-miR399m), *Vitis vinifera* (vvi-miR399d), *Zea mays* (zma-miR399g-3p), *Populus trichocarpa* (ptc-miR399j), *Brachypodium distachyon* (bdi-miR399d), *Cucumis melo* (cme-miR399f), *Theobroma cacao* (tcc-miR399c), *Oryza sativa* (osa-miR399h), *Brachypodium distachyon* (bdi-miR399a), *Zea mays* (zma-miR399h-3p), *Prunus persica* (ppe-miR399b), *Salvia sclarea* (ssl-miR399), *Triticum aestivum* (tae-miR399), *Fritillaria* (fri-miR399e), *Zea mays* (zma-miR399c-5p), *Zea mays* (zma-miR399f-5p), *Medicago truncatula* (mtr-miR399s-5p), *Medicago truncatula* (mtr-miR399t-5p), *Citrus sinensis* (csi-miR399a-5p), *Arabidopsis lyrata* (aly-miR399h-5p), *Arabidopsis lyrata* (aly-miR399a-5p), *Zea mays* (zma-miR399g-5p), *Solanum tuberosum* (stu-miR399i-5p), *Solanum tuberosum* (stu-miR399j-5p), *Arabidopsis lyrata* (aly-miR399d-5p), *Arabidopsis lyrata* (aly-miR399e-5p), *Citrus sinensis* (csi-miR399f-5p), *Citrus sinensis* (csi-miR399e-5p), *Zea mays* (zma-miR399j-5p), *Asparagus officinalis* (aof-miR399b), *Citrus sinensis* (csi-miR399c-5p), *Zea mays* (zma-miR399h-5p), *Zea mays* (zma-miR399b-5p), *Zea mays* (zma-miR399d-5p), *Zea mays* (zma-miR399i-5p), *Gossypium raimondii* (gra-miR399), *Citrus sinensis* (csi-miR399d-5p), *Zea mays* (zma-miR399e-5p), *Aegilops tauschii* (ata-miR399b-5p), *Aegilops tauschii* (ata-miR399a-5p), *Asparagus officinalis* (aof-miR399c), *Manihot esculenta* (mes-miR399h), *Arabidopsis lyrata* (aly-miR399b-5p),

Cucumis melo (cme-miR399g), *Citrus sinensis* (csi-miR399b-5p). *Arabidopsis lyrata* (aly-miR169c-3p), *Zea mays* (zma-miR169p-3p) olarak sıralanabilir. (Şekil 4.6, Şekil 4.7).

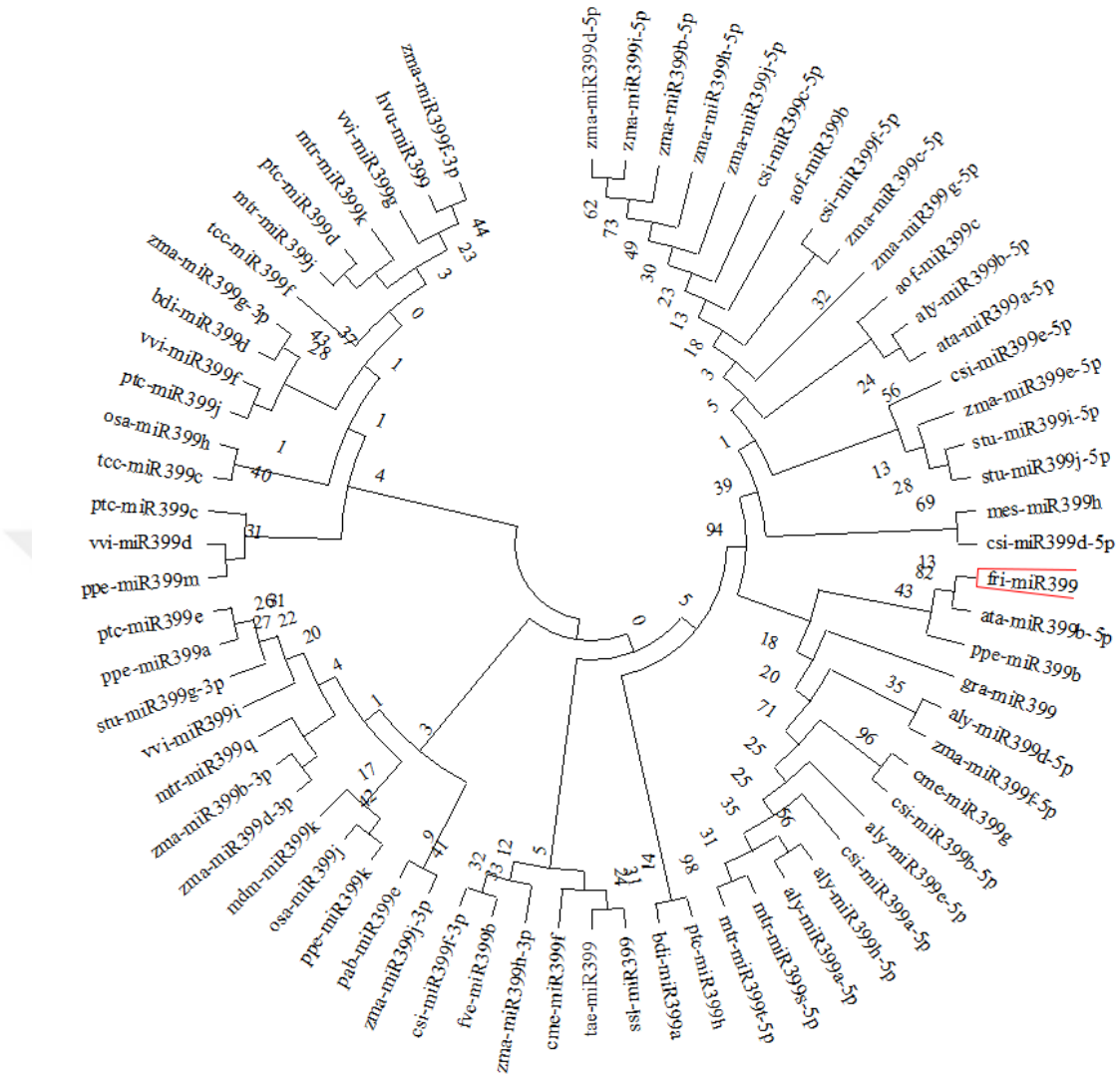


Şekil 4.6 miR399 ailesinin hizalama sonuçları



Şekil 4.7 miR399 ailesinin hizalama sonuçları

Fritillaria da dahil olmak üzere toplamda 23 farklı bitkiden elde edilen 69 miRNA dizisi analiz edildi ve filogenetik ağaç çizildi. Elde edilen filogenetik ağacın 2 ana gruba ayrıldığı belirlendi. Birinci grup *Zea mays* bitkisine ait zma-miR399f-3p dizisiyle başlayarak *Prunus persica* bitkisine ait olan ppe-miR399m dizisi ile biten 16 miRNA dizisini içerdiği görüldü. İkinci grupta ise *Fritillaria* cinsine ait **fri-miR399** dizisi ile *Aegilops tauschii* bitkisine ait olan **ata-miR399b-5p** dizisinin benzerlik gösterdiği bulundu. Bu grupta ayrıca *Prunus persica* bitkisine ait **ppe-miR399b** dizisinin yer aldığı da belirlendi. *Fritillaria* bitkisine ait dizinin bulunduğu grubun, evrimsel gelişmede diğerlerinden daha erken ayrıldığı da gözlendi (Şekil 4.8).



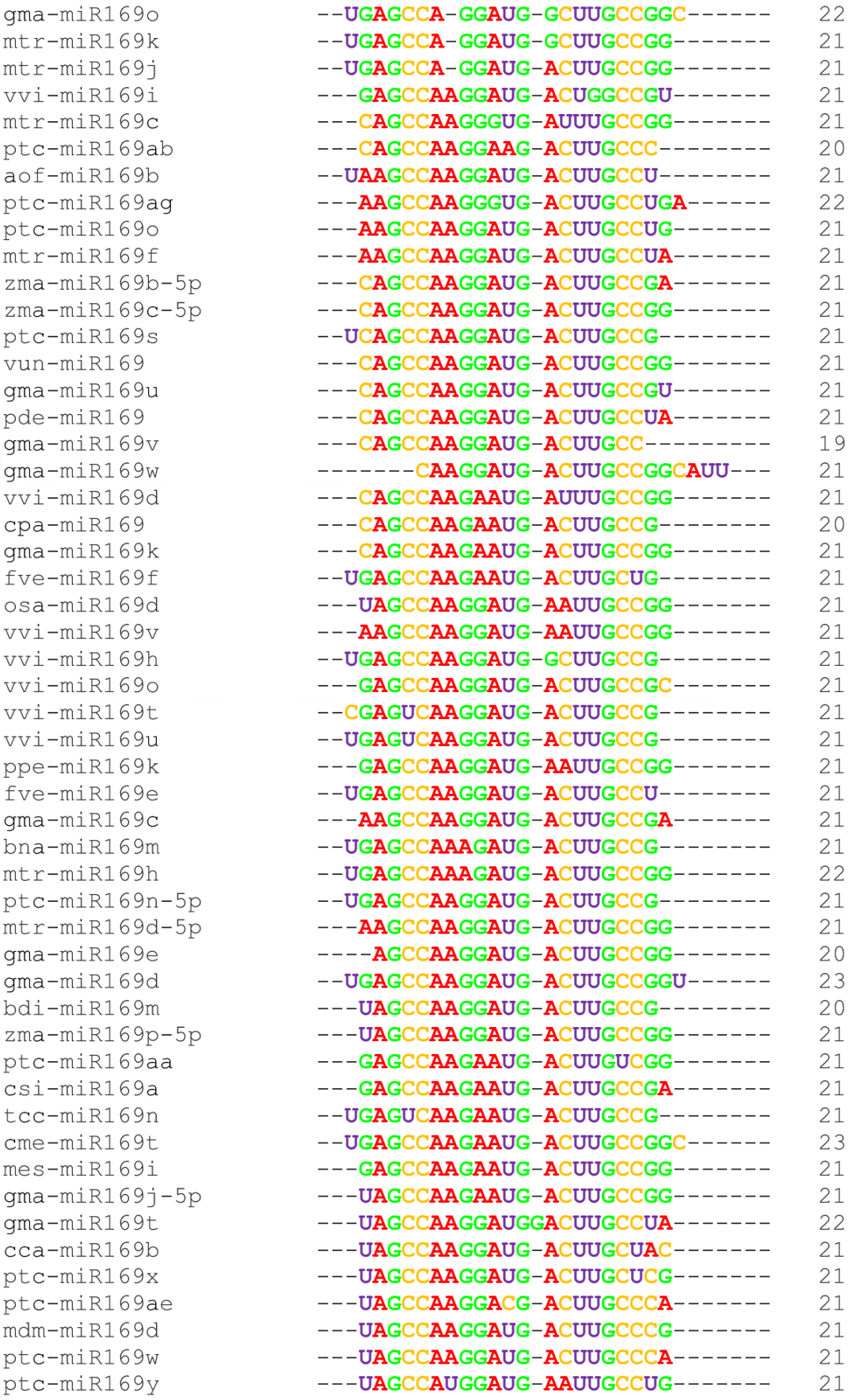
Şekil 4.8 miR399 ailesinin filogenetik ağaç sonuçları

4.3.2 miRNA169 ailesine özgü dizilerin analizi

fri-miR169 dizisi ile birlikte 140 referans miR169 dizisinin hizalama analizi gerçekleştirilerek diziler arasındaki benzerlik incelendi. Bu referans diziler; *Glycine max* (gma-miR169o), *Medicago truncatula* (mtr-miR169k), *Medicago truncatula* (mtr-miR169j), *Vitis vinifera* (vvi-miR169i), *Medicago truncatula* (mtr-miR169c), *Populus trichocarpa* (ptc-miR169ab), *Asparagus officinalis* (aof-miR169b), *Populus trichocarpa* (ptc-miR169ag), *Populus trichocarpa* (ptc-miR169o), *Medicago truncatula* (mtr-miR169f), *Zea mays* (zma-miR169b-5p), *Zea mays* (zma-miR169c-5p), *Populus*

trichocarpa (ptc-miR169s), *Vigna unguiculata* (vun-miR169), *Glycine max* (gma-miR169u), *Pinus densata* (pde-miR169), *Glycine max* (gma-miR169v), *Glycine max* (gma-miR169w), *Vitis vinifera* (vvi-miR169d), *Carica papaya* (cpa-miR169), *Glycine max* (gma-miR169k), *Fragaria vesca* (fve-miR169f), *Oryza sativa* (osa-miR169d), *Vitis vinifera* (vvi-miR169v), *Vitis vinifera* (vvi-miR169h), *Vitis vinifera* (vvi-miR169o), *Vitis vinifera* (vvi-miR169t), *Vitis vinifera* (vvi-miR169u), *Prunus persica* (ppe-miR169k), *Fragaria vesca* (fve-miR169e), *Glycine max* (gma-miR169c), *Brassica napus* (bna-miR169m), *Medicago truncatula* (mtr-miR169h), *Populus trichocarpa* (ptc-miR169n-5p), *Medicago truncatula* (mtr-miR169d-5p), *Glycine max* (gma-miR169e), *Glycine max* (gma-miR169d), *Brachypodium distachyon* (bdi-miR169m), *Zea mays* (zma-miR169p-5p), *Populus trichocarpa* (ptc-miR169aa), *Citrus sinensis* (csi-miR169a), *Theobroma cacao* (tcc-miR169n), *Cucumis melo* (cme-miR169t), *Manihot esculenta* (mes-miR169i), *Glycine max* (gma-miR169j-5p), *Glycine max* (gma-miR169t), *Cynara cardunculus* (cca-miR169b), *Populus trichocarpa* (ptc-miR169x), *Populus trichocarpa* (ptc-miR169ae), *Malus domestica* (mdm-miR169d), *Populus trichocarpa* (ptc-miR169w), *Populus trichocarpa* (ptc-miR169y), *Zea mays* (zma-miR169l-5p), *Hordeum vulgare* (hvu-miR169), *Asparagus officinalis* (aof-miR169a), *Theobroma cacao* (tcc-miR169i), *Malus domestica* (mdm-miR169b), *Sorghum bicolor* (sbi-miR169o), *Aegilops tauschii* (ata-miR169j-5p), *Brachypodium distachyon* (bdi-miR169k-5p), *Zea mays* (zma-miR169o-5p), *Brachypodium distachyon* (bdi-miR169j-5p), *Brachypodium distachyon* (bdi-miR169i), *Zea mays* (zma-miR169q-5p), *Cucumis melo* (cme-miR169b), *Cucumis melo* (cme-miR169o), *Populus trichocarpa* (ptc-miR169q), *Populus trichocarpa* (ptc-miR169u-5p), *Theobroma cacao* (tcc-miR169g), *Malus domestica* (mdm-miR169o), *Zea mays* (zma-miR169h), *Zea mays* (zma-miR169j-5p), *Vitis vinifera* (vvi-miR169e), *Nicotiana tabacum* (nta-miR169t), *Solanum lycopersicum* (sly-miR169e-5p), *Sorghum bicolor* (sbi-miR169d-5p), *Malus domestica* (mdm-miR169e), *Oryza sativa* (osa-miR169f.2), *Oryza sativa* (osa-miR169i-5p.2), *Glycine max* (gma-miR169s-3p), *Solanum tuberosum* (stu-miR169d-3p), *Glycine max* (gma-miR169j-3p), *Glycine max* (gma-miR169n-3p), *Triticum aestivum* (tae-miR169), *Camelina sativa* (cas-miR169d), *Camelina sativa* (cas-miR169f), *Arabidopsis thaliana* (ath-miR169g-3p), *Brachypodium distachyon* (bdi-miR169c-3p), *Citrus sinensis* (csi-miR169n-3p), *Arabidopsis thaliana* (ath-miR169a-3p), *Zea mays* (zma-miR169r-3p),

Aegilops tauschii (ata-miR169h-3p), *Glycine max* (gma-miR169l-3p), *Brachypodium distachyon* (bdi-miR169a-3p), *Zea mays* (zma-miR169b-3p), *Medicago truncatula* (mtr-miR169l-3p), *Aegilops tauschii* (ata-miR169f-3p), *Zea mays* (zma-miR169c-3p), ***Fritillaria*** **(fri-miR169),** *Arabidopsis thaliana* (ath-miR169b-3p), *Medicago truncatula* (mtr-miR169e-3p), *Manihot esculenta* (mes-miR169ad), *Oryza sativa* (osa-miR169i-3p), *Oryza sativa* (osa-miR169p), *Zea mays* (zma-miR169e), *Oryza sativa* (osa-miR169q), *Zea mays* (zma-miR169d), *Glycine max* (gma-miR169i-3p), *Zea mays* (zma-miR169q-3p), *Zea mays* (zma-miR169m-3p), *Zea mays* (zma-miR169n-3p), *Zea mays* (zma-miR169o-3p), *Glycine max* (gma-miR169h), *Brachypodium distachyon* (bdi-miR169j-3p), *Solanum tuberosum* (stu-miR169e-3p), *Zea mays* (zma-miR169l-3p), *Aegilops tauschii* (ata-miR169b-3p), *Aegilops tauschii* (ata-miR169a-3p), *Brachypodium distachyon* (bdi-miR169k-3p), *Glycine max* (gma-miR169i-5p), *Populus trichocarpa* (ptc-miR169n-3p), *Solanum lycopersicum* (sly-miR169e-3p), *Solanum tuberosum* (stu-miR169f-3p), *Solanum lycopersicum* (sly-miR169f), *Populus trichocarpa* (ptc-miR169u-3p), *Oryza sativa* (osa-miR169r-3p), *Amborella trichopoda* (atr-miR169b), *Solanum tuberosum* (stu-miR169c-3p), *Solanum tuberosum* (stu-miR169a-3p), *Camelina sativa* (cas-miR169g-3p), *Arabidopsis lyrata* (aly-miR169n-3p), *Arabidopsis lyrata* (aly-miR169i-3p), *Arabidopsis lyrata* (aly-miR169m-3p), *Camelina sativa* (cas-miR169e-3p), *Citrus sinensis* (csi-miR169l-3p), *Brachypodium distachyon* (bdi-miR169e-3p), *Zea mays* (zma-miR169k-3p), *Aegilops tauschii* (ata-miR169c-3p), *Sorghum bicolor* (sbi-miR169d-3p), *Brachypodium distachyon* (bdi-miR169h-3p)'dur. (Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11)



Şekil 4.9 miR169 ailesinin hizalama sonuçları



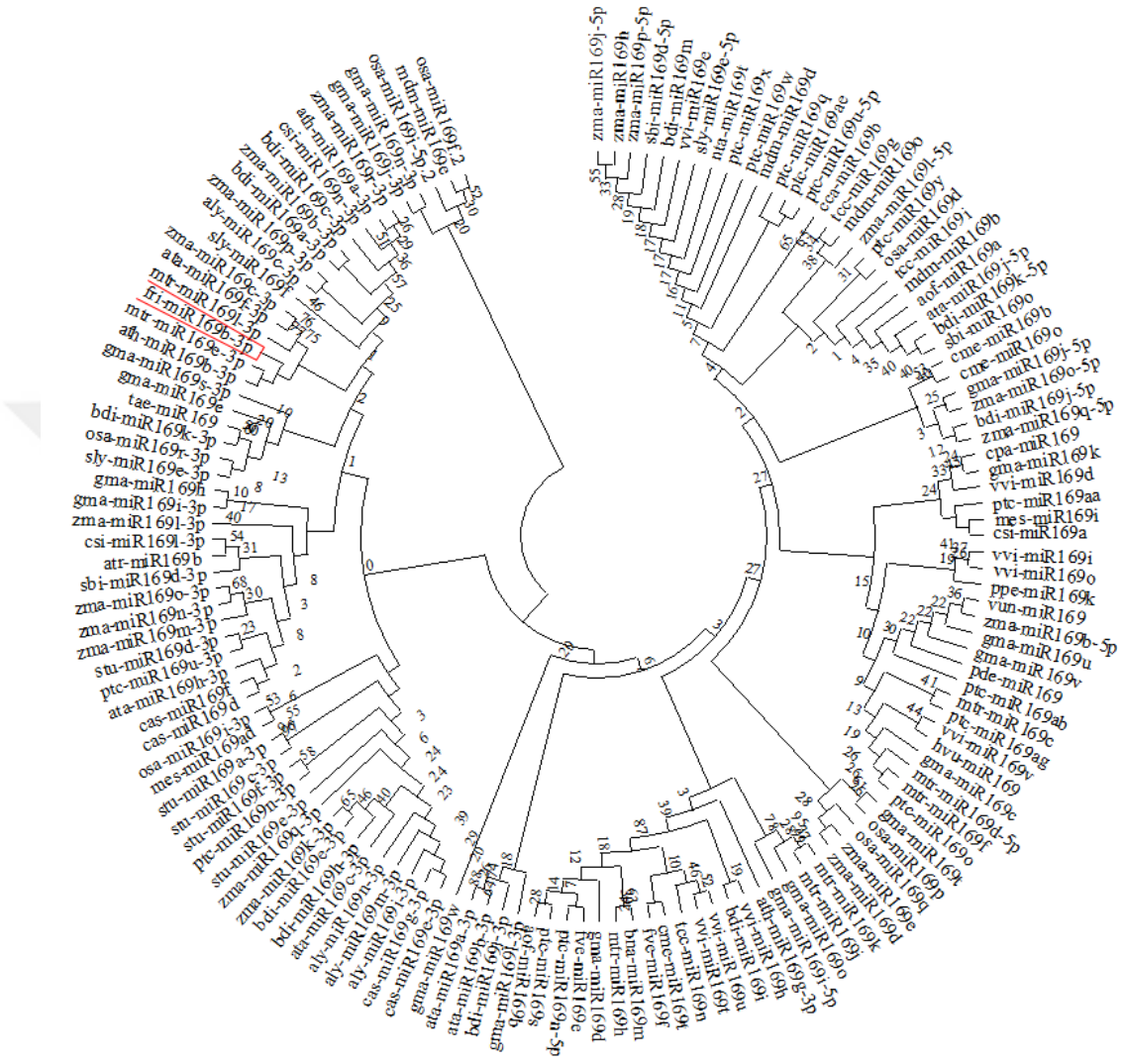
Şekil 4.10 miR169 ailesinin hizalama sonuçları



Şekil 4.11 miR169 ailesinin hizalama sonuçları

Toplamda 33 farklı bitkiden elde edilen 141 miRNA dizisi analiz edilerek filogenetik ağaç çizildi. Analizlerde miRNA169 ailesinin 2 ana gruba ayrıldığı görüldü. Birinci grup *Oryza sativa* bitkisine ait osa-miR169f.2 dizisiyle başlayarak *Glycine max* bitkisine ait olan gma-miR169j-3p dizisi ile biten 5 miRNA dizisini içermektedir. Geri kalan kısmı ise ikinci ana grubu oluşturmaktadır. Sonuçlara bakıldığında *Fritillaria* cinsine ait **fri-miR169** dizisinin yer aldığı grubun iki kardeş dala ayrıldığı belirlendi. Bir dalda fri-miR169b-3p bulunurken, diğer kardeş dalda *Medicago truncatula* bitkisine

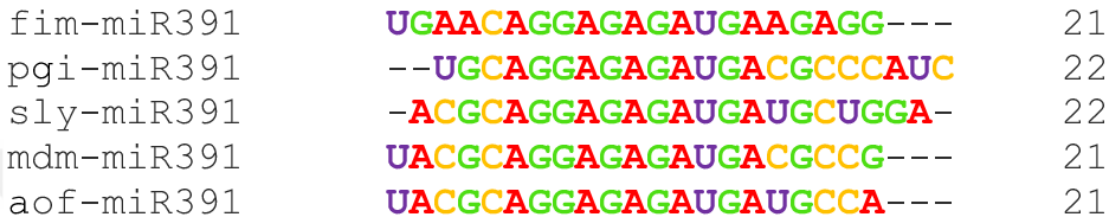
ait olan **mtr-miR169f-3p** ve *Arabidopsis thaliana* bitkisine ait olan **ath-miR169b-3p** dizisi bulunduğu gözlendi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 miR169 ailesinin filogenetik ağaç sonuçları

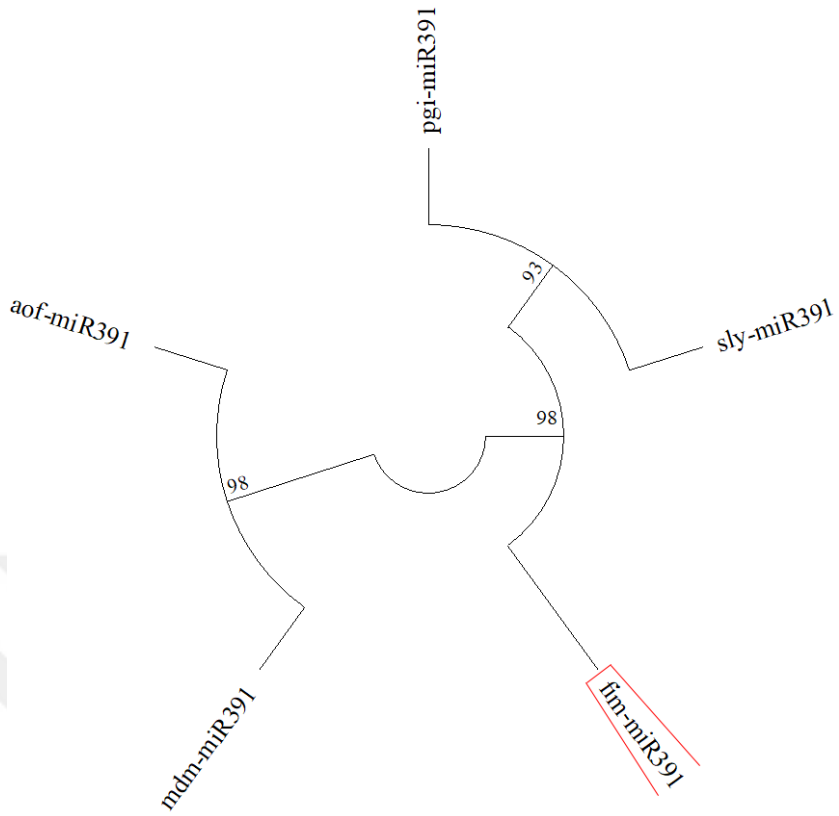
4.3.3 miRNA391 ailesine özgü dizilerin analizi

fim-miR391 dizisi ile birlikte 4 referans miR391 dizisinin hizalama analizi gerçekleştirilerek diziler arasındaki benzerlik incelendi. Şekil 4.13'te de gösterildiği gibi bu referans diziler; ***Fritillaria imperialis*** **(fim-miR391)**, *Panax ginseng* (pgi-miR391), *Solanum lycopersicum* (sly-miR391), *Malus domestica* (mdm-miR391), *Asparagus officinalis* (aof-miR391) olarak sıralanabilir.



Şekil 4.13 miRNA391 ailesinin hizalama sonuçları

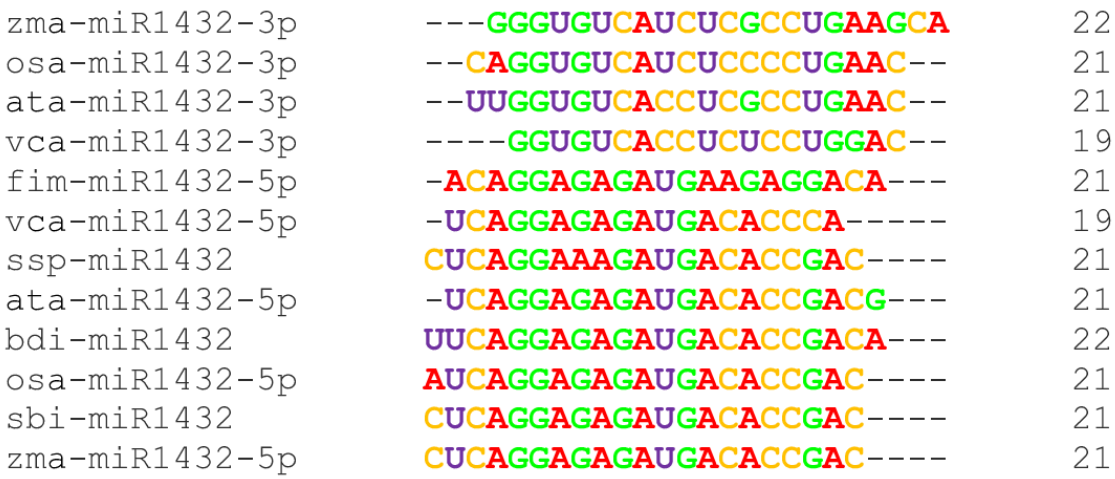
Toplamda 5 farklı bitkiden elde edilen 5 miRNA dizisinin 2 ana gruba ayrıldığı görüldü. Birinci grup, *Asparagus officinalis* bitkisine ait aof-miR1391 ve *Malus domestica* bitkisine ait olan mdm-miR391 dizisini içermektedir. İkinci grupta ise ***Fritillaria imperialis*** (fim-miR391), *Solanum lycopersicum* (sly-miR391) ve *Panax ginseng* (pgi-miR391) dizileri bulunmaktadır. Bununla birlikte sly-miR391 ve pgi-miR391 dizilerinin kardeş dallarda bulunduğu belirlendi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 miR391 ailesinin filogenetik ağaç sonuçları

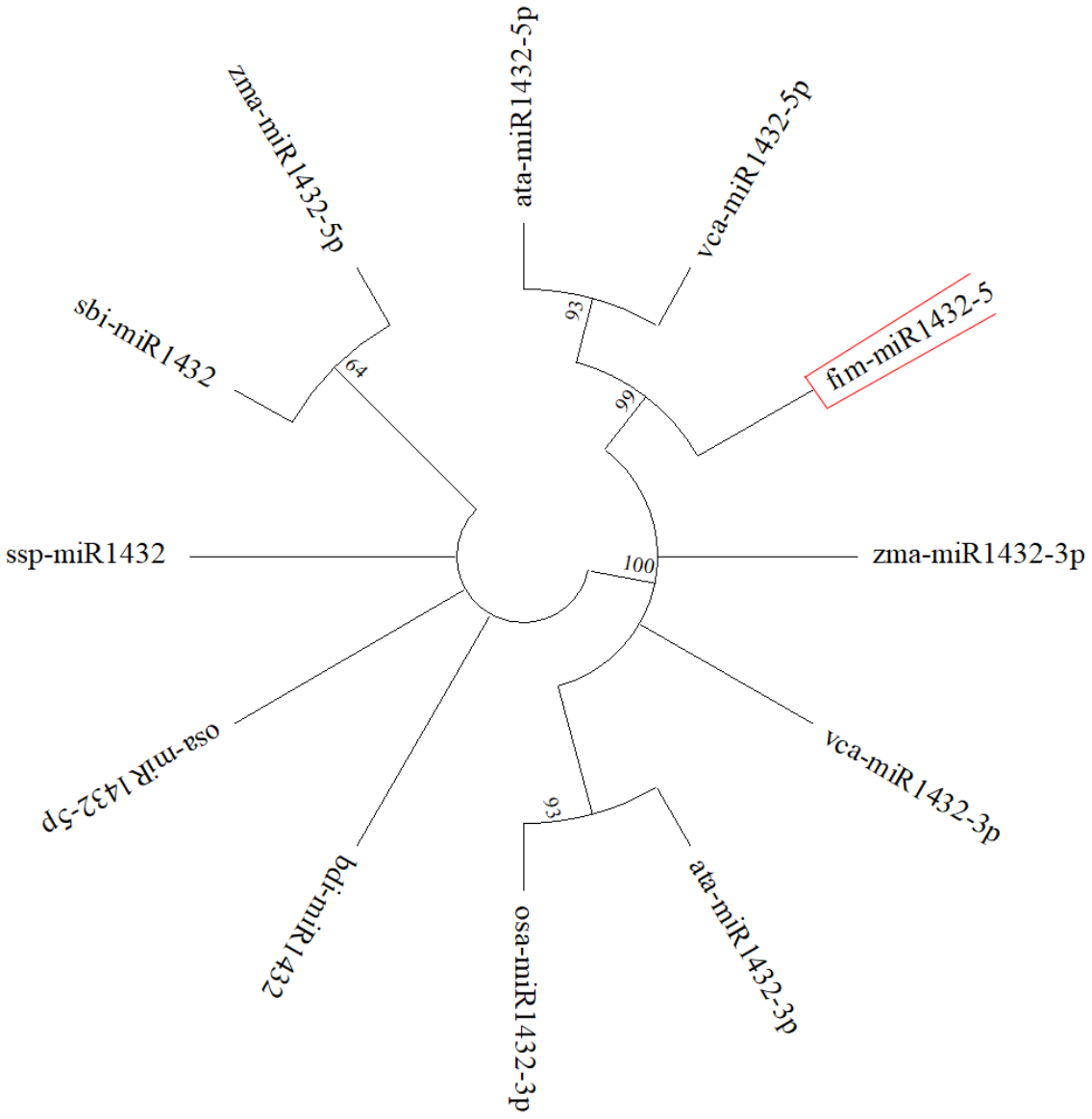
4.3.4 miRNA1432 ailesine özgü dizilerin analizi

fim-miR1432 dizisi ile birlikte 11 referans miR1432-5 dizilerinin hizalama analizi gerçekleştirilerek diziler arasındaki benzerlik incelendi. Bu diziler; *Zea mays* (zma-miR1432-3p), *Oryza sativa* (osa-miR1432-3p), *Aegilops tauschii* (ata-miR1432-3p), *Vriesea carinata* (vca-miR1432-3p), ***Fritillaria imperialis* (fim-miR1432)**, *Vriesea carinata* (vca-miR1432-5p), *Saccharum sp.* (ssp-miR1432), *Aegilops tauschii* (ata-miR1432-5p), *Brachypodium distachyon* (bdi-miR1432), *Oryza sativa* (osa-miR1432-5p), *Sorghum bicolor* (sbi-miR1432), *Zea mays* (zma-miR1432-5p)'dır (Şekil 4.15).



Şekil 4.15 miRNA1432 ailesinin hizalama sonuçları

Toplamda 8 farklı bitkiden elde edilen 12 miRNA dizisi kullanılarak çizilen filogenetik ağacın, 2 ana gruba ayrıldığı görüldü. Birinci grupta: *Zea mays* (zma-miR1432-5p), *Sorghum bicolor* (sbi-miR1432), *Saccharum sp.* (ssp-miR1432), *Oryza sativa* (osa-miR1432-5p), *Brachypodium distachyon* (bdi-miR1432) 5 nt dizileri bulunmaktadır. İkinci grup ise diğer dizileri içermektedir. ***Fritillaria imperialis*** bitkisine ait olan **fim-miR1432'nin** bulunduğu grubun 2 dala ayrıldığı gözlendi. Dalların birinde *Aegilops tauschii* (ata-miR1432-3p) ve *Vriesea carinata* (vca-miR1432-3p) dizileri bulunurken, diğer dalda fim-miR1432-5p dizisinin yer aldığı belirlendi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 miR1432 ailesinin filogenetik agaç sonuçları

4.3.5 miRNA8602 ailesine özgü dizilerin analizi

fim-miR8602 ile atr-miR8602 referans dizilerinin hizalama analizi gerçekleştirilerek diziler arasındaki benzerlik incelendi. Bu diziler sırasıyla; ***Fritillaria imperialis* (fim-miR8602)** ve *Amborella trichopoda* (atr-miR8602)'dır. miRBase veri tabanında miRNA8602 ait tek bir referans dizi ulunduğu için sadece hizalama analizleri gerçekleştirildi, filogenetik ağaç çizilmedi. (Şekil 4.17)

```
fim-miR8602        ACAGGAGAGAUGAAGAGGACA      21
atr-miR8602        UCAGGAGAGAUGAUGCCGGCC      21
```

Şekil 4.17 miRNA8602 ailesinin hizalama sonuçları

4.6 miRNA Hedef Genlerinin Hedeflenmesi

Fritillaria cinsinde miRNA dizilerinin tanımlanması, ikincil yapıların oluşturulması, miRNA dizileri arasında evrimsel ilişkilerin hizalama ve filogenetik ağaç çizilerek incelenme yapıldıktan sonra hedef genlerin belirlenmesi aşamasına geçildi. Tüm analiz aşamalarından geçilerek yeni tanımlanan miR399, miR169, miR391, miR1432 ve miR8602 dizilerinin hedef genleri bulundu. *Fritillaria* cinsinde tanımlanan miRNA dizilerinin hedef genleri Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2 *Fritillaria* cinsinde tanımlanan miRNA dizilerinin hedef genleri

№	miRNA	İşlevi	Aksesyon numarası	RNA hyb sonuçları
1	fri-miR399	KT290211.*1 Fritillaria agrestis* clone FBac001 genomic sequence, complete sequence	KT290211.1	target 5' C G A U A 3' G CGAAGGAGA GUU CUCUG C GUUUCCUCU CAA GAGAC miRNA 3' A G C 5'
2	fri-miR169	AF037457.1 *Fritillaria agrestis* photosystem II oxygen evolving complex protein 1 precursor (psbO) mRNA, complete cds	AF037457.1	target 5' A C CCAUCGAGGGC G U 3' GUG CCGA GGGACU AGUCCU CAU GGCU UCCUGA UCAGGG miRNA 3' A C G 5'
3	fim-miR1432	>AF219214.1 *Fritillaria camtschatcensis* clone sr31 retrotransposon TfcII, partial sequence	AF219214.1	target 5' G AAACA CGG G 3' GUUC UCUUUAUCUCUCC GU CAGG AGAAGUAGAGAGG CA miRNA 3' A A 5
4	fim-miR8602	>AF219214.1 *Fritillaria camtschatcensis* clone sr31 retrotransposon TfcII, partial sequence	AF219214.1	target 5' G AAACA CGG G 3' GUUC UCUUUAUCUCUCC GU CAGG AGAAGUAGAGAGG CA miRNA 3' A A 5
5	fim-miR391	>KT290211.1 *Fritillaria agrestis* clone FBac001 genomic sequence, complete sequence	KT290211.1	target 5' A CUU G A A A 3' GC GUCCUUC UUG GG UAU CG CAGGAAG AAC CC AUA miRNA 3' G U A 5'

V BÖLÜM

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, *Fritillaria* cinsine ait bitkilerde farklı metabolik yolaklarda rol oynayan yeni miRNA dizileri farklı *in siliko* yöntemler kullanılarak belirlendi. Çalışmanın sonucunda *Fritillaria* cinsinde 5 farklı miRNA dizisi (miR399, miR169, miR391, miR1432 ve miR8602) ilk defa tanımlandı. Belirlenen kriterlere uygun olan pre-miRNA dizilerinin ikincil yapıları ise "RNAfold Web Server" programı kullanılarak çizildi. Filogenetik analizler kapsamında *Fritillaria* bitkisinde tanımlanan miRNA dizileri ile referans miRNA dizileri arasındaki evrimsel ilişki, hizalama (Clustal Omega) ve filogenetik ağaç analizleri (MEGA) ile analiz edildi. Hedef genlerin belirlenmesinde de hem BLASTN hem "RNA Hybrid" programları kullanıldı.

Bitkilerde yeni miRNA dizilerini tanımlamada gerçekleştirilmesi gereken kriterlerden biri pre-miRNA dizilerindeki Watson-Crick eşleşmesi yani miRNA ve referans miRNA dizileri arasında en az 12-17 nt'in ya da G/U bç eşleşmesidir. *Fritillaria* türlerinde tanımlanan yeni pre-miRNA dizilerinin de bu uygulamaya göre 12'den fazla eşleşme yaptığı gözlendi. Pre-miRNA dizilerinin uzunluğu 56-140 nt dizileri arasında farklılık sergilediği ve ortalama 94 nt uzuluğunda olduğu görüldü. *Fritillaria* türlerinde tanımlanan olgun miRNA dizilerinin uzunluğu 18-23 nt arasında olduğu gözlendi. Olgun miRNA dizilerinin nt uzunluğunun oranları; 23 nt uzunluğundaki diziler için %2,60, 22 nt uzunluğundaki diziler için %16,52, 21 nt uzunluğundaki diziler için %65,65, 18 nt uzunluğundaki diziler için %1,30 ve 19-20 nt uzunluğundaki diziler için (%6,95) olduğu belirlendi. Yang *et al*. [110], miRNA dizilerini tanımlamada bu tezde kullanılan metodu kullanmıştır [111]. Deng *et al*. [112] tarafından arpa (*Hordeum vulgare)* bitkisinin üzerinde yaptığı araştırmanın sonuçları da bu tez çalışmasının sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Tezde elde edilen sonuçlara benzer şekilde Wu *et al*. yaptığı araştırmada 21 nt uzunluğundaki dizilerinin diğerlerine kıyasla daha büyük oranda olduğunu gözlenmiştir [113]. Benzer rapor *Paeonia ostii* bitkisinde yapılan araştırmada da tespit edilmiştir [114]. Farklı çalışmalarda da olgun miRNA dizilerinin 19 ile 24 nt arasında olduğu rapor edilmiştir [103, 104, 115, 116, 117].

Bu tez çalışmasında yeni tanımlanan dizilerde %GC içeriğinin %51,36'lık bir ortalama ile %47,15 - %62,50 arasında değiştiği görüldü. Sonuçlardan elde edilen %GC oranının başka

çalışmalara kıyasla daha yüksek olduğu tespit edildi. Bu çalışmaların birinde şeker kamışı (*Saccharum officinarum* L.) bitkisinde *in siliko* analizler kullanılarak yeni miRNA dizileri belirlenmiş ve %38 - 47 olmak üzere daha düşük oranda %GC içeriğinin tespit edildiği bildirilmiştir [118]. Aynı şekilde, %GC oranı düşük olarak rapor edilen başka bir çalışma da soğan bitkisinde (*Allium cepa* L.) yapılmıştır [119].

Ayrıca miRNA dizilerinin ortalama MFE değerlerinin -20.5 kcal mol^{-1} ile -36.4 kcal mol^{-1} arasında ve ortalama -26.26 kcal mol^{-1} olduğu görüldü. Elde edilen bu ortalamanın daha önce süs bitkilerinde ve arpada yapılan sonuçlara yakın benzerlikte olduğu (-28.73 kcal mol^{-1} ve -33.7 kcal mol^{-1}) belirlendi [112, 120]. Yapılan başka çalışmaların raporlarına bakılınca havuçtan (*Daucus carota* L.) (-23.58 ve -24.83 kcal mol^{-1}) [121] ve susamdan (*Sesamum indicum* L.) (-24.27 kcal mol^{-1}) [10] daha yüksek olduğu görüldü. Buna karşılık, üvez bitkisinden (*Xanthoceras sorbifolium*) (-59.6 kcal mol^{-1}) [117] doğu mazısı bitkisinden (*Platycladus orientalis*) (-43.9 kcal mol^{-1}) [178] ve çaydan (*Camellia sinensis* L.) (-110.9 kcal mol^{-1} ve -71.8 kcal mol^{-1}) [122] daha düşük olduğu da gözlendi. AMFE değerlerine bakılınca ortalama -31.05 olmak üzere -49.11 ve -20.65 arasında olduğu görüldü. Elde edilen bu sonuçların şeker kamışı (*Saccharum officinarum* L.) üzerinde yapılan araştırmanın sonuçlarına yakın benzerlik gösterdiği tespit edildi [118].

Son birkaç yılda, bitkilerde kodlama yapmayan RNA'ların (ncRNA) bir çok çeşidi tanımlanmıştır. Bu kodlama yapnayan RNA'lar RNA olgunlaşması, ekleme, transkripsiyonun düzenlenmesi, transkripsiyon sonrası RNA modifikasyonları, gen susturulması ve nükleozomun yeniden şekillenmesi gibi çeşitli işlemlerde yer almaktadır. Bu nedenle, ncRNA'ların gen düzenleyici olarak türlü metabolik yolaklarda önemli bir rol oynadığı tartışılmaz konudur [123, 124, 125, 126]. miRNA dizileri sadece transkripsiyon aşamasında değil onunla birlikte translasyon aşamasında da gen anlatımının düzenlenmesinde rol oynar [127]. Bu nedenle, miRNA ve hedef gen arasında mükemmel eşleşme ve benzerlik olması önemlidir [128]. miRNA ve hedef genin arasındaki benzerliği ve tamalayıcılığı kontrol etmek için BLAST programı en kullanışlı veri tabanıdır. *Fritillaria* cinsi üzerinde yapılan bu çalışmada da miRNA ve hedef genler arasındaki benzerleğin belirlenmesinde BLAST programı kullanıldı ve sonrasında da "RNA Hybrid" analizleri yapıldı. Sonuç olarak toplamda 5 miRNA dizisinin farklı fonksiyonlardaki 5 özgün hedef geni bulundu.

Bitkilerde potansiyel miRNA dizilerinin tanımlanması ve belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan metotların biri *in siliko* analizlerdir [129]. Yapılan araştırmaların sonuçlarına

dayanılarak *in siliko* analizlerle tanımlanan yeni miRNA dizilerinin büyüme, gelişim ve strese cevap gibi bir çok farklı metabolik yolaklarda rol oynadığı da rapor edilmiştir [130, 131]. Bu tez çalışmasında, *Fritillaria* cinsine ait bitkilerde tanımlanan miR399, miR169, miR391, miR1432 ve miR8602 dizilerinin de başta strese cevap olmak üzere farklı biyolojik süreçlerde, hücresel bileşenlerde ve farklı metabolik yolaklarda rol oynadığı görüldü.

Bitkilerin normal gelişimi, büyümesi ve yaşamını sürdürmesi için en az 17 kimyasal besin elementi gerekir. Bu 17 temel besin elementlerinin 14'ünü mineral besinler oluşturur, diğerleri ise oksijen, karbon ve hidrojendir [132]. Mikro ve makro elementlerin yeterli miktarda olmaması ve eksiksiği bitkilerde besin stresi meydana getirir. Bu da bitkilerin büyümesine ve gelişmesine yan etki gösteren en büyük stres faktörlerinden biridir [133]. Bitkiler de bu strese karşı özel mekanizmaların geliştirmektedirler [134, 135]. Bazı çalışmalarda bitkilerde besin stresine karşı çeşitli düzenleyici elementler tanımlanmıştır [136, 137]. Son yıllarda, miRNA'ların, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin (TF'ler) transkripsiyon sonrası düzenlenmesi yoluyla bitkide her türlü stres faktörlerine karşı tepkide yer aldığı bulunmuştur [138, 139]. Fosfor (P), kök gelişimi ve bitki verimliliğinde rol oynayan en önemli elementlerden biridir P, nükleotitler ve fosfatid gibi temel organik bileşiklerin yapısal bir elementi olmasının yanı sıra bitkilerde enerji iletimi, enerji üretimi, metabolizma ve amino asit sentezi ile de bağlantılı olmak üzere birçok biyolojik etkinlikte rol oynamaktadır [137]. Bitkilerde P eksikliğine karşı oluşan strese cevapta rol alan miRNA (miR399) ilk olarak *Arabidopsis* bitkisinde tanımlanmıştır [140, 141]. miR399'un bitkilerde P yetersizliğinde oluşan strese cevapta rol oynadığını belirleyen ve onların mekanizmalarını açıklayan farklı çalışmalar da vardır [142, 143, 144]. Kim *et al*. [145] miR399'un bitki çiçeklenmesinde de rol oynayabileceğini rapor etmiştir. Peng *et al*. [146] ise kışlık buğdayın bir çeşidi olan Dongnongdongmai1 (Dn1) bitkisi izerinde yaptığı araştırmada tae-mir399 ve onun hedef geni olan TaUBC24'ün bitkinin soğuğa dirençliliğinde büyük rol oynadığını tespit etti. Başka bir çalışmada miR399 dizisinin, turunçgillerde üreme gelişimini ve erkek fertilitesini etkilediği rapor edilmiştir [144]. Benzer şekilde çeltikte yapılan araştırmada da miR399'un potasyum (K), sodyum (Na) ve kalsiyum (Ca) eksikliklerinde de rol oynadığı gözlenmiştir [147]. Bu tez çalışmasında da fim-miR399'un retrotranspozonlar ile ilgili olduğu belirlendi. miRNA'lar gibi diğer bir epigenetik mekanizma olan retrotranspozonlar da gen anlatımının düzenlenmesinde önemli rol oynar [103].

Bitkiler, normal büyümesini ve gelişmesini sağlamak için kuraklık ve yüksek sıcaklık gibi olumsuz koşullar altında çok miktarda reaktif oksijen türü biriktirir. Antioksidan sistem, kuraklık koşullarında üretilen bu reaktif oksijen türlerini temizleyerek oksidatif hasarı azaltmaktadır. *Zanthoxylum bungeanum* bitkisi üzerinde yapılan araştırmada kuraklık stresi altında miR169b-3p'un hedef geni olan CAT'ın, kuraklığa olumlu tepki gösterdiği rapor edilmiştir [148]. *Brachypodium sylvaticum* ve buğdayda (*Triticum aestivum* L.) yapılan çalışmada, soğuk stres altında miR169 dizisi tanımlanmış ve soğuğa tepki göstermede olumlu etki sergileyebileceği hakkında bilgi verilmiştir [149]. Azot (N), bitkilerin en önemli bileşenlerinden proteinlerde ve fotosentetik pigmentlerde bulunduğundan dolayı bitki büyümesi için en gerekli maddelerin biridir. Bu nedenle, N stresine duyarlı miRNA'ların tanımlanması, bilim adamları tarafından sıkça araştırılan konu haline gelmiştir. Bu konudaki araştırmaların biri de Jagadhesan *et al*. [150] tarafından N stresinde miR169'un gösterdiği etkiler ve çeşitli metabolik yolaklarda ne gibi rol oynadığıyla ilgili olan araştırmadır. Ayrıca miR169'un strese cevap ve adaptasyon gibi farklı metabolik yolaklarda rol oynadığna ilişkin çalışmalar da yapılmıştır [151, 152]. Naman *et al*. [153], viral hastalıklara karşı meyveli bitkilerin etkisi ile ilgili yaptığı incelemede, portakal (*Citrus sinensis*) bitkisinde bulunan csi-miR169–3p ve SARS-CoV-2'nin etkileşiminin dikkat çektiğini, csi-miR169-3p, viral genom susturmasını indüklemek için umut verici terapötik aday olabileceği hakkında rapor etmiştir [153]. Bu tez çalışmasında da fim-miR169'un fotosentez ile ilişkili olduğu belirlendi.

Tezde tanımlanan diğer bir miRNA olan miR391, yakın zamanlarda tanımlanan miRNA ailesidir. miR391'in dizileri miR390 ailesine yakın benzerliktedir ve aralarında 5 nt fark vardır. Bundan dolayı Xie *et al*. [153], miR391'i miR390 ailesinin bir üyesi olarak kabul etmiştir. Sonradan *Arabidopsis'*te yapılan biyokimyasal çalışmalardan elde edilen bulgular ise bu açıklamanın doğru olmadığını göstermiştir. Sonuçlar; 5' terminal adenosin (5'-A) taşıyan miR390'ın fonksiyonel olarak AGO7 ile ilişkili olduğu, 5' terminal üridin (5'-U) taşıyan miR391'in esas olarak AGO1 ile ilişkili olduğunu kanıtlamıştır [154, 155]. miR391 ailesi ile ilgili önceden yapılmış olan araştırmalarda, bu miRNA'nın bitkilerde büyüme ve gelişmede rol oynadığı rapor edilmiştir [156, 157, 158]. Başka çalışmalarda ise oksin tepkisinde de rol oynadığı belirtilmiştir [159, 160]. Fei *et al*. [161] yayınlamış oldukları çalışmada; miR167a, miR171b ve miR391 dizilerinin bitkilerde köklenmenin başlatılmasında, birincil kök ile taç kökü ve kök kıllarının oluşumunda önemli rol oynayabileceğini gözlemlemişlerdir. Soya fasulyesi (*Glycine max*) bitkisi üzerinde yapılan araştırmada ise miR391'in soğuk stressinde

rol oynadığı bildirilmiştir [162]. Tütün (*Nicotiana tabacum*), patates (*Solanum tuberosum*) ve mercimek (*Lens culinaris*) bitkileri üzerinde yapılan çalışmalarda da miR391 ailesi araştırılmıştır [163, 164, 165]. Bu tez çalışmasında da fim-miR391'in retrpotranspozonlar ile ilgili olduğu belirlendi [103].

Bitki büyüme ve gelişmesinin düzenlenmesi çok hassastır ve ilk başta genetik bilgiye sonra da dış çevresel faktörlere bağlıdır [166]. Zhao *et al*. [167] yapmış oldukları araştırmada; çeltikte (*Oryza sativa*) miR1432 anlatımının inhibe edilmesi veya *OsACOT* (Asil-CoA Thioesterase) geninin aşırı anlatımının sonucunda, tahıl ağırlığının önemli ölçüde arttığı ve bu durumun da çeltiğin verimini arttırdığını bildirmiştir. Tahıl veriminin düzenlenmesi dışında miR1432, *M. oryzae* enfeksiyonuna da duyarlıdır [168]. Arpada (*Hordeum vulgare*) miR1432-5p düşük K stresine yanıt olarak Ca^{2+} sinyal yoluna katılabileceği tespit edilmiştir [169]. Ayrıca miR1432, bitkilerde biyotik veya abiyotik streslere karşı geliştirme ve savunma yanıtlarını içeren korunmuş bir miRNA ailesidir. Arpada bitki gelişimi sırasında miR1432-5p miktarları artmaktadır [170]. Mısır (*Zea mays*) bitkisinnin meristemlerinde miR1432 anlatımının soğuk stresi altında azaldığı görülmüştür [130]. Buğdayda (*Triticum aestivum*), yapraklardaki miR1432'nin anlatımının, mikorizal işlemin varlığında su eksikliği ile azaldğı tespit edilmiştir [171]. Yabani buğdayda (*Triticum turgidum ssp. dicoccoides*), miR1432'nin kuraklık stresi altındaki köklerde indüklendiği görülmüştür [172]. Bitkilerde, miRNA'lar hedef gen anlatımını düzenleyerek gelişimsel plastisite, stres tepkileri ve simbiyotik, parazitik etkileşimler dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçleri manipüle eder [173]. Bitki patojen etkileşimindeki miRNA hedef modüllerine ilişkin mevcut bilgiler, esas olarak bitki ve mantar veya virüslerin üzerinde yoğunlaşmıştır. İlk olarak Jia *et al*. osa-miR1432'nin bakterilere karşı bitkide dirençlilik sağlama mekanizması ile ilgili bilgi vermişlerdir [174]. Şeker kamışı (*Saacharum Officinarum* L.) bitkisi üzerinde yapılan araştırmada da miR1432'nin tuzluluk stresinde rol oynadığı rapor edilmiştir [175]. Bu tez çalışmasında da fim-miR1432'nin retrotranspozonlar ile ilgili olduğu belirlendi [103].

Bu tez çalışmasında *Fritillaria* türlerinde ilk olarak tanımlanan miR8602 ailesinin başka bitkilerde bulunduğuna dair bilgilerle karşılaşılmadı. Sadece *Amborella trichopoda* bitkisinde ilk olarak miR8602'nin bulunduğu ve böylelikle miRBase veri tabanında yer aldığı görüldü [176]. Ayrıca bu miRNA ailesinin çok nadire ve ilk defa *Fritillaria* türlerinde bulunduğu da dikkat çekicidir. Ayrıca, fim-miR8602'nin retrotranspozonlar ile ilgili olduğu belirlendi [177].

Bitki miRNA'lar'ı; büyüme, gelişme, biyotik ve abiyotik stres faktörlerine verilen yanıtlar dahil olmak üzere ana fizyolojik süreçlerde yer alan genleri düzenleyen küçük kodlama yapmayan RNA'lardır. Gen anlatımının düzenlenmesinde post-transkripsiyonel ve/veya post-translasyonel aşamalarda ve kuraklık, deniz seviyesinden yükseklik, sıcaklık, tuzluluk ve ağır metaller dahil olmak üzere abiyotik çevresel stres faktörleri bir çok alanda miRNA'lar temel bir düzenleyici rol oynamaktadır. Bu tez çalışması, Aygül lalesinde ve *Fritillaria* cinsine ait diğer türlerde miRNA dizilerinin araştırıldığı ilk detaylı çalışmadır. Elde edilen sonuçların ileride yapılacak yeni araştırmalarda ve *Fritillaria*'nın başka türleri üzerinde de araştırmaların yapılmasında temel olacağı beklenilmektedir.

KAYNAKÇA

[1]. Anderson, Alyssa M, "Describing the Undiscovered", Journal of Chironomidae Research, (31) (2018): 2–3.

[2]. IUCN, The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2021-2, Cambridge: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, (2021).

[3]. Rønsted N, Law S, Thornton H, Fay M. F, and Chase M. W, Molecular Phylogenetic Evidence for The Monophyly of *Fritillaria* and *Lilium* (*Liliaceae*; *Liliales*) and the Infrageneric Classification of *Fritillaria*, Molecular Phylogenetics and Evolution, 35 (2005): 509–527.

[4]. Kimsanaliev D, Ömürzakova N, Kıdıraliyeva B, İmanberdieva N, Maadalieva A, Moldaliev Z, Kaya Y, 8th International Congress on Fundamental and Applied Sciences 2021 (ICFAS2021), Proceeding Book, Antalya, Turkey, pp. 176, 2021.

[5]. Ulrich-Merzenich G, Panek D, Zeitler H, Wagner H, and Vetter H, New Perspectives for Synergy Research with the Omic-Technologies, Phytomedicine, 16 (6-7) (2009): 495-508.

[6]. Romanick S, and Ferguson B. S, Introduction to Nutritional Epigenomics. Ferguson, B. S. (ed.), Nutritional Epigenomics, Academic Press, 2019.

[7]. Elvir L, Duclot F, Wang Z, and Kabbaj M, Epigenetic Regulation of Motivated Behaviors by Histone Deacetylase Inhibitors, Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 105 (2019): 305-317

[8]. Talebizadeh Z, Shah A, and DiTacchio L, The Potential Role of a Retrotransposed Gene and a Long Noncoding RNA in Regulating an X-Linked Chromatin Gene (KDM5C): Novel Epigenetic Mechanism in Autism, Autism Research, 12(7) (2019): 1007-1021.

[9]. Palazzo A. F, and Lee E. S, Non-coding RNA: What is Functional and What is Junk, Frontiers in Genetics, 6 (2015): 2.

[10]. Marakli S, Identification and Functional Analyses of New Sesame Mirnas (*Sesamum indicum* L.) and Their Targets, Molecular Biology Reports, 45 (2018): 2145-2155.

[11]. Pritchard C. C, Cheng H. H, and Tewari M, MicroRNA Profiling: Approaches and Considerations, Nature Reviews Genetics, 13(5) (2012): 358-369.

[12]. Vasudevan S, Tong Y, and Steitz J. A, Switching from Repression to Activation: microRNAs can up-regulate Translation, Science, 318(5858) (2007): 1931-1934.

[13]. Бондаренко. Л, Императордун таажысы–Гүл өстүрүүчүлүк. Москва, 2002. - 12-б.

[14]. Баранова. М.В, К систематике рода Lilium. Ленинград, 1990. - , 74-б.

[15]. Hill L, Fritillaria: A list of published names. version 5.7. Available at: http://www.fritillariaicones.com/info/names/frit.names.pdf (last accessed November 2013).

[16]. Rix EM, *Fritillaria*: A revised classification: together with an updated list of species, *Fritillaria* Group of the Alpine Garden Society, Worcestershire, (2001): 1-14.

[17]. WCSP, World Checklist of Selected Plant Families, Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew, Available at: http://wcsp.science.kew.org (last accessed September 2017).

[18]. Day P. D, Berger M, Hill L, Fay M. F, Leitch A. R, Leitch I. J, Evolutionary Relationships in The Medicinally İmportant Genus *Fritillaria* L. (Liliaceae), Molecular Phylogenetics and Evolution, 80 (2014): 11–19.

[19]. Alp Ş, "Doğal Çiçeksoğanları ve Ters Lale Koruma Önlemleri ve Yetiştiriciliği." Yalova: Doğal Çiçek Soğancıları Derneği, 2006.

[20]. Иманбердиева Н.А., Маадалиева А.М, Современное Состояние Эндема *Fritillaria Eduardii* и Его Интродукция в Чуйскую Долину (Кыргызская Республика), Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. № 12. (2020): С. 17-20.

[21]. Jefferson-Brown M, Pratt K, The Gardener's Guide to Growing Fritillaries, David & Charles, Devon, England, 1997.

[22]. Tekşen M, Aytac Z, The revision of the genus *Fritillaria* L. (*Liliaceae*) in the Mediterranean region (Turkey), Turkish Journal of Botany, 35 (2011): 447–78.

[23]. Hao D, Gu X, Xiao P, Peng Y, Phytochemical and Biological Research of Fritillaria Medicine Resources, Chin Journal Natural Medicine, 11 (2013):330–44.

[24]. Li H, Jiang Y, Li P, Chemistry, Bioactivity and Geographical Diversity of Steroidal Alkaloids from the *Liliaceae* Family, Natural Product Reports, 23 (2006): 735.

[25]. Marco R, Accordini S, Cerveri I, Corsico A, Antó JM, Künzli N, et al, Incidence of Chronic Obstructive Pulmonary Disease in a Cohort of Young Adults According to The Presence of Chronic Cough and Phlegm, The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 175 (2007): 32–9.

[26]. Majnooni MB, Fakhri S, Shokoohinia Y, Kiyani N, Stage K, Mohammadi P, Phytochemicals: Potential Therapeutic Interventions Against Coronavirus-Associated Lung Injury, Frontiers in Pharmacology, 11 (2020):1–22.

[27]. Gürlek, Hao D, Gu X, Xiao P, Peng Y, Phytochemical and Biological Research of *Fritillaria* Medicine Resources, Chin Journal of Nature Medicine, 11 (2013): 330–44.

[28]. Abdalla MA, Zidorn C, The genus Tragopogon (Asteraceae): a Review of its Traditional Uses Phytochemistry and Pharmacological Properties, Journal of Ethnopharmacology, 250 (2020): 112466.

[29]. Li Y, Xu C, Zhang Q, Liu JY, Tan RX, In vitro Anti-Helicobacter Pylori Action of 30 Chinese Herbal Medicines Used to Treat Ulcer Diseases, Journal Ethnopharmacology, 98 (2005): 329–33.

[30]. Kim M, Nguyen D, Heo Y, Park KH, Paik H, Kim YB, Antiviral Activity of *Fritillaria thunbergii* Extract Against Human Influenza Virus H1N1 (PR8) in *vitro*, *in ovo* and *in vivo*, Journal of Microbiology and Biotechnology, 30 (2020):172–7.

[31]. Kim S, Shin D, Oh M, Chung S, Lee J, Chang I, Inhibition of Sortase, a Bacterial Surface Protein Anchoring Transpeptidase, by β-itosterol3-O-glucopyranoside from *Fritillaria verticillata*, Bioscience Biotechnology Biochemistry, 67 (2003): 2477–9.

[32]. Li X, Gao W, Huang L, Huang L, Liu C, In vitro Antioxidant and in vivo Anti-infammatory Potential of Crude Non-alkaloid Fractions from *Fritillaria ussuriensis* Maxim, Latin American Journal of Pharmacy, 8 (2010):1328–35.

[33]. Pan F, Su T, Liu Y, Hou K, Chen C, Wu W, Extraction, Purifcation and Antioxidation of A Polysaccharide from *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*, International Journal of Biological Macromolecules, 112 (2018):1073–83.

[34]. Rozi P, Abuduwaili A, Mutailifu P, Gao Y, Rakhmanberdieva R, Aisa HA, Sequential Extraction, Characterization and Antioxidant Activity of Polysaccharides from *Fritillaria pallidifora* Schrenk, International Journal of Biological Macromolecules, 131 (2019): 97–106.

[35]. Ruan X, Yang L, Cui W, Zhang M, Li Z, Liu B, et al, Optimization of Supercritical Fuid Extraction of Total Alkaloids, Peimisine, Peimine and Peiminine from the Bulb of *Fritillaria thunbergii* Miq, and Evaluation of Antioxidant Activities of the Extracts, Materials, 9 (2016): 524.

[36]. Liu S, Yang T, Ming TW, Gaun TKW, Zhou T, Wang S, et al, Isosteroid Alkaloids from *Fritillaria cirrhosa* bulbus as Inhibitors of Cigarette Smoke Induced Oxidative Stress, Fitoterapia, 140 (2020):104434.

[37]. Li H, Hung A, Li M, Yang A, Fritillariae Thunbergii Bulbus: traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacodynamics, Pharmacokinetics and Toxicity, International Journal of Molecular Sciences, 20 (2019): 1667.

[38]. Li Z, Qiao Y, Li J, A C, Hu K, Tang M, Acute and Sub-chronic Toxicity Studies of The Extract of Thunberg *Fritillary* Bulb, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 68 (2014): 370–7.

[39]. Xu Y, Ming TW, Gaun TKW, Wang S, Ye B, A Comparative Assessment of Acute Oral Toxicity and Traditional Pharmacological Activities Between Extracts of *Fritillaria cirrhosae* Bulbus and *Fritillaria pallidifora* Bulbus, Journal Ethnopharmacology, 238 (2019): 111853.

[40]. Guo X, Ni J, Xue J, Wang X, Extract of bulbus *Fritillaria cirrhosa* Perturbs Spindle Assembly Checkpoint, Induces Mitotic Aberrations and Genomic İnstability in Human Colon Epithelial Cell Line, Toxicologic Pathology, 69 (2017): 163–71.

[41]. Guo X, Ni J, Xue J, Wang X, Extract of bulbus *Fritillaria cirrhosa* Perturbs Spindle Assembly Checkpoint, Induces Mitotic Aberrations and Genomic İnstability in Human Colon Epithelial Cell Line, Toxicologic Pathology, 69 (2017): 163–71.

[42]. Zarei O, Yaghoobi MM, Cytotoxic efects of *Fritillaria imperialis* L. Extracts on Human Liver Cancer Cells, Breast Cancer Cells and Fbroblast-like Cells, Biomedicine and Pharmacotherapy, 94 (2017): 598–604.

[43]. Kang DG, Sohn EJ, Lee YM, Lee AS, Han JH, Kim TY, Efects Of Bulbus *Fritillaria* Water Extract on Blood Pressure and Renal Functions in the L-NAME-Induced Hypertensive Rats, Journal of Ethnopharmacology, 91 (2004): 51–6.

[44]. Wu X, Chan S, Ma J, Li P, Shaw P, Lin G, Investigation of Association of Chemical Profles with The Tracheobronchial Relaxant Activity of Chinese Medicinal Herb Beimu Derived from Various *Fritillaria* Species, Journal Ethnopharmacology, 210 (2018): 39–46.

[45]. Zhang Q, Zheng Z, Yu D, Steroidal alkaloids from the bulbs of *Fritillaria unibracteata*, Journal of Asian Natural Products Research, 13 (2011): 1098–103.

[46]. Cho I, Lee MJ, Kim J, Han NY, Shin KW, Sohn Y, *Fritillaria ussuriensis* Extract Inhibits The Production of Infammatory Cytokine And Mapks in Mast Cells, Bioscience Biotechnolpgy Biochemistry, 75 (2011): 1440–5.

[47]. Xu F, Xu S, Wang L, Chen C, Zhou X, Lu Y, Antinociceptive Efcacy of Verticinone in Murine Models of Infammatory Pain and Paclitaxel Induced Neuropathic Pain, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 34 (2011): 1377–82.

[48]. Atta-Ur-Rahman, Akhtar MN, Choudhary MI, Tsuda Y, Sener B, Khalid A, New Steroidal Alkaloids from *Fritillaria imperialis* and Their Cholinesterase Inhibiting Activities, Chemical Pharmocological Bulletin, 50 (2002):1013–6.

[49]. M. V. Baranova, The Ecologo-Morphological Peculiarities of the Underground Organs of the Representatives of the Genius *Fritillaria* (*Liliaceae*), (2008).

[50]. Бутков А. Я., Петилиум Эдуарда. – Красная книга Узбекской СССР. Редкие инаходящиеся под угрозой исчезновения виды животных и растений. Том II. Растения / Подред. А.С. Садыкова и др. – Ташкент: Фан, 1984. – С. 79–80.

[51]. Камелин. Р.В, Белоусова Л. С., Рябчик Эдуард. Крассная Книга СССР. 2-Том. Москва, 1984. - 240-б.

[52]. Лозина-Лозинская А. С., Рябчик – Fritillaria L. CCCP, 1935. - 302–б.

[53]. Imanberdieva N. A. Current state of the endem *P. eduardiii* and its İntroduction to the Chui Valley (Kyrgyz Republıc). IV. International Eurasian Agriculture and Natural Sciences Congress. Congress Book. Turkish 2020. 75 p.

[54]. Satıcıoğlu H, Batken'de (Kırgızistan) ve Batman'da (Türkiye) Ters Lale Efsaneleri, İnsan ve Toplum Bilimleri Araştırmaları Dergisi, 9 (1) (2020): 417-434.

[55]. Açılova R, "Batkendin Tuzu Oor". Kasiettü Batken Aymagı cana El Bilimi içinde 101-102, Bişkek: Madaniy İzildöö Borboru, 2011.

[56]. Karimov C, "Batken Aygül Gülü Menen Düynö Cüzünö Taanımal". Kasiettü Batken Aymagı cana El Bilimi içinde, (2011): 124-125.

[57]. Çopiya Ismanova, 69, tahsil durumu: orta, ev hanımı, 21.05.2019, Batken eyaleti-Merkez ilçesi-Bozadır köyü.

[58]. Elmas, Taylakova, 49, tahsil durumu: orta, ev hanımı, 15.05.2019, Batken eyaleti-Kadamcay ilçesi-Köktaala köyü.

[59]. Regel E, Kurze Nachrichten über die letzten Sammlungen von A. Regel, Gartenflora 33 (1884a): 68–73.

[60]. Regel E, Internationale Gartenbau-Ausstellung der Kaiserlichen Gartenbau-Gesellschaft in St. Petersburg vom 5. /17.–17. /29, Gartenflora 33 (1884b): 163–170.

[61]. Regel E, *Fritillaria imperialis* L. var. *inodora purpurea* Rgl, Gartenflora 33 (1884c): 257–258.

[62]. Regel E, Descriptiones Plantarum Novarum Et Minus Cogni-Tarum, IX. Trudy Imp. S.-Peterburgsk. Bot. Sada, Acta Horti Petropolitani, 8 (1884d): 639–702.

[63]. Losina-Losinskaja A.S, 1935. Genus 271. *Fritillaria* L. Pp. 232–246. in: Komarov, V.L. (ed.), Flora of the U.S.S.R., vol. 4. Leningrad: Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR.

[64]. Willem A. Wietsma, Ronald G, van den Berg, Johan van Scheepen & Jan J. Wieringa, The Nomenclatural History of *Fritillaria eduardii* and The Correct Names of its Varieties, (2011): 1754–1759.

[65]. Sadykova A, Unique Flora of Kyrgyzstan. Materials of The All-Russıan Youth Scientific and Practical Conference Modern Problems of The Ecology of The Anımal And Plant World, 2021, Russia.

[66]. D. Mil`ko, Eduard's Imperial Crown (*Petilium eduardii*, *Liliaceae*) In Kyrgyzstan, (2005).

[67]. Бараталиева Ө, Н. Алымкулова, Кыргызстандын экономикалык жана социалдык географиясы. Бишкек, 2012. - 220-б

[68]. Имс А. Д, Морфология цветковых растений. Москва, 1964. - 110-б.

[69]. Артамонов В. И., Редкие и исчезающие растения (по страницам Красной книгиСССР). Кн. 1. – М.: Агропромиздат, 1989. – 383 с.

[70]. Burquez A, Blue tits (Parus caeruleus) As Pollinators of The Crown Imperial (*Fritillaria imperialis*) in Britain. – Oikos, 1989, Vol. 55. – P. 335–340.

[71]. Peters W.S, Pirl M, Gottsberger G, Peters D.S, Pollination of the Crown Imperial Fritillaria imperialis by Great Tits Parus major, Journal für Ornithologie, 136 (2) (1985): 207–212.

[72]. Кыргыз Республикасынын Кызыл Китеби, 2005.

[73]. Birney E, Stamatoy an no poulos, J. A, Dutta A, Guigó R, Gingeras T. R, Mar-gulies E. H, Identification and Analysis of Functional Elements In 1% of the Human Genome by the ENCODE Pilot Project, Nature, 447 (2007): 799–816.

[74]. Ameruoso A, Gambill L, Liu B, Kcam M. C. V, and Chappell J, Brave New 'RNA'world—Advances in RNA Tools and Their Application for Understanding and Engineering Biological Systems, Current Opinion in Systems Biology, 14 (2019): 32-40.

[75]. Eddy S. R, Non–Coding RNA Genes and the Modern RNA World. Nature Reviews Genetics, 2 (12) (2001): 919-929.

[76]. Ponting C. P, and Belgard T. G, Transcribed Dark Matter: Meaning or Myth, Human Molecular Genetics, 19 (2010): 162-168.

[77]. Gibb E. A, Brown C. J, and Lam W. L, The Functional Role of Long Non-Coding RNA in Human Carcinomas, Molecular Cancer, 10 (2011): 38.

[78]. Czech B, Hannon GJ, Small RNA Sorting: Matchmaking for Argonautes, Nature Reviews Genetics, 12 (2011): 19–31.

[79]. Li Z, Zhao W, Wang M, and Zhou X, The Role of Long Noncoding RNAs in Gene Expression Regulation, (2019).

[80]. Nigita G, Marceca G. P, Tomasello L, Distefano R, Calore F, Veneziano D, and Croce C. M, ncRNA Editing: Functional Characterization and Computational Resources. Lai X, Gupta S. K, Vera J, (eds.), Computational Biology of Non-Coding RNA, Humama Press, (2019).

[81]. Pradas-Juni M, Hansmeier N. R, Link J. C, Schmidt E, Larsen B. D, Klemm P, and Kiefer C. A, A MAFG-lncRNA Axis Links Systemic Nutrient Abundance to Hepatic Glucose Metabolism, Nature Communications, 11(1) (2020): 1-17.

[82]. Wang C, Ding Q, Plant P, Basheer M, Yang C, Tawedrous E, and Yousef G. M, Droplet Digital PCR Improves Urinary Exosomal miRNA Detection Compared to Real-Time PCR, Clinical Biochemistry, 67 (2019): 54-59.

[83]. Ma Q, Wang L, Yang Y, Su Y, Wang T, Hou Q, and Yao H, Association Between lncRNA and GCKR Gene in Type 2 Diabetes Mellitus, Clinica Chimica Acta, 501 (2020): 66-18.

[84]. Vasudevan S, Tong Y, and Steitz J. A, Switching from Repression to Activation: microRNAs can up-regulate Translation, Science, 318(5858) (2007): 1931-1934.

[85]. Ghosh Z, Chakrabarti J, and Mallick B, miRNomics the Bioinformatics of microRNA Genes, Biochemical and Biophysical Research Communications, 363(1) (2007): 6-11.

[86]. Lee R. C, Feinbaum R. L, and Ambros V, The *C. elegans* Heterochronic Gene lin-4 encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to Lin-14, Cell, 75(5) (1993): 843-854.

[87]. Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S, and Mello C, Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, Nature, 391(6669) (1998): 806-811.

[88]. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, and Tuschl T, Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs, Science, 294 (5543) (2001): 853-858.

[89]. Barros-Viegas A. T, Carmona V, Ferreiro E, Guedes J, Cardoso A. M, Cunha P, and Cardoso A. L, miRNA-31 Improves Cognition and Abolishes Amyloid-B Pathology by Targeting APP and BACE1 in an Animal Model of Alzheimer's Disease, Molecular Therapy-Nucleic Acids, 19 (2020):1219-1236.

[90]. Bartel D. P, MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function, Cell, 116 (2004): 281-297.

[91]. Unver T, and Budak H, Conserved microRNAs and Their Targets in Model Grass Species *Brachypodium distachyon*, Planta, 230 (2009): 659-669.

[92]. Hou J, and Zhao D, microRNA Regulation in Renal Pathophysiology, International Journal of Molecular Sciences,14 (7) (2013): 13078-1309.

[93]. Ambros V, Bartel B, Bartel D. P, Burge C. B, Carrington J. C, A Uniform System for microRNA Annotation, RNA, 9(3) (2003): 277-279.

[94]. Meyers B. C, Axtell M. J, Bartel B, Bartel D. P, Baulcombe D, Bowman J. L, and Zhu J. K, Criteria for Annotation of Plant microRNAs, The Plant Cell, 20 (12) (2008): 3186-3190.

[95]. Zhang B. H, Pan X. P, Cox S. B, Cobb G. P, and Anderson T. A, Evidence that miRNAs are Different from Other RNAs, Cellular and Molecular Life Sciences, 63 (2006): 246-254.

[96]. Becker C, Riedmaier I, Reiter M, Tichopad A, Pfaffl M. W, and Meyer H. H, Changes in the miRNA Profile Under the Influence of Anabolic Steroids in Bovine Liver, Analyst, 136 (6) (2011): 1204-1209.

[97]. Yildiz M, & Terzi H, Bitkilerin Yüksek Sicaklik Stresine Toleransinin Hücre Canliliği Ve Fotosentetik Pigmentasyon Testleri İle Belirlenmesi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi, 23(1) (2007): 47-60.

[98]. Karaismailoğlu R, & Marakli S, miRNAs as biomarkers in human diseases, International Journal of Science Letters, 4 (1) (2021): 190-201.

[99]. Provost P, MicroRNAs as a Molecular Basis for Mental Retardation, Alzheimer's and Prion Diseases, Brain Research, 1338 (2010): 58-66.

[100]. Altschul S. F, Gish W, Miller W, Myers E. W, and Lipman D. J, Basic Local Alignment Search Tool, Journal of Molecular Biology, 215(3) (1990): 403-410.

[101]. Altschul S. F, Madden T. L, Schäffer A. A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D. J, Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs, Nucleic Acids Research, 25 (1997): 3389-3402.

[102]. Lorenz R, Bernhart S. H, Zu Siederdissen C. H, Tafer H, Flamm C, Stadler P. F, and Hofacker I. L, ViennaRNA Package 2.0. Algorithms for Molecular Biology, 6(1) (2011): 26.

[103]. Marakli S, In Silico Determination of Transposon-Derived miRNAs and Targets in Aegilops species, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 38 (10) (2020): 3098-3109.

[104]. Xu J, Xian Q, Zhang N, Wang K, Zhou X, Li Y, Dong J, Chen X, Identification of miRNA-Target Gene Pairs Responsive to Fusarium Wilt of Cucumber via an Integrated Analysis of miRNA and Transcriptome Profiles, Biomolecules, 11 (11) 2021: 1620.

[105]. Zuker M, and Stiegler P, Optimal Computer Folding of Large RNA Sequences Using Thermodynamics and Auxiliary Information, Nucleic Acids Research, 9 (1981): 133-148.

[106]. Tamura K, Stecher G, & Kumar S, MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11, Molecular Biology and Evolution, 38 (7) (2021): 3022-3027.

[107]. Saitou N, and Nei M, The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees, Molecular Biology and Evolution, 4 (1987): 406-425.

[108]. Nei M, and Kumar S, Molecular Evolution and Phylogenetics, Oxford University Press, New York, 2000.

[109]. Felsenstein J, Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap, Evolution, 39 (1985): 783-791.

[110]. Ying Yang, Xian-Ge Hu, Bingsong Zheng, Yue Li, Tongli Wang, Anket Sharma, Huwei Yuan, and Jian-Feng Mao, Characterization of microRNAs and Their Targets in a Highly Adaptable Conifer *Platycladus orientalis*, *Journal* of the American Society for Horticultural Science, 11 (2021): 147-1.

[111]. Dai X, Zhuang Z, & Zhao P. X, A Plant Small RNA Target Analysis Server (2017 release), Nucleic Acids Researchs, (2018): 46 49 54.

[112]. Deng P, Wang L, Cui L, Feng K, Liu F, Du X, et al, Global Identification of MicroRNAs and Their Targets in Barley under Salinity Stress, Plos ONE, 10(9) (2015): e0137990.

[113]. Wu L, Yu J, Shen Q, Identification of microRNAs in Response to Aluminum Stress in The Roots of Tibetan Wild Barley and Cultivated Barley, BMC Genomics, 19 (2018)**:** 560.

[114]. Jigang Han, Tianrui Zhang, Jian Li & Yonghong Hu, Identification of miRNA Responsive to Early Flowering in Tree Peony (*Paeonia ostii*) by High-Throughput Sequencing, The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 96:3 (2021): 297-310.

[115]. Deepak Kumar, Latoyia P. Downs, Monica Embers, Alex Flynt, Shahid Karim, bioRxiv, 2022.04.14.488330.

[116]. Sun GL, MicroRNAs and Their Diverse Functions in Plants, Plant Molecular Biology, 80 (1) (2012): 17–36.

[117]. Wang L, Ruan C, Bao A, Small RNA Profiling for Identification of Micrornas Involved in Regulation of Seed Development and Lipid Biosynthesis in Yellowhorn, BMC Plant Biolology, 21 (2021): 464.

[118]. Ashraf MA, Feng X, Hu X, Ashraf F, Shen L, Iqbal MS, *in silico* Identification of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Genome Encoded microRNAs Targeting Sugarcane Bacilli Form Virus, Plos One, 17(1) (2022): e0261807.

[119]. Kohnehrouz B. B, Bastami M, and Nayeri S, *In Silico* Identification of Novel microRNAs and Targets Using EST Analysis in *Allium cepa* L, Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences, 10 (2018): 771-780.

[120]. Bozkurt S, ve Maraklı S, Bazı süs bitkilerinde miRNA'ların tanımlanması ve hedeflerinin belirlenmesi, 9. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyotenoloji Kongresi, 18-20 Aralık 2020, Türkiye.

[121]. Bhan B, Koul A, Sharma D, Manzoor M. M, Kaul S, Gupta S, and Dhar M. K, Identification and Expression Profiling of miRNAs in Two Color Variants of Carrot (*Daucus carota* L.) using deep sequencing, Plos One, 14 (3) (2019): e0212746.

[122]. Tian C, Zhou C, Zhu C, Chen L, Shi B, Lin Y, Lai Z, Guo Y, Genome-Wide Investigation of the MiR166 Family Provides New Insights into Its Involvement in the Drought Stress Responses of Tea Plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze), *Forests,* 13(4) (2022): 628.

[123]. Jampala P, Garhewal A, Lodha M, Functions of long non-coding RNA in *Arabidopsis thaliana*, Plant Signaling and Behavior, 16 (2021): 1925440.

[124]. Rincon-Riveros A, Morales D, Rodriguez J.A, Villegas V.E, Lopez-Kleine L, Bioinformatic Tools for the Analysis and Prediction of ncRNA Interactions, International Journal of Molecular Sciences, 22 (2021): 11397.

[125]. Yao R.W, Wang Y, Chen L.L, Cellular functions of long noncoding RNAs, Nature Cell Biology, 21 (2019): 542–551.

[126]. Yu Y, Zhang Y, Chen X, Chen Y, Plant Noncoding RNAs: Hidden Players in Development and Stress Responses, Annual review of cell and developmental biology Abbreviation, 35 (2019): 407–431.

[127]. Von Born P, Bernardo-Faura M, and Rubio-Somoza I, An Artificial miRNA System Reveals that Relative Contribution of Translational Inhibition to miRNA-Mediated Regulation Depends on Environmental and Developmental Factors in *Arabidopsis thaliana,* Plos One, 13(2) (2018): e0192984

[128]. Zhao M, Meyers B. C, Cai C, Xu W, and Ma J, Evolutionary Patterns and Coevolutionary Consequences of MIRNA Genes and microRNA Targets Triggered by Multiple Mechanisms of Genomic Duplications in Soybean, The Plant Cell, 27(3) (2015): 546-562.

[129]. Jike W, Sablok G, Bertorelle G, Li M, and Varotto C, *In Silico* Identification and Characterization of a Diverse Subset of Conserved microRNAs in Bioenergy Crop *Arundo donax* L, Scientific Reports, 8 (1) (2018): 16667.

[130]. Aydinoglu F, and Lucas S. J, Identification and Expression Profiles of Putative Leaf Growth Related microRNAs in Maize (*Zea mays* L.) hybrid ADA313, Gene, 690 (2019): 57-67.

[131]. Zhao L, Chen C, Wang Y, Shen J, and Ding Z, Conserved microRNA Act Boldly During Sprout Development and Quality Formation in Pingyang Tezaocha (*Camellia sinensis*), Frontiers in Genetics, 10 (2019): 237.

[132]. Fageria N.K, The Use of Nutrients in Crop Plants; Routledge: London, UK; Taylor & Francis: London, UK; England and Wales: London, UK, 2016.

[133]. Mee C.Y, Balasundram S.K, Mohd Hanif A.H, Detecting and Monitoring Plant Nutrient Stress Using Remote Sensing Approaches, Asian Journal of Plant Sciences, 16 (2017): 1–8.

[134]. Schillaci M, Kehelpannala C, Martinez-Seidel F, Smith P.M.C, Arsova B, Watt M, Roessner U, the Metabolic Response of Brachypodium Roots to The Interaction with Beneficial Bacteria Is Affected by The Plant Nutritional Status, Metabolites, 11 (2021): 358.

[135]. Trehan S.P, Kumar M, Improving Nutrient Use Efficiency by Exploiting Genetic Diversity of Crops, In Nutrient Use Efficiency: From Basics to Advance, Springer, (2015): 209–220.

[136]. Gogolev Y.V, Ahmar S, Akpinar B.A, Budak H, Kiryushkin A.S, Gorshkov V.Y, Hensel G, Demchenko K.N, Kovalchuk I, Mora-Poblete F, Omics, Epigenetics, and Genome Editing Techniques for Food and Nutritional Security, Plants, 10 (2021): 1423.

[137]. Islam W, CRISPR-Cas9; An Efficient Tool for Precise Plant Genome Editing, Molecular & Cellular Proteomics, Probes 39 (2018): 47–52.

[138]. Nizampatnam NR, Schreier SJ, Damodaran S, Adhikari S, Subramanian S, microRNA160 Dictates Stage-specific Auxin and Cytokinin Sensitivities and Directs Soybean Nodule Development, The Plant journal: for cell and molecular biology, 84 (2015): 140-153.

[139]. Noman A, Aqeel M, Khalid N, Islam W, Sanaullah T, Anwar M, Khan S, Ye W, Lou Y, Zinc Finger Protein Transcription Factors: Integrated Line of Action for Plant Antimicrobial Activity, Microbial Pathogenesis, 132 (2019): 141–149.

[140]. Branscheid A, Sieh D, Pant BD, May P, Devers EA, Elkrog A, Schauser L, Scheible WR, Krajinski F, Expression Pattern Suggests a Role of mir399 In the Regulation of The Cellular Response to Local Pi Increase During Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis, Molecular Plant Microbe Interaction, 23 (7) (2010): 915-26.

[141]. Chiou, T. J., Aung, K., Lin, S. I., Wu, C. C., Chiang, S. F. and Su, C. L, Regulation of Phosphate Homeostasis by MicroRNA in *Arabidopsis*, Plant Cell, 18 (2006): 412-421.

[142]. Park S.H, Jeong J.S, Seo J.S, Park B.S, Chua N.H, Arabidopsis Ubiquitin-specific Proteases UBP12 and UBP13 shape ORE1 Levels During Leaf Senescence Induced by Nitrogen Deficiency, New Phytologist, 223 (2019): 1447–1460.

[143]. Rao S, Balyan S, Jha S, Bansal C, Das J.R, Gupta A, Mathur S, Orchestration of MicroRNAs and Transcription Factors in the Regulation of Plant Abiotic Stress Response in Plant Stress Biology, Springer, (2020): 251–277.

[144]. Wang R, Fang YN, Wu XM, Qing M, Li CC, Xie KD, Deng XX, Guo WW. The miR399-*CsUBC24* Module Regulates Reproductive Development and Male Fertility in Citrus, Plant Physiology, 183(4) (2020): 1681-1695.

[145]. Kim W, Ahn HJ, Chiou TJ, Ahn JH, The role of the miR399-PHO2 Module in The Regulation of Flowering Time in Response to Different Ambient Temperatures in Arabidopsis thaliana, Molecules and Cells, 32(1) (2011): 83-8.

[146]. Peng K, Tian Y, Sun X, Song C, Ren Z, Bao Y, Xing J, Li Y, Xu Q, Yu J, Zhang D, Cang J, tae-miR399-*UBC24* Module Enhances Freezing Tolerance in Winter Wheat via a CBF Signaling Pathway, The Journal of Agricultural and Food Chemistry, 17;69 (45) (2021): 13398-13415.

[147]. Hu B, Wang W, Deng K, Li H, Zhang Z, Zhang L, and Chu C, MicroRNA399 is Involved in Multiple Nutrient Starvation Responses in Rice, Frontiers in Plant Science, 6 (2015): 188.

[148]. Fei X, Li J, Kong L, Hu H, Tian J, Liu Y, Wei A, miRNAs and Their Target Genes Regulate the Antioxidant System of Zanthoxylum bungeanum Under Drought Stress, Plant Physiology and Biochemistry, 150 (2020):196-203.

[149]. Zhao W, Xiao W, Sun J, Chen M, Ma M, Cao Y, Cen W, Li R, Luo J, An Integration of MicroRNA and Transcriptome Sequencing Analysis Reveal Regulatory Roles of miRNAs in Response to Chilling Stress in Wild Rice, *Plants*, 11 (7) 2022: 977.

[150]. Jagadhesan B, Das S, Singh D, Micro RNA Mediated Regulation of Nutrient Response in Plants: The Case of Nitrogen, Plant Physiology, (2022).

[151]. Rao S, Balyan S, Jha S, and Mathur S, Novel Insights into Expansion and Functional Diversification of MIR169 Family in Tomato, Planta, 251(2) (2020):55.

[152]. Wu W, Wu Y, Hu D, Zhou Y, Hu Y, Chen Y, and Chen M, A Manually Curated Database of Experimentally Validated Stress-Responsive Non-Coding RNAs in Plants, Database, (2020).

[153]. Mangukia N, Rao P, Patel K, Pandya H, Rawal RM, Unveiling the Nature's Fruit Basket to Computationally Identify Citrus Sinensis Csi-Mir169-3p As A Probable Plant Mirna Against Reference and Omicron SARS-Cov-2 Genome, Computers in Biology and Medicine, 146 (2022):105502.

[153]. Xie Z, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givan SA, Carrington JC, Expression of Arabidopsis MIRNA genes, Plant Physiology, 138 (2005): 2145-2154.

[154]. Mi Sj, Cai T, Hu YG, Chen Y, Hodges E, Ni FR, Wu L, Li S, Zhou H, Long CZ, et al, Sorting of small RNAs into Arabidopsis Argonaute Complexes is Directed by The 5 ' Terminal Nucleotide, Cell, 133 (1) (2008): 116-127.

[155]. Montomery TA, Howell MD, Cuperus JT, Li DW, Hansen JE, Alexander AL, Chapman EJ, Fahlgren N, Allen E, Carrington JC, Specificity of ARGONAUTE7-miR390 Interaction and Dual Functionality in TAS3trans-acting siRNA Formation, Cell, 133(1) (2008): 128-141.

[156]. Levy A, Szwerdszarf D, Abu-Abied M, Mordehaev I, Yaniv Y, et al, Profiling microRNAs in *Eucalyptus grandis* Reveals No Mutual Relationship Between Alterations in Mir156 And Mir172 Expression and Adventitious Root Induction During Development, BMC genomics, 15 (2014): 524.

[157]. Mishra AK, Duraisamy GS, Tycova A, Matousek J, Computational Exploration of Micrornas From Expressed Sequence Tags of *Humulus lupulus* Target Predictions and Expression Analysis, Computational Biology and Chemistry, 59 (2015): 131-141.

[158]. Singh A, Singh S, Panigrahi KC, Reski R, Sarkar AK, Balanced Activity of Microrna166/165 And Its Target Transcripts from The Class III Homeodomain-Leucine Zipper Family Regulates Root Growth in *Arabidopsis thaliana*, Plant cell reports, 33 (2014): 945-953.

[159]. Nizampatnam NR, Schreier SJ, Damodaran S, Adhikari S, Subramanian S, microRNA160 Dictates Stage-specific Auxin and Cytokinin Sensitivities and Directs Soybean Nodule Development, The Plant journal: for cell and molecular biology, 84 (2015): 140-153.

[160]. Pinweha N, Asvarak T, Viboonjun U, Narangajavana J, Involvement of miR160/miR393 and Their Targets in Cassava Responses to Anthracnose Disease, Journal of plant physiology, 174 (2015): 26-35.

[161]. Fei Yongjun, Luo Caroline and Tang Wei, Differential expression of microRNAs During Root Formation in *Taxus chinensis* var. *mairei* cultivars, Open Life Sciences, 14 (1) (2019): 97-109.

[162]. Jakub Kuczyński, Joanna Gracz-Bernaciak, Tomasz Twardowski, Wojciech M, Karłowski, Agata Tyczewska, Cold stress-induced miRNA and Degradome Changes in Four Soybean Varieties Differing in Chilling Resistance, Journal of Agronomy and Crop Science published by Wiley-VCH GmbH, (2021).

[163]. Han W-H, Wang J-X, Zhang F-B, Liu Y-X, Wu H, Wang X-W, Small RNA and Degradome Sequencing Reveal Important MicroRNA Function in *Nicotiana tabacum* Response to *Bemisia tabaci*, *Genes*, 13(2) (2022): 361.

[164]. Ross BT, Zidack N, McDonald R, Flenniken ML, Transcriptome and Small RNA Profiling of Potato Virus Y Infected Potato Cultivars, Including Systemically Infected Russet Burbank, *Viruses*, 14(3) (2022): 523.

[165]. Seyed Sajad Sohrabi, Ahmad Ismaili, Farhad Nazarian, Fallahi Hossein, Identification and Characterization of Conserved miRNAs in lentil, *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 32, 4, (2020): 432-444.

[166]. Dong Q, Hu B, Zhang C, microRNAs and Their Roles in Plant Development, Frontiers in Plant Science, 13 (2022): 824240.

[167]. Zhao Y. F, Peng T, Sun H. Z, Teotia S, and Wen H. L, MiR1432- OsACOT (acyl-CoA thioesterase) Module Determines Grain Yield Via Enhancing Grain Filling Rate in Rice, Plant Biotechnology Journal, 17 (2019): 712–723.

[168]. Li Y, Lu YG, Shi Y, Wu L, Xu YJ, Huang F, Guo XY, Zhang Y, Fan J, Zhao JQ, Zhang HY, Xu PZ, Zhou JM, Wu XJ, Wang PR, Wang WM, Multiple rice microRNAs are Involved in Immunity Against the Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*, Plant Physiology, 164 (2) (2014):1077–1092.

[169]. Zeng J, Ye Z, He X, Zhang G, Identification of microRNAs and Their Targets Responding to Lowpotassium Stress in Two Barley Genotypes Differing in low-K tolerance, Journal of Plant Physiology, 234-235 (2019): 44-53.

[170]. Pacak A, Kruszka K, Swida-Barteczka A, Nuc P, Karlowski W, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulinska Z, Developmental Changes in Barley Microrna Expression Profiles Coupled with Mirna Target Analysis, Acta Biochimica Polonica, 63(4) (2016): 799–809.

[171]. Fileccia V, Ingraffia R, Amato G, Giambalvo D, Martinelli F, Identification of microRNAS Differentially Regulated by Water Deficit in Relation to Mycorrhizal Treatment in Wheat, Molecular Biology Reports, 46(5) (2019): 5163–5174.

[172]. Kantar M, Lucas SJ, Budak H, miRNA Expression Patterns of *Triticum Dicoccoides* in Response to Shock Drought Stress, Planta, 233 (3) (2011): 471–484.

[173]. Song X.W, Li Y, Cao X.F, Qi Y.J, MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plant-Environment Interactions, Annual Review of Plant Science, 70 (2019): 489–525.

[174]. Jia Y, Li Q, Li Y, Zhai W, Jiang G, Li C, Inducible Enrichment of Osa-miR1432 Confers Rice Bacterial Blight Resistance through Suppressing *OsCaML2*, *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (21) 2021:11367.

[175]. Tofigh Mazalmazraei, Leila nejadsadeghi, Khosro Mehdikhanlou, Comparative Analysis of Differentially Expressed miRNAs in Leaves of Three Sugarcane (Saacharum Officinarum L.) Cultivars During Salinity Stress, 09 August 2021, PREPRINT (Version 1) available at Research Square.

[176]. Amborella Genome Project. The Amborella Genome and the Evolution of Flowering Plants, Science, 20;342 (6165) (2013):1241089.

[177]. Nizampatnam NR, Schreier SJ, Damodaran S, Adhikari S, Subramanian S, microRNA160 Dictates Stage-specific Auxin and Cytokinin Sensitivities and Directs Soybean Nodule Development, The Plant journal: for cell and molecular biology, 84 (2015): 140-153.

[178]. Ying Yang, Xian-Ge Hu, Bingsong Zheng, Yue Li, Tongli Wang, Anket Sharma, Huwei Yuan, and Jian-Feng Mao, Characterization of microRNAs and Their Targets in a Highly Adaptable Conifer *Platycladus orientalis*, *Journal* of the American Society for Horticultural Science, 11 (2021): 147-1.