

T.C.
UŞAK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

BRASSICA JUNCEA (L.)’DA KROMA (Cr) DUYARLI GENLERİN VE
MİKRORNA’LARIN ANALİZİ

DOKTORA TEZİ

Nuriye MERAĞLI

EYLÜL, 2024

UŞAK

T.C.
UŞAK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ANALYSIS OF CHROMIUM (Cr) RESPONSES GENES AND MIRNAS IN
BRASSICA JUNCEA (L.)

DOKTORA TEZİ

Nuriye MERAKLI

UŞAK, 2024

TEZ BİLDİRİMİ

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

Nuriye MERAKLI



Bu çalışma; Uşak Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (UBAP) desteklenen 2024/MF002 numaralı proje kapsamında yürütülmüştü

**BRASSICA JUNCEA (L.)’DA KROMA (Cr) DUYARLI GENLERİN VE
MİKRORNA’LARIN ANALİZİ
(Doktora Tezi)**

Nuriye MERAkli

**UŞAK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

Eylül 2024

ÖZET

Brassica juncea, yaygın olarak Hint veya kahverengi hardal olarak bilinir ve dünya çapında önemli bir endüstriyel yağ bitkisidir. Hayvan yemi, biyodizel, yemeklik yağ ve ilaç gibi birçok endüstri için hammadde sağlaması nedeniyle ekonomik değeri yüksektir. *B. juncea*, yüksek biyokütlesi, hızlı büyümesi, orta düzeyde metal birikimi, hasat kolaylığı ve metal toleransı sayesinde krom (Cr) ile kirlenmiş toprakların fitoremediasyonunda önemli bir potansiyel göstermektedir. Son zamanlarda, mikroRNA’lar bitkilerin farklı metal streslerine karşı yanıtların düzenlenmesinde önemli roller üstlenmeleri nedeniyle daha fazla araştırılmaktadır. Ancak, *B. juncea*’nın krom (Cr) stresine karşı yanıtta mikroRNA’ların rolü hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır.

Bu çalışmada, krom toleranslı *B. juncea* var. Early raya ve krom duyarlı *B. juncea* var. Sindh raya bitkilerinin transkriptomik yanıtı, RNA dizileme yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Cr toksisitesi toleransında rol oynayan spesifik genlerin ekspresyonu, RT-qPCR ile daha detaylı bir şekilde incelenmiştir. Fizyolojik büyüme analizinde, yüksek krom (1000 μ M) uygulamasına karşı, Early raya’nın kök-gövde uzunluğu, gövde yaş ağırlığı, kök yaş ağırlığı ve kök-gövde kuru ağırlığı gibi büyüme parametreleri, diğer *B. juncea* varyetelerine kıyasla daha az etkilenmiştir. Buna karşın, Sindh raya, yüksek krom (1000 μ M) etkisine karşı aynı büyüme parametrelerinde daha belirgin olumsuz etkiler göstermiştir. Ayrıca, Cr uygulamasından sonra yüksek Cr alımının köklerde gerçekleştiği

ve kök Cr içeriğinin toprak üstü kısımlara göre önemli ölçüde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Early raya, iki hafta (15 gün) boyunca Cr^{3+} (1000 μM) uygulandığında köklerde yüksek krom biriktirmiş ve diğer *Brassica juncea* varyetelerine kıyasla yüksek krom toleransı göstermiştir. 1000 μM Cr uygulanan Early raya bitkilerinin köklerinde, kontrol bitkilerine (Cr- uygulanmayan) kıyasla toplam 70 genin farklı şekilde ifade edildiği tespit edilmiştir. Bu genlerden 27'sinin ifadesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Anlamlı fark gösteren genlerin 19'u yukarı düzenlenen, 8'i ise aşağı düzenlenen genler olarak tespit edilmiştir. Diğer taraftan, iki hafta (15 gün) boyunca Cr^{3+} uygulanan Sindh raya bitkisi düşük krom toleransı göstermiştir; bu bitkide kontrol grubuna kıyasla toplam 80 genin farklı şekilde ifade edildiği ve bu genlerden sadece 50'sinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Bu genler arasında, 28'i yukarı düzenlenen, 22'si ise aşağı düzenlenen genler olarak tespit edilmiştir. RT-qPCR analizi için transkriptom dizileme sonuçlarına göre ROS ile ilişkili mekanizmalarda yer alan ve önemli ölçüde diferansiyel ekspresyon gösteren üç gen seçilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Cr uygulanan deney gruplarında incelenen APX, Fe-SOD ve RBOH genleri yukarı düzenlendiği bulunmuştur.

Bu tez çalışması, *B. juncea*'da miRNA ve mRNA profillemesi aracılığıyla Cr^{3+} stresine yanıtta ilişkili potansiyel olarak önemli miRNA'ları, hedef genleri ve yolları tanımlamaktadır. Tanımlanan yollar, hedef genler ve miRNA'lar, *B. juncea*'da krom toleransını arttırmada gelecekteki omik araştırmalar için önemli hedefler olacaktır. Ayrıca, *B. juncea*'da krom stresine tolerans ve transkriptom düzeyindeki değişiklikler üzerine yapılan kapsamlı ve öncü bir araştırma olarak değerlendirilmektedir.

Bu çalışma, Yükseköğretim Kurulu'nun (YÖK) 100/2000 (Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji Programı) Doktora Burs Programı ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'nun (TÜBİTAK) 2211-A Yurt içi Doktora Programı tarafından desteklenmiştir. Ayrıca, Uşak Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (BAP) Prof. Dr. Abdülrezzak Memon'a verilen (Proje no: 2024/MF002) proje ile desteklenmiştir.

Anahtar Kelimeler : Abiyotik stres, gen anlatımı, RT-qPCR, Transkriptomik analiz, *Brassica juncea*

Sayfa Adedi : 181

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Abdülrezzak MEMON

Tez 2. Danışmanı : Prof. Dr. Hüseyin ALTUNDAĞ

**ANALYSIS OF CHROMIUM (Cr) RESPONSES GENES AND MIRNAS IN
BRASSICA JUNCEA (L.)**

(Ph.D Thesis)

Nuriye MERAKLI

**UŞAK UNIVERSITY
GRADUATE EDUCATION INSTITUTE
Department of Molecular Biology and Genetics**

September 2024

ABSTRACT

Brassica juncea, commonly known as Indian or brown mustard, is a significant industrial oil crop worldwide. It is commercially valuable because it provides raw materials for various industries, including animal feed, biodiesel, cooking oil, and medicine. *B. juncea* demonstrates substantial potential for the phytoremediation of chromium (Cr)-contaminated soils owing to its high biomass, rapid growth, moderate metal accumulation, ease of harvesting, and metal tolerance. Recently, microRNAs are recognized for their crucial regulatory roles in plant responses to different metal stresses. Nevertheless, there is limited information on microRNAs in *B. juncea*, particularly those involved to chromium (Cr) stress response.

In this study, the transcriptomic response of *B. juncea* Early raya, which is tolerant to chromium toxicity, and *B. juncea* Sindh raya, which is sensitive to chromium toxicity, was investigated using RNA sequencing. The expression of specific genes be regulated by chromium toxicity tolerance was further examined through RT-qPCR. In the physiological growth analysis, Early raya showed less impact from high chromium (1000 µM) on all growth parameters, including root-shoot length, shoot fresh weight, root fresh weight, and root-shoot dry weight, compared to other *B. juncea* varieties. Conversely, Sindh raya exhibited more significant effects from high chromium (1000 µM) on the same growth parameters. Additionally, after chromium application, the highest chromium uptake was observed in the roots, with the root chromium content being significantly higher than in plant's above-ground parts. Early raya accumulated high chromium in the roots when treated with Cr³⁺ (1000 µM) for two weeks (15 days) and showed high

chromium tolerance compared to the other *Brassica juncea* varieties. A total of 70 genes were differentially expressed in the roots of Early raya when treated with 1000 μ M Cr, compared to the control plants (without Cr). Of these genes, the expression of 27 were statistically significant ($p < 0.05$). Among the significantly different genes, 19 were upregulated and 8 were downregulated. On the other hand, the roots of Sindh raya when treated with 1000 μ M Cr for two weeks showed low chromium tolerance; 80 genes in variety were differentially expressed compared to the control. Of these genes, the expression of 50 were statistically significant ($p < 0.05$). Among them, 28 were upregulated, and 22 were downregulated. For RT-qPCR analysis, three genes involved in different mechanisms and showing significant differential expression were selected according to transcriptome sequencing results. Among the genes studied in the Cr-treated experimental groups compared to the control, the APX, Fe-SOD, and RBOH genes were upregulated.

This thesis identifies potentially significant miRNAs, genes, and pathways related to Cr^{3+} stress response through miRNA and mRNA profiling in *B. juncea*. The identified pathways, genes, and miRNAs are significant targets for future omics studies to enhance chromium tolerance in *B. juncea*. This represents the first comprehensive study on chromium stress tolerance and transcriptomic changes in *B. juncea*.

This study supported by the Council of Higher Education's (YOK) 100/2000 (Plant Genetics and Agricultural Biotechnology Program) Doctoral Scholarship Program and the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) (2211-A Ph.D. Program). Additionally, the support from BAP Project given to Prof. Dr. Abdülrezzak Memon (project no: 2024/MF002) is appreciated.

Keywords	: Abiyotik stress, Gene expression, RT-qPCR, Transcriptomik analysis, <i>Brassica juncea</i>
Number of pages	: 181
Advisor	: Prof. Dr. Abdulrezzak MEMON
Co-advisor	: Prof. Dr. Huseyin ALTUNDAG

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince her türlü desteği ve yardımı esirgemeyen, paylaştığı bilgi ve tecrübeleriyle rehberlik ve teşvik eden ve her zaman sevgiyle hatırlayacağım kıymetli danışmanım Prof. Dr. Abdülrezzak MEMON'a en içten dileklerimle teşekkür ederim. Araştırma süresince ikinci danışmanlığımı üstlenerek çalışmalarımı yürütebilmem için verdiği destek, bilgi ve deneyimlerin yanı sıra insana olan saygısı ve içtenliği ile örnek aldığım hocam Prof. Dr. Hüseyin ALTUNDAĞ'a en derin saygılarımı ve içten dileklerimi sunarım.

Tez çalışmamın tamamlanmasında ve savunmasında değerli zamanlarını bana ayıran ve bilgi, deneyim ve değerli geri bildirimleriyle çalışmamı geliştirmeme katkıda bulunan tez izleme komitesindeki jüri üyelerim, Doç. Dr. Aynur KARADAĞ GÜREL ve Dr. Öğr. Üyesi Pelin BARAN'a, en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, çalışmam sırasında bana destek olan ve katkı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Ahmet KAHRAMAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması "*Brassica juncea* L.'de (kahverengi hardal) krom (Cr) stresine duyarlı miRNA'lar ve onların hedef genlerinin high-throughput dizileme ile tanımlanması" adlı 2024/MF002 kodlu BAP projesi tarafından desteklenmiştir. Bu desteğinden dolayı, Uşak Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP)'ne teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca finansal destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na "(TÜBİTAK)-BİDEB 2211-A Yurt İçi Genel Doktora Burs Programı" ve Yüksek Öğretim Kurumu'na "(YÖK) 100/2000 Bitki Genetiği ve Tarımsal Biyoteknoloji Programı" kapsamındaki desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Araştırmamın bir kısmını gerçekleştirdiğim İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi'nde Real Time qPCR çalışmalarına yardımcı olan ve desteğini her zaman hissettiğim kıymetli dostum, Dr. Aslı ELDEM'e çok ama çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca duydukları sevgi ve güveni bana hissettiren, bugünlere gelmem de büyük emeği olan başta annem Gülizar MERAKLI'ya ve babam Hasan MERAKLI'ya, sevgisi ve desteğini her zaman hissettiğim canım ablam Selin MERAKLI'ya en içten sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. AĞIR METALLER.....	6
2.2. BİTKİLER ve Ağır METALLER.....	7
2.3. BİTKİLERİN AĞIR METALLERE KARŞI YANITI.....	10
2.4. BİTKİLERDE AĞIR METAL ALIMI ve TAŞINIMI.....	13
2.4.1. Metal İyonunun Hücre Duvarına Bağlanması.....	15
2.4.2. Ağır Metalin Plazma Zarı-Kök-Toprak Üstü Kısma Hareketi.....	15
2.4.3. AĞIR METAL TAŞINIMINDA ROL OYNAYAN TAŞIYICILAR.....	16
2.5. BİTKİLERDE AĞIR METAL TOLERANSI.....	19
2.5.1. Ağır Metallerin Hücre İçinde Sekestrasyonu ve Bölümlendirilmesi.....	21
2.6. BİTKİLERDE AĞIR METAL KAYNAKLI OKSİDATİF STRES.....	22
2.6.1. Ağır Metal Stresine Sinyal Yanıtı.....	24
2.6.2. Sinyal İletimi.....	25
2.6.3. Protein Metabolizması.....	26
2.6.4. Fonksiyonel Genomik.....	27
2.6.5. miRNA-Tabanlı Düzenleme.....	28
2.7. MİKRO-RNA'LAR.....	29
2.8. BİTKİLERDE MİRNA'LARIN BİYOGENEZİ ve ÇALIŞMA MEKANİZMASI.....	30
2.9. BİTKİLERDE METAL STRESİNE KARŞI MİRNA'NIN ROLÜ.....	32
2.10. MİRNA TANIMLAMA YÖNTEMLERİ.....	38
2.11. BİTKİ MİRNA'LARININ TANIMLANMASI ve DOĞRULANMASI.....	38

2.12. MİRNA TANIMLAMA ve KARAKTERİZASYONU STRATEJİLERİ.....	39
2.13. YÜKSEK VERİMLİ DİZİLEME TEKNOLOJİLERİ (RNA DİZİLEME.....	40
2.14. MİRNA HEDEFLERİNİN TANIMLANMASI.....	41
2.15. FİTOREMEDİASYON.....	42
2.16. <i>BRASSICA JUNCEA</i> : FİTOREMEDİASYONDAKİ ROLÜ.....	44
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	48
3.1. BİTKİ MATERYALİ.....	48
3.2. BİTKİLERİN YETİŞTİRİLMESİ, CR-UYGULANMASI VE BÜYÜME PARAMETRELERİNİN ÖLÇÜMÜ.....	48
3.2.1. Fizyolojik Analizler.....	50
3.2.1.1. Çimlenme Deneyleri.....	50
3.3. BİTKİLERDE BİRİKEN METAL İÇERİKLERİNİN TAYİNİ.....	56
3.4. MOLEKÜLER ANALİZLER.....	57
3.4.1. Total RNA İzolasyonu.....	57
3.4.2. Total RNA Örneklerinin Kalite Okumalarının Gerçekleştirilmesi.....	58
3.4.3. Rna Dizileme ve miRNA Kütüphane Hazırlama	59
3.4.4. Dizileme ve miRNA Miktar Tespiti.....	65
3.4.5. Diferansiyel İfade Analizi.....	66
3.4.6. Fonksiyonel Zenginleştirme Analizi.....	67
3.4.7. Ters Transkripsiyon – Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi ve Kontrolü.....	67
3.4.8. Primer Tasarımı Ve Gerçek Zamanlı qPCR (RT qPCR).....	68
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	69
4. SONUÇLAR.....	71
4.1. BİTKİDE BİRİKEN AĞIR METAL MİKTARI.....	71
4.2. KROM ve MİKRO ELEMENTLER ARASINDAKİ KORELASYON.....	83
4.3. KROM (Cr) BİRİKİMİ.....	83
4.4. AĞIR METAL UYGULAMASI YAPILAN BİTKİLERDE ANLATIMI DEĞİŞEN GENLERİN TANIMLANMASI ve BELİRLENMESİ.....	87
4.4.1. <i>Brassica juncea</i> var. Early raya ve <i>Brassica juncea</i> var. Sindh raya Bitkilerinden Total RNA İzolasyonu.....	87
4.4.2. RNA Dizileme Analizinden Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi.....	88
4.4.2.1. RNA Dizileme ve Ham Veri Ön-İşleme.....	88

4.4.2.2. Verilerin Deney Kalitesi Bakımından Kontrolü Ve Ön İşlenmesi.....	89
4.4.2.3. Pseudo-Hizalama ve miRNA Miktar Tespiti.....	90
4.4.2.4. Fonksiyonel Zenginleştirme Analizi.....	104
4.5. SEÇİLEN BAZI HEDEF GENLERİN RT-qPCR ANALİZLERİ.....	110
5. TARTIŞMA.....	113
6. KAYNAKLAR.....	142
7. ÖZGEÇMİŞ.....	179



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Brassicaceae familyasına ait bazı türlerdeki miRNA'lar ve onların hedef genleri.....	34
Çizelge 3.1. Bitkilere uygulanan 1x Hoagland çözeltisi için gerekli stok çözeltileri.....	49
Çizelge 3.2. Real time qPCR çalışmaları için tasarlanan primerlere ait diziler.....	68
Çizelge 3.3. cDNA uygulamasındaki sıcaklık ve inkübasyon süreleri.....	68
Çizelge 3.4. RT-qPCR uygulamasında kullanılan bileşenler ve reaksiyon miktarları....	69
Çizelge 3.5. RT-qPCR uygulaması için PCR cihazında kurulan program.....	69
Çizelge 4.1. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulamasının <i>B. juncea</i> , JS-13, Early raya, Sindh raya, S-9, Ganj sarhen ve THB-81 varyetelerine ait çimlenme oranı, bitkilerin kök uzunlukları, boy uzunlukları, yaş ağırlıkları ve kuru ağırlıkları.....	76
Çizelge 4.2. İki hafta (15 gün) boyunca farklı konsantrasyonlarda CrCl ₃ çözeltisi uygulanan <i>B. juncea</i> , JS-13, Early raya, Sindh raya, S-9, Ganj sarhen ve THB-81 bitkilerinin kök, gövde ve yapraklarında biriken ağır metal miktarları (mg/kg KA) (± değerler standart sapmayı göstermektedir)	77
Çizelge 4.3. <i>B.juncea</i> var. Early raya ve <i>B.juncea</i> var. Sindh raya bitkisinin kök dokularına ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri.....	84
Çizelge 4.4. Tüm örnekler üzerinden kalite kontrol ölçümlerinin ortalama değerlerini göstermektedir.....	87
Çizelge 4.5. Brassicaceae (hardal ailesi) üyelerinin hizalama ölçümleri.....	89
Çizelge 4.6. miRBase'den tanımlanan olgun miRNA'lar.....	90
Çizelge 4.7. Karşılaştırmada tespit edilen miRNA'ların sayısı.....	91
Çizelge 4.8. <i>B.juncea</i> var. Early raya bitkisine ait kök örneklerinde, Cr1000 (deney grubunda) CK (kontrol grubuna) oranla farklı seviyede ifade edilen miRNA'lar ve onların "ifadesi artan (up) ve ifadesi azalan (down)" hedef genlerinin listesi.....	92
Çizelge 4.9. <i>B.juncea</i> var. Sindh raya bitkisine ait kök örneklerinde, Cr1000 (deney grubunda) CK (kontrol grubuna) oranla farklı seviyede ifade edilen miRNA'lar ve onların "ifadesi artan (up) ve ifadesi azalan (down)" hedef genlerinin listesi.....	94
Çizelge 4.10. FC değeri>1.2 ve <0.83 olan genler için karşılaştırma başına zenginleştirilmiş terim sayısı.....	100

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Çin lahanası (AA), lahana (CC), kolza tohumu (AACC), Hint hardalı (AABB) ve diğer yaygın sebzeler gibi <i>Brassica</i> cinsinin altı türü arasındaki genetik ilişkileri gösteren U üçgen diyagramı, A, B ve C genomlarının her birinden gelen kromozomlar farklı renklerle gösterilmiştir.....	45
Şekil 3.1. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. Early raya bitkilerinin genel görünümü.....	51
Şekil 3.2. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. THB-81 bitkilerinin genel görünümü.....	52
Şekil 3.3. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. Ganj sarhen bitkilerinin genel görünümü.....	53
Şekil 3.4. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. JS-13 bitkilerinin genel görünümü.....	54
Şekil 3.5. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. Sindh raya bitkilerinin genel görünümü.....	55
Şekil 3.6. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. S-9 bitkilerinin genel görünümü.....	56
Şekil 3.7. Multiplex Küçük RNA Kütüphanesi Hazırlama İş Akışı.....	60
Şekil 4.1. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. Early raya bitkilerinin genel görünüm	73
Şekil 4.2. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. THB-81 bitkilerinin genel görünümü.....	73
Şekil 4.3. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. Ganj sarhen bitkilerinin genel görünümü.....	74
Şekil 4.4. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. JS-13 bitkilerinin genel görünümü.....	74
Şekil 4.5. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. Sindh raya bitkilerinin genel görünümü	75
Şekil 4.6. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. S-9 bitkilerinin genel görünümü.....	75

Şekil 4.7. Kontrol vs. 1000 μ M Cr- <i>B. juncea</i> var. Early raya ve Kontrol vs. 1000 μ M Cr- <i>B. juncea</i> var. Sindh raya karşılaştırmalarından elde edilen Venn diyagramı karşılaştırması. A) Yukarı regüle edilen DEM'ler ve B) Aşağı regüle edilen DEM'ler..92	92
Resim 4.8. Kontrol vs. 1000 μ M Cr- <i>B. juncea</i> var. Early raya ve Kontrol vs. 1000 μ M Cr- <i>B. juncea</i> var. Sindh raya DEM-hedef gen çiftlerinin Venn diyagram karşılaştırması A) Yukarı regüle edilen Hedef genler ve B) Aşağı regüle edilen Hedef genler.....93	93
Şekil 4.9. Kontrol- <i>B. juncea</i> var. Early raya ve Kontrol- <i>B. juncea</i> var. Sindh raya karşılaştırmalarından elde edilen tüm DEM'lerin hedef genleri için zenginleştirme analizinin her kaynağından (GO:BP, GO:CC, GO:MF, KEGG) en önemli 10 terimi gösteren balon grafiği (Resimlerdeki gen oranı, analizdeki ilgili terime atanan gen sayısının analizdeki toplam gen sayısına oranını temsil ederken, p-değeri yanlış keşif oranı (FDR) için düzeltilmiş p-değerini temsil etmektedir).....107	107
Şekil 4.10. Kontrol- <i>B. juncea</i> var. Early raya ve 1000 μ M Cr- <i>B. juncea</i> var. Early raya karşılaştırmalarından elde edilen tüm DEM'lerin hedef genleri için zenginleştirme analizinin her kaynağından (GO: BP, GO:CC, GO:MF, KEGG) en önemli 10 terimi gösteren balon grafiği. Şekillerdeki gen oranı, analizdeki ilgili terime atanan gen sayısının analizdeki toplam gen sayısına oranını temsil ederken, p-değeri yanlış keşif oranı (FDR) için düzeltilmiş p-değerini temsil etmektedir).....108	108
Şekil 4.11. Kontrol- <i>B. juncea</i> var. Sindh raya ve 1000 μ M Cr- <i>B. juncea</i> var. Sindh raya karşılaştırmalarından elde edilen tüm DEM'lerin hedef genleri için zenginleştirme analizinin her kaynağından (GO: BP, GO:CC, GO:MF, KEGG) en önemli 10 terimi gösteren balon grafiği (Şekillerdeki gen oranı, analizdeki ilgili terime atanan gen sayısının analizdeki toplam gen sayısına oranını temsil ederken, p-değeri yanlış keşif oranı (FDR) için düzeltilmiş p-değerini temsil etmektedir).....109	109
Şekil 4.12. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. Sindh raya bitkisinin kök kısımlarının deney grubunda kontrol grubuna oranla farklı eksprese olan genlerin Relative Transkript Seviyeleri.....110	110
Şekil 4.13. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. Early raya bitkisinin kök kısımlarının deney grubunda kontrol grubuna oranla farklı eksprese olan	

genlerin Relative Transkript Seviyeleri	111
Şekil 5.1. <i>B. juncea</i> var. Sindh raya bitkisine ait kök örneklerinde, Cr1000 (deney grubunda) CK (kontrol grubuna) oranla farklı seviyede ifade edilen bazı miRNA'lar ve onların hedef genleri.....	122
Şekil 5.2. <i>B. juncea</i> var. Early raya bitkisine ait kök örneklerinde, Cr1000 (deney grubunda) CK (kontrol grubuna) oranla farklı seviyede ifade edilen bazı miRNA'lar ve onların hedef genleri.....	123
Şekil 5.3. Tespit edilen bazı miRNA'lar ve hedef genleri.....	124



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur

Simge	Açıklama
°C	Santigrat derece
%	Yüzde
μM	Mikromolar
μl	Mikrolitre
mg/kg	Miligram bölü kilogram
mg/L	Miligram bölü litre
g	Gram
mg	Miligram
kg	Kilogram
ml	Mililitre
M	Molar
OD	Optik Yoğunluk
rpm	Dakikada dönüş
R1-R3	Tekerrür 1-3
mg/kg	Miligram bölü kilogram
g/mol	Gram bölü mol
g/cm ³	Gram bölü santimetreküp
kJ.mol ⁻¹	Kilojoule çarpı mol
J/(mol K)	Joule bölü mol kelvin

Kısaltma	Açıklama
MT	Metallothionein
PC	Fitoşelatin
ZRT	Zn-düzenlenmiş taşıyıcı

IRT	Fe-düzenlenmiş taşıyıcı
ZTR	Çinko düzenleyici taşıyıcı
CTR/COPT	Cu Taşıyıcı Protein
NA	Nikotinamin-metal
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ZIP	Çinko taşıyıcı protein
HMA_s	Ağır metal ATPaz' lar
AtHMA2	<i>A. thaliana</i> ' da ağır metal ATPaz 2
AtHMA4	<i>A. thaliana</i> ' da ağır metal ATPaz 4
YSL	Sarı çizgil-benzeri protein ailesi
MTP	Metal Tolerans Protein
HMA1	Ağır metal ATPaz 1
HMA3	Ağır metal ATPaz 3
OsNramp1-3	<i>O. sativa</i> ' da doğal dirençle ilişkili makrofaj protein 1, 2, 3
Nramp	Doğal dirençle ilişkili makrofaj protein
MRP	Çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein
MDR	Çoklu ilaç direnç proteinleri
dNTP	Deoksinükleosit trifosfat
EST	Sıra dizi ifadeleri
FASTA	Nükleotit veya protein dizi dosya formatı
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
POD	Peroksidaz
CAT	Katalaz
GSH	İndirgenmiş glutatyon
BLAST	Temel yerel hizalama arama aracı
MSA	Çoklu dizi hizalama
SPL	Squamosa promoter-binding protein-like
O²⁻	Oksidasyon anyonları
OH	Hidroksil radikalleri
EXO70	Exocyst Subunit 70

HMW	Yüksek molekül ağırlıklı
LMW	Düşük molekül ağırlıklı
H₂O₂	Hidrojen peroksit
NO	Nitrik oksit
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
TF	Transkripsiyon faktör
SA	Salisilik asit
JA	Jasmonik asit
CK	Sitokinin
ABA	Absisik asit
ET	Etilen
CaM	Kalmodulin
PI3K	Fosfatidil inositol 3-kinaz
CDPK	Kalsiyum bağımlı protein kinaz
RNAi	RNA interferansı
miRNA	mikroRNA
CBP	Cu ²⁺ bağlayıcı protein
PTGS	Post-transkripsiyonel gen sessizleştirme
ncRNA	Kodlanmayan RNA
ARF	Oksin yanıt faktörü
NFY	Nükleer Faktör Y
LAC	Lakkaz

1.GİRİŞ

Toprak kirliliği, dünya genelinde tüm ülkelerin karşı karşıya olduğu bir sorundur. Modern çağın hızlı sanayileşmesiyle çevredeki toksik kimyasallardan ve metallere kaçınmak neredeyse imkânsız hale gelmiştir. Son yıllarda küresel ekonominin gelişmesi, modern tarıma geçiş ve sanayileşmenin hızlanmasıyla birlikte, toprak kirliliği de önemli bir ekolojik sorun olarak öne çıkmaya başlamıştır. Bu durum günümüzde de devam etmekte olup, giderek artan dünya nüfusu ve sanayileşmenin getirdiği endüstriyel atıklar nedeniyle topraklar önemli ölçüde kirlenmekte ve böylece kullanılabilir tarım alanları için ciddi sorunlar yaratmaktadır. Özellikle ağır metal kirliliği, sanayi ve tarımdaki hızlı büyüme ile dünya nüfustaki büyük artışın doğal ekosistemi bozması sonucunda, çevre ve gıda güvenliği açısından ciddi bir tehdit oluşturmaktadır.

Ağır metaller, doğal ve insan kaynaklı (antropojenik) faaliyetler sonucu toprağa karışan en tehlikeli kirlleticilerden biridir. Doğada kendiliğinden yaygın olarak bulunan ağır metaller, sanayileşmenin hızlanmasıyla birlikte izin verilen konsantrasyonların üzerine çıkmaktadır. Biyolojik olarak ayrışmayan bu kirleticiler, çok düşük konsantrasyonlarda dahi canlı organizmalar üzerinde toksik etkilere yol açabilir. Tarım topraklarında ve su kaynaklarında sürekli olarak biriken ağır metaller, besin zincirine girme riski nedeniyle insan, bitki ve hayvan sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmaktadır (Sarwar ve ark., 2017). Özellikle endüstriyel atıklar, madencilik, aşırı pestisit ve gübre kullanımı, enerji ve yakıt üretimi, eritme ve kanalizasyon gibi antropojenik faaliyetler yoluyla çevreye hem türü hem de içeriği yüksek miktarda ağır metaller salınmaktadır. Bu durum, toprak kirliliğine neden olarak pH, renk, gözeneklilik ve doğal kimya gibi çeşitli toprak özelliklerinde zararlı değişikliklere yol açmakta ve bitkisel üretimi, toprak kalitesini, insan beslenmesini ve çevreyi olumsuz yönde etkileyerek ekolojik dengede büyük bozulmalara neden olmaktadır (Tao ve ark., 2015). Topraktaki ağır metallerin düşük konsantrasyonları, bitkiler için gerekli ya da gereksiz olsun, belirli bir aralıkta bitkilerin gelişimini etkilememektedir. Ancak bu metallerin bazıları bitkiler için son derece önemli olup, normal süreçlerinde eser miktarda gerekli olan temel mikro elementlerdir. Bununla birlikte, konsantrasyonun çok yüksek olması durumunda bitkinin bünyesinde biriken ağır metaller tolerans eşiğini aşar ve bu da bitkide zehirlenmeye, hatta

bitkinin ölümüne yol açar. Ayrıca, esansiyel olmayan metaller, esansiyel metallerin yerini alarak ya da biyomoleküllerin ve önemli stres düzenleyici proteinlerin yapısını değiştirerek çeşitli biyolojik süreçleri bozabilir (Sarwar ve ark., 2010). Ağır metaller toksik seviyelerini aştığında reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine yol açabilir. Örneğin, esansiyel olmayan krom (Cr), bitkilerde bilinen bir biyolojik işlevi olmayan metallerden biridir. Krom stresine maruz kalan bitkilerde, fotosentez, solunum ve mineral alımı gibi önemli metabolik ve fizyolojik süreçler etkilenir, bu da bitkinin büyüme ve gelişimini engeller. Ayrıca, krom bitkilerdeki önemli enzim gruplarını doğrudan etkileyerek biyomoleküllerin bütünlüğünü bozabilir, bazı makromolekülleri değiştirebilir ve biyomoleküllerin yapısal formülündeki temel metal iyonlarını değiştirebilir. Bu durum, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile birlikte antioksidan savunma mekanizmalarını değiştirerek ciddi toksisiteye yol açabilir (Shanker ve ark., 2005, Yıldız ve ark., 2011). Bitkilerde krom fitotoksitesisi, tohum çimlenmesini ve fide büyümesini inhibe eder, membran hasarlarına yol açar, fotosentez pigmentlerinin bozulmasına neden olur ve kökler aracılığıyla besin ve su alım dengesini bozar.

Dünyanın birçok bölgesinde, antropojenik faaliyetlerin yanı sıra hem tür hem de içerik bakımından yüksek miktarda ağır metal içeren doğal maden yatakları bulunmaktadır. Bu metallerce zengin alanlarda yetişen bitkiler arasında, karakteristik bitki türleri bulunur. Bu türler, metalleri uzaklaştırmak için geliştirdikleri özel mekanizmalar sayesinde, ağır metaller ve diğer çevresel kısıtlamalara karşı yüksek tolerans sergilerler (Huang ve Cunningham, 1996; Meagher, 2000; Memon ve ark., 2001). Bazı bitkiler, ortamdaki ağır metalleri bünyelerine almaktan kaçınırken, diğerleri ise bitki kökleri aracılığıyla alınan ağır metalleri ya kök dokularında biriktirir (fitoimmobilizasyon) ya da simplastik ve/veya apoplastik yollarla ksilem damarlarıyla bitkinin toprak üstü kısımlarına taşır. Gövdede, metaller genellikle düşük metabolik aktiviteye sahip hücresel organeller olan vakuollerde birikir. Bu, hiperakümülatör bitkilerde zararlı metalleri hücresel metabolik süreçlerden uzak tutmak için önemli bir tolerans mekanizması olabileceğini göstermektedir. Akümülatör bitkilerin tespitiyle kirlenmiş alanların iyileştirilmesi için bu bitkilerin kullanımı, fitoremediasyon olarak bilinen bir yöntemle sağlanabilir. Fitoremediasyon, ağır metal sorunlarının üstesinden gelmek ve geniş bir araştırma geçmişine sahip olmak için yeni bir yaklaşım olarak kullanılmaktadır (Salt ve ark., 1995; Tangahu ve ark., 2011; Shah ve Daverey, 2020).

Fitoremediasyon, bitkilerin kirleticileri alma, biriktirme, adsorbe etme veya stabilize etme kapasitesinden yararlanan bir biyoremediasyon tekniğidir (Memon ve Schröder, 2009; Doğru ve ark., 2021). Bu süreç, kirleticileri bitkilerin kökleri aracılığıyla daha az toksik elementlere dönüştürmeyi veya bunları köklere veya toprak üstü dokularda absorbe etmeyi amaçlar. Fitoremediasyon, diğer remediasyon yöntemlerine kıyasla toprağın biyolojik özelliklerini ve fiziksel yapısını iyileştirme, rizosfer bölgesindeki mikroflora yenileme, besin aktarımını artırma ve çevresel sürdürülebilirliği sağlama potansiyeline sahip umut vaat eden bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır. Geniş alanlarda uygulanabilir olması, minimum düzeyde izleme gerektirmesi ve biyokütlede biriken metallerin fiziksel-kimyasal, termal veya biyolojik işlemlerle geri kazanılabilmesi fitoremediasyonun avantajlarından. Bu yöntem, genellikle besin alımının uygun olduğu, yönetimi kolay olan yüksek miktarlarda biyokütle içeren ototrofik bir sisteme dayanmaktadır.

Bazı bitkiler, ağır metallerin detoksifikasyonunda rol oynayabilecek çeşitli mekanizmalara sahip olup, metal stresi altında hayatta kalmayı başarabilirler. Ağır metal toksisitesine karşı yüksek tolerans, bitkinin genotipi ile çevresi arasındaki etkileşime bağlı olarak, metal alımının azalması veya bitkideki içsel birikimin artması ile sağlanabilir. Koordineli bir moleküler süreç ağı, bitkilere çoklu metal detoksifikasyon mekanizmaları ve onarım yetenekleri kazandırarak, metal içeren toprak ortamlarında hayatta kalmalarını sağlar. Bitkilerde ağır metallerin birikim süreçleri ve tolerans mekanizmalarının ayrıntılı olarak anlaşılması, fitoremediasyon tekniklerinin verimliliğini arttırmak için kritik öneme sahiptir. Moleküler genetik teknolojilerinin artan kullanımı, bitkilerin fitoremediasyon yeteneklerini geliştirmeye ve bu teknolojileri daha etkili, zaman tasarrufu sağlayan ve ekonomik olarak uygulanabilir hale getirmeye olanak sağlar. Fitoremediasyon tekniklerinin mekanizmalarını ve etkinliğini daha iyi anlayabilmek için, önemli metabolik yolların moleküler temelleri ile gen işlevlerinin detaylı bir şekilde incelenmesi gerekmektedir. Bu doğrultuda, yeni nesil dizileme ve miRNA mikrodizileri gibi genomik teknolojiler, ağır metallere duyarlı genleri, miRNA'ları ve onların hedef genlerini tespit ederek binlerce genin ifade seviyesini belirlemektedir.

Bu tez kapsamında altı *Brassica juncea* (Kahverengi hardal) varyetesinin metal birikim kapasiteleri tespit edilmiş ve fitoremediasyon uygunlukları değerlendirilerek kroma karşı toleranslı (akümülatör) tür ve dışlayıcı (hassas) tür belirlenmiştir.

Çalışmalarda bitki materyali olarak, hızlı büyüme, yüksek biyokütle ve yüksek oranda metal biriktirme yeteneğine sahip olan ve ağır metal birikimi ve toleransı ile ilişkili moleküler mekanizmalar için model tür olması nedeniyle *Brassica juncea* seçilmiştir. Pakistan’da bitki ıslahçıları tarafından yeni geliştirilen Pakistan kökenli olan *B. juncea* var. JS-13, Early raya, Sindh raya, S-9, Ganj sarhen ve THB-81’in krom toleransı bakımından karşılaştırılmıştır. Literatürde bilindiği üzere, Cr (krom), tarım bitkileri için potansiyel olarak tehlikeli bir kirleticidir. Bu bağlamda, *B. juncea* var. JS-13, Early raya, Sindh raya, S-9, Ganj sarhen ve THB-81 bitkilerine farklı konsantrasyonlarda Cr çözeltisi (0, 10, 50, 100, 200, 500 ve 1000 μM CrCl_3) vermikülit ortamda uygulanmıştır. İki hafta (15 gün) sonunda hasat edilen *B. juncea* varyetelerine ait kök, gövde ve yaprak dokularındaki krom (Cr), potasyum (K), kalsiyum (Ca), demir (Fe), magnezyum (Mg), çinko (Zn) ve bakır (Cu) miktarı, hassas ölçüm imkânı sunan İndüktif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektroskopisi (ICP-OES) ile tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan istatistiksel analizlerle elde edilen sonuçların kendi içerisinde anlamlı olup olmadığı karşılaştırılmıştır. Ağır metal uygulamaları sonucunda *B. juncea* var. Early raya Cr-toleranslı/akümülatör bir bitki ve *B. juncea* var. Sindh raya Cr-dışlayıcı/hassas bir bitki olarak belirlenmiştir. Fizyolojik çalışmalar sonrasında, Cr ile ilişkili anlatımı değişen genlerin ve miRNA’ların tanımlanması ile ilgili çalışmaların yetersiz olması ve Cr’nin akümüülasyonunda bitkideki en önemli kısmın kökler olması nedeniyle, Cr-toleranslı *B. juncea* var. Early raya ve Cr-duyarlı *B. juncea* var. Sindh raya bitkilerinin kök kısımlarında ağır metal akümüülasyonu ve toleransı ile ilişkili moleküler mekanizmaları daha iyi anlamak amacıyla RNA dizileme (high-throughput) analiz yapılmıştır. Çalışmada, *Brassica juncea* var. Early raya ve *Brassica juncea* var. Sindh raya bitkilerinin kök kısımlarında krom (Cr) uygulamasının miRNA’lar ve onların hedef genlerinin ifade profilleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ayrıca, ROS ile ilişkili olduğu düşünülen bazı genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyeleri, Cr uygulanan bitkilerin köklerinde incelenmiş ve bu genlerin savunma mekanizmasındaki rollerinin moleküler seviyede anlaşılması için RT-qPCR yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem kullanılarak, farklı konsantrasyonlarda Cr uygulaması yapılan Early raya ve Sindh raya köklerinde ROS ile ilişkili olduğu düşünülen 3 genin (APX, Fe-SOD ve RBOH) mRNA seviyesindeki anlatım değişiklikleri detaylı olarak incelenmiştir.

Elde edilen bu özgün sonuçlar, miRNA aracılı düzenleyici ağlar ve *Brassica juncea* bitkilerinin Cr streslerine karşı yanıtının altında yatan moleküler mekanizmalar hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. Tanımlanan yollar, miRNA'lar ve onların hedef genleri, *Brassica juncea*'nın ağır metal toleransının iyileştirmek için önemli hedefler olarak değerlendirilecektir. Ayrıca, krom stresine karşı bitkilerin yanıt mekanizmalarının araştırılmasına yeni bilgiler sağlamakta ve ağır metal stresine karşı bitkilerde yeni stratejilerin geliştirilmesine katkı sunmaktadır. Dahası, elde edilen sonuçlar, ağır metal akümüasyonu ve toleransı ile ilişkili moleküler mekanizmalarda aydınlatılmamış noktaların açıklanmasına ve fitoremediasyon sistemlerinin geliştirilmesine önemli bir kaynak oluşturacaktır. *Brassica* türlerinde Cr stresine yanıtta miRNA aracılı düzenleyici mekanizmalar hakkında yeni bilgiler sağlayacaktır. Ek olarak, üstün fitoremediasyon yeteneğine sahip bitkilerin geliştirilmesi için başta çevreciler, tarımcılar, genetikçiler olmak üzere birçok alana katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ağır Metaller

Ağır metaller, biyolojik işlevleri ve kimyasal özellikleri bakımından farklılık gösteren heterojen element grubudur. Periyodik tabloda geçiş elementi grubunda yer alan elementler “ağır metal” olarak adlandırılmaktadır. Ağır metaller, yoğunluğu 5 g cm^3 ’ün üzerinde olan elementlerdir (Hutton ve Symon, 1986; Nriagu, 1989; Hawkes, 1997) ve atom ağırlıklarının veya yoğunluklarının yüksek olması nedeniyle “ağır metal” olarak tanımlanmaktadır (Battarbee ve ark., 1988; Gao ve ark., 2024). Toprakta doğal olarak oluşan ağır metaller, büyük atom ağırlığına sahip elementler olup, suyun en az beş katı daha yoğun olan metallerdir (Tchounwou ve ark., 2012; Abd Elnabi ve ark., 2023). Günümüzde çevreye ve insanlara toksik etki gösterebilen metalik kimyasal elementleri ve metaloidleri tanımlamak için “ağır metal” kelimesi kullanılmaktadır (Lenntech, 2004; Duruibe ve ark. 2007). Örneğin, bazı metaloidler ve selenyum, arsenik ve alüminyum gibi daha hafif metaller toksiktir. Bu elementler, bazı durumlarda ağır metal olarak adlandırılmaktadır. Ancak, altın elementi gibi bazı ağır metaller genellikle toksik değildir (Tchounwou ve ark., 2012; Briffa ve ark., 2020)

Günlük yaşamımızda yaygın olarak bulunan ağır metaller krom, titanyum, vanadyum, mangan, demir, kobalt, nikel, bakır, çinko, arsenik, molibden, kadmiyum, kurşun’dur. Bakır, mangan, çinko, nikel, demir gibi bazı metaller bitki için optimal hücresel büyüme için gereklidir. Bu metaller, düşük miktarlarda (nM) gerekli iken, tüm ağır metaller daha yüksek miktarlarda (M ila mM) canlı organizmalar için toksiktir (DalCorso ve ark., 2014). Kurşun, kadmiyum, krom, arsenik ve cıva gibi bitkilerde biyolojik işlevi olmayan metallere, temel olmayan metaller adı verilmektedir. Bu tür metaller, biyolojik sistemlerde yüksek dozlarda toksik etki göstermektedir (Franić ve Galić, 2019).

Biyolojik sistemlerdeki rollerine göre metaller, esansiyel olan ve esansiyel olmayan olarak sınıflandırılmaktadır. Esansiyel ağır metaller, bitkilerin sağlıklı ve verimli bir şekilde büyümesi ve gelişmesi için küçük miktarlarda ihtiyaç duydukları ve bitkilerin fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerinde önemli rol oynayan metallerdir. Örneğin mangan (Mn), bakır (Cu), demir (Fe) ve çinko (Zn) gibi eser elementler, bitkilerin yaşam faaliyetleri için gereklidir (Gohre ve ark., 2006; Sebastian ve Prasad, 2015;

Vatansever ve ark., 2017). Öte yandan, esansiyel olmayanlar elementler, bitkilerin fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonlarında rol oynamayan ve ihtiyaç duymadıkları metallere aittir. Cıva (Hg), kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), kobalt (Co), krom (Cr) ve arsenik (As) bu tür elementlerdir ve genellikle toksik etkiler göstermektedirler (Sahan ve ark., 2022). Bitkilerde esansiyel olan ve esansiyel olmayan metallerin belirli bir seviyeyi aşması durumunda toksisite meydana gelmektedir (Meraklı ve ark., 2022; Meraklı ve Memon, 2023).

Son yıllarda, ağır metallerin çevre kirliliği üzerindeki etkileri giderek artan bir endişe kaynağı haline gelmektedir (Masindi ve Muedi, 2018; Vardhan ve ark., 2019). Bu toksik kirleticiler, biyolojik olarak parçalanamadıkları için çevrede uzun süre kalabilmektedir. Ağır metaller, yer kabuğunun doğal bileşenleri olarak, doğal ve antropojenik faaliyetler aracılığıyla çevreye salınmaktadır. Doğal kaynaklar arasında minerallerin aşınması, erozyon ve volkanik faaliyetler bulunurken; antropojenik kaynaklar madencilik, metal eritme, elektrokaplama, pestisitler, fosfat gübreler, biyokatıların kullanımı, çamur boşaltma, endüstriyel deşarj ve atmosferik birikim gibi faaliyetleri içermektedir (Bradl ve ark., 2005; Wuana ve ark., 2011; Masindi ve ark., 2021). Madencilik, metal eritme ve endüstriyel ve tarımsal kullanımlar gibi antropojenik faaliyetler, ağır metallerin çevrede yayılmasına ve yoğunlaşmasına neden olarak bu metallerin miktarının her geçen gün artmasına yol açmaktadır. Özellikle madencilik ve eritme işlemleri sırasında meydana gelen sızıntılar, yanma (özellikle enerji üretimi, yakma, eritme ve içten yanmalı motorlar sırasında) ve endüstriyel atıklar, ağır metal kirliliğinin önemli nedenlerindendir. Sonuç olarak, ekosisteme karışan ve toprakta biriken ağır metaller, toprak verimliliğini, topraktaki biyolojik döngüyü ve toprakta yetişen ürünlerin verimini olumsuz yönde etkilemekte, bu metaller besin zinciri aracılığıyla diğer canlı organizmalara geçmekte ve birikmektedir. Bu durum, toprak ve toprak ile ilişkili canlı organizmaların doğal faaliyetlerini olumsuz yönde etkilemektedir.

2.2.Bitkiler ve Ağır Metaller

Bitkiler, başlıca besin kaynağı olan topraktan birçok elementi alır. Bitkiler hem vejetatif hem de üreme kısımlarının optimal büyüme ve gelişimini sağlamak için topraktan çeşitli inorganik mineral elementlere ihtiyaç duyar (Pandey, 2015, 2018). Bu mineraller, makromoleküllerin yapısal bileşenleri olarak, enzimatik reaksiyonlarda

kofaktör olarak, uygun su potansiyelini korumak için ozmotik çözünmüş maddeler olarak veya hücresel bölmelerde iyon dengesini sağlamak için iyonize türler olarak çeşitli işlevler üstlenmektedir.

Bitkiler, ihtiyaç duydukları mikro ve makro besinler aracılığıyla besin alımı gerçekleştirir; bu besinler, bitkilerin büyümesi, gelişmesi ve hayatta kalması için gereklidir (Nadeem ve ark., 2018; Kumar ve ark., 2021). Mineraller, bitki büyümesi için gerekli nispi miktarlarına göre iki ana sınıfa ayrılır: mikro besinler ve makro besinler. Bu sınıflandırma, bitkilerin bu besin maddelerine olan ihtiyaçlarının miktarına dayanmaktadır. Makro besinler, bitkiler tarafından büyük miktarlarda ihtiyaç duyulan ve bitki dokularında yüksek miktarlarda bulunan besin maddeleridir; bitki gelişimi için kritik öneme sahiptirler. Mikro besinler ise bitkiler tarafından daha az miktarlarda ihtiyaç duyulan besin maddeleridir, ancak bitki sağlığı için yine de gereklidirler. Başlıca makro besinler azot (N), potasyum (K), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), fosfor (P) ve kükürt (S)'tür; bunlar genellikle bitkilerde kuru doku ağırlığının %0,1'inin üzerinde bulunan konsantrasyonlara sahiptir. Bitkilerin eser miktarda ihtiyaç duyduğu mikro besin elementleri ise demir (Fe), çinko (Zn), manganez (Mn), bakır (Cu), bor (B), klor (Cl), molibden (Mo) ve nikel (Ni)'dir; bu elementler genellikle kuru doku ağırlığının %0,01'inden daha düşük konsantrasyonlarda bulunur. Mikro besinler, hastalık direncini artırmak, ürün verimliliğini korumak ve bitkilerin streslere karşı daha dayanıklı hale gelmesini sağlamak için önemlidir (Gupta ve ark., 2017; Mittal ve ark., 2023). Örneğin, bakır (Cu) mikro besini, bakterilere karşı etkili bir fungusittir ve mantar hastalıklarının kontrolünde kullanılır. Çinko (Zn) mikro besini ise bitki hücre duvarlarının sağlamlığını artırarak hastalıklara karşı direnci destekler (Tripathi ve ark., 2021). Bu mikro besinlerin redoks reaksiyonlarına katılması ve birçok enzimin aktivasyonunda kofaktör olarak işlev görmesi, bitkilerin yaşamsal süreçlerinin düzenlenmesi ve sağlıklı büyüme ile gelişmeleri için gereklidir. Bu on dört element, karbon (C), hidrojen (H) ve oksijen (O) elementleriyle birlikte bitkilerin büyümesi için hayati öneme sahiptir.

Bitkilerin sağlıklı büyümesi ve yüksek verimlilik sağlaması için topraktaki besin maddelerinin dengeli bir şekilde bulunması gerekmektedir. Besin elementlerinin bir veya daha fazlasının eksikliği, toprak verimliliğini ve bitki gelişimini önemli ölçüde etkileyebilir (Tripathi ve ark., 2015; Shrivastav ve ark., 2020). Makro ve mikro besinler, bitkilerin tüm biyokimyasal ihtiyaçlarını destekleyen temel besin maddeleri arasındadır.

Temel besin elementleri noksanlığında, bitkiler yaşam döngüsünü tamamlayamamakta, diğer elementler belirli fonksiyonlarını yerine getirememekte ve yeterince beslenememektedir. Temel besinlerin yaklaşık yarısı makro besinlerdir ve bu besinler hayati fonksiyonlarda önemli rol oynar. Örneğin, bitkiler proteinleri, karbonhidratları, nükleik asitleri ve diğer temel bileşenleri sentezlemek için karbona ihtiyaç duyar. Bitkilerde farklı birçok element bulunabilir; ancak, bu elementler bitkilere seçici olmayan bir şekilde girer. Temel olmayan bu elementlerin çoğu, bitkiler için bilinen bir işlevi olmamakla birlikte, yüksek miktarlarda bulunduğunda bitki büyümesini olumsuz etkileyebilir ve bitkilerin normal fonksiyonlarını bozabilir. Bunlar arasında kadmiyum (Cd) ve krom (Cr) gibi elementler bulunur (Saha, 2011).

Krom, bitkiler için esansiyel olmayan bir ağır metaldir (Singh ve ark., 2013; Shrivastava, 2002; 2021). Yüksek konsantrasyonlarda büyüme inhibisyonuna, CO₂ alımında azalmaya, klorofil sentezinde düşüşe ve kloroza neden olabilir (Singh ve ark., 2013; Sharma ve ark., 2020). Krom, bitkiye Cr(VI) veya Cr(III) formlarında organik asitlerle kompleksler oluşturarak girer (Singh ve ark., 2013; Shahid ve ark., 2017). Kompleksleşme, kromun çözünürlüğünü ve dolayısıyla kök ksilemi yoluyla hareketliliğini artırır. Cr(VI), kök hücrelerine simplastik yol ile girerken, Cr(III) apoplastik yol ile girer. Cr(VI) daha sonra indirgenir ve kortekste depolanır. Krom, bitkinin üst kısımlarına yeterince taşınmasa da kimyasal formlarına bağlı olarak dokular içinde birikir (Zayed ve Terry, 2003; Vernay ve ark., 2007). Cr(III) ve Cr(VI), hücre duvarında bulunan kalsiyum değişim bölgeleri ve sülfat/fosfat taşıma proteinleri aracılığıyla sitozole girer. Sitozolde Cr(VI)'nin çoğu Cr(III)'e indirgenir ve kalan Cr(VI) iyonları daha sonra taşınarak vakuolde depolanır. Vakuolde kalan Cr(VI) iyonları ya Cr(III)'e indirgenir ya da reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna yol açar (Panda ve Choudhury, 2005; Eleftheriou ve ark., 2015). Bu bağlamda, bu tür elementler çevreye salındıkça ve toprağa karıştıkça, ortamdaki derişimlerine bağlı olarak bitkilerde toksisiteye neden olur. Sonuç olarak, bitkilerde transpirasyon, stoma hareketleri, besin ve su alımı, fotosentez, enzim aktivitesi, çimlenme, protein sentezi, membran stabilitesi ve hormonal denge gibi birçok fizyolojik süreç bozulur. Özellikle toprak üstü kısımlarında (gövde, yaprak, meyve) ve köklerde gelişim süreçlerini etkileyerek bitkinin besin değerinde azalmaya yol açar (DalCorso, 2012; Saleem ve ark., 2022).

2.3. Bitkilerin Ağır Metallere Karşı Yanıtı

Metallofit bitkiler, yüksek düzeyde ağır metallere tolerans gösteren ve bu metalleri biriktirebilen bitkiler olarak tanımlanır (Baker ve ark., 1990, 2020; Bothe ve Slomka 2017; Oladoye ve ark., 2022). Bu bitkiler için en uygun ortam, yüksek metal içeriğine sahip topraklardır; örneğin, maden yatakları ve endüstriyel atık sahaları. Bu topraklara uzun süre uyum sağlayarak yaşam sürdürebilirler. Bitkilerin adaptasyonları ağır metalleri absorbe etme, biriktirme, taşıma ve tolerans geliştirme mekanizmalarıyla gerçekleştirilir. Köklerde metal sekestrasyonu (birikim), hücresel duvarın yapısal değişiklikleri, metal şelasyonu (bağlama) ve metal iyonları için taşıyıcı proteinlerin üretimi gibi süreçler bu mekanizmalara dahildir. Bu mekanizmalar, bitkilerin ağır metallerin zararlı etkilerini azaltmalarına ve bu ortamlarda hayatta kalmalarına yardımcı olur (Ghori ve ark., 2019; Hall, 2002; Clemens, 2001; Clemens ve ark., 2002; Clemens, 2017). Bu bitkiler genellikle bulundukları habitatlara göre tanımlanır; ancak yüksek seviyelerdeki metallerle (en bol bulunan kaya oluşumunda rol oynayan sekiz element dışındaki elementler: Al, Ca, Fe, K, Mg, Na, O ve Si) değiştirilmiş veya kirlenmiş substratlarda da yaşam sürebilirler (Alford ve ark., 2010). Ağır metallere toleranslı bitkilerin temel yaşam alanları, metallerin yüzeye çıktığı metalli veya orojenik topraklar olarak adlandırılan bölgelerdir (Ali, 2013). Bu alanlarda bulunan yüksek metal konsantrasyonları, metallofitlerde metal direncinin gelişmesini sağlar. Madencilik faaliyetleri, metallofitlerin yaşadığı metal açısından zengin habitatları yok ederek ve bozarak yaşam alanlarını değiştirmektedir (Venkateswarlu ve ark., 2016). Bazı metallofitler, toksik seviyelerdeki elementleri konsantre edebilme yeteneğine sahipken, akümülatör olmayan bitkiler bu elementleri biriktiremez. Bu bitkiler genellikle Brassicaceae familyasına aittir. Bitkilerin yapraklarında eser elementleri biriktirme yeteneği, doğal olarak metal açısından zengin topraklarda yetişen türlerde gözlemlenir. Ancak, hiperakümülatörlerde eser element birikim potansiyeli sadece habitatlarına bağlı değildir. Örneğin, düşük metal içeriğine sahip topraklardan yetişen *Thlaspi caerulescens* ekotipleri, metallik topraklarda yetişen ekotiplerden daha fazla birikim gösterebilmektedir (Dechamps ve ark., 2005).

Metallofit bitkiler genellikle tek başlarına büyüme eğiliminde olmadıkları için, metal açısından zengin topraklarda ektomikorizal ve arbusküler mikorizal mantarlar gibi mikroorganizmalarla birlikte bulunurlar (Bothe, 2011; Moreira ve ark., 2021). Bu mikroorganizmalar, bitkilerle simbiyotik ilişkiler kurarak ağır metalleri daha etkili bir

şekilde almalarına, taşımalarına ve tolerans geliştirmelerine yardımcı olurlar. Mikorizalar, ağır metallerin girişini sınırlamak için absorpsiyon veya şelasyon mekanizmalarını kullanır. Ayrıca, bitkilerin metal ile kirlenmiş alanlarda hayatta kalmasını destekleyen kök eksüdasyonu mekanizması da bulunmaktadır. Kök eksüdatları, bitkilerin köklerinden amino asitler, organik asitler, su, inorganik iyonlar, şekerler gibi çeşitli bileşenlerin salgılanmasıdır. Bu salgılar arasında bikarbonatlar, protonlar, karbondioksit ve mukus, sideroforlar, alelopatik bileşikler gibi atıklar da bulunur. Ağır metallerle ilişkili olarak, kök eksüdatları ağır metal-ligand kompleksleri oluşturarak ve rizosferin pH'ını artırarak ağır metal toksisitesini azaltır ve biyoyararlanımı etkili bir şekilde kontrol altında tutar.

Ağır metallerle kirlenmiş topraklarda kolonize olan bitkiler, bu metallerle başa çıkmak için üç temel strateji geliştirmiştir (Ashraf ve ark., 2011; Jan ve Parry, 2016). Bu stratejilere göre, bitkiler ağır metallerle karşı yanıtına göre üç gruba ayrılır: Metal dışlayıcı (metal excluder), metal indikatör ve metal akümülatör bitkilerdir.

1) Metal dışlayıcılar: Metal dışlayıcı bitkiler, ağır metalleri substrattan köklerine alırken, bu metallerin toprak üstü kısımlarına taşınmasını ve girişini kısıtlar (Baker, 1981; Massoura ve ark., 2004). Ağır metal fitotoksitesini önlemek için bitkiler, savunma mekanizmalarını iki ana kategoriye ayrılır: kaçınma ve tolerans (Saxena ve ark., 2020). Kaçınma stratejisi, bitkilerin ağır metallerle karşı hücre dışı düzeyde uyguladıkları ilk savunma mekanizmasıdır. Bu mekanizmaları kullanan bitkiler, ağır metallerin kök sistemine girişini sınırlayarak veya engelleyerek bu metallerin toprakta birikmesini önler (Manara, 2012; Dalvi ve Bhalerao, 2013). Bu bitkiler "dışlayıcılar" olarak adlandırılır. Dışlayıcı bitkiler, metal iyonlarını kök hücre duvarlarında veya rizosferde bağlayarak ağır metallerin köklere ve bitkinin toprak üstü kısımlarına taşınmasını önler. Bu sayede, bitki ağır metal toksisitesinden kaçınmış olur. Bu grup, ağır metallerin taşınmasını sınırlayarak toprak üstü kısımlarda düşük seviyelerde kirlenici bulunduran bitki türlerinin çoğunluğunu içerir. Birçok bitki türü, metaller veya metaloidler gibi eser elementlere karşı yüksek tolerans geliştirmiştir. Toleranslı bitkiler, genellikle eser metallerin girişini ve kökten gövdeye taşınmasını sınırlayan dışlayıcılar olarak bilinir (Maestri ve ark., 2010). Bu tür bitkiler düşük metal ekstraksiyon potansiyeline sahip olup, fitostabilizasyon amacı için ideal adaylardır (Lasat, 2002; Iqbal ve ark., 2015). Dışlayıcı bitkiler, genellikle toprak üstü/toprakta biriktirdikleri ağır metal miktarı bakımından (1 birimden az) düşük

seviyelere sahiptir.

(2) Metal indikatörler: Metal indikatörleri olarak bilinen bitkiler, hasat edilebilir biyokütlelerinde belirli metalleri biriktirir ve bu seviyeler genellikle topraktaki metal miktarını yansıtır (Sheoran ve ark., 2010; Lux ve ark., 2011). Bu tür bitkiler, toprakta belirli bir metalin yüksek miktarlarını işaret edebilir. Bu özellikleri, çeşitli alanlarda kullanılabileceklerini gösterir; örneğin, madencilik bölgelerinde veya endüstriyel atıkların olduğu alanlarda toprak analizlerinde ve çevresel izleme çalışmalarında kullanılabilirler.

3) Metal akümülatörler: Metal akümülatörleri olarak bilinen bitkiler, metalleri hücre içinde depolayarak, taşıyarak ve biriktirerek topraktaki seviyeleri çok aşan miktarlarda hasat edilebilir biyokütlelerinde biriktirirler. Hiperakümülatörler olarak da adlandırılan bu bitkilerin toprak üstü kısımlarında metal miktarı genellikle belirli değerlerin üzerindedir: örneğin Hg için 10 mg/kg, Cd ve Se için 100 mg/kg, Co, Cu, Cr, Ni ve Pb için 1000 mg/kg, ve Zn ve Mn için 10,000 mg/kg (Baker ve Brooks, 1989; Reeves, 2006). Bu tür bitkiler, absorbe edilen metal iyonlarını sitoplazmadan uzaklaştırarak zararsız hale getirirler (Rascio ve Navari-Izzo, 2011).

Son yıllarda fitoremediasyon, fitomining ve gıda ürünü biyofortifikasyonu gibi alanlara büyük ilgi gösterilmesinin nedeni, metal akümülatörü bitkilerin potansiyelleridir. 450'den fazla bitki türü (%0,2'si angiosperm) eser metaller (Zn, Ni, Mn, Cu, Co ve Cd), metaloidler (As) ve ametaller (Se) için hiperakümülatör olarak tanımlanmıştır; bu bitkilerin çoğunluğu Ni hiperakümülatörleridir (Reeves, 2006; Rascio ve Navari-Izzo, 2011). 52 familya ve 130 cinse ait 721 hiperakümülatör bitki türü bulunmaktadır. Bu türler genellikle Brassicaceae (çoğunlukla), Fabaceae, Euphorbiaceae, Asteraceae, Phyllanthaceae, Lamiaceae ve Scrophulariaceae familyalarına aittir (Szczyglowska ve ark., 2011; Pasricha ve ark., 2021; Thalassinou ve ark., 2023).

Hiperakümülatör bitkiler, hiperakümülatör olmayan ilişkili bitkilerden üç temel özellikleriyle ayrılır: (i) ağır metal (HM) mobilizasyonu ve alım hızının güçlü bir şekilde artması, (ii) kökten toprak üstü kısımlara daha hızlı translokasyon, (iii) HM'yi yapraklarda veya diğer bitki kısımlarında detoksifiye etme, bölümlendirme ve uzaklaştırma yeteneğinin gelişmiş olması (Sytar ve ark., 2021). Hiperakümülatör bitkilerin hipertolerans özelliği, bitkilerin ağır metal toksisitesiyle başa çıkabilmesini sağlayan temel bir özelliktir (DalCorso ve ark., 2008). Diğer yandan, hiperakümülatör

olmayan bitkiler, özellikle toprak üstü kısımlarında (Baker, 1981), metal birikimini en aza indirmek için kök hücre vakuolünde kompleksleşme ve sekestrasyon yoluyla metalleri bitki kısımlarından uzaklaştırma konusunda hiperakümülatör bitkilerden farklıdır.

2.4. Bitkilerde Ağır Metal Alımı ve Taşınımı

Bitkiler besinlerini topraktan alır. Ancak, temel besinleri almakta yeterince seçici olmadıkları için bazen temel olmayan hatta toksik elementleri de absorbe edebilirler. Metal alımı, metalin toprak özsuyundan kök hücrelerine taşınmasını içeren oldukça karmaşık bir süreçtir (Tangahu ve ark., 2011). Toprak özsuyu kök hücrelerine kök kılları aracılığıyla girer. Saifullah ve ark. (2009), metal alım mekanizmasını detaylandırarak toprak özsuyunun önce plazma zarını geçerek simplasta girdiğini ve ardından plazmodezmalar aracılığıyla hücreler arasında geçtiğini açıklamıştır. Toprak özsuyu, apoplastik yolu izler; apoplastik çözeltisi endodermis hücrelerinin simplastına girer ve daha sonra plazmodezma bağlantıları aracılığıyla stele hücrelerine geçer. Toprak çözeltisi daha sonra hücreler arasında hareket eder ve ksilem aracılığıyla iletilir. Metal iyonları kökler tarafından alındıktan sonra ya köklerde depolanır ya da gövdeye taşınır (Aleel, 2009). Transpirasyon çekimi, bitkilerde metal iyonlarının gövdelere taşınması için gerekli olan suyun kütleli yukarı doğru hareketini sağlayan bir süreçtir (Annamalainathan ve ark., 2013; Page ve Feller, 2015). Bu süreçte, ksilem aracılığıyla metal taşınması organik asitler ve amino asitler gibi bileşenler tarafından kolaylaştırılır.

Demir, manganez, molibden, bakır, çinko ve nikel gibi bazı temel geçiş elementleri, bitkiler tarafından az miktarda ihtiyaç duyulduğu için mikro besinler olarak bilinir. Bu elementler, bitki metabolizması için önemli olup, normal büyüme ve gelişme için gereklidir. Öte yandan, gümüş, altın ve kobalt gibi bazı geçiş metalleri ile alüminyum gibi geçiş metali olmayan elementler, bitki büyümesi üzerinde uyarıcı etki gösterebilir; ancak genellikle bitkiler tarafından gerekli olmayan veya temel olmayan besinler olarak kabul edilir.

Bitkiler, topraktan besin elementlerini alırken seçici iyon alımı ve elementlerin difüzyonu yoluyla indüklenen konsantrasyon gradyanlarını kullanırlar. Bu süreçler, bitkilerin ihtiyaç duydukları elementleri topraktan almalarını sağlar. Ancak, element biriktirme seviyeleri bitki türlerine göre farklılık gösterebilir (Annamalainathan ve ark.,

2013). Bitkiler, hem ‘akümülatör’ hem de ‘dışlayıcı’ roller üstlenebilirler. Akümülatör bitkiler, toprak üstü dokularında kirleticileri absorbe edebilirler; bu absorpsiyona rağmen hayatta kalabilirler. Bu bitkiler, absorbe ettikleri kirleticileri dokularında biyolojik olarak ayrıştırabilir veya biyotransformasyon yoluyla inert formlara dönüştürebilirler. Diğer yandan, dışlayıcı bitkiler, kirleticilerin biyokütlelerine alımını sınırlayarak, bu kirleticilerin toprakta birikmesini önlerler (Reichman, 2002).

Bitkiler, çevreden gerekli mikro besinleri alabilmek için son derece spesifik ve etkili mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar, mikro besinlerin çok düşük ppm seviyelerinde olsa dahi alınmasını sağlar. Bitki kökleri, bitki tarafından üretilen şelatlaştırıcılar, pH değişiklikleri ve redoks reaksiyonları ile desteklenerek, topraktaki çok düşük seviyelerdeki mikro besinleri neredeyse çözünmeyen çökeltilerden bile çözerek bünyelerine alabilmektedir. Ayrıca, bitkiler, mikro besinleri taşımak ve depolamak için de oldukça spesifik mekanizmalar geliştirmiştir. Bu mekanizmalar, kimyasal özellikleri temel elementlere benzeyen toksik elementlerin alımı, taşınması ve depolanmasında da rol oynamaktadır. Bu nedenle, mikro besin alım mekanizmaları fitoremediasyon için son derece önemlidir. Bitkilerin toksik elementleri topraktan alarak temizleme sürecinde bu mekanizmalar kritik bir rol oynar.

Bitki hücrelerinin plazma zarında, iyon alımı ve taşınmasında rol alan özel proteinler veya taşıma mekanizmaları bulunmaktadır: (1) Proton pompaları: Bu mekanizmalar enerji tüketerek elektrokimyasal gradyanlar oluşturur ve iyonların alımını sağlar. Proton pompaları genellikle ATPazlar olarak bilinir. (2) Ko- ve antitransporterler: Bu proteinler, ATPazlar tarafından üretilen elektrokimyasal gradyanları kullanarak iyonların aktif alımını gerçekleştirir. (3) Kanallar: Bu proteinler, iyonların hücreye taşınmasını kolaylaştırarak iyon alımı ve taşınmasında önemli bir rol oynar (Ku ve ark., 2022).

Taşıma mekanizmaları, genellikle çeşitli iyonları alabilme ve taşıyabilme kapasitesine sahiptir. Ancak, ağır metal kirleticilerinin alımı sırasında, özellikle farklı iyon türlerinin birbirleriyle etkileşime girebileceği durumlar ortaya çıkabilir. Bu durum, bitkilerin ağır metal kirleticilerini alması ve taşınmasında karmaşık etkileşimlerin oluşabileceğini gösterir.

Bitki alımı ve taşınım mekanizmaları birbirleriyle ilişkilidir. Genellikle bitkiler, kısa süreli metabolik gereksinimler dışında eser elementleri biriktirmezler. Bu gereksinimler, genellikle eser elementler için 10 ile 15 ppm gibi küçük seviyelerde yeterli olmaktadır.

Diğer taraftan, toksik metal iyonlarını binlerce ppm seviyesinde alabilen ‘hiperakümülatör’ bitkiler de bulunmaktadır. Hiperakümülatör bitkiler, genellikle iki veya daha fazla ağır metali absorbe edip biriktirebilirler. Bu yetenek, bitkilerin ağır metalleri alım ve taşınım kapasitesine bağlıdır (Shrivastava ve ark., 2019). Metal biriktiren bitki türleri, Cd, Zn, Co, Mn, Ni ve Pb gibi ağır metalleri, biriktirmeyen (dışlayıcı) bitkilerin biriktirdiği miktarın 100 ila 1000 katı kadar alabilirler (Memon ve ark., 2001; Arantza ve ark., 2022). Bu bitkilerde ağır metallerin hiperakümüasyonu genellikle üç aşamada gerçekleşir: (1) metallerin plazma zarından taşınması, (2) ağır metallerin ksileme yüklenmesi ve toprak üstü kısımlara taşınımı, (3) metallerin hücresel düzeyde detoksifikasyonu ve depolanması (Memon, 2016).

2.4.1. Metal iyonunun hücre duvarına bağlanması

Ağır metallerin hücreye girişinin engellenmesi, bitkilerde metal toleransı için önemli bir süreçtir. Bu süreçte, kök hücrelerindeki metal iyonlarının miktarı, apoplast bölgesindeki çinko ve bakır iyonlarının bağlanmasıyla düzenlenir. Ayrıca, plazma zarı ve hücre duvarı arayüzlerinde yüksek miktarlarda ağır metal birikir (Dalcorsio ve ark., 2013). Bitkinin Katyon Değişim Kapasitesi (CEC), hücre duvarındaki değişim grupları tarafından kontrol edilir. Bu bölge, kök hücre duvarında yer alır ve metal alımı için kullanılabilirliği belirler (Farhangi-Abriz ve Ghassemi-Golezani, 2023). Hücre duvarı, temel olarak histidil grupları, karbonhidratlar ve pektin bölgeler aracılığıyla metal immobilizasyonu ve alımından sorumludur. Ancak, hücre duvarı sınırlı bağlanma bölgelerine sahiptir. Bu sınırlı bağlanma bölgeleri, metal iyonlarıyla temas ettiğinde ağır metal toleransı üzerinde daha az etkiye sahiptir (Hooper ve ark., 2010).

2.4.2. Ağır metalin plazma zarı-kök-toprak üstü kısma hareketi

Bitki hücre zarlarındaki plazma zarı taşıyıcıları, metal alımından sorumludur ve hücredeki metal konsantrasyonunu düzenleyerek bitkilerde metal stresini arttırabilir (Manara, 2012). Ayrıca, bu taşıyıcı proteinler, ağır metallerin toprak üstü kısımlara taşınmasında önemli bir rol oynar. Metaller kökler tarafından alındıktan sonra ksilem aracılığıyla taşınır ve ardından bitkinin farklı bölgelerine ulaşır. Metaller, şelatlayıcılar (örneğin amino asitler ve organik asitler) ile reaksiyona girerek kompleksler oluşturabilir.

Bu metal-şelat kompleksleri floem özsuyuna taşınır (Kochian, 1991; Faizan ve ark., 2024). Serbest iyonlar ya da metal-şelat kompleksleri, vakuol membranından aktif olarak taşınır. Fitoşelatinler veya organik asitler tarafından şelatlanan metal iyonları, vakuolde depolanır ve belirli koşullarda çözünmeyen çökeltiler oluşturabilir. Bitkilerde metallerin toksik etkilerine karşı önemli savunma mekanizmaları, hücresel bölümlendirme ve şelatlama gibi süreçlerdir (Hossain ve ark., 2012; Emamverdian ve ark., 2015).

2.4.3. Ağır metal taşınımında rol oynayan taşıyıcılar

Ağır metallerin toksik etkileri, bitki hücrelerinde birikimlerine bağlı olarak çeşitli şekillerde ortaya çıkar. Metal taşıyıcılar, bu metallerin bitki hücrelerinde taşınmasında kritik bir rol oynar. Plazma membranında farklı metal taşıyıcı grupları bulunur. Ağır metaller, bitki hücrelerinin plazma membranı aracılığıyla diğer gerekli besinlerle birlikte taşınmak üzere spesifik taşıma mekanizmalarını kullanır (Williams ve ark., 2000). Kök hücrelerindeki taşıyıcılar aracılığıyla alınan ağır metaller, ksilem bileşenlerinde birikebilir. Metal şelatlayıcılar, ksilem bileşenleri ile kompleksler oluşturur ve bu komplekslerin toprak üstü kısımlara taşınmasını sağlar.

Ağır metallerle temas eden bitki için bir sonraki önemli fizyolojik süreç, metallerin ksileme yüklenmesi ve apoplastik taşınımının geliştirilmesidir. Bu süreç, metallerin detoksifiye edilip depolandığı toprak üstü kısımlara ulaşmasını kapsamaktadır (Shahid ve ark., 2017). Bu aşama, metallerin ksilemde düşük seviyelerde tutulmasını ve kök hücre tonoplastından hızlı bir şekilde dışarı çıkarılmasını içerir (DalCorso ve ark., 2013). Metallerin toprak üstü kısımlara taşınması, transpirasyon yoluyla veya ksilem damar duvarlarında gerçekleşen katyon değişimi ile düzenlenir (Weis ve Weis, 2004; Song ve ark., 2017). Ksilem damarlarında metallerin taşınması genellikle kompleks formda gerçekleşir. Örneğin, Zn organik asitlerle şelatlanırken, Cu amino asitlerle kompleks oluşturur. Ni, Ni-peptit kompleksi olarak taşınırken, Cd iki değerli iyon olarak taşınır. As ise As-sülfür kompleksleri veya sikloheksilendinitrotetraasetik asit ve nitrilotriasetik asit ile şelatlanır (Gupta ve Chatterjee, 2017).

Metal komplekslerinin kökten toprak üstü kısımlara taşınmasında farklı taşıyıcı proteinler rol oynamaktadır. Bu taşıyıcılar, metal alımı ve taşınımında kritik öneme sahiptir. Taşıyıcı proteinler arasında ZIP'ler, HMA'lar, NRAMP'ler ve CDF'ler bulunmaktadır.

- (i) ZIP, metal alımında önemli bir metal taşıyıcıdır. ZIP taşıyıcıları, özellikle dikotiledon bitkiler olmak üzere, birçok bitki türünde incelenmiştir (Ajeesh Krishna ve ark., 2020). Bu taşıyıcılar, Mn^{2+} , Fe^{2+}/Fe^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} ve özellikle Zn^{2+} gibi çeşitli metal iyonlarının taşınımında rol oynarlar. Bu ailede tanımlanan proteinler arasında ZRT ve IRT bulunur (Gupta ve ark., 2016). IRT1 homologları olan AtIRT1, OsIRT1 ve HvIRT1, plazma zarına lokalize olmuştur ve temel görevlerinin sırasıyla Fe^{2+}/Fe^{3+} ve Mn^{2+} alımı olduğu belirtilmiştir (Pedas ve ark., 2008). Bu taşıyıcılar genellikle hücre zarı üzerinden katyon taşınımında rol oynamaktadır ve bitkilerde, hayvanlarda ve bakteri ve mantarlar gibi mikroorganizmalarda bulunmaktadır (Fox ve Gueriot, 1998; Hall ve Williams, 2003). *Arabidopsis thaliana* bitkisinde 15 olası ZIP proteini ve pirinç bitkisinde 12 olası ZIP proteini olduğu bulunmuştur (Eng ve ark., 1998; Li ve ark., 2013).
- (ii) NRAMP, doğal dirençle ilişkili bir makrofaj proteinidir. NRAMP ailesi bakterilerde, mantarlarda, bitkilerde ve hayvanlarda çinko, bakır, nikel, demir ve bakır gibi metal iyonlarının taşınmasına katılmaktadır (Komal ve ark., 2015). NRAMP ailesinin üyeleri, moleküler düzeyde incelenen tüm bitkilerde tanımlanmıştır (Qin ve ark., 2017). *A.thaliana*'da NRAMP'lerin Fe, Mn ve Cd taşıdığı gösterilmiştir. AtNRAMP3 ve AtNRAMP4 yakından ilişkilidir, benzer gen ifade profillerine sahiptirler ve Fe tarafından düzenlenirler. Her ikisi de vakuol zarında yer alır. AtNRAMP3 ve AtNRAMP4, vakuolden metalleri taşınımı için birlikte işlev görürler (Curie ve ark., 2000). Mayada ifade edildiğinde, AtNRAMP1, AtNRAMP3 ve AtNRAMP4, Fe, Mn ve Cd'nin alımını sağlar (Curie ve ark., 2000; Xiao ve ark., 2008).
- (iii) COPT, bakır taşıyıcı ailesi, mantarlarda, bitkilerde ve hayvanlarda tanımlanmış olup, bu taşıyıcılar hem hücre içi hem de hücre dışı bölgelerde bakır taşınımında önemli rol oynamaktadır (Yruela ve ark., 2009). *A.thaliana*'da bakır taşıyıcı ailenin varsayılan beş üyesi (COPT1–5) tanımlanmıştır (Sancenón ve ark., 2003). Bu aileye ait proteinler, TM1, TM2 ve TM3 olmak üzere üç bölgeye sahiptir. Hücre dışı membrana sıkı bir şekilde bağlanan TM2 ve TM3 bölgeleri arasında küçük bir ara bağlantı dizisi

bulunmaktadır ve bu dizi ekstraselüler membrana sıkıca bağlanmaktadır (Yuan ve ark, 2011).

- (iv) P_{1B} tipi ATPaz'lar, aynı zamanda ağır metal ATPazları (HMAs) olarak bilinir ve bitkilerde geçiş metal taşınmasında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Bu taşıyıcı aile, filogenetik analizde Cu/Ag grubu ve Zn/Co/Cd/Pb grubu olarak adlandırılan iki ana alt sınıfa ayrılır (Williams ve Mills, 2005). *A.thaliana*'da AtHMA4, klonlanan ve karakterize edilen Zn/Co/Cd/Pb grubunun ilk bitki P_{1B} tipi ATPaz'dır. Ağır metal taşıyan P-tipi ATPaz taşıyıcı ailesi, hücresel bileşenler arasında, ksilem ve sitoplazma arasında metal taşınımına katılmaktadır (Eren ve Argüello, 2004; Argüello ve ark., 2007). Bu HMA'ların temel işlevi, çinko ve kadmiyum gibi metalleri sitoplazmadan plazma zarı aracılığıyla hücre organellerine taşımaktır (Lee ve ark., 2007; Zhang ve ark., 2018).
- (v) MATE, çoklu ilaç ve toksik bileşik parçalama protein ailesi, prokaryotlarda ve ökaryotlarda bulunmaktadır. MATE taşıyıcıları bitkilerde geniş bir aileyi temsil eder. Bitkilerde, MATE tipi taşıyıcıların çeşitliliği bakteri ve hayvanlardan daha fazladır. Örneğin, *A. thaliana*'da 58 MATE ortologu bulunmaktadır. Bu protein ailesi genellikle hücrelerden toksik metallerin atılması için gereklidir (Wang ve ark., 2016). Ayrıca, sitrat taşıyıcısını kodlayan genler, alüminyum detoksifikasyonuna ve demirin köklerden toprak üstü kısımlara taşınımına yardımcı olmaktadır (Liu ve ark., 2016). Son araştırmalar, bazı MATE proteinlerinin, demir (Fe) translokasyonu veya alüminyum (Al) detoksifikasyonu için gereken sitratın taşınmasında rol aldığını bildirmiştir. *A. thaliana*'da FRD3'ün, köklerden-toprak üstü kısımlara Fe translokasyonu için gereken bir sitratı taşıyıcısı olduğunu göstermektedir (Pineau ve ark., 2012).
- (vi) OPT, oligopeptid taşıyıcı ailesi, özellikle mantarlarda, hayvanlarda ve bitkilerde bulunmaktadır. Bu proteinler, birçok substratı taşıyabilen transmembran alanlara sahiptir (Lubkowitz, 2016). Oligopeptid taşıyıcı ailesindeki genler, substratlarını hücre dışı ortamdan veya bir organelden sitozol içine taşıdığı düşünülen integral membran proteinlerini kodlar (Lubkowitz, 2011). Bitki taşıyıcılarının filogenetik analizleri, iki uzak sınıfı

ortaya çıkarmıştır: sarı şerit benzeri (YSL) proteinleri ve bu ailenin adını aldığı oligopeptid taşıyıcıları (OPT'ler). Bu aile için üç kategori substrat tanımlanmıştır: küçük peptitler, metallerle bağlı ikincil amino asitler ve glutatyon.

- (vii) ABC, (ATP bağlayıcı kaset) taşıyıcı ailesi, şelatlı metal iyonlarının vakuole taşınımına dahil olmaktadır (Rea, 2007; Song ve ark., 2014). Ksenobiyotikler ve ağır metaller, ABC taşıyıcıları tarafından hücre içi vakuollere taşınır ve iki alt aile olan MRP ve PDR'nin ağırlıklı olarak şelatlı ağır metallerin depolanmasında aktif olduğu bildirilmiştir. Hücre içi vakuoller, PC-Cd komplekslerinin birikimi ve depolanması için ana bölgelerdir. PC-Cd kompleksleri sitozol içinde üretilir ve daha sonra ABC taşıyıcıları tarafından vakuollere taşınır (Manara, 2012). Vakuollerde, daha fazla Cd ve sülfür alımı ile HMW kompleksleri oluşur. HMW kompleksleri, ana Cd depolama formudur.
- (viii) CDF, katyon difüzyonunu kolaylaştırıcılar taşıyıcı ailesi, metal tolerans protein (MTP) ailesi olarak da bilinen, bakteri, mantar, hayvan ve bitkiler gibi çeşitli organizma gruplarında bulunur (Gustin ve ark., 2011). Bu taşıyıcı aile altı transmembran bölge içerir. Bu ailenin üyeleri, başlıca Zn^{2+} , Mn^{2+} ve Fe^{2+} seçiciliğiyle hücrel ağır metal homeostazında yer alırlar (Montanini ve ark., 2007; Kolaj-Robin ve ark., 2015). Zn^{2+} , Mn^{2+} ve Fe^{2+} özgüllüklerine rağmen, birçok CDF, ayrıca Co^{2+} , Ni^{2+} ve Cd^{2+} gibi diğer ağır metalleri de taşıyabilir. CDF taşıyıcıları, sitoplazmadan hücre dışına veya organellere ağır metallerin akışında rol oynar. *A. thaliana*'da on iki MTP geni ve *O. sativa*'da on MTP geni tanımlanmıştır (Zhang ve ark., 2020; El-Sappah ve ark., 2023). Ayrıca, CDF ailesine ait proteinler bakteri hücrelerinde metal toleransından sorumludur. (Ricachenevsky ve ark., 2013).

2.5. Bitkilerde Ağır Metal Toleransı

Ağır metal iyonları sitozole girdiğinde, bitkiler bu metal iyonlarının toksisitesiyle başa çıkmak için tolerans ve depolama mekanizmalarına başvururlar. Hiperakümülatör bitkiler, bu iyonları detoksifiye etmek için inaktivasyon, şelasyon ve bölmelendirme gibi stratejiler kullanır (Dalvi ve Bhalerao, 2013; Manara, 2012). Şelasyon yoluyla serbest

metal iyonlarının miktarı nispeten düşük seviyelere indirgenir. Sitoplazmada ağır metallerin şelasyonunda rol oynayan birçok organik ve inorganik ligand bulunur. Organik bileşikler arasında organik asitler, amino asitler, fitoşelatinler, metallotiyoninler, hücre duvarı proteinleri, pektinler ve polifenoller yer alır. Bu bileşikler, ağır metalleri kompleksleştirerek serbest iyonlar olarak sitoplazmada kalmalarını engeller ve böylece bitkilerin bu metalleri kullanımını azaltır. Örneğin, sitrat *Thlaspi goesingense* yapraklarında nikelin şelatlanmasını sağlarken, asetik ve sitrik asitler *Solanum nigrum* yapraklarında kadmiyumu bağlar. Ayrıca, malatin *A. halleri*'nde çinkonun şelasyonunda rol oynadığı gözlemlenmiştir (Sun ve ark., 2006). Ağır metal stresi, belirli amino asitlerin birikimini de tetiklemektedir. Örneğin, kadmiyum *A. thaliana*'da sistein üretimini arttırmaktadır (Domínguez Solís ve ark., 2004), nikel hiperakümülasyonu ise histidin birikimini arttırmaktadır (Richau ve ark., 2009). Ayrıca, yüksek prolin birikimi de kadmiyum, kurşun, çinko ve bakır stresi ile ilişkilendirilmiştir (Saradhi, 1991). Bu amino asitler, hücrelerde ve ksilem özsuyunda bulunan ağır metal iyonlarını şelatlayarak ağır metallerin detoksifikasyonuna katkıda bulunmaktadır (Cobbett, 2000).

Fitoşelatinler ve metallotioneinler, yüksek seviyelerde ağır metallerle yanıtta indüklenir. Örneğin, tütün yapraklarında Cd, fitoşelatinler tarafından şelatlanır, metallotioneinler ise *Silene vulgaris*'te Cu stresine yanıtı düzenler; metallotionein geninin artan ifadesi, artan Cu toleransı ile ilişkilidir (Ernst ve ark., 1992; Schat ve ark., 2002). Şelasyonun ardından, ligandların ağır metallerle oluşturduğu kompleksler aktif olarak sitoplazmadan toksik olmayan inaktif bölmelere, örneğin vakuole taşınır (Hasan ve ark., 2009). Depolama ve vakuoler bölümlendirme, toksik ağır metal iyonlarını hücre bölünmesi ve solunumun gerçekleştiği önemli bölgelerden uzaklaştırarak ağır metallerin zararlı etkilerine karşı etkili bir koruma sağlar. Bu süreçler, ağır metal iyonlarının hücresel metabolik süreçlerle etkileşimini azaltır ve böylece hücreyi korur (Sheoran ve ark., 2010).

Ağır metal iyonları, vakuoller dışında yaprak sapları, yaprak kınları ve tüyler gibi diğer bölgelere de sekestrasyon ve bölümlendirme yoluyla taşınabilir. Bu bölgelerde ağır metaller, bitkiye daha az zarar verir (Yan ve ark., 2020). Ayrıca, ağır metaller yaşlı yapraklara taşınabilir ve bu yaprakların doğal olarak dökülmesiyle bitki gövdesinden uzaklaştırılabilir (Weis ve Weis, 2004). Örneğin, *Plantago lanceolata* yapraklarına Zn taşınmadan bir hafta önce yaprak dökümü başlar ve bu süreçte Zn bitkiden uzaklaştırılır

(Yan ve ark., 2020; Ernst, 1996). Bu stratejilerin ağır metalleri detoksifiye etmekte yetersiz kaldığı durumlarda, sitoplazmada metal iyonlarının birikimi artar ve bu durum reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini tetikler. Aşırı ROS üretimi, hücre homeostazının bozulmasına, hücresel süreçlerin inhibisyonuna, DNA hasarına ve protein oksidasyonuna neden olabilen oksidatif strese yol açar (Sharma ve ark., 2012; Yan ve ark., 2020).

Ağır metal kaynaklı oksidatif hasarla başa çıkmak için bitki hücreleri, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POD) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimleri aktive eder. Ayrıca, glutatyon, flavonoidler, karotenoidler, askorbat ve tokoferoller gibi enzimatik olmayan antioksidan bileşenleri indükleyerek reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleme mekanizmalarını devreye sokar (Gill ve Tuteja, 2010; Zandi ve Schnug, 2022). Bu nedenle, bitkilerin bu antioksidan savunma sistemi, ağır metal stresine karşı mücadelede önemli bir rol oynar (Yan ve ark., 2020).

2.5.1. Ağır Metallerin Hücre içinde Sekestrasyonu ve Bölümlendirilmesi

Ağır metaller, bitki hücrelerine alındıktan ve taşındıktan sonra bitki gelişimini olumsuz etkileyerek çeşitli zararlı sonuçlara yol açabilir. Bitkilerde bu süreç, reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı, antioksidan enzim aktivitesinin yükselmesi, proteoliz, lipid peroksidasyonunun artışı, fotosentezin azalması, kloroz ve yavaş büyüme gibi belirtilerle kendini gösterir; bu durum genellikle hücre ölümü ile sonuçlanır (Sharma ve ark., 2019).

Bitkiler, ağır metal iyonlarının toksik etkilerini azaltmak için çeşitli stratejiler geliştirmiştir. Yüksek metal iyonu konsantrasyonları, hücre içinde farklı bölmelerde tutulabilir. Bu metal iyonları, dışa akış pompaları aracılığıyla apoplasta taşınabilir veya golgi aygıtı, vakuol ve hücre duvarları gibi hücresel bölmelerde depolanabilir (Ghori ve ark., 2019; Emamverdian ve ark., 2015). Bu strateji sayesinde, metal iyonlarının doğrudan enzimler ve metabolitlerle etkileşimi azalır, böylece inaktivasyonları önlenir. Sitoplazmada bulunan ağır metal iyonları, örneğin Cd, Zn, Cu, Ag, Au, Hg ve Pb, metalotioneinler (MT'ler), fitoşelatinler (PC'ler) ve glutatyon (GSH) tarafından şelatlanarak düşük molekül ağırlıklı (LMW) ve/veya yüksek molekül ağırlıklı (HMW) kompleksler oluşturur ve daha sonra vakuollere taşınır (Yadav, 2010).

Yüksek moleküler ağırlıklı (HMW) bileşikler, vakuolde asidik pH ortamında ayrıştırılır ve serbest kalan ağır metaller organik bileşiklerle şelatlanır. Bu bileşikler

arasında malat, oksalat, sitrat ve amino asitler bulunur (Clemens, 2006). ABC taşıyıcıları, özellikle MRP ve PDR alt aileleri, şelatlanan ağır metalleri aktif bir şekilde vakuole taşır. Benzer şekilde, CDF taşıyıcı ailesi (MTP'ler olarak bilinir) de metal iyonlarının sitoplazmadan vakuole, apoplasta ve endoplazmik retikulumda sekestrasyonunda önemli bir rol oynar (Jogawat ve ark., 2021). Ayrıca, mezofil hücreleri, epidermal hücreler ve tüyler (trikomlar) gibi özel hücre tiplerinde de metal iyonlarının depolanması söz konusudur. Örneğin, Cd, Mn ve Pb ağır metaller yaşlı yapraklara taşınır ve yaprak dökümünden önce bu yapraklarda birikir (Shahid ve ark., 2017).

2.6. Bitkilerde Ağır Metal Kaynaklı Oksidatif Stres

Ağır metal iyonları, protein gruplarının bağlanma bölgelerinde belirli katyonları değiştirme yeteneğine sahiptir. Bu durum, antioksidan enzimlerin inaktivasyonuna ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimine yol açar. Sonuç olarak, kalsiyum homeostazı bozulur, sülfidril grupları tükenir, DNA hasarı meydana gelir ve lipid peroksidasyonu artar; tüm bunlar oksidatif hasara neden olur (Blokhina ve ark., 2003). Ağır metallerin fitotoksikolojik etkileri arasında enzim inhibisyonu, biyomoleküllerin inaktivasyonu ve oksidatif stres bulunur. Oksidatif stres, genellikle pro-oksidan ve antioksidan seviyeleri arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır ve oksidatif homeostaz olarak da adlandırılabilir.

Oksidatif stres, serbest radikaller ve aktif oksijen atomları içeren moleküller olan reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından tetiklenir ve elektron eksikliği ile ilişkilidir; bu durum hücre bileşiklerine zarar verir (Sharma ve ark., 2012). Yüksek konsantrasyonlarda ağır metaller, oksidatif stresi tetikleyebilir ve bu da büyüme inhibisyonuna neden olabilir. Ağır metallerin ROS üretiminde çeşitli mekanizmaları bulunmaktadır (Hossain ve ark., 2012). Redoks-aktif metaller (örneğin, bakır ve krom), en zararlı ROS türü olan hidroksil radikallerini ($\text{OH}\cdot$) üretebilir. Redoks kapasitesi olmayan metaller (özellikle kadmiyum, kurşun, çinko ve nikel) ise süperoksit ($\text{O}_2\cdot$) üretebilen tekli oksijeni içerebilir. ROS, proteinlerin ve membran lipidlerinin spesifik olmayan oksidasyonuna, DNA hasarına, enzim inhibisyonuna ve programlanmış hücre ölümüne neden olabilir (Sharma ve ark., 2012). Öte yandan, ROS bitki savunma sisteminde önemli bir rol oynar ve bitkilerden tamamen temizlenemez (Noctor ve ark., 2018; Dumanović ve ark., 2021). Reaktif oksijen türlerinin zararlı etkisi, konsantrasyonlarına bağlıdır. ROS'un konsantrasyonu savunma

mekanizmaları için belirli bir eşiği aştığında, oksidatif stres ortaya çıkar (Sharma ve ark., 2012).

Bitkilerde plazma membranında bulunan oksidoredüktazlar, özellikle NADPH oksidaz, reaktif oksijen türlerinin (ROS) başlıca kaynağıdır. NADPH oksidaz, NADPH'den elektron transferi yaparak apoplastik bölgede süperoksit radikallerinin üretimini sağlar; bu da çeşitli biyolojik süreçler ve sinyal iletimi için önemlidir. NADPH oksidazlar, solunum patlaması oksidaz homologları (RBOH) olarak sınıflandırılır ve NADPH'den O_2 'ye elektron transferi için gerekli temel enzimlerdir. RBOH enzimleri, süperoksit radikalının üretimini uyarır ve daha sonra hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüşümünü sağlar (Sagi ve Fluhr, 2006).

Normal koşullar altında, krom (Cr) üç değerlikli Cr(III) ve altı değerlikli Cr(VI) formlarında bulunur. Cr(VI), Cr(III) ile karşılaştırıldığında biyoyararlanımı yüksek olduğu için daha toksik bir formdur. Bitkilerde Cr toksisitesi, tohum çimlenmesinin inhibisyonu, klorofil bozunumu ve hücresel ultra yapı bozulması ile ilişkilidir. Cr, doğrudan elektron transferi veya metabolik reaksiyonların inhibisyonu yoluyla ROS üretme yeteneğine sahiptir. Cr toksisitesi, bitkilerde antioksidan seviyelerini azaltır ve süperoksit radikal ($O_2^{\bullet-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) üretimini artırır. Cr stresi altındaki arpa genotipleri üzerinde yapılan çalışmalar, Cr'nin bitki büyümesini engelleyebileceğini ve lipid peroksidasyonunu arttırarak H_2O_2 üretimini yükseltebileceğini göstermiştir (Pasricha ve ark., 2021).

ROS üretimi genellikle hücreler için zararlı olarak kabul edilir. Ancak, ROS'un bu zararlı etkileri, birçok enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanın ortak faaliyetleriyle dengelenir. Ağır metal stresi altında, antioksidan seviyeleri önemli ölçüde değişebilir. Hem redoks metaller hem de redoks olmayan metallerin yüksek konsantrasyonları, antioksidan enzim seviyelerini arttırabilir veya azaltabilir. Örneğin, pirinçte krom (Cr) uygulaması antioksidan seviyelerini etkiler (Tripathi ve ark., 2012). Redoks olmayan metaller, antioksidanların ROS'u temizleme etkinliğini bozarak oksidatif strese neden olabilir (Gupta, 2010; Raza ve ark., 2012). Redoks metallerinden demir (Fe) gibi yüksek konsantrasyonlar, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) gibi ROS üretir ve antioksidan seviyelerini azaltır (Das ve Roychoudhury, 2014; Pandhair ve Sekhon, 2006). *Brassica juncea*'da yüksek çinko (Zn) konsantrasyonları, katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan

enzimlerin aktivitelerinde önemli bir artışa neden olur (Nouairi ve ark., 2009; Nilova ve ark., 2023). Öte yandan, çinko uygulaması buğdayda bu antioksidan enzimlerin aktivitelerini inhibe ederek oksidatif stres oluşturur (Li ve ark., 2013). Yüksek bakır (Cu) seviyeleri ise *Brassica napus* ve domateste lipid peroksidasyon aktivitesinin artmasına neden olmuştur (Feigl ve ark., 2013; Nazir ve ark., 2019).

Cd uygulamasına yanıt olarak, ayçiçeği kotiledonlarında antioksidan enzimlerin azaldığı bildirilmiştir (Laspina ve ark., 2005). Benzer şekilde, *Silene cucubalus* (çuha çiçeği) ve *Ditylum brightwellii* bitkilerinde Cd'ye maruz kalma, glutatyon (GSH) içeriklerinin azaldığını ve bunun sonucunda H₂O₂ ve süperoksit radikallerinin (O₂•-) birikerek oksidatif stresin arttığını göstermiştir (De Vos ve ark., 1992; Rijstenbil ve Gerringa, 2002). Cd uygulaması ayrıca, soya fasulyesi köklerinde H₂O₂, nitrik oksit (NO) ve O₂•- konsantrasyonlarının artmasına neden olmuştur (Chmielowska-Bak ve ark., 2017). Ağır metal stresine karşı algılamada ve yanıtta önemli bir rol oynadığı bildirilen bileşenlerden biri nitrik oksittir (Sahay ve Gupta., 2017). Kökten toprak üstü kısımlara sinyal iletimi, ağır metal kaynaklı oksidatif strese artan lipid peroksidasyonu veya antioksidan savunma yanıtları ile ilişkilidir. Özellikle glutatyon redüktaz, süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerindeki artışlar önemli bir rol oynamaktadır (Bhaduri ve Fulekar, 2015).

2.6.1. Ağır Metal Stresine Sinyal Yanıtı

Bitkiler, ağır metal detoksifikasyonu ve hücrel konsantrasyonlarını toksisite eşik seviyelerinin altında tutmak için çeşitli stratejiler geliştirmektedir (Yadav, 2010; Dubey ve ark., 2018). Genel olarak, bitkiler iki ana savunma stratejisi benimser: kaçınma ve tolerans (Dalvi ve Bhalerao, 2013). Kaçınma stratejisi, bitkilerin metal dışlama, çeşitli ligandlarla kompleks oluşturma ve translokasyon yoluyla fazla metal alımını sınırlama yeteneğini ifade ederken; tolerans stratejisi, biriken metal iyonlarını düzenleme yeteneğini içerir. Metal iyonlarının türüne, konsantrasyonlarına, bitki türlerine, organlarına ve gelişim aşamasına bağlı olarak tolerans stratejisi değişiklik göstermektedir (Singh ve ark., 2016; Thakur ve ark., 2016). Mn, Cu, Zn ve Fe gibi esansiyel metal iyonları, karmaşık metabolik ve sinyal iletim mekanizmalarına katılmaktadır. Bunlar arasında Ca-kalmodulin sinyalizasyonu, hormonlar, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) fosforilasyon kaskadı, ROS sinyalizasyonu ve strese yanıt gösteren genlerin

aşağı regülasyonu yer alır (Thapa ve ark., 2012; Patel ve ark., 2021).

Transkripsiyonel ve proteomik düzenlemede farklı şekilde ifade edilen birçok protein, ağır metal detoksifikasyonu ve sekestrasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Dubey ve ark., 2014; Singh ve ark., 2016). Bu mekanizmalar sayesinde bitkiler, ağır metal stresine karşı çeşitli sinyal iletim stratejileri, transkripsiyonel düzenleme (gen ifadesi düzenlemesi) ve posttranskripsiyonel düzenleme (gen ifadesi sonrası düzenleme) stratejileri geliştirirler.

2.6.2. Sinyal İletimi

Ağır metal iyonlarının optimal seviyelerde seçilmesi ve alınması, bitkilerin normal gelişimi için önemli bir süreçtir (Gupta ve ark., 2013). Bitkilerin ağır metal stresine karşı gösterdiği tolerans, özellikle NO, ROS, H₂S ve fitohormonlar gibi sinyal moleküllerini algılama ve iletmeye yeteneğine bağlıdır (Shivaraj ve ark., 2020). Bu moleküller, transkripsiyon faktörlerini (TF'ler) hedef alarak, gerekli fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler süreçleri düzenleyerek gen ekspresyonunu kontrol eder (Saibo ve ark., 2009).

Ağır metaller, bitkilerdeki fitohormon konsantrasyonlarını değiştirebilir; örneğin, bu hormonlar arasında salisilik asit (SA), jasmonik asit (JA), oksinler, sitokininler (CK'ler), absisik asit (ABA) ve etilen (ET) yer alır (Sytar ve ark., 2019). Bu hormonlar, bitkilerde uzun mesafeli sistemik yanıtları düzenler. Örneğin, ekzojen ABA uygulaması *A. thaliana*'da IRT1 ekspresyonunu azaltarak Fe içeriğinin artmasına ve Cd alımının azalmasına neden olduğu rapor edilmiştir (Fan ve ark., 2014). Benzer şekilde, *Populus cathayana*'da yüksek Mn uygulaması sonrasında yüksek ABA içeriği tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2018). Ayrıca, As uygulaması sonrasında pirinç fidelerinin köklerinde ABA sinyal genlerinin transkript seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir (Huang ve ark., 2012).

Ağır metal stresi, NADPH oksidaz aracılığıyla plazma membranında, mitokondride ve peroksizomlarda H₂O₂ üretimini arttırmaktadır. Bu süreç, sitoplazmik Ca²⁺, kalmodulin (CaM), protein kinazları ve etilen tarafından düzenlenir (Nazir ve ark., 2020). NADPH oksidaz, NADPH'yi katalizler ve moleküler oksijene elektronlar transfer eder, bu da süperoksit anyonlarının oluşumuna neden olur. Ağır metal stresi altında, NO uzun mesafe sinyal iletimi sağlar ve daha sonra H₂S, ROS ve oksin gibi farklı sinyal molekülleriyle etkileşime girer (Mathur ve ark., 2022). Shivaraj ve ark. (2014), H₂S'in

ağır metal stresi altında bir sinyal molekülü olarak rol oynadığını rapor etmiştir. Ekzojen olarak uygulanan H₂S'nin, *Brassica napus* bitkisinde Pb tarafından indüklenen toksisiteyi azalttığı, antioksidan sistem aktivitelerini arttırdığı, H₂O₂ üretimini azalttığı, toplam GSH içeriği ve GSH/GSSG oranını arttırdığı bulunmuştur (Kumar ve Prasad, 2018).

Ağır metal kaynaklı MAPK yollarının aktivasyonu, bitkilerde fosfatidil inositol 3-kinaz (PI3K), kalsiyum bağımlı protein kinazlar (CDPK), reaktif oksijen türleri (ROS), NADPH oksidazları ve diğer MAPK'lar aracılığıyla başlatılır (Islam ve ark., 2015). Bu MAPK kaskadları, transkripsiyon faktörlerini (TF'ler), enzimleri, proteinleri ve diğer sinyal moleküllerini aktive ederek, ağır metal stresi altında gen ekspresyonunu düzenlemede önemli bir rol oynar (Li ve ark., 2022). Cd uygulaması, *Arabidopsis* ve soya fasulyesinde NO üretimini artırarak MAPK'ların transkriptlerinin artmasına neden olurken, 2-(4-karboksifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oksil-3-oksit (NO temizleyici) MAPK aktivasyonunu azaltır (Gill ve ark., 2013). Ağır metal uygulamasında, soya fasulyesinde, *A. thaliana*'da ve pirinçte, MAPK ve hedeflenen genlerin transkript seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (Li ve ark., 2022).

2.6.3. Protein Metabolizması

Bitkilerin ağır metal stresine toleransı, ağır metal iyonlarının algılanması, emilimi, taşınması ve PC-ağır metal komplekslerinin oluşumu gibi birçok süreci kapsamaktadır (Ghori ve ark., 2019). Ek olarak, antioksidan savunma sisteminin ve membran-lipid bütünlüğünün korunması gibi diğer önemli mekanizmalar da yer almaktadır (Dutta ve ark., 2018). Bu mekanizmalar, transkripsiyonel ve posttranslasyonel düzenlemeler aracılığıyla kontrol edilmektedir.

Ağır metal stresine toleranslı bitkilerin geliştirilmesi için birçok geleneksel ve yenilikçi biyoteknolojik yaklaşımların benimsenmesi gerekmektedir (Mani ve Kumar, 2014; DalCorso ve ark., 2019). Bu yaklaşımlar, genetik ve moleküler araçların yanı sıra, bitkilerde ağır metal stres toleransını önemli ölçüde arttırmaktadır. Proteomik, bitkilerde ağır metal toleransını incelemek için güçlü bir araç olarak kullanılmaktadır (Singh ve ark., 2016; Hossain ve Komatsu, 2013). Bu analizler, birçok bitkide ağır metal toleransında önemli rol oynayan birçok proteinin tanımlanmasına yardımcı olmuştur. Farklı ifade edilen proteinler, çeşitli işlevsel gruplara ayrılmış olup, bunların çoğu antioksidan savunma sistemi ile ilişkilidir. Protein çeşitliliği, uygulama süresine bağlı olarak

değişiklik göstermektedir (Singh ve ark., 2015). Ağır metal uygulaması, protein disülfid izomerazları, şaperonlar ve ısı şok proteinleri gibi protein katlanmasıyla ilişkili önemli protein gruplarının yukarı düzenlenmesine neden olduğu tespit edilmiştir (Rana ve ark., 2020).

Ağır metal uygulaması sonrasında bitkilerde gözlemlenen üçüncü büyük işlevsel grup, patojenlere karşı yanıt veren proteinleri içermektedir. Bu durum, ağır metal ve biyotik stres yanıtları arasında bir etkileşim olduğunu göstermektedir. Ayrıca, ağır metal uygulaması, iyon taşınmasında ve lipid metabolizmasında rol oynayan proteinlerin yukarı düzenlenmesine neden olmaktadır. Lipid çift tabakasının yapısına etki eden önemli protein gruplarından biri olan vakuolar proton pompaları, vakuoller ve hücre içi veziküler taşıma arasında görev yapmaktadır (Martinoia ve ark., 2000, 2007). Diğer yandan, ağır metal uygulamasının bitkilerdeki yanıtında hücre duvarı metabolizmasındaki proteinler, hücre duvarının ağır metal stres toleransında önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

2.6.4. Fonksiyonel Genomik

Fonksiyonel genomik, genlerin ve gen ürünlerinin işlevlerini inceleyen bir biyoloji dalıdır. Temel amacı, bir organizmanın genomunda bulunan genlerin biyolojik süreçler ve işlevler üzerindeki rollerini anlamaktır. Bu alan, genlerin hangi biyokimyasal yolları kontrol ettiğini, hücresel süreçlerde nasıl görev aldığını ve genetik varyasyonların fenotipe nasıl etki ettiğini araştırır. Bitkilerin ağır metal stresine yanıt mekanizmalarını ve bu yanıtların tolerans geliştirme süreçlerindeki moleküler düzenlemeleri inceleyen araştırmaları kapsamaktadır. Bu süreçte bitkiye tolerans kazandıran stres yanıtlarında görev alan farklı genlerin işlevini anlamak için gen ekspresyon analizleri, RNA interferansı, CRISPR-Cas9 gibi gen düzenleme teknolojileri, mikrodizi ve RNA dizileme gibi teknikler kullanılır. Ayrıca, bu genlerin işlevsel olarak karakterize edilmesi, stres yanıt sürecinin daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır (Huang ve Xu, 2008). Genomik, transkriptomik, proteomik, fenomik, biyoinformatik ve metabolomik gibi omik tabanlı yaklaşımlardan elde edilen bilgilerin bir araya getirilmesi, genlerin kapsamlı işlevsel analizlerinin yapılmasına ve hücresel ve genom düzeyindeki gen etkileşimlerinin anlaşılmasına olanak tanımaktadır. Bitki genomlarının tam dizilimi, bu araçları bir araya getirerek birçok genin işlevini aynı anda tanımlamamıza yardımcı olmaktadır (Yang ve ark., 2021).

Grennan (2011), bitki metallothioneinlerinin (MT'lerin) metal homeostazisinde önemli bir fizyolojik rol oynadığını belirtmiştir. MT genleri, bitkilerin belirli doku veya organlarında farklı şekillerde ifade edilmektedir. Örneğin, MT1 sınıfı genler köklerde, MT2 sınıfı genler yapraklarda, MT3 sınıfı genler olgunlaşmış meyvelerde ve PEC/pec MT genleri gelişen tohumlarda ifade edilir (Sharma ve ark., 2021). *A. thaliana*'da tohuma özgü MT4'ün ifadesi incelendiğinde, bitkinin Zn'den daha fazla Cu biriktirdiği gözlemlenmiştir. Yüksek metal miktarı uygulandığında, yapraklar ve kökler MT4 sınıfı gen aktivasyonu aracılığıyla hem Cu hem de Zn'ye tolerans göstermiştir (Rodrı'guez-Llorente ve ark., 2010).

Model bitki *A. thaliana*'dan yedi farklı fonksiyonel metallothionein (MT) geni izole edilmiştir (Zhou ve Goldsbrough, 1994). Bu genler arasında AtMT1a, AtMT2a, AtMT2b ve AtMT3, özellikle yapraklarda Cu'ya karşı bitki toleransını arttırmıştır. AtMT4 ise tohumlarda çinko homeostazını düzenleyerek gelişimin geç evrelerinde yüksek düzeyde ifade edilmektedir. Ayrıca, farklı MT genleri ağır metal stresi altındaki bitkilerde önemli ölçüde farklı ifade profilleri göstermektedir. Örneğin, MT2a ve MT2b genleri, ağır metal hiperakümülatörü *Noccaea caerulescens*'in köklerinde, *A. thaliana*'nın köklerine kıyasla daha yüksek düzeyde ifade edilirken, MT3 geni *N. caerulescens*'in toprak üstü kısımlarında hiperakümülatör olmayan *Thlaspi arvense*'den daha yüksek düzeyde ifade edilmektedir. MT4 geni ise olgunlaşan meyvelerde ve gelişmekte olan tohumlarda ifade edilmektedir (Guo ve ark., 2003). Bu nedenle, bitki MT'leri, tohum gelişimi, meyve olgunlaşması, kök gelişimi ve çimlenme gibi birçok fizyolojik süreçte önemli rol oynamaktadır.

2.6.5. miRNA-Tabanlı Düzenleme

RNA interferans (RNAi), ağır metal stresi sinyal iletiminde rol oynayan genlerin işlevlerini tanımlamak için umut vaat eden bir yaklaşımdır (Saurabh ve ark., 2014). MikroRNA'lar (miRNA'lar), mRNA'nın hedeflenen bölünmesi yoluyla posttranskripsiyonel aktiviteyi negatif olarak düzenleyen küçük, tek zincirli RNA'lardır (Nelson ve ark., 2003; Michlewski ve Cáceres, 2019). miRNA'lar, ağır metal stresine adaptasyonun önemli düzenleyicileri olarak tanımlanmıştır (Ding ve ark., 2020). Arpa, *Ricinus communis*, *B. napus* ve *O. sativa* gibi bitkilerde metal stresine duyarlı miRNA'lar ve onların hedef genleri hakkında birçok rapor bulunmaktadır (Çelik ve Akdaş, 2019;

Joshi ve ark., 2019). Örneğin, bakır-çinko süperoksit dismutaz (Cu-Zn SOD; CSD), yüksek Cu seviyelerinde süperoksit radikallerinin dismutasyonunda önemli bir rol oynar (Gill ve ark., 2015). Yüksek Cu seviyelerinde, miR398 CSD1 ve CSD2 mRNA'larının ekspresyonunu düzenler. Benzer şekilde, miR395, miR397, miR408 ve miR857 gibi diğer miRNA'lar da Cu stresi altında indüklenir ve lakkaz ve PC genlerinin transkript seviyelerini aşağı düzenler (Zeng ve ark., 2014; Yi-Bin ve ark., 2015). *Chlamydomonas reinhardtii*'nin CRR1 (bakır yanıt düzenleyicisi) homolog geni ve *A.thaliana*'nın Squamosa promotör bağlayıcı protein benzeri 7 (SPL7) gibi Cu homeostazının transkripsiyonel modülatörleri, Cu ve mikroRNA'ların düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu genler, Cu yanıt düzenlemesi ve Cu homeostazında önemli işlevlere sahip olup, örneğin bu süreçler de miR857 gibi mikroRNA'lar da aktif bir rol üstlenmektedir (Printz ve ark., 2016).

B. napus'ta Cd stresine maruz kalan bitkilerde miR156, miR171 ve miR396a transkriptlerinin ifade düzeylerinde azalma gözlemlenmiştir (Zhou ve ark., 2012a). Benzer şekilde, *Medicago* bitkilerinde Cd stresine karşı miR393, miR171, miR319 ve miR529 yüksek seviyelerde ifade edilirken, miR166'nın ifade seviyesi azalmıştır (Zhou ve ark., 2012b). *B. napus*'ta miR395'in aşırı ifadesi, Cd stresine karşı oksidatif stresle mücadelede toleransın artmasında önemli bir rol oynamaktadır (Zhang ve ark., 2013). Hg stresi altında, bitkilerde miR529, miR393, miR319 ve miR171 gibi mikroRNA'lar yüksek düzeyde ifade edilirken, miR166 aşağı düzenlenmektedir. Bu süreçte miR319, miR160 ve miR395 üzerinde herhangi bir etki gözlenmemiştir (Noman ve ark., 2019).

As stresi altında, *O. sativa*'da 18 yeni miRNA'nın farklı şekilde ifade edildiği bildirilmiştir (Sharma ve ark., 2015). Aynı şekilde, *B. juncea*'da 69 miRNA'nın farklı ifade profilleri gösterdiği rapor edilmiştir (Srivastava ve ark., 2013). Ayrıca, Cu²⁺ bağlayıcı proteinler (CBP'ler) dışında, miR528'in IAR1 proteininin ifadesini azaltarak bağlı auxin seviyelerini düzenlediği ve *O. sativa* fidelerini As hasarından koruduğu belirtilmiştir (Liu ve Zhang, 2012). As stresi altında, miR159'un olası bir hedefi olarak OPT1 (oligopeptid taşıyıcı) geni tespit edilmiştir (Srivastava ve ark., 2013). Al stresi altında, *Medicago*'da tanımlanan miRNA'lar arasında miR396, miR390, miR319, miR160 ve miR159'un düşük seviyede ifade edildiği belirlenmiştir (Chen ve ark., 2012). Ayrıca, soybean'da 30 Al-duyarlı miRNA tanımlanmış olup, bunlar arasında miR396 ve miR390'ın artan ifade gösterdiği tespit edilmiştir (Huang ve ark., 2018).

2.7. Mikro-RNA'lar

Ribonükleik asit (RNA), azotlu baz, riboz şeker ve fosfat gruplarından oluşan bir moleküldür. RNA molekülleri genellikle DNA'dan transkribe olur ve temel olarak iki sınıfa ayrılır: proteine dönüştürülenler ve dönüştürülmeyenler. Proteine dönüşen RNA türü mRNA'dır (mesajcı RNA). Proteine dönüşmeyen RNA türleri ise tRNA (taşıyıcı RNA), rRNA (ribozomal RNA) ve küçük RNA'lar olarak adlandırılır. Küçük RNA'ların birçok çeşidi vardır; bunlar arasında siRNA (küçük sessizleştirici RNA), snoRNA (küçük nükleolar RNA), snRNA (küçük nüklear RNA) ve miRNA (mikro RNA) bulunmaktadır. miRNA'lar, yaklaşık 20-24 nükleotit uzunluğunda kodlanmayan küçük RNA molekülleridir. MIR genlerinden veya intron bölgelerinden kodlanan, saç tokası (hairpin) yapısındaki transkriptlerden türetilirler (Budak ve Akpınar, 2015). miRNA'lar, proteine translasyonda görev almazlar; bunun yerine gen ifadesinin transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzenlenmesinde rol oynarlar (Mazzucotelli ve ark., 2008; Samad ve ark., 2017).

miRNA'lar, hedef mRNA'lara bağlanarak mRNA translasyonunu baskılar veya mRNA'ları degrade ederler, böylece gen fonksiyonunu post-transkripsiyonel seviyede düzenlerler. İlk olarak, 1993 yılında Lee ve arkadaşları tarafından *Caenorhabditis elegans* adlı nematod üzerinde yapılan çalışmalarda, lin-4 adlı bir genin küçük bir RNA transkribe ettiği ancak hiçbir proteini kodlamadığı rapor edilmiştir. Bu durumun nematodlara özgü bir RNA'dan kaynaklandığı düşünülmüştür. Yaklaşık yedi yıl sonra, Reinhart ve arkadaşları tarafından memelilerin gelişim sürecini düzenleyen ilk miRNA olan let-7 bulunmuş ve birçok türde korunduğu tespit edilmiştir. Bu raporların ardından, araştırmacılar bitkilerde post-transkripsiyonel gen sessizleştirme (PTGS) ile küçük RNA aktivitesinin ilişkili olduğunu göstermişlerdir.

2.8. Bitkilerde miRNA'ların Biyogenezi ve Çalışma Mekanizması

Ökaryotik genomlar, gen ifadesinin transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde önemli rol oynayan binlerce kodlanmayan RNA (ncRNA) içerir. Kodlanmayan RNA'lar, düşük protein kodlama potansiyeline sahip fonksiyonel RNA'lardır. Bu ncRNA'lar uzunluklarına göre üç kategoriye ayrılır: küçük ncRNA'lar (sRNA'lar) (18–30 nt), orta boy ncRNA'lar (31–200 nt) ve uzun ncRNA'lar

(lncRNA'lar) (>200 nt). Özellikle bitki mikroRNA'ları (miRNA'lar) genellikle 21 nt uzunluğundaki sRNA'lardır ve mRNA hedeflerinin yıkımını veya translasyonunu inhibe ederek hedef genlerin ifadesini baskırlar. Çalışmalar, mikroRNA'ların (miRNA'lar) bitkilerin stres yanıtlarında önemli düzenleyici moleküller olarak rol oynadığını göstermiştir (Kumar, 2014).

miRNA'lar, endojen MIR genleri tarafından kodlanan 20-24 nükleotit uzunluğunda küçük düzenleyici RNA'lardır. Endojen sRNA sınıfına ait olan miRNA'lar, post-transkripsiyonel düzeyde genlerin susturulmasında önemli bir rol oynar. Protein kodlayan genler gibi, miRNA genleri de MIR genleri aracılığıyla, miRNA'ların öncü RNA'larını kodlayarak mRNA'nın transkripsiyon sonrası modifikasyonunda kilit bir işlev üstlenir (He ve Hannon, 2004). Bu süreç, translasyonel inhibisyon veya DNA metilasyonu yoluyla gerçekleşir. Birincil transkriptler, kısmen çift sarmallı kök halka yapısına sahip öncü RNA'ları oluşturur ve bu RNA'lar, DCL (Dicer-like) proteinleri tarafından işlenerek olgun miRNA'ları serbest bırakır.

miRNA biyogenezinde, birincil miRNA'lar (pri-miRNA'lar), nükleer kodlu MIR genlerinden RNA polimeraz II (Pol II) tarafından transkribe edilerek karakteristik saç tokası (hairpin) yapısına sahip öncü transkriptler oluşturur (Budak ve Akpınar, 2015). Bu öncü transkriptler, DCL proteinleri tarafından miRNA-miRNA* dublekslerine dönüştürülür. Bu süreç, HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) ve SERRATE (SE) proteinleri tarafından desteklenir. Oluşan pre-miRNA saç tokası öncüsü, DCL1, HYL1 ve SE tarafından 20-22 nükleotit uzunluğundaki miRNA/miRNA* dublekslerine dönüştürülür. Daha sonra, dubleksin 3' ucu HUA ENHANCER 1 (HEN1) tarafından metillenerek korunur ve HASTY (HST1) adlı bir exportin protein tarafından sitoplazmaya aktarılır. Son olarak, sitoplazmada, dubleksin bir ipliği (miRNA), ARGONAUTE 1 (AGO1) proteini ile birleşerek RNA kaynaklı susturma kompleksini (RISC) oluşturur. Bu kompleks, dizilim tamamlanmasına dayanarak mRNA'ları özgün olarak hedef alır ve sonuç olarak, mRNA yıkımına ve/veya translasyonel baskıya neden olur (Liu ve ark., 2017).

Yapılan araştırmalar, olgun miRNA'ların hedef genlerin translasyonunu inhibe ederek bitki genlerinin ifadesini düzenlediğini göstermiştir (Zhang ve ark., 2006). Bu düzenleme, miRNA'ların kodlama bölgesiyle tamamlayıcı eşleşme yaparak veya hedef mRNA'nın 3'UTR ve 5'UTR bölgelerine bağlanarak gerçekleştirilir. Ayrıca, bazı

miRNA'lar hedef gen mRNA'sını post-transkripsiyonel seviyede keserek gen ifadesini düzenler. Bu inhibisyon, bitki organlarının morfogenezini, büyümesini, gelişimini, hormon salgılanmasını, sinyal iletimini ve bitkilerin dış stres ve çevresel faktörlere yanıt verme yeteneğini etkiler (Sun ve ark., 2012; Dong ve ark., 2022).

Bitkilerde miRNA'lar, hedef mRNA ile tam veya yüksek derecede komplementer (tamamlayıcı) olduğunda, hedef mRNA'yı keserek parçalar. Son yıllarda, bitkilerde translasyon inhibisyon yolları keşfedilmiştir (Zhang ve ark., 2006; Sun ve ark., 2012). Parçalanma ve inhibisyon mekanizmaları, genellikle miRNA'lar ile hedefleri arasındaki komplementerliğe bağlı olarak koordine edilir (Mallory ve Vaucheret, 2006).

miRNA'lar, gen ifadesini post-transkripsiyonel seviyede hedeflerin kontrolü ile düzenlemenin yanı sıra, DNA ve histon metilasyonu gibi epigenetik değişikliklere neden olarak da gen ifadesini düzenleyebilirler (Kumar ve ark., 2018; Akhter ve ark., 2021). Bitkilerdeki korunmuş miRNA'ların fonksiyonel analizi, birçok biyolojik ve metabolik sürecin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu süreçler arasında oksin sinyali, meristem sınır oluşumu, organ ayrımı, yaprak gelişimi ve polaritesi, yan kök oluşumu, gençlikten yetişkin evresine geçiş, bitki-çiçeklenme evresine geçiş ve çiçek organı kimliği gibi gelişim süreçleri yer almaktadır.

2.9. Bitkilerde Metal Stresine Karşı miRNA'ların Rolü

Transkripsiyon sonrası gen düzenleyicisi olarak birçok miRNA, bitkilerde ağır metal stres yanıtında önemli bir rol oynamaktadır (Mendoza-Soto ve ark., 2012; Noman ve Aqeel, 2017). Son bulgular, miRNA aracılı gen düzenlemesinin ağır metal düzenleyici ağlarda kritik bir işlev gördüğünü ortaya koymaktadır. Ayrıca, yüksek verimli genom çapında ifade profilleri, miRNA'nın bitki ağır metal toksik yanıtındaki rolünü ve hedeflerini anlamamızı büyük ölçüde geliştirmiştir. *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Brassica juncea* ve diğer Brassicaceae familyasına ait bitkilerde önemli sayıda ağır metale duyarlı miRNA tanımlanmıştır (Çizelge 2.1). Farklı bitki türlerinde, Cd, Hg, Al, As ve Cr gibi ağır metallere karşı önemli derecede farklı ifade gösteren birçok miRNA bulunmaktadır (Ding ve ark., 2020; Yang ve ark., 2022). Metal düzenleyici miRNA hedef genlerinin analizi, birçok miRNA'nın bitkilerin ağır metale yanıtında yer aldığını göstermiştir. Hedef genler, metal alımı ve taşınması, sülfat dağılımı ve asimilasyonu,

protein katlanması, antioksidan sistemler ve bitki hormonu sinyal iletim gibi çeşitli süreçlerde rol oynamaktadır (Noman ve ark., 2019).

Yeni nesil dizileme teknikleri ve miRNA mikrodizileri gibi yenilikçi teknolojiler sayesinde, metal hiperakümülatör *Sedum alfredii*, pirinç, mısır, *Brassica juncea*, *Medicago truncatula*, *Hordeum vulgare* ve diğer birçok bitkide ağır metallere karşı duyarlı birçok önemli miRNA tanımlanmıştır (Ding ve ark., 2020; Yang ve ark., 2022). Protein kodlayan genlere benzer şekilde, miRNA ifadesi strese yanıtta yukarı veya aşağı düzenlenmektedir. Örneğin, *A. thaliana*'da azot (N) noksanlığına yanıt olarak miR-160'ın ifadesi yukarı düzenlenirken, miR-169'un ifadesi aşağı düzenlenmiştir (Wang ve ark., 2017; Singh ve ark., 2023). Bu miRNA'ların değişen ifadeleri, stresler sırasında bitki büyümesi ve gelişiminin azaltılmasında rol oynamaktadır. Azot eksikliği miR-160'ın ifadesini artırırken, bu durum oksin yanıt faktörlerini (ARF'ler) kodlayan hedef genlerinin ifadesinin azalmasına yol açmaktadır. Ayrıca, miR-169'un azalan ifadesi, Nükleer Faktör Y'yi (NFY) kodlayan hedef gen ailesinin artmasına neden olmaktadır. NFY, nitrat taşıyıcılarını kodlayan genlerin, AtNRT2.1 ve AtNRT1.1'in promotörlerine bağlanarak ifadelerini düzenlemektedir (Xu ve ark., 2014). Turpta 81 bilinen miRNA ve 72 yeni miRNA Solexa dizilime ile tanımlanmıştır; elde edilen verilere göre, 54'ü bilinen miRNA'lar ve 16 yeni miRNA'lar olup, Cr-stresine yanıt olarak farklı şekillerde ifade edilmiştir. Ayrıca, mikro dizilim kullanılarak, toplamda 18 bilinen ve 148 yeni miRNA tanımlanmıştır; bu miRNA'lar *Brassica parachinensis*'in düşük ve yüksek Cd biriktiren çeşitlerinde Cd-stresi altında farklı şekillerde ifade edilmiştir (Liu ve ark., 2015).

Farklı bitki türlerinde, Cd, Hg, Cr, Al, As ve Pb gibi ağır metallerin etkisi altında birçok miRNA'nın farklı seviyelerde ifade edildiği belirlenmiştir (Ding ve ark., 2020; Yang ve ark., 2022). Metal-duyarlı miRNA'ların genellikle transkripsiyon faktörlerini hedeflediği ve bu durumun, miRNA'ların bitkilerin ağır metal stresine verdiği yanıtta temel bir rol oynadığını gösterdiği bilinmektedir. Metal taşıyıcılar, bitkilerde metal alımı, taşınması ve homeostazisini düzenleyen önemli faktörlerdir. Örneğin, Cd'in bitkiye alınımında ve taşınmasında miRNA'ların etkili olduğu düşünülmektedir. Zhou ve ark. (2012), *B. napus*'ta yüksek verimli RNA dizilimi kullanarak korunan ve korunmayan 84 farklı miRNA tanımlamıştır. Degradom dizileme yöntemiyle, bu miRNA'ların 802 hedef geni belirlenmiştir. Özellikle, *B. napus*'ta miR159 ve miR167'nin sırasıyla ABC taşıyıcısı ve NRAMP metal taşıyıcılarını hedeflediği doğrulanmıştır. Ayrıca, Meng ve ark. (2017),

B. napus'taki NRAMP taşıyıcı genlerinin genom çapında tanımlanması ve doğrulanması için biyoinformatik ve RNA dizilimi yöntemlerini kullanmıştır. Degradom dizileme verilerine dayanarak, NRAMP genlerinden biri olan BnNRAMP1b'in miR167 tarafından hedeflendiği ve bu durumun BnNRAMP1b'in *B. napus*'ta miR167'nin hedef geni olduğu doğrulanmıştır.

Çizelge 2.1. Brassicaceae familyasına ait bazı türlerdeki miRNA'lar ve onların hedef genleri

Bitki	miRNA	Hedef Gen	Metals/ Metalloid	Referans
<i>Arabidopsis thaliana</i>	miR857	Laccase (LAC7); Secondary growth	Cu,Cd	Abdel-Ghany ve Pilon, 2008; Zhao ve ark., 2015; Fu ve ark., 2019; Ding ve Zhu, 2009; Khraiweh ve ark., 2012
	miR397	(Laccase-Regulate inter-tissue lignification and secondary cell wall thickness, activities of PPO, SOD, and POD)	Cu, Cd	Sunkar ve ark., 2006; Khraiweh ve ark., 2012; Pegler ve ark., 2021; Jones-Rhoades ve ark., 2004; Ding ve Zhu, 2009
	miR398	(CSD1 and CSD2 genes, CCS1 and COX5b-1 genes SODs relive oxidative stress)	Cu, Cd, Cs	Pegler ve ark., 2021; Lung ve ark., 2015; Sunkar ve ark., 2006; Yamasaki ve ark., 2007; Gu ve ark., 2017; Jones-Rhoades ve ark., 2004; Beauclair ve ark., 2010; Ding ve Zhu, 2009; Yang ve Chen, 2013; Khraiweh ve ark., 2012
	miR408	(Laccase, plantacyanin transcripts, SPL7, HY5 Regulate plastocyanin (PC) content)	Cu, Cr, As	Pegler ve ark., 2021; Ding ve Zhu, 2009; Khraiweh ve ark., 2012
	miR528	(MAX2 gene and l-resistant blo, LACod acid oxidase, MATE, LAC Signal transduction, regulation of cell cycle, plant development, ascorbate metabolism, miRNA processing, control of cellular-free auxin levels)	As, Al, Cd	Xie ve ark., 2007; Wu ve ark., 2009; Srivastava ve ark., 2013; Yang ve Chen, 2013; Gupta ve ark., 2014
	miR395	(SLIM1, SULTR2;1, APS Sulfur assimilation, response to cadmium ion, sulfate transport	Cd, As, Al, Cu	Jagadeswaran ve ark., 2014; Huang ve ark., 2010; Liang ve ark., 2010; Kawashima ve ark., 2011; Jones-Rhoades ve ark., 2004
	miR156	(SPL7 -Regulate Cu homeostasis, decrease endogenous ROS)	Cu, Cd, Cr, Al	Jones-Rhoades ve ark., 2004; Liu ve Zhang 2012; Yu ve ark., 2012
	miR160	(ARF-Regulate auxin signal)	Cr, Al, Cs	Lung ve ark., 2015; Jones-Rhoades ve ark., 2004; Khraiweh ve ark., 2012; Gupta ve ark., 2013
	miR164	(NAC, CUP trancription factors Signaling pathway, root development, response to oxidative stress)	As, Cr, Al, Hg	Jones-Rhoades ve ark., 2004; Guo ve ark., 2005; Zeng ve ark., 2012
	miR393	(TIR1/AFBs (F -box auxin receptors) and bHLH (TF) Regulate auxin signaling)	Cd, Hg, Al, Cs	Lung ve ark., 2015; Jones-Rhoades ve ark., 2004; Yang ve Chen, 2013; Gupta ve ark., 2014
	miR159	(ABC transporter protein, OPT1-Regulate metal transporters); Natural resistance-associated macrophage proteins (NRAMP)	Cd, As, Cr, Al	Khraiweh ve ark., 2012; Shahbaz ve Pilon, 2019; Yang ve Chen, 2013; Gupta ve ark., 2014; Xie ve ark., 2007; Zhou ve ark., 2012; Huang ve ark., 2010
	miR156	Squamosa-promoter binding transcription factor (TF), glutathione-cglutamylcysteiny1 transferase 2	Cd, Al, Mn, As	Rhoades ve ark.,2002; Yang ve Chen, 2013; Gupta ve ark., 2014; Xie ve ark., 2007; Zhou ve ark., 2012; Huang ve ark., 2010

<i>Brassica napus</i>	miR164	NAC	S, Cd	Khraiwesh ve ark., 2012; Huang ve ark., 2010
	miR169	CCAAT-binding transcription factor (CBF-B/NF-YA)	Cd	Jian ve ark., 2018; Srivastava ve ark., 2021; Zhou ve ark., 2012; Huang ve ark., 2010
	miR171	Scarecrow-like (SCL) TF, nodulation signaling pathway 2 protein	Cd, Hg, Al, As	Fu ve ark., 2019; Zhou ve ark., 2012; Xie ve ark., 2007; Yang ve Chen, 2013; Gupta ve ark., 2014; Huang ve ark., 2010; Khraiwesh ve ark., 2012
	miR172	Cysteine-rice RLK 10 (Transcription factor)	Cd, As	Fu ve ark., 2019; Xie ve ark., 2007; Gupta ve ark., 2013; Huang ve ark., 2010; Khraiwesh ve ark., 2012
	miR395	(SLIM1, SULTR2;1 (Sulphate transporter2;1), APS (coding for ATP sulphurylases)- Sulfur assimilation, response to cadmium ion, sulfate transport)	Cd, As, Al, Mn	Huang ve ark., 2010; Fu ve ark., 2019; Ding ve ark., 2013; Yang ve Chen, 2013; Gupta ve ark., 2013;
	miR393	bHLH (TF), transport inhibitor response 1/auxin F-box (TF); TIR1 (Transport inhibitor response 1)	Cd, Hg, Al	Xie ve ark., 2007; Sunkar ve ark., 2001; Pasquinelli ve ark., 2000; Gusmaroli ve ark., 2001; Gupta ve ark., 2013; Xie ve ark., 2007; Huang ve ark., 2010; Khraiwesh ve ark., 2012
	miR394	F-box TF, RNA polymerase sigma factor	Cd	Zhou ve ark., 2012; Fu ve ark., 2019; Gupta ve ark., 2013
	miR397	Ice1 (inducer of CBF expression 1) (TF), laccase, laccase-4 precursor, chromosome chr7 scaffold_42	Mn, Cd, As	Fu ve ark., 2019; Zhou ve ark., 2012; Huang ve ark., 2010
	miR398	induction of CSD1 and CSD2 transcripts	Cd	Yang ve Chen, 2013; Gupta ve ark., 2013; Huang ve ark., 2010; Khraiwesh ve ark., 2012
	miR167	(NRAMP1b metal transporter protein-Metal uptake and translocation); ATP-binding cassette (ABC) transporter	Cd	Srivastava ve ark., 2013; Yang ve Chen, 2013; Gupta ve ark., 2013; Xie ve ark., 2007; Huang ve ark., 2010
	miR403	Putative argonaute protein	Cd	Huang ve ark., 2010;
	miR408	GGT- PC synthase(PCS) -metal complexes; Chemocyanin precursor, copper ion binding protein, laccase, plantacyanin, uclacyanin-2 precursor, ascorbate oxidase, basic blue copper protein,	Al, Cd, Mn, As	Fu ve ark., 2019; Zhou ve ark., 2012; Yang ve Chen, 2013; Huang ve ark., 2010
<i>B. juncea</i>	miR167	(NRAMP1b metal transporter protein-Metal uptake and translocation); Auxin responsive factors (TF), metal transporter NRAMP1 and 2	Cd, Hg, Mn, As	Srivastava ve ark., 2013; Yang ve Chen, 2013; Gupta ve ark., 2013; Yang ve ark., 2022
	miR159	MYB and TCP transcription factors, ABC transporter, oligopeptide transporter 1 (OPT1)	Cd, Al, As	Srivastava ve ark., 2013; Yang ve Chen, 2013; Gupta ve ark., 2013;
	miR156	Squamosa-promoter binding transcription factor (TF), glutathione-glutamylcysteinyl transferase 2	Cd, Al, Mn, As	Srivastava ve ark., 2013; Yang ve Chen, 2013; Gupta ve ark., 2014;
	miR169	CCAAT-binding (TF), chloroplast photosystem II subunit x, nuclear (TF) Y subunit A-3 and A-10	Cr, Cd, Al, As	Srivastava ve ark., 2013; Gupta ve ark., 2014; Yang ve ark., 2022
	miR164	NAC domain (TF), phytoalexins, monothiol glutaredoxin	Cd, Hg, Al, As	Srivastava ve ark., 2013;
	miR171	(SCL (TF) Shoot branching, signaling pathway)	Hg, As, Cr, Cd	Yang ve ark., 2022
	miR395	ATP-sulphurylase, cytochrome b5-like heme/steroid binding- domain-containing protein, Sulfate transporter	As, Al	Srivastava ve ark., 2013; Xu ve ark., 2013; Gupta ve ark., 2013

	miR319	(TCP (TF), cyclin Leaf morphogenesis, cell differentiation, embryonic development, cell division)	Hg, As, Al, Cd	Srivastava ve ark., 2013; Yang ve ark., 2022
	miR854	(Putative serine acetyl transferase (SAT) Synthesis of O-acetylserine)	As	Srivastava ve ark., 2013; Xu ve ark., 2013; Srivastava ve ark., 2021; Gupta ve ark., 2013; Yang ve ark., 2022
	miR838	Lipase	As	Srivastava ve ark., 2013; Srivastava ve ark., 2021; Xu ve ark., 2013
	miR172	Apetala-2 like (TF), ARF, helix-loop-helix DNA-binding domain-containing protein (TF)	Hg, Mn, Al, As	Srivastava ve ark., 2012; Srivastava ve ark., 2013; Gupta ve ark., 2013
Raphanus sativus (Radish/Turp)	miR156	(Contig27694- Glutathione S-transferase 5 (GST5)	Cd, Cr, Pb	Xu ve ark., 2013; Liu ve ark., 2015; Wang ve ark., 2014
	miR159	(Contig31028- ABC transporter family protein)		Liu ve ark., 2015; Wang ve ark., 2014
	miR166	(CL3287.Contig3- Iron transporter protein)		Liu ve ark., 2015; Wang ve ark., 2014
	miR393	(Contig26439- Phytochelatin synthase 1)		Liu ve ark., 2015; Wang ve ark., 2014
	miR408	(Contig26439- Ascorbate oxidase) HY5 and SPL7		Liu ve ark., 2015; Wang ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2014
	miR7767-3p, rsa-miRn55 and miR5671	ABC transporter proteins (PDR5 and PXA1), and heavy metal ATPase (HMA5)	Cr	Liu ve ark., 2015
	miR5265	yellow stripe-like 1 gene (YSL1) (transporter of nicotinamide)	Cr	Liu ve ark., 2015
Brassica parachinensis L.	bra-miR838a	(ATPase family protein), bra-miR5021c (laccase; aspartyl protease family)	Cd	Yang ve ark., 2022
	bra-miR5021a ve bra-miR838a	(myeloblastosis (MYB) families of transcription factors)		
	bra-miR5021a	(acetyl-CoA C-acyltransferase (GO: 0003988); phosphoprotein phosphatase (GO: 0004721)		
	miR395	SLIM1, SULTR2;1, APS Sulfur assimilation, response to cadmium ion, sulfate transport; Yellow Stripe-like (YSL), and heavy-metal-associated 2 (HMA2) and 4 (HMA4)	Cd, As, Al	

miRNA'lar genellikle metal alım taşıyıcılarının ekspresyonunu ve hücrel taşınmasını düzenleyen faktörler olarak işlev görürler (Noman ve Aqeel, 2017). Özellikle, miR159 ve miR167 gibi miRNA'ların, ATP bağlama kaseti (ABC) ve doğal dirençle ilişkili makrofaj proteinleri (NRAMP'ler) gibi metal taşıyıcı genleri hedeflediği bulunmuştur. Bu nedenle, bu miRNA'ların metal alımını, taşınmasını ve vakuolar sekestrasyonu düzenlediği gösterilmiştir (Gupta ve ark., 2014; Jamla ve ark., 2021).

Bitkilerde nikotianamin bağlı metal komplekslerinin taşıyıcısı olan YSL1 geninin, turpta miR5265 tarafından hedeflendiği tespit edilmiştir. Ayrıca, metal homeostazisinin diğer önemli taşıyıcıları olan ABC taşıyıcı proteinleri (PDR5 ve PXA1) ile ağır metal ATPaz (HMA5), turptaki Cr stresine yanıt olarak sırasıyla miR7767-3p, rsa-miRn55 ve

miR5671 tarafından hedeflendiği rapor edilmiştir (Liu ve ark., 2015). Bir oligopeptit taşıyıcısı olan OPT1, miR159'un hedefi olarak tanımlanmıştır (Srivastava ve ark., 2013). OPT'lerin S, Fe, Ni, Cu ve Zn gibi metallerin taşınmasında rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle, As varlığında optimum besin dengesini sağlamak için OPT1'in miRNA'lar tarafından düzenlenmesi gerekebilir (Srivastava ve ark., 2013). MATE protein ailesi, bitkilerde Al toleransına katkıda bulunan önemli bir faktördür (Maron ve ark., 2013). miR169'un aşırı ifadesinin, nitrat taşıyıcılarının azalmasına ve dolayısıyla nitrat alımını ve birikimini etkileyebileceği gösterilmiştir (Zhao ve ark., 2011). Kükürt varlığında miR395, ATP sülfürlazların ve Sülfat taşıyıcı 2'nin (SULTR2; 1) düzenlenmesinde rol oynar ve S noksanlığı koşullarında artan bir ifade gösterir (Liang ve ark., 2010; Kumar ve ark., 2017). *Arabidopsis thaliana* fidelerinde miR395'in yukarı düzenlenmesi, As veya Cu kaynaklı oksidatif strese yanıt olarak Jagadeswaran ve ark. (2014) tarafından rapor edilmiştir. Hint hardalında (*Brassica juncea*), miR838 ve miR854'ün, sırasıyla O-asetilserin sülfat alımı ve sentezinde rol oynayan SULTR2;1, SULTR2;2 ve serin asetil transferaz (SAT) translasyonunu azalttığı tespit edilmiştir (Srivastava ve ark., 2013). Xu ve ark. (2013), fitoşelatin sentaz geninin miRNA'lar tarafından düzenlenmesinin önemini vurgulamıştır. *B. juncea*'da miR395, miR838 ve miR854, As-stresine yanıt veren miRNA'lar olarak tanımlanmıştır. miR838 ve miR854'ün, miR395 hariç, SULTR2'nin translasyonunu azalttığı tahmin edilmektedir. Bitkilerde Cu-Zn-SOD, Fe-SOD ve Mn-SOD gibi farklı süperoksit dismutaz (SOD) formları bulunmaktadır. Cu-Zn-SOD, özellikle bakır stresine yanıt olarak miR398'in bitkilerde belgelenen bir hedefidir.

MYB, SPL, ERF, bZIP ve TCP gibi birçok transkripsiyon faktörü (TF), bitkilerin metal stresine karşı yanıtında düzenleyici rol oynar. SPL transkripsiyon faktörleri, birçok gelişimsel süreçte kritik bir rol oynar ve metal homeostazisi dahil olmak üzere strese yanıtı aracılık eder (Preston ve Hileman, 2005).

MAPK sinyalleme yollarının, özellikle reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini açısından bitkilerin metal stresine yanıtındaki önemli rolü kanıtlanmıştır (Singh ve ark., 2019). Kalsiyum bağlayıcı protein CDPK6'nın rsa-miRn42 tarafından ve mitojenle aktive olan protein kinaz MEKK1'in miR5293 tarafından hedeflenmesi, Cr stresi altında *Raphanus sativus* bitkisinde sinyal iletimi ile ilgili proteinlerin tanımlanmasını sağlamıştır (Liu ve ark., 2015). Bu bulgular, miRNA'ların sinyal iletiminin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir. *Brassica napus*'ta, ABC taşıyıcısını ve

NRAMP metal taşıyıcısını kodlayan genlerin sırasıyla miR159 ve miR167 tarafından hedeflendiği doğrulanmıştır. Ayrıca, Meng ve ark. (2017), biyoinformatik analizler ve RNA dizileme teknikleri kullanarak *B. napus*'taki NRAMP taşıyıcı genlerin genel tanımlanmasını gerçekleştirmiştir. Degradom dizileme verilerine dayanarak, NRAMP genlerinden BnNRAMP1b'nin miR167 tarafından hedeflendiği tespit edilmiştir. Bu bulgu, BnNRAMP1b'nin *B. napus*'ta miR167 tarafından hedeflendiğini doğrulamaktadır.

Brassica napus'taki degradom dizilimi, metal şelasyonunda rol oynayan çeşitli genlerin miRNA'lar tarafından hedeflendiğini ortaya koymuştur. Örneğin, miR156'nın Cd'ye yanıt olarak ifadesinin arttığı belirlenmiştir ve bu miRNA, glutatyon- γ -glutamilsisteinil transferazı (GGT) kodlayan geni hedeflemektedir. GGT, glutatyon (GSH) metabolizmasında önemli bir rol oynar ve metal şelasyonunda GSH'nin kullanımında kritik bir işlev üstlenir. Ayrıca, PC sentaz fitoşelatinlerin (PC) sentezinde görev alır ve ağır metallerle şelasyon yaparak bitki hücrelerinde metal toksisitesini azaltır. Bu şelat kompleksleri daha sonra vakuola taşınarak metal detoksifikasyonunda kullanılır.

2.10. miRNA Tanımlama Yöntemleri

miRNA'lar, moleküler biyoloji araştırmalarında önemli bir odak noktası haline gelmiştir. Bu miRNA'lar, mRNA'lara belirli dizilerle bağlanarak translasyonu inhibe eder veya mRNA'yı degradasyona uğratarak hedef genlerin ifadesini engellerler. Olgun miRNA'ların tam dizisinin belirlenmesi, miRNA hedef tahminleri, evrimi, düzenleyici rollerinin anlaşılması ve biyogenez mekanizmaları hakkında daha ileri çalışmalar yapılmasını gerektirmektedir.

miRNA hedef genlerinin doğru tahmini ve doğrulanması, spesifik miRNA'ların işlevlerini tanımlamak için kritik öneme sahiptir. Genellikle, biyoinformatik yaklaşımlarla tanımlanan aday miRNA hedefleri bulunur, ancak miRNA-hedef etkileşimlerinin yalnızca az bir kısmı deneysel olarak doğrulanmıştır. miRNA'lar ve hedeflerini tanımlamak ve doğrulamak için çeşitli yaklaşımlar mevcuttur; bunlar arasında yeni nesil yüksek verimli dizileme teknolojileri önemli bir yer tutar. Araştırma stratejilerinin mevcut durumunu anlamak için, biyoinformatik ve deneysel araştırmalardaki temel uygulamalardan başlayarak bitki miRNA'larını tanımlama ve doğrulama yaklaşımlarındaki gelişmeler büyük bir öneme sahiptir.

2.11. Bitki miRNA'larının Tanımlanması ve Doğrulanması

Son yıllarda, farklı bitki familyalarında birçok miRNA tanımlanmıştır. Son on yılda, miRBase (<http://www.mirbase.org/>) üzerindeki kayıtlı miRNA'ların sayısı 28'den (sürüm 3.0) 5940'a (mevcut sürüm 19.0) yükselmiştir. Bu miRNA'lar arasında *Vitis vinifera*'da 163, narenciyede 79, *Malus domestica*'da 207, *A.thaliana*'da 713, pirinçte 708, *Populus*'ta 374, mısırdaki 321, *Physcomitrella*'da 280, *Medicago truncatula*'da 675, soya fasulyesinde 506, *Pinus taeda*'da 38 ve *Brassica napus*'ta 92 miRNA'nın olduğu rapor edilmiştir (Sun ve ark., 2014).

Bitki mRNA'larını tanımlamak ve doğrulamak için en yaygın üç yöntem şunlardır: korunan dizilere ve ikincil yapıya dayalı hesaplamalı tahminler, küçük RNA kütüphanelerinin klonlanması ve miRNA'ların yüksek verimli dizileme ile doğrudan tespiti. Yüksek verimli dizileme gibi yeni ve verimli teknolojilerin gelişmesi, yeni tanımlanan miRNA'ların sayısında belirgin bir artışa yol açmıştır (Lv ve ark., 2012). Günümüzde bitkilerde miRNA'ların sayısını tahmin etmek zor olduğu gibi miRNA'ların temel özellikleri hâlen tam olarak tanımlanmamış olup, çoğu çalışmada, model bitkiler veya bazı önemli bitkiler ile sınırlı kalmaktadır. miRNA'ların tanımlanması ve karakterize edilmesi üzerine yapılan araştırmalar, bu moleküllerin işlevleri hakkında önemli bilgiler sunmaktadır.

2.12. miRNA Tanımlama ve Karakterizasyonu Stratejileri

İleri genetik, miRNA'ların tespiti için gelişmiş bir yaklaşım olmakla birlikte, zaman alıcı ve pahalıdır, bu nedenle sınırlı uygulamalara sahiptir. Bu yaklaşımın biyolojik olarak işlevsel miRNA'ların artan listesine katkıda bulunması olası olmayabilir. Ters genetikte ise araştırmacılar, işlevleri veya fenotipleri tanımlamak için bilinen dizileri kullanmaktadır.

miRNA'ların tanımlanmasında kullanılan iki temel ters genetik stratejisi bulunmaktadır; biyoinformatik ve deneysel yaklaşımlar (Unver ve ark., 2009). Biyoinformatik araçlar, miRNA'ların tanımlanması için yaygın olarak kullanılan bir yöntem haline gelmiş olup, hem hayvanlarda hem de bitkilerde yeni miRNA'ların belirlenmesinde kullanılmaktadır. Biyoinformatik yöntemlerle miRNA'ların tanımlanmasının temel prensibi, bilinen miRNA'ların homolog dizilerinin tek bir genom

içinde ve ilişkili organizmaların genomları arasında oluşturulmasıdır (Zhang ve ark., 2006). Dizi ve yapı homolojileri, miRNA tahminleri için temel sağlamaktadır. Hesaplamalı stratejiler, miRNA'ları ve onların hedef genlerini tahmin etmek için güvenilir ve etkili bir yöntem sunmakta ve hayvanlar, mantarlar ve yüksek bitkiler üzerindeki araştırmalarda kullanılmaktadır (Riolo ve ark., 2005; Sun ve ark., 2014).

Küçük RNA kütüphanelerinin klonlanması ve dizilenmesi, miRNA'ların tanımlanması ve karakterize edilmesi için kullanılan mevcut deneysel yaklaşımlardır. Ancak bu yaklaşımların bazı sınırlamalara sahiptir. miRNA ifadesi, doku ve zaman özgüllüğüne bağlı olarak değişkenlik gösterebilir ve genellikle düşük ifade seviyelerinde bulunur. Ayrıca, miRNA'lar genellikle belirli çevresel uyaranlara yanıtta transkripsiyona uğrar ve hedef mRNA'ları kesip parçalar, bu da miRNA'ların ve diğer küçük RNA'ların klonlanmasını zorlaştırır. Bu bağlamda, hesaplamalı yaklaşımlar avantaj sağlar. Son yıllarda, 454 pirodizileme ve Illumina/Solexa gibi yeni nesil yüksek verimli dizileme teknikleri, bitkilerde yeni miRNA'ları tanımlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Wang ve ark., 2010; Unamba ve ark., 2014).

2.13. Yüksek Verimli Dizileme Teknolojileri (RNA Dizileme)

Hesaplamalı olarak tahmin edilen miRNA'lar, PCR tabanlı klonlama veya hibridizasyon tabanlı yöntemlerle deneysel olarak doğrulanmıştır. Ancak, olgun miRNA bölgesi bilinmediğinde PCR tabanlı klonlama zorluklar çıkarabilirken, hibridizasyon tabanlı yöntemler daha az miktarda bulunan miRNA'ları tespit etmede duyarlılık sorunları yaşar. Ayrıca, bu yöntemler gerçek miRNA dizilerini ortaya çıkarmada yetersiz kalabilir. Teknolojideki son gelişmeler, özellikle Illumina/Solexa ve 454 pirodizileme gibi yeni nesil yüksek verimli dizileme teknolojileri, bitki miRNA'larını tanımlamak için etkili bir şekilde kullanılabilir. Türler özgü miRNA'lar genellikle korunan miRNA'lardan daha düşük seviyelerde birikir. Bu nedenle, bilinen genom dizilerine sahip model bitki türlerinde yaygın olarak kullanılan Sanger dizileme yöntemi gibi geleneksel dizileme yaklaşımlarını kullanarak bu miRNA'ları değerlendirmek genellikle zordur (Peláez ve ark., 2012; Sun ve ark., 2014).

Yeni nesil dizileme teknolojilerinin kullanımı, düşük miktardaki, doku özgüllüğü ve zaman-mekan özgüllüğüne sahip bitki mikroRNA'larının tanımlanmasında büyük avantaj sağlamıştır. Bu teknolojiler, *Arabidopsis*, pirinç, üzüm, turuncgiller, çilek, kavak,

Triticum aestivum, *Zea mays*, *M. truncatula*, *Gossypium hirsutum* ve *Taxus chinensis* gibi bitkilerde yeni tespitler için yüksek verimli araçlar sunmaktadır (Jain ve ark., 2012; Egan ve ark., 2012).

Yüksek verimli yaklaşımlar, miRNA'ları miktar seviyelerine göre de tespit edebilmektedir (Ma ve ark., 2015; Martinez ve ark., 2011). Düşük maliyetli dizilemeye olan talep, dizileme sürecini bir araya getirerek aynı anda binlerce veya milyonlarca diziyi üreten yüksek verimli (yeni nesil) teknolojilerin geliştirilmesini sağlamıştır. Bu teknolojiler, DNA dizileme maliyetini geleneksel yöntemlerin ötesine taşıyarak önemli ölçüde azaltmayı hedeflemektedir. Ultra yüksek verimli dizileme, 500.000'e kadar dizileme ve sentezleme süreçlerini paralel olarak yürütebilme kapasitesine sahiptir.

RNA dizileme (RNA-seq) teknolojileri, bitki miRNA'larının tespitinde önemli bir rol oynamaktadır. RNA-seq, miRNA'ları dizilemek için yeni nesil dizileme veya büyük ölçekli yüksek verimli DNA dizileme teknolojilerini kullanmaktadır. Bu teknik, genellikle özel olarak zenginleştirilmiş küçük RNA'ları girdi olarak gerektirir ve araştırmacıların daha önce karakterize edilmemiş miRNA'ları tespit etmelerine, doku ve hastalığa özgü ifade kalıplarını ve miRNA izoformlarını incelemelerine olanak tanır. Diğer teknikler gibi miRNA dizilemenin de avantajları (dizi bağımsızlığı ve kapsam) ve dezavantajları (yüksek maliyet, altyapı gereksinimleri, uzun çalışma süresi ve potansiyel yan etkiler) bulunmaktadır.

2.14. miRNA Hedeflerinin Tanımlanması

Yeni nesil dizileme verilerinin artmasıyla birlikte, farklı bitki genomlarında yeni miRNA'lar tespit edilmektedir. miRNA'ların işlevsel açıklamasını doğru bir şekilde yapmak için, onların hedeflerini tanımlamak önemli bir adımdır. Hayvan miRNA'larının aksine, bitki miRNA'larının hedeflerini tanıması genellikle tam veya tama yakın tamamlayıcı baz eşleşmesi gerektirir. Bu, bitki ve hayvan miRNA'ları arasındaki temel bir farktır ve bu nedenle bitki miRNA'larında hedef tahmini nispeten daha basittir.

Bitkilerde hedef mRNA'ları belirlemek için hem deneysel hem de hesaplamalı teknikler kullanılmaktadır. Bitki miRNA'larının mRNA'ları tam tamamlayıcılıkla hedefleyebilme yeteneği ilk olarak *Arabidopsis*'te miR171 ile gözlemlenmiştir (Mallory ve Vaucheret ark., 2006). miR171'in, üç SCARECROW-benzeri (SCL) transkripsiyon

faktörü ile yüksek derecede tamamlayıcılık gösterdiği belirtilmiştir (Chen, 2005). Korunan miRNA hedeflerini tahmin etmek, homolog mRNA'ların bir miRNA ailesindeki korunan miRNA'lar tarafından hedeflendiğini ortaya koymuştur; ancak, bireysel bir miRNA ile hedefi arasında daha fazla boşluk ve uyumsuzluk olabilmektedir (Unver ve ark., 2009; Sun ve ark., 2012).

2.15. Fitoremediasyon

"Fitoremediasyon" temel olarak bitkilerin ve bitkilerle ilişkili toprak mikroorganizmalarının çevredeki kirleticilerin konsantrasyonlarını veya toksik etkilerini azaltmak için kullanımını ifade eder (Greipsson, 2011). Bu yöntem, ağır metallerin ve radyonüklidlerin yanı sıra organik kirleticilerin (polinükleer aromatik hidrokarbonlar, poliklorlu bifeniller ve pestisitler gibi) uzaklaştırılmasında kullanılır. Fitoremediasyon, yeni, uygun maliyetli, yerinde uygulanabilir, verimli, çevre dostu ve güneş enerjisi ile desteklenen bir iyileştirme stratejisidir (Clemens, 2001; Saier ve Trevors, 2010; Sarma, 2011; Singh ve Prasad, 2011).

Fitoremediasyon, çevredeki kirleticilerin doğal ortamdan uzaklaştırılması veya azaltılması için bitkilerin kullanılmasıyla gerçekleşen bir temizleme sürecidir. Bu yöntem, toprak, su veya hava gibi çevresel ortamlardaki kirleticilerin bitkiler tarafından absorbe edilerek, depolanarak veya metabolize edilerek etkisiz hale getirilmesini içerir. Fitoremediasyonun alt başlıkları arasında fitoekstraksiyon, fitostabilizasyon, rizofiltrasyon ve fitovolatilizasyon bulunmaktadır.

1. Fitoekstraksiyon, bitkilerin kökleri aracılığıyla topraktaki kirletici maddeleri absorbe etme sürecidir. Kirleticiler, bitkilerin kökleri tarafından topraktan alınır ve bitkilerin toprak üstü kısımlarına taşınır. Bu toprak üstü kısımlar daha sonra toplanıp yakılarak enerji elde edilir ve metal külünden geri dönüştürülür (Kumar ve ark., 1995; McGrath ve ark., 2003; Ghorı ve ark., 2016).

2. Fitostabilizasyon, topraktaki ve yeraltı suyundaki kirletici maddelerin bitki dokuları tarafından absorbe edilip biriktirilmesi, köklere adsorbe edilmesi veya kök bölgesinde çöktürülmesi yoluyla bu kirleticilerin hareketsiz hale getirilmesi sürecidir. Bu yöntem, belirli bitki türlerinin kullanımıyla kirleticilerin toprakta göçünü engeller ve erozyon ile deflasyon gibi süreçlerin hareketlerini sınırlayarak toprağın stabilitesini artırır (Berti ve Cunningham, 2000; Hooda, 2007; Ashraf ve ark., 2010).

3. Rizofiltrasyon, sulak alanlarda yapılan ortak alan atık suyu temizleme yöntemidir. Bu yöntemde, bitki kökleri çevreleyen sulak alandaki kirleticileri absorbe eder, köklerde biriktirir veya çökeltilir. Ayrıca, kirleticiler köklerde birikerek tutulabilir. Bu süreç, su kaynaklarındaki kirleticilerin giderilmesini sağlar (Ali ve ark., 2013)..

4. Fitovolatilizasyon, bitkilerin kirleticileri alarak bu kirleticileri terleme yoluyla atmosfere saldığı bir süreçtir. Bitkiler, su ile birlikte kirleticileri alır ve bu kirleticiler, değışmiş bir formda veya orijinal haliyle atmosfere salınır. Özellikle ağaçlar ve diğerk bitkiler, buharlaşma yoluyla kirleticileri atmosfere bırakır. Bu yöntemle kirleticilerin atmosfere karışması sağlanarak çevreden uzaklaştırılmaları gerçekleştirilir (Nabais ve ark., 2007; Wu ve ark., 2007; Ashraf ve ark., 2010).

Yeşil bitkiler, çevredeki kirleticileri absorbe ederek ve çeşitli mekanizmalarla detoksifiye ederek önemli bir yetenek sergilerler. Kirleticileri genellikle yüzey toprağına zarar vermeden kullanarak yararlılıklarını ve verimliliklerini korurlar. Ayrıca, organik madde katkılarıyla toprağın verimliliğini artırarak çevresel iyileşmeye katkıda bulunurlar (Weil ve Magdoff, 2004; Fageria, 2012). Bazı bitkiler, metal içeren topraklarda yetişerek toksisite belirtileri göstermeksizin yüksek miktarda metal biriktirme yeteneğı geliştirmiştir (Reeves ve Brooks, 1983; Memon ve Schroder, 2009; Memon, 2016; Doğru ve ark., 2021). Fitoremediasyon için ideal bitkiler, yüksek metal konsantrasyonlarına tolerans gösterebilmeli, büyük miktarda metal biriktirebilmeli, yüksek biyokütle oluşturmali, hızlı büyümeli ve derin bir kök sistemine sahip olmalıdır (DalCorso ve ark., 2019; Baker ve ark., 2020). Ayrıca, bitkilerin zorlu toprak koşullarına (örneğin, toprak pH'ı, tuzluluk, toprak yapısı, su içeriğı) dayanabilme ve derin bir kök sistemi geliştirebilme yetenekleri de önemlidir. Bu özellikler, bitkilerin kirletici maddeleri etkin bir şekilde temizleme kapasitesini belirler. Bazı bitkiler bu özelliklere doğal olarak sahipken, diğerk bitkiler genetik mühendislik potansiyeli sayesinde daha etkili ve özelleştirilmiş bitki türleri olarak geliştirilebilir. Bu amaçla, metal akümülasyonu ve toleransının moleküler mekanizmalarını belirlemek gereklidir.

Fitoremediasyonu etkileyen faktörler hakkındaki artan bilgi, bitkilerin iyileştirme performansını artırmak için genetik modifikasyona dayanak oluşturur. Metal hiperakümülatörlerinin tanımlanması, bitkilerin kirlenmiş toprağı ve suyu temizleme konusunda genetik bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.

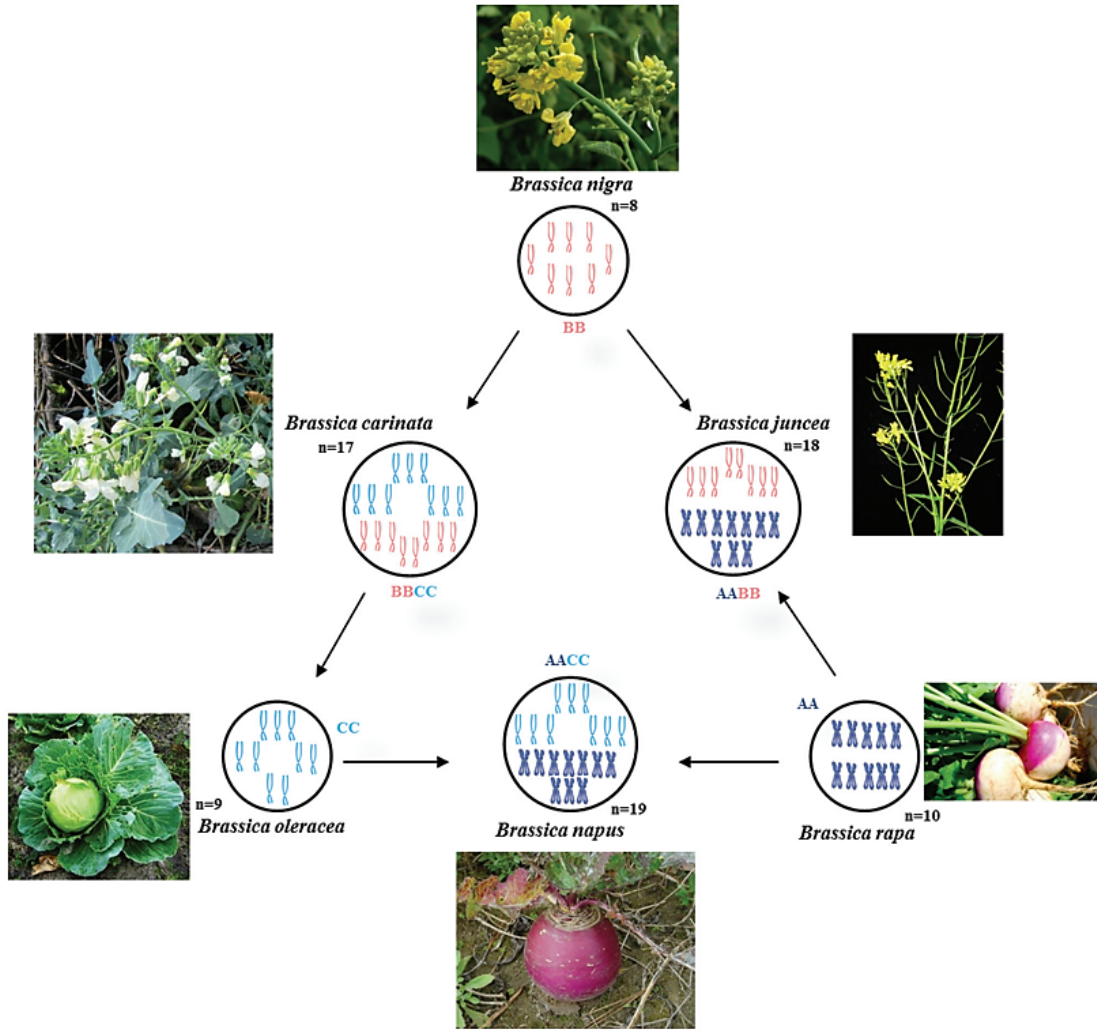
Fitoremediasyon, çevre mühendisliğı, bitki fizyolojisi, genetik, toprak bilimi ve

biyoteknoloji gibi çeşitli alanları bir araya getiren disiplinler arası bir teknolojidir. Bu alanlardaki araştırmaların birleşimi, bitkilerin kirleticileri absorbe etme, metabolize etme ve toksinleri etkisiz hale getirme yeteneklerini daha iyi anlamamızı sağlar ve bu bilgileri uygulamalı çözümlere dönüştürmemize yardımcı olur. Fitoremediasyon, bitkilerin ağır metal iyonlarını sitoplazmadan uzaklaştırma veya daha az toksik veya daha kullanışlı bir formda şelasyon yaparak ya da inaktive ederek detoksifiye etme yeteneklerini artırmayı hedefler. GSH ve PC'lerin sentezinde yer alan enzimlerin modifikasyonu veya aşırı ekspresyonu, bitkilerde ağır metal toleransını ve dolayısıyla fitoremediasyon potansiyelini artırmak için etkili bir yaklaşım olabilir.

Genetik modifikasyon, Hint hardalının fitoekstraksiyon yeteneğini artırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Bennett ve ark., 2003; Kumar ve ark., 2023). Ma ve ark. (2009), Cu'ya dayanıklı olan ve Hint hardalında ağır metal stresini önleyen AX10 adlı bir bakteri suşu ile Hint hardalı tohumlarını aşılamışlardır. Aşılanmış bitkiler, aşılanmamış bitkilere göre %56'ya kadar daha fazla Cu biriktirmiştir (Ma ve ark., 2009). Benzer şekilde, Bañuelos ve ark. (2005), Se alımını iyileştirmek amacıyla transgenik bitkiler kullanmış ve bu bitkiler normal (değiştirilmemiş) bitkilere kıyasla Se alımında %30'luk bir artış sağlamıştır.

2.11. *Brassica juncea*: Fitoremediasyondaki Rolü

Farklı *Brassica* türleri arasındaki genetik ilişkiler, U üçgen teorisi ile iyi bir şekilde açıklanmıştır (Nagaharu, 1935; Şekil). Bu teori, *B. carinata*, *B. juncea*, *B. napus*, *B. nigra*, *B. oleraceae* ve *B. rapa* gibi *Brassica* türleri arasındaki kromozom sayıları ve genetik yapılar arasındaki ilişkileri açıklar. Teoriye göre, *Brassica* türlerinin genetik ilişkileri bir üçgen şeklinde düzenlenmiştir. Üçgenin köşeleri, farklı kromozom sayıları ve genetik özelliklere sahip üç temel türü temsil eder: *B. nigra* (BB), $2n = 16$; *B. oleraceae* (CC), $2n = 18$; ve *B. rapa* (AA), $2n = 20$. Üçgenin kenarları ise bu temel türler arasında meydana gelen interspesifik hibridizasyonları temsil eder. Örneğin, *B. juncea* (AABB), $2n = 36$ ve *B. napus* (AACC), $2n = 38$ gibi amfidiploid türler, bu interspesifik hibridizasyonların sonucudur (Chen ve ark., 2020).



Şekil 2.1. Çin lahanası (AA), lahana (CC), kolza tohumu (AACC), Hint hardalı (AABB) ve diğer yaygın sebzeler gibi *Brassica* cinsinin altı türü arasındaki genetik ilişkileri gösteren U üçgen diyagramı, A, B ve C genomlarının her birinden gelen kromozomlar farklı renklerle gösterilmiştir (Kumar ve ark., 2015).

B. juncea (Kahverengi hardal), metalle kirlenmiş topraklarda adaptasyon gösterebilme ve gelişebilme yeteneği nedeniyle bir metallofit olarak sınıflandırılmıştır (Ali ve ark., 2013; Li ve ark., 2019). Bu tür hem doğal hem de yapay olarak kirlenmiş topraklardan ve sulardan ağır metallerin uzaklaştırılmasında dikkat çekici bir yeteneğe sahiptir (Huysen ve ark., 2004; Li ve ark., 2019; Meyers ve ark., 2008). *B. juncea*, köklerinde ve toprak üstü kısımlarında ağır metalleri biriktirme kapasitesine sahiptir (Varkey ve ark., 2012; Rathore ve ark., 2019); ancak, bu birikim köklerde daha yüksek miktarda gözlemlenmektedir (Li ve ark., 2019; Meyers ve ark., 2008). Çevredeki ağır

metal konsantrasyonlarının artmasıyla kök alımı arttıkça, toprak üstü kısımlara taşınma da artmaktadır (Li ve ark., 2019; Meyers ve ark., 2008; Napoli ve ark., 2019).

B. juncea'nın ağır metal toleransı, büyümesini ve performansını engelleyebilecek reaktif oksidatif strese karşı koruma sağlayan yüksek antioksidan, sistein ve askorbik asit konsantrasyonlarıyla ilişkilidir (Diwan ve ark., 2008; Fryzova ve ark., 2017). Ayrıca, bu tür, aşırı ağır metal seviyelerine adaptasyona yardımcı olan etkili kök hücre vakuol depolama sistemlerine sahiptir (Graziani ve ark., 2016; Meyers ve ark., 2008). *B. juncea*, bir veya birden fazla metalle kirlenmiş alanların iyileştirilmesinde uzun yıllardır kullanılmaktadır. Örneğin, *B. juncea*, Pb seviyelerini 1000 mg/kg'ye kadar tolere edebildiği için yüksek bir Pb toleransına sahiptir (Graziani ve ark., 2016); bu da Baker ve Brooks'un (1989) tanımına göre bu bitkinin gerçekten bir hiperakümülatör olduğunu göstermektedir.

Chigbo ve ark. (2013), *B. juncea*'nın fitoekstraksiyon verimliliğinin, farklı özelliklere sahip kirleticiler arasındaki rekabetçi alım ve etkileşimler nedeniyle birden fazla ağır metal veya kirletici türüyle kirlenmiş ortamlarda azalabileceğini belirtmiştir. Chigbo ve ark. (2013), piren varlığında *B. juncea*'da Cu birikiminin %85'e kadar azaldığını ve biyokütlede düşüş yaşandığını gözlemlemiştir. Cu birikimindeki bu azalma, kök salgıları ve piren ile komplekslerin reaksiyonları sonucunda çözünmez Cu komplekslerinin oluşmasına yol açmakta ve böylece Cu alımını sınırlamaktadır (Jeelani ve ark., 2020).

B. juncea'nın ağır metalleri giderme yeteneğinin yanı sıra fitostabilizasyon özellikleri göstermesi, bu türün çeşitli fitoremediasyon teknikleri için kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. *B. juncea* kökleri ve toprak üstü kısımlarında farklı ağır metal birikim kapasitelerine sahiptir (Clemente ve ark., 2005; Mhalappa ve ark., 2013). Örneğin, Pb ve Cd birikimi kök bölgelerinde, gövde ve yapraklara kıyasla daha yüksektir (Meyers ve ark., 2008; Wu ve ark., 2020). Clemente ve ark. (2005), *B. juncea*'nın köklerinde yüksek Pb konsantrasyonu gözlemlerken, toprak üstü kısımlarında bu konsantrasyonun eşik değerinin altında olduğunu belirtmişlerdir. Cu, Fe, Mn ve As ise yapraklarda daha yüksek birikim göstermektedir. Roychowdhury ve ark. (2017), *B. juncea* bitkisinin ağır metalleri genellikle yapraklarda, ardından köklerde ve en son gövdelerde $Zn > Cu > Pb$ sıralamasına göre biriktirdiğini bildirmiştir.

B. juncea'nın özellikle birden fazla kirleticinin bulunduğu ortamlarda yavaş gelişme gösterebileceği ileri sürülmüştür (Chen ve ark., 2020; Fornes ve ark., 2009; Goswami ve Das, 2015; Mhalappa ve ark., 2013). Goswami ve Das (2015), aşırı ağır metal toksisitesinin bitki biyokütlesi, kök ve toprak üstü kısımlarının (gövde ve yaprak) uzunluğu ile klorofil ve karotenoid içeriğini olumsuz etkilediğini belirtmişlerdir. Mohamed ve ark. (2012), *B. juncea*'nın Cd hiperakümülatörü olarak iyi bir potansiyel sergilemesine rağmen, Cd toksisitesinin bitki büyümesini ve biyokütlesini engelleyebileceğini gözlemlemişlerdir. Shahandeh ve Hossner (2000), EDTA'nın özellikle *B. juncea* ve ayçiçeğinde bitki toprak üstü kısımlarında Cr alımını artırmada en etkili şelatlama ajanı olduğunu doğrulamışlardır. Benzer şekilde, Mbangi ve ark. (2018), EDTA eklenmesinin *B. juncea*'nın toprak üstü kısımlarındaki Cr konsantrasyonunu 50 kat ve ayçiçeğinde 10 kat artırdığını gözlemlemişlerdir. Bu bulgular, *B. juncea*'nın Cr fitoremediasyonu için umut vaat eden bir aday tür olduğunu göstermektedir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada, *Brassica juncea* (Kahverengi hardal) türünün; *B. juncea* var. JS-13, *B. juncea* var. Early raya, *B. juncea* var. Sindh raya, *B. juncea* var. S-9, *B. juncea* var. Ganj sarhen ve *B. juncea* var. THB-81 kodlu altı varyetesi kullanılmıştır. Tohumlar, Tarım Araştırma Enstitüsü, Tandojam, Sind Eyaleti, Pakistan'dan temin edilmiştir. *Brassica juncea* bitkisi, hızlı büyüme ve yüksek biyokütle üretme oranı (diğer hiperakümülatörlerden en az 10 kat daha fazla), bazı ağır metalleri yüksek miktarda biriktirme, gelişmiş bir kök sistemine sahip olması, az su gerektiren önemli bir yağlı tohum bitkisi olması nedeniyle tercih edilmiştir.

3.2. Bitkilerin Yetiştirilmesi, Ağır Metal Uygulaması ve Büyüme Parametrelerinin Ölçümü

B. juncea'nın altı varyetesine (*B. juncea* var. THB-81, *B. juncea* var. JS-13, *B. juncea* var. Early raya, *B. juncea* var. Sindh raya, *B. juncea* var. S-9 ve *B. juncea* var. Ganj sarhen) uygulanmak üzere, Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı tarafından açıklanan “tehlikeli kirletici maddeler” listesinde 78. sırada yer alan (ATSDR, 2022) Cr metali seçilmiştir. Bitkilere krom(III) klorür ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ olarak) çözeltisi uygulanmıştır. Uygulanan krom seviyeleri, literatür taramaları ve ön denemeler sonucunda belirlenmiştir (Akinci ve Akinci, 2010; Siddiqui ve ark., 2014).

Başlangıçta, *B. juncea*'nın her bir varyetesinden 100 adet tohum ayrı ayrı 50 ml'lik falkon tüplerde oluşabilecek herhangi bir kontamasyonu önlemek için 15 dakika boyunca Tween-20 içeren %5'lik sodyum hipoklorit (NaClO) çözeltisi ile yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuş ve akabinde deiyonize su (dH_2O) ile iyice yıkanmıştır. Daha sonra, imbibisyonu sağlamak için petri kaplarında bir saat boyunca dH_2O bekletilen tohumlar, çimlenme ve fide gelişimi için vermikülit içeren viyollere yerleştirilmiştir. Her bir türde her bir tekrür için bir viyol ve her uygulamada 100'er tohum kullanılmıştır. 25 (27,5 cmx 27,5 cm) gözlü viyollerden faydalanılmış, her bir viyol bir tekrür kabul edilerek her tekrürde bir uygulama için toplam 100 adet tohum uygulamaya dâhil edilmiştir. Deneyin başlangıcında, her bir Cr-uygulanan gruplara 10, 50, 100, 200, 500, 1000 μM

konsantrasyonlarında 20 ml Cr çözeltisi ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ olarak) uygulanmıştır. Cr-uygulanmayan kontrol (0) gruplarına, sadece 20 ml dH_2O uygulanmıştır. Çimlenme aşamasında tohumları karanlıkta bekletmek ve büyüme fazında nemini korunmak için her bir viyolün üzeri beş gün boyunca alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Tohumlar beş gün boyunca karanlıkta $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de çimlendirilmiştir. 5. günde her bir türün çimlenme oranı hesaplanmıştır (Akıncı ve Akıncı, 2010). Bu aşamadan sonra, 5. günde çimlenen fidelerin büyüme ve gelişimi için iklim odasının koşulları 16 saat gündüz/ 8 saat gece periyodu, $22\text{-}25^\circ\text{C}$ hava sıcaklığı, %70/85 bağıl nem oranı ve 10.000 lüks ışık yoğunluğu olarak ayarlanmıştır. 5 günlük çimlenmeden sonra, Cr-uygılanan gruplara 20 ml'lik 1/4 Hoagland besi çözeltisi içeren farklı seviyelerde (10, 50, 100, 200, 500 ve 1000 μM) hazırlanan Cr çözeltileri ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ olarak); Cr-uygulanmayan (kontrol (0)) gruplarına ise sadece 20 ml'lik 1/4 Hoagland besi çözeltisi 10 gün boyunca güneşli muamele edilmiştir. Bitkiler düzenli olarak temel besin ihtiyacının karşılanması için 1/4 oranında seyreltilen Hoagland besi çözeltisi uygulanmıştır (Hoagland ve Arnon, 1938) (Çizelge 3.1). Deney grupları; kontrol grubu dâhil olmak üzere 3'er adet tekerrürlü (R1, R2, R3) olacak şekilde ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Bitkilere uygulanan 1x Hoagland çözeltisi için gerekli stok çözeltileri

Stok çözelti	Bileşim	Final konsantrasyonu
A	KNO_3	6.5 mM
	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	4.0 mM
B	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	2.0 mM
	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2.0 mM
C	H_3BO_3	4.6 μM
	$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	0.5 μM
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	0.1 μM
	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 μM
D	FeCl_3	45 μM

3.2.1. Fizyolojik Analizler

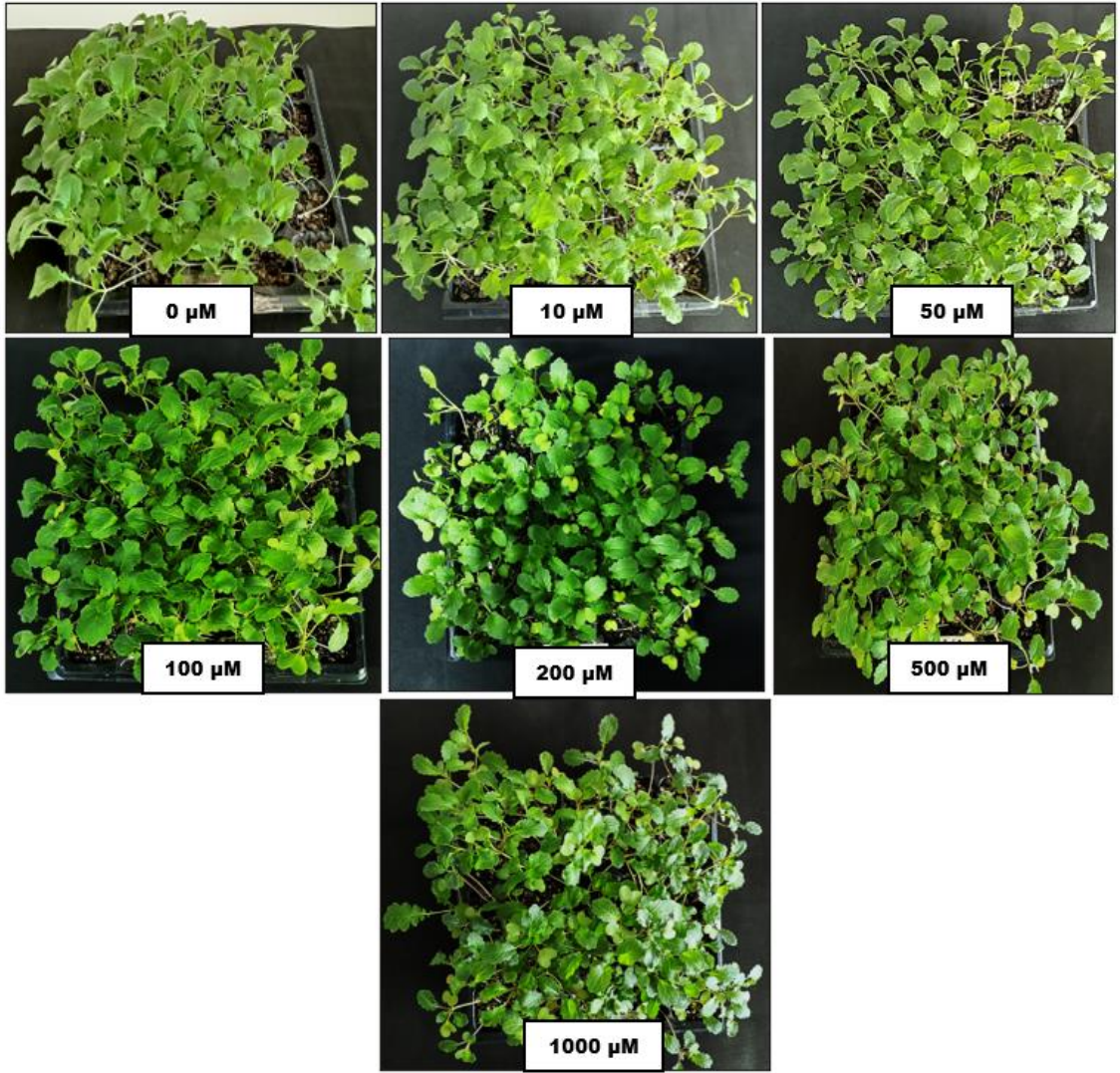
3.2.1.1. Çimlenme Deneyleri

Yüz tohum, üç tekrarlı olarak vermikülit içeren 25 (27,5 cm x 27,5 cm) gözlü viyollere yerleştirilmiştir. Deneyin başlangıcında, her bir Cr-uygulanan gruplara 10, 50, 100, 200, 500 ve 1000 µM konsantrasyonlarında 20 ml Cr çözeltisi (CrCl₃.6H₂O olarak) uygulanmıştır. Cr-uygulanmayan kontrol (0) gruplarına, sadece 20 ml dH₂O uygulanmıştır. Çimlenme aşamasında tohumları karanlıkta bekletmek ve büyüme fazında nemini korunmak için her bir viyolün üzeri beş gün boyunca alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Tohumlar beş gün boyunca karanlıkta 25 ± 2°C’de çimlendirilmiştir. 5. günde her bir türün filizlenen tohumları yani 2 mm’lik radikül uzaması gösterenler sayılmış ve çimlenme oranı hesaplanmıştır (Çizelge 4.1). Fidelerin çimlenme oranları aşağıdaki formül yardımıyla belirlenmiştir (Akinci ve Akinci, 2010).

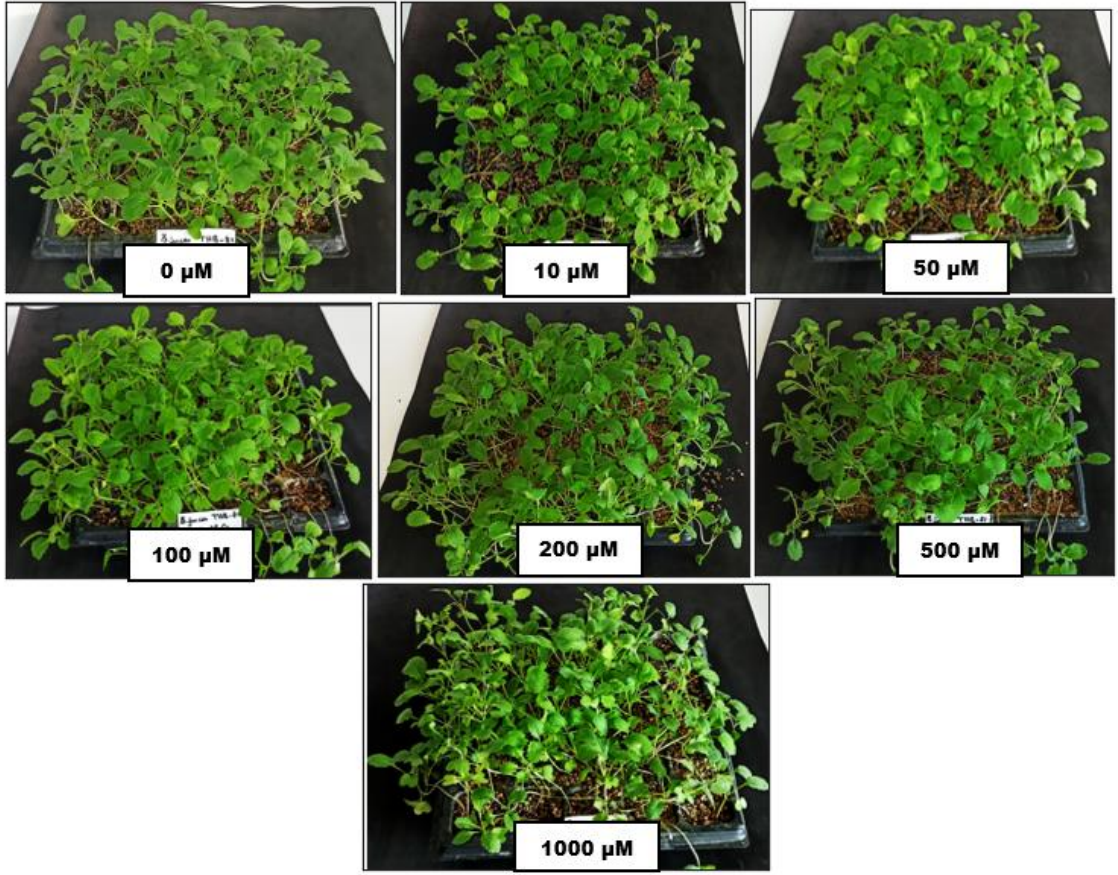
$$\text{Çimlenme oranı (G-max)} = (G/T) \cdot 100$$

(G = toplam çimlenen tohum sayısı; T = deneydeki toplam tohum sayısı)

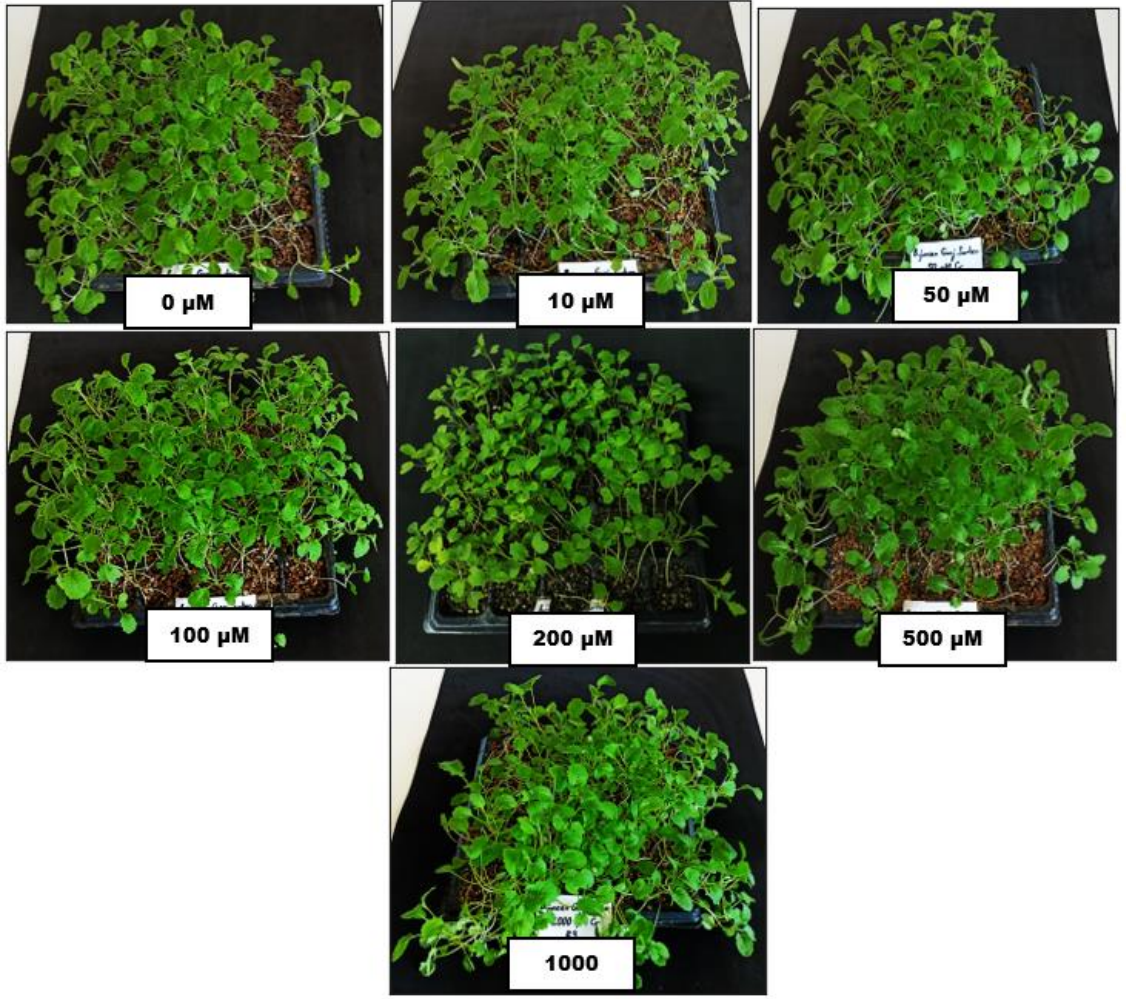
İki haftalık (15 günlük) deneyden sonra, muamele edilen fidelerin ve kontrollerin kök ve boy (kök+gövde) uzaması (cm cinsinden) ve yaş ağırlığı (g cinsinden) ölçülmüştür. Akabinde, 72°C’ de bir etüvde 72 saat kurutulduktan sonra, kök ve gövde kuru ağırlıkları elde edilmiştir. Ayrıca, metal tayini için örnekler 72°C’ ye ayarlanan etüve kurutulmuştur. İleriki moleküler çalışmalar için ayrılan örnekler (kök, gövde, yaprak) ise -20°C’de muhafaza edilmiştir. Her deney kendi içinde, Cr-uygulanmayan (kontrol) ve Cr-uygulanan deney gruplarına ait 3’er adet biyolojik tekrar içermektedir. Hasat işlemi sırasında, her biyolojik tekrara ait bitkilerden alınan kök, gövde ve yaprak örnekleri kendi grubu dâhilinde bir araya getirilerek harmanlanmıştır.



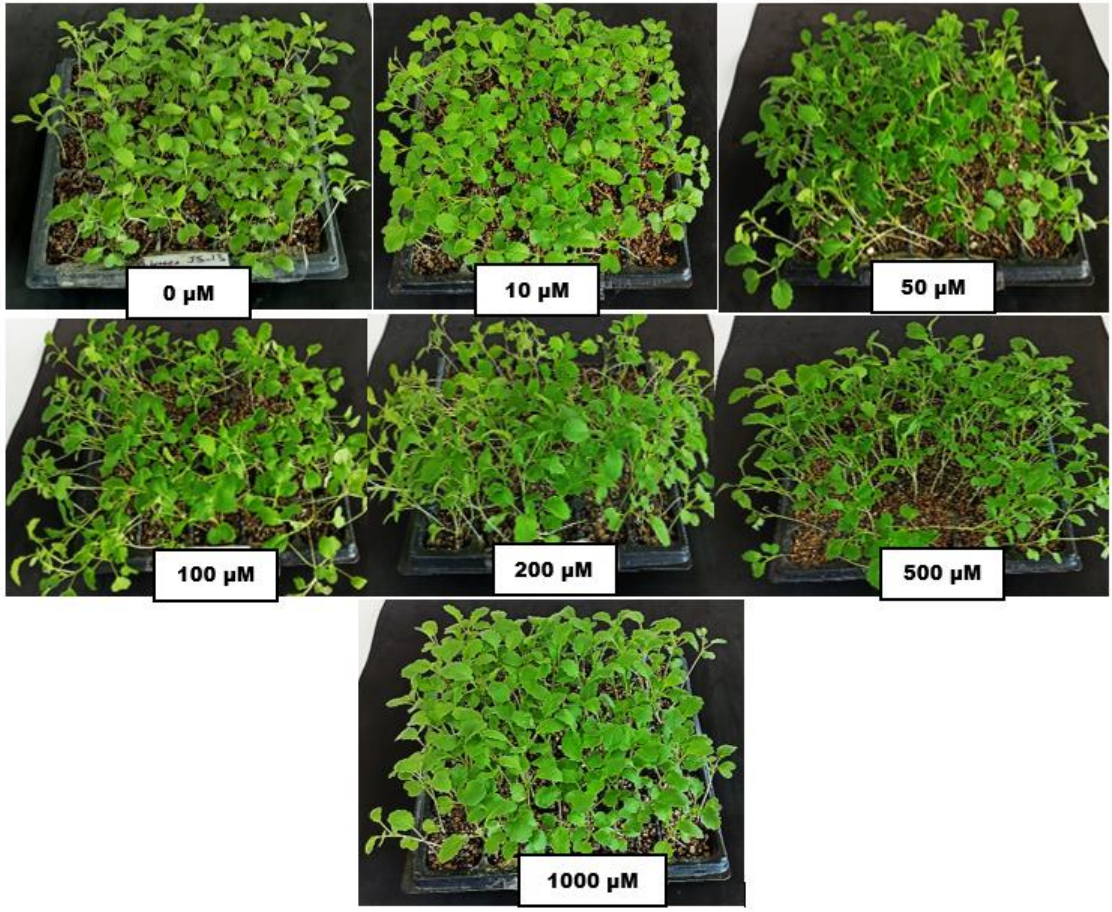
Şekil 3.1. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan *B. juncea* var. Early raya bitkilerinin genel görünümü



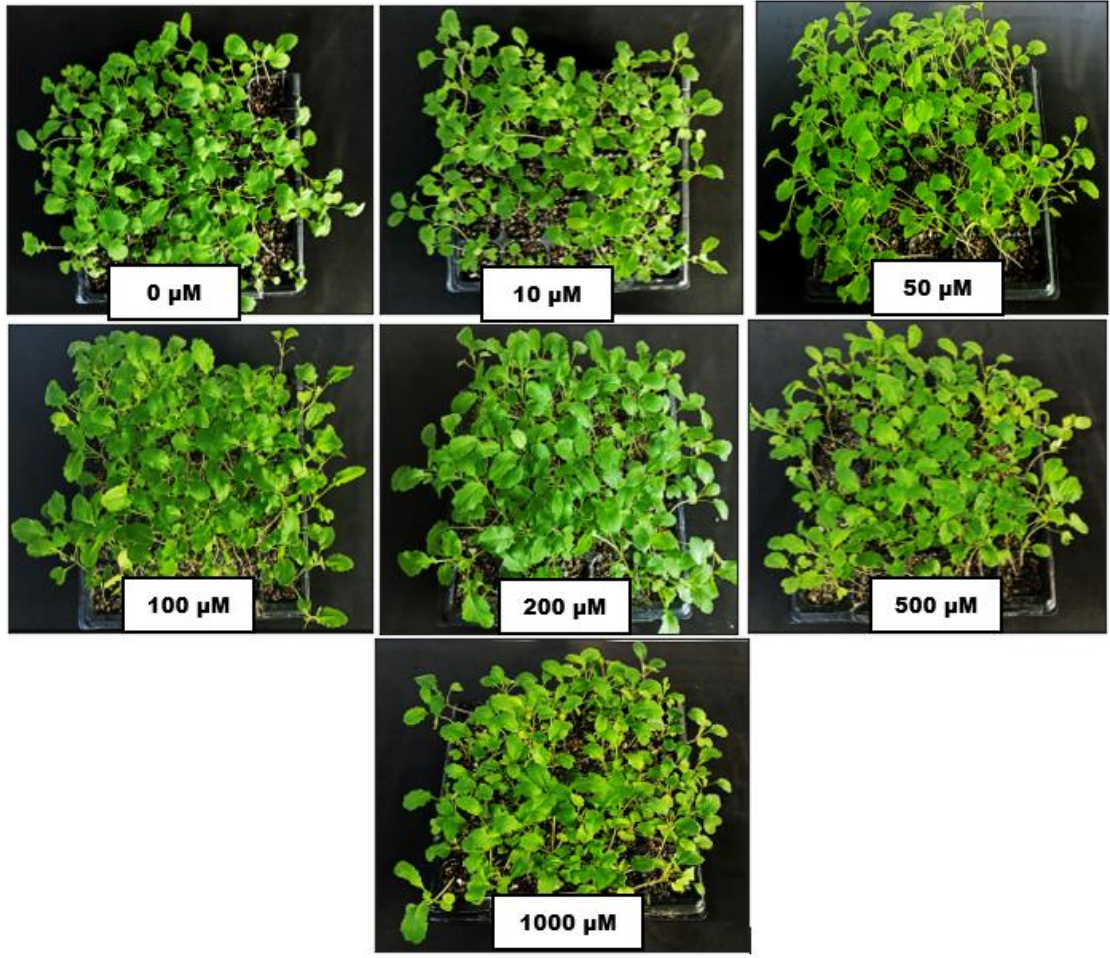
Şekil 3.2. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan *B. juncea* var. THB-81 bitkilerinin genel görünümü



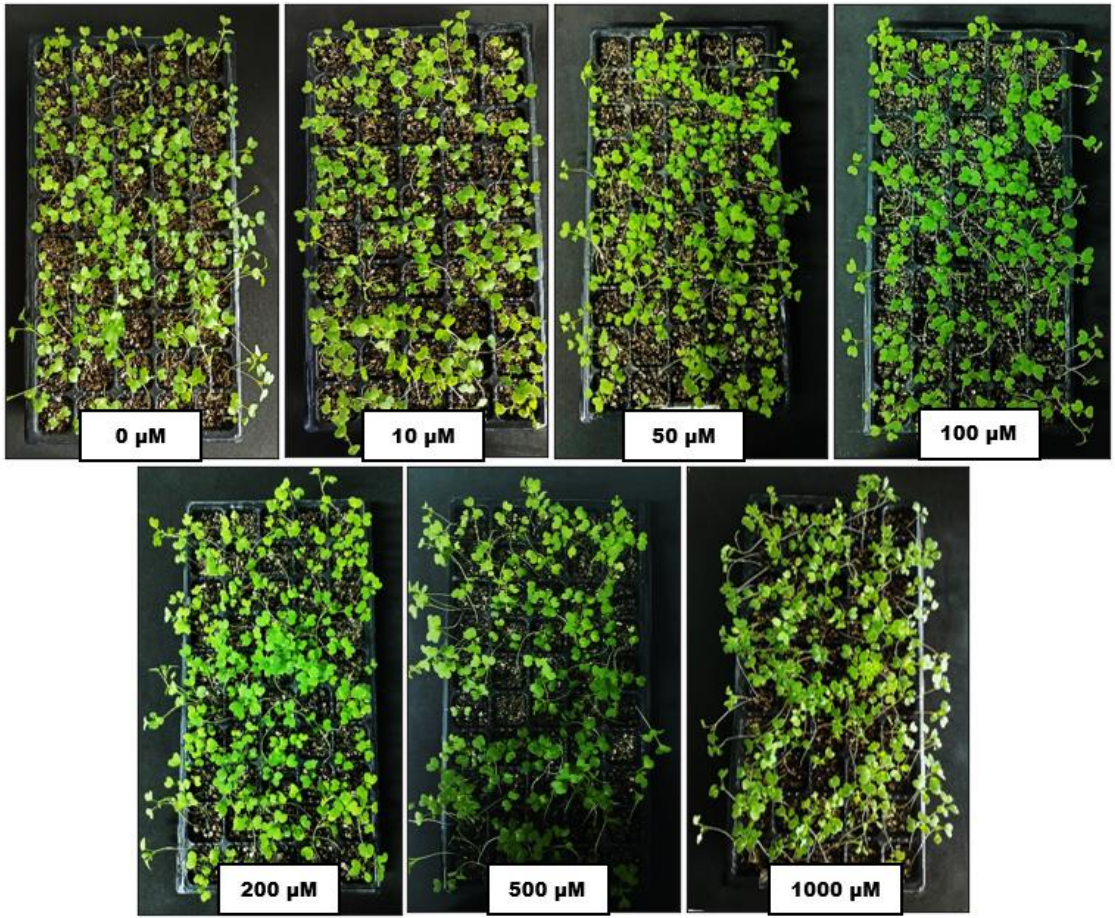
Şekil 3.3. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan *B. juncea* var. Ganj sarhen bitkilerinin genel görünümü



Şekil 3.4. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan *B. juncea* var. JS-13 bitkilerinin genel görünümü



Şekil 3.5. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan *B. juncea* var. Sindh raya bitkilerinin genel görünümü



Şekil 3.6. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan *B. juncea* var. S-9 bitkilerinin genel görünümü

3.3. Bitkilerde Biriken Metal İçeriklerinin Tayini

Cr-uygulamasından sonra, her bir türün kök, gövde ve yaprak kısımlarında biriken metal (Ca, Cr, Fe, Zn, Cu, Mg, K) miktarının tayini için kurutulan örnekler asit ile yaş yakma yöntemine tabi tutulmuştur (Memon ve ark., 1982). Kısaca; hasat işleminden sonra örnekler 72 °C'ye ayarlanan etüvde 72 saat boyunca kurutulmuştur. Kurutulan bitki örneklerinden (0.5 g) 100 ml'lik erlenmeyerlere konulmuştur. Örneklerin üzerine (0.5 g) kuru ağırlık başına 5 ml nitrik asit (HNO_3) konsantresi ilave edilerek ısıtıcı tablada organik materyal buharlaşana kadar sindirilmiştir. Akabinde, 2 ml perklorik asit (HClO_4) konsantresi ilave edilerek örneklerde küçük hacim kalana kadar ısıtıcı tablada ısıtılmaya devam edilmiştir. Uygulanan nitrik asit-perklorik asit oranı ($\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$) 5:2'dir. Bu işlem, erlenmeyerlerde yaklaşık 1 ml materyal kalana ve çözelti tam olarak

berraklaşınca kadar devam ettirilmiştir. Örneklerin bulunduğu erlenmeyerler yeterince soğuduktan sonra 15 ml'lik falkon tüplerinde 10 ml'ye tamamlanacak şekilde dH₂O ilave edilmiştir. Yaş yakma yöntemine tabi tutulan bitki örneklerinin ve toprak örneklerinin Ca, Cr, Fe, Zn, Cu, Mg, K içerikleri ICP-OES (İndüktif Eşleşmiş Plazma–Optik Emisyon Spektrometresi) (SPECTRO ARCOS) ile tayin edilmiştir.

3.4. Moleküler Analizler

3.4.1. Total RNA İzolasyonu

Metal tayini sonuçlarına dayanarak, Cr-toleranslı olarak belirlenen *B. juncea* var Early raya ve Cr-dışlayıcı olarak belirlenen *B. juncea* var Sindh raya'nın üç tekerrüründeki kök örneklerinin RNA izolasyonu, Thermo Scientific™'in GeneJET Bitki RNA Saflaştırma Mini Kiti (#K0801) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, RNA izolasyonu için kullanılan havanlar ve tokmaklar DEPC ile bir süre muamele edilmiştir. DEPC'den çıkarılan havan ve topuz otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır.

RNA izolasyon kitinin protokolüne uygun bir şekilde aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

1. -20°C'de muhafaza edilen örnekler (0.2 g) havanda sıvı azot ile öğütme işlemi gerçekleştirilmiştir.
2. Sıvı azot yardımıyla toz haline gelinceye kadar öğütülen bitki materyali steril eppendorf tüpe (2ml) aktarılmıştır.
3. Aktarılan materyale 10 µl DTT (2M) içeren 510 µl Bitki RNA Lizis solüsyonu ilave edilmiştir. Ekstraktların iyice homojenize olabilmesi için 10-20 s vorteks yapılmıştır.
4. Vortekslenen örnekler ısıtıcı tablada (hotblock) 56 °C'de 3 dakika inkübe edildikten sonra 14.000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüjden çıkarılan örneklerden supernatant kısmı alınarak yeni steril bir mikrosantrifüj tüpe aktarılmıştır. Aktarılan örneğe 250 µl olacak şekilde %96'lık etanol ilave edilerek pipet yardımıyla karışım haline getirilmiştir.
6. Etanol ilave edilen örnekler RNA izolasyon kolonuna aktararak 1 dk 11.000 rpm' de santrifüj edilmiştir.

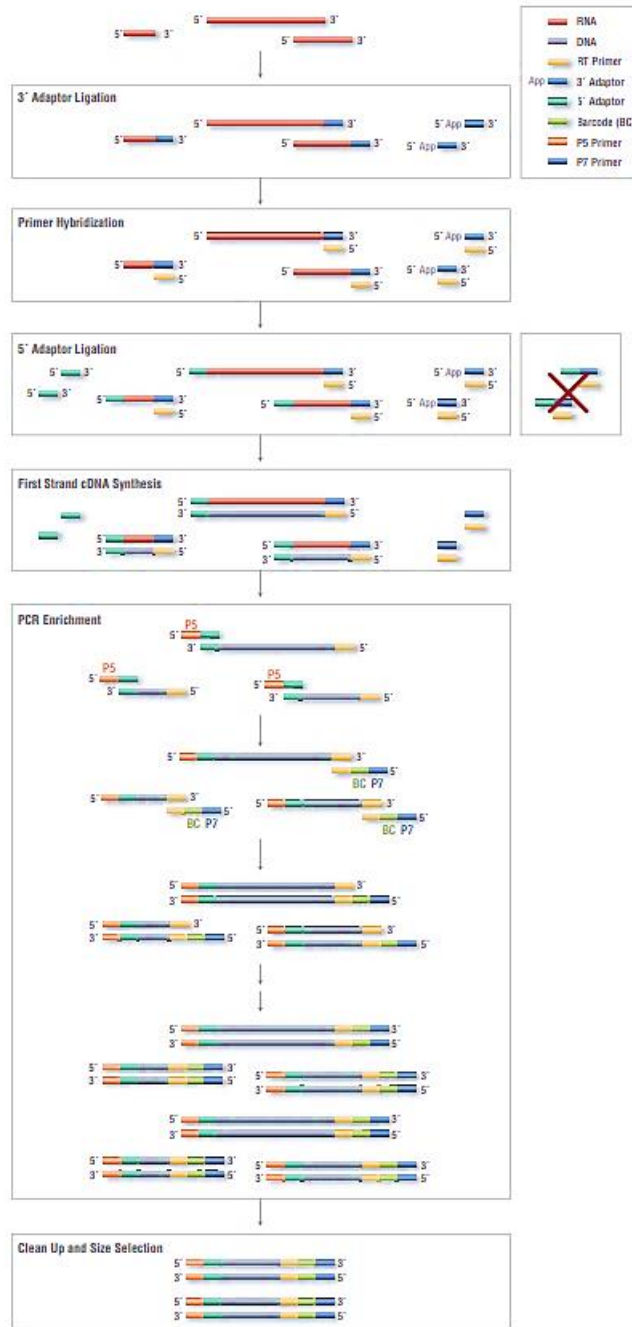
7. Saflaştırma kolonundan geçen sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, yıkama işlemi için örnekler 700 µl Yıkama Tamponu 1 (WB1) (tampona kitte belirtildiği şekilde etanol ilave edilmiştir) ilave edilmiş ve 12.000 rpm’ de santrifüj edilmiştir.
8. Kolondan geçen sıvı tekrar uzaklaştırılarak, yıkama işlemini tekrarlamak için kolona 500 µl Yıkama Tamponu 2 (WB2) (tampona kitte belirtildiği gibi etanol ilave edilmiştir) ilave edilmiş ve 12.000 rpm’ de 1 dk santrifüj edilmiştir.
9. Kolondan geçen sıvı tekrar uzaklaştırılarak, bir önceki aşamayı (8.adım) tekrarlamak üzere kolona 500 µl Yıkama Tamponu 2 (WB2) ilave edilmiş ve 14.000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir.
10. Yıkama işlemlerinin akabinde, kolon RNaz içermeyen steril eppendorf tüpe (2ml) aktarılmıştır.
11. Son aşamada, RNA’nın ayrımı için, kolona 50 µl nükleaz içermeyen su ilave edilmiş ve 12.000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj edildikten sonra, RNA’lar kolondan uzaklaştırılmış ve eppendorf tüpte toplanmıştır. Total RNA izolasyonu tamamlandıktan sonra, saflaştırılan RNA’lar -20 °C’de moleküler çalışmalar için muhafaza edilmiştir.

3.4.2. Total RNA Örneklerinin Kalite Okumalarının Gerçekleştirilmesi

İzole edilen total RNA’ların kalitesi NanoDrop 2000 cihazında (Thermo Scientific) 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki okumalar ile değerlendirilmiştir (Memon ve ark., 2014; Demirel ve ark., 2014). RNA bütünlüğünü ve konsantrasyonunu değerlendirmede kullanılan en ileri yöntemlerden biri, mikroakışkan teknolojisine dayalı örnek profillemenin 2100 Bioanalyzer cihazı (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) ile gerçekleştirilmesidir. Bu yöntem, minyatürleştirilmiş bir elektroforez platformu olarak düşünülebilir ve tek bir çip üzerinde 12’ye kadar örneğin 45 dakikadan kısa bir sürede analiz edilmesine olanak tanır. Floresan boya kullanılarak çalıştırılan örneklerin analizi sonucunda, tam boyutlu agaroz jellerde elde edilen görüntülere benzer bir çıktı oluşturulur. Ayrıca, mikroakışkan cihaz tarafından çözümlenen her RNA türünün bolluğunu gösteren bir elektroferogram üretilir. Her kanalda gözlemlenen RNA türlerinin dağılımına özel bir algoritma uygulanarak RNA Bütünlük Numarası (RIN) hesaplanır. RIN değeri 1 ile 10 arasında değişir; 10 tam ve sağlam bir RNA’yı, 1 ise tamamen bozulmuş bir RNA’yı ifade eder. Bu çalışmada, 1,9 ile 2,1 arasında bir A260/280 oranına ve ≥ 7 RNA bütünlük değerine (RIN) sahip RNA örnekleri kullanılmıştır.

3.4.3. RNA Dizileme ve miRNA Kütüphane Hazırlama

B. juncea var. Early raya ve *B. juncea* var. Sindh raya bitkilerinin üç biyolojik tekerrürünün tümü kullanılarak ve Cr-uygulanmayan (kontrol) ve 1000 μ M Cr-uygulanan kök örnekleri RNA dizilimi için hazırlanmıştır. RNA izolasyon kitinin prosedürüne göre sıvı azotta öğütülen 200 mg kök örneklerinden total RNA izole edilmiştir. Başlangıç materyali olarak, RNA örneklerinin kalitesi ve miktarı sırasıyla NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spektrofotometre (NanoDrop Technologies), Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies), Agilent RNA 6000 Nano Çip kullanılarak analiz edilmiştir. RNA dizileme için yalnızca 1,8'den yüksek A260/280 nm oranına, 2'den yüksek A260/230 nm oranına ve 7'den yüksek RNA Bütünlük Numarasına (R.I.N.) sahip örnekler kullanılmıştır. Yeni nesil dizileme deneyleri, Lifescience Araştırma ve Uygulama Merkezi, Genoks tarafından gerçekleştirilmiştir (Yenimahalle, Ankara).



Şekil 3.7. Multiplex Küçük RNA Kütüphane Hazırlama İş Akışı

Illumina NextSeq 550 cihazında dizileme için miRNA kütüphane çalışmaları, E7330L-NEBNext® Small RNA Library Prep Set for Illumina® (Multiplex Compatible) kiti prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir. NEBNext Multiplex Küçük RNA Kütüphane Hazırlama kiti, küçük RNA'ları indeksli kütüphanelere dönüştürmek için gerekli adaptörleri, primerleri, enzimleri ve tamponları içermekte ve bu kütüphaneler, Illumina

platformunda yüksek kaliteli bir dizileme için kullanılmaktadır. Yeni iş akışı, yüksek verimli, yüksek çeşitlilikte kütüphaneler üretirken adaptör-dimerlerini en aza indirecek şekilde optimize edilmiştir. İndekslenmiş kütüphaneler, Şekil 3.7’de şematik olarak açıklanan talimatları izlenerek NEBNext Multiplex miRNA Kütüphane Hazırlama Kiti (Illumina) ile 2 µg RNA’dan hazırlanmıştır.

miRNA kütüphane hazırlama kitin protokolüne uygun bir şekilde aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

1. 3’ SR Adaptör Bağlama

1000 ng 3 µl örneğin üzerine 0,5 µl 3’ SR Adaptor eklenmiş ve 70 °C’de 2 dk inkübasyona bırakılarak ardından buz üzerine alınmıştır. (Eğer örnek 100 ng’a dilüe edilecekse 3’ SR Adaptor’de 1:2 dilüe edilir.)

1.	3’ SR Adaptör + Total RNA	
Reaktif	Miktar	12
Input RNA+ NFW	3	36
3’ SR Adaptör	0.5	6
Toplam	3.5	42

İnkübasyon 70 °C	
70 °C	2 dk
Lid 30 °C	Vol 10 ul
Yaklaşık 2 dk	

2. 3’ SR Adaptör Bağlama-2

Buzda bekleyen örneklerin üzerine 6,5 µl 3’ Ligation Master Mix eklenmiş ve 25°C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır.

2.	3’ Ligasyon Master Mix	
Reaktif	Miktar	12
3’ Ligation Rxn Buffer	5	60
3’ Ligation Enzyme Mix	1.5	18
Toplam	6.5	78

İnkübasyon 25 °C	
25 °C	1 saat
Lid 30 °C	Vol 10 ul
Yaklaşık 1 saat	

3. Ters Transkripsiyon Primer Hibridizasyonu

100 ng’ye yakın toplam RNA girdileri için, SR RT Primer for Illumina’yı nükleaz içermeyen suda 1:2 oranında seyreltilmiştir (1000 ng input total RNA için seyreltmeye gerek yoktur). 25 °C inkübasyondan alınan örneklerin üzerine 2,8 µl Hybridize the Reverse Transcription Master Mix eklenir ve hibridizasyon programında inkübasyona bırakılır. (Bu adım adaptör-dimer oluşumunu önlemek için önemlidir. SR RT Primer, 3’ ligasyon reaksiyonundan sonra serbest kalan 3’ SR Adaptörünün fazlasına hibritleşir ve ssDNA adaptörünü dsDNA molekülüne dönüştürür. dsDNA’lar, T4 RNA Ligaz 1’in aracılık ettiği ligasyon için substratlar değildir ve bu nedenle sonraki ligasyon adımı 5’ SR Adaptörüne ligasyon yapmazlar).

3.	Ters Transkripsiyon Primer Hibridizasyonu	
Reaktif	Miktar	12
NFW	2.3	27.6
SR RT Primer	0.5	6
Toplam	2.8	33.6

Hibridizasyon	
75 °C	5 dk
37 °C	15 dk
25 °C	15 dk
4 °C	∞
Lid>85 °C	Vol 20 ul
Yaklaşık 35 dk	

4. 5' SR Adaptör Bağlama

5 dakika kala, 5' SR adaptörü 120 µl nükleaz içermeyen suda süspanse edilmiştir. 100 ng'ye yakın toplam RNA girdileri için, 5' SR adaptörü nükleaz içermeyen suda 1:2 oranında seyreltilir (1000 ng input total RNA için seyreltmeye gerek yoktur). 5' SR Adaptöründen örnek sayısından %10 fazla yeni tüpe (0,2 ml) alikotlanmıştır. 70°C'de 2 dakika inkübe edilmiş ve ardından hemen buza yerleştirilmiştir. (Tüpler buz üzerinde tutulur ve 30 dakika içinde kullanılmalıdır). Kalan süspanse edilmiş 5' SR adaptörü alikotlanmış ve -80°C'de saklanmıştır. (Kullanmadan önce alikotlar denatüre edilmelidir. Alikotlar çok fazla don-çöz yapılmayacak miktarlarda bölünmelidir). Buzda bekleyen örneklerin üzerine 2,3 µl Ligate the 5' SR Adaptör Mix eklenmiş ve 25°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ardından buza alınmıştır.

4.	5' SR Adaptör	
Reaktif	Miktar	12
5' SR Adaptör	0.5	6
Toplam	0.5	6

İnkübasyon 70 °C	
70 °C	2 dk
Lid 100 °C	Vol 10 ul
Yaklaşık 2 dk	

4.	5' SR Adaptör Mix	
Reaktif	Miktar	12
5' SR Adaptör (Denatured)	0.5	6
5' Ligation Rxn Buffer (10X)	0.5	6
5' Ligation Enzyme Mix	1.3	15.6
Toplam	2.3	27.6

İnkübasyon 25 °C	
25 °C	1 saat
Lid 30 °C	Vol 30 ul
Yaklaşık 1 saat	

5. Ters Transkripsiyon

Buzda bekleyen 30 µl örneklerin üzerine 5 µl Reverse Transcription Mix eklenmiş ve 50 °C’de 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra, PCR amplifikasyon basamağına geçilmiştir (PCR amplifikasyon basamağına devam edilmesi planlanmıyor ise, RT reaksiyonu 70°C’de 15 dakika ısıtarak inaktive edilir ve numuneler –15°C ile –25°C arasında güvenle saklanabilir.)

5.	Ters Transkripsiyon Mix	
Reaktif	Miktar	12
First Strand Synthesis Rxn	4	48
Murine RNase Inhibitor	0.5	6
ProtoScript II Rev. Trans.	0.5	6
Toplam	5	60

İnkübasyon 50 °C	
50 °C	1 saat
Lid 100 °C	Vol 20 ul
Yaklaşık 1 saat	

6. PCR Amplifikasyonu

Örneklerin (20 µl) üzerine 30 µl PCR Amplification Master Mix eklenir, thermal cycler’a yerleştirilir ve PCR programı başlatılır.

*Illumina Set 1 için NEBNext Multiplex Küçük RNA Kitaplığı Hazırlık Seti, her biri farklı bir indekse sahip 1–12 PCR primeri, Set 2 23–24 PCR primeri, kit indeks primerleri 1–48 PCR primeri içerir. Her reaksiyon için, PCR adımı sırasında 12 PCR primer indeksinden sadece biri kullanılır.

**Amplifikasyon koşulları, RNA input miktarına, dokuya ve türe göre değişiklik gösterebilir.

6.	PCR Amplifikasyon Master Mix	
Reaktif	Miktar	12
LongAmp Taq 2X M.Mix	25	300
SR Primer	1.25	15
Index Primer*	1.25	-
NFW	2.5	30
Toplam	30	345

PCR		
94 °C	30 sn	x10-12**
94 °C	15 sn	
62 °C	20 sn	
70 °C	15 sn	
70 °C	5 dk	
4 °C	∞	
Lid 100 °C	Vol 50 ul	
Yaklaşık 20-25 dk		

7. Monarch PCR ve DNA Saflaştırılması

Monarch PCR ve DNA kiti kullanılarak PCR'da çoğaltılan cDNA

Örnekler aşağıdaki Çizelgede belirtilen 7:1 miktarına göre önceden izopropanol eklenmiş DNA Cleanup Binding Buffer ile birleştirilerek alt-üst edilerek ya da pipetaj ile karıştırılmıştır (Ancak vorteks yapılmaz).

20–100 µl'lik bir başlangıç numune hacmi önerilir. Daha küçük numune hacimleri için TE eklenerek hacim arttırılabilir. 800 µl'den büyük hacimler için (Örnek+DNA Cleanup Binding Buffer) part part yükleme ve santrifüj yapılır.

Örnek+DNA Cleanup Binding Buffer kolona yüklenir ve 16,000 x g'de 1 dk santrifüj edilir. Tüm hacim bitene kadar bu işlem tekrarlanabilir. Kolonun altı dökülür ve kolona 200 µl DNA Wash Buffer eklenir, 16,000 x g'de 1 dk santrifüj edilir. Bu işlem bir kez daha tekrarlanır.

Kolon yeni 1,5 ml'lik tüp üzerine yerleştirilir. Üzerine 27,5 µl DNA Elution Buffer eklenir ve 1 dk inkübe edilir, ardından 16,000 x g'de 1 dk santrifüj edilir.

8. Kalite Kontrol

Boyut seçimini gerçekleştirmek için birkaç farklı yöntem vardır. Bioanalyzer kullanılarak kütüphanenin QC kontrolüne dayalı olarak uygun yöntemin seçilmesi önerilir. AMPure XP Beads kullanılarak boyut seçimi, küçük parçaları çıkarmaz. QC kontrolü yaparsanız ve numuneniz Adaptör dimer (127 bp pik) veya aşırı primer (70-80 bp) içeriyorsa, boyut seçimi için jel veya Pippin Prep kullanılması önerilir.

8.1. AMPure XP Bead Kullanarak Kalite Kontrolü ve Boyut Seçimi

AMPure XP Bead ile boyutu seçimi, yalnızca Bioanalyzer'da hiçbir primer dimer ve adaptör dimer göstermeyen numuneler için önerilir. 150 bp'den büyük piklerin çıkarılması uygun olacaktır. 150 bp'den daha büyük fragmanlar bolsa, yüksek molekül ağırlıklı fragmanları tamamen ortadan kaldırmak için iki boncuk boyutu seçimi turu gerekli olabilir. Monarch PCR & DNA Kiti kullanarak PCR ile güçlendirilmiş cDNA (100 µl) prüfiye edilir. 7:1 binding buffer:örnek oranını kullanılır. Her santrifüj adımından sonra kolon altı atılır. Prüfiye edilmiş DNA 27,5 µl NFW ile elute edilir.

Boyut seçimini gerçekleştirmeden önce ürünlerin QC'sinin yapılması önerilir. 1 µl saflaştırılmış PCR ürünü DNA 1000 çipi'e yüklenir. Saflaştırılmış PCR reaksiyonuna (25 µl), 32,5 µl (1,3X) yeniden süspanse edilmiş AMPure XP boncukları eklenir ve bir vorteks karıştırıcı üzerinde veya en az 10 kez yukarı ve aşağı pipetleme yaparak iyice

karıştırılır. Oda ısısında 5 dakika inkübe edilir. Tüp manyetik standa alınır, berraklaşana kadar beklenir. Süpernatant (57,5 µl) dikkatlice yeni bir tüpe aktarılır. Süpernatanı atılmaz, büyük DNA parçalarını içeren boncukları atılır. Süpernatanta (57,5 µl) 92,5 µl (3,7X) AMPure XP Bead eklenir, iyice karıştırılır ve oda ısısında 5 dakika inkübe edilir. Tüp manyetik standa alınır, berraklaşana kadar beklenir. Süpernatant dikkatlice çekilip atılır (boncukları atılmaz). Manyetik Standta bekleyen boncuklara 200 µl %80'lik EtOH ile 2 kez 30 saniye alkol yıkaması yapılır. Tüplere spin atılır ve manyetik standa geri alınır kalan alkol çekilip atılır ve alkolün uçması için 10 dakika kadar kurumaya bırakılır. Boncukları fazla kurutulmamalıdır, bu DNA hedefinin daha düşük geri kazanımıyla sonuçlanabilir. Boncuklar hala koyu kahverengi ve parlak görüldüğünde, fakat tüm görünür sıvı buharlaştığında boncuklar 15 µl NFW ile elute edilir. Boncuklar daha açık kahverengiye dönüp çatlamaya başladıklarında çok kurudurlar. Bead'ler vorteks ya da pipetaj ile iyice çözündürülür 2 dakika inkübasyona bırakılır ve manyetik standa alınır. Süpernatant yeni 0,2 ml PCR tüpüne aktarılır. 1 µl örnek High Sensitivity chip'e yüklenir ve small RNA kitaplığının pik dağılımını ve konsantrasyonunu kontrol edilir.

Kütüphaneler, Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) kullanılarak kantitatif hale getirilmiş ve her indeks etiketli örneğin eşit molar miktarlarda bulunacağı şekilde birleştirilmiş ve havuzlanmıştır. Havuzlanan örnekler, Illumina NextSeq 550 Sistemi kullanılarak 2x101 paired-end formatında küme oluşturma ve dizileme işlemine tabi tutulmuştur. Oluşturulan dosyalar, her örnek için FASTQ formatında nükleotid dizisini içermektedir. Paired-end deneylerde okumalar genellikle iki sıralı dosya üzerinde bölünmüş, biri ilk ucu ve diğeri ikinci ucu içermektedir. Ham dizilim dosyaları (FASTQ formatı), FastQC yazılımı (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) kullanılarak kalite kontrol analizine tabi tutulmuştur. Bu yazılım, dizi kalite kontrolü, dizi GC içeriği ve dizi uzunluk dağılımı gibi dizi hakkında bilgi içeren kolay grafik çıktılar sağlamaktadır.

3.4.4. Dizileme ve miRNA Miktar Tespiti

miRNA miktar tespiti, küçük RNA okumalarını miRBase'de listelenen türlerin bilinen miRNA veritabanına hizalayan miRDeep2'nin Quant modülü (Friedländer ve ark., 2012) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her ne kadar miRBase veritabanında *B. juncea*'ya ait bilinen miRNA'lar bulunmasa da (sürüm 22.1, Kozomara ve ark., 2019),

Brassica napus, *Brassica oleracea* ve *Brassica rapa* dâhil olmak üzere diğer Brassicaceae (hardal ailesi) üyelerinden miRNA'lar bu veritabanına dâhil edilmiştir. Bu nedenle, *B. juncea* ile birlikte bu *Brassica* türlerin referans genomları Ensembl Plant veritabanından indirilmiştir (sürüm 58) ve ön işlenmiş okumalar Bowtie1 (sürüm 1.3.1, Langmead ve ark., 2009) kullanılarak bu genomlara hizalanmış ve hizalama işlemi sırasında, okuma başına maksimum bir uyumsuzluğa izin verilmiştir. Aynı dizilere sahip okumalar, tekrarlamayı ortadan kaldırmak ve miRNA miktar tespitinin doğruluğunu arttırmak için birleştirilmiştir. quantifier.pl modülü, birleştirilen (eşsiz) okumaları *B. napus*'un bilinen olgun miRNA'larına atayarak miRNA ifadelerini ham sayılar biçiminde hesaplamak için kullanılmıştır.

3.4.5. Diferansiyel İfade Analizi

Karşılaştırılan örnekler arasında diferansiyel olarak ifade edilmiş miRNA'ların (DEM'ler) tespiti, kat değişimi (FC) hesaplamasına dayanmaktadır. PCA (Temel Bileşen Analizi), ggplot2 R paketi (versiyon 3.4.2) (Wickham, 2016) ile aykırı değerlerin varlığını değerlendirmek için tüm örnekler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCA analizi yapılmadan önce miRNA verileri, ortalama merkezleme ve birim standart sapmaya ölçeklendirme gibi işlemlerle normalize edilmiştir. Bu, verilerin karşılaştırılabilir ve analiz edilebilir olmasını sağlanmıştır. Ham okuma sayıların normalize edilmesi DESeq2 R paketi (sürüm 1.34.0) ile gerçekleştirilmiştir (Love ve ark., 2014). DESeq2 ile normalleştirmeden önce, karşılaştırılan tüm numuneler için sıfır olan miRNA'lar hesaplamaadan çıkartılmıştır. miRNA'ların kat değişim değerleri, tüm karşılaştırmalar için ayrı ayrı normalleştirilmiş sayım değerleri ile hesaplanmıştır. Farklı olarak ifade edilmiş miRNA'lar, FC değerleri kullanılarak belirlenmiştir. Bu işlem gerçekleştirilirken, karşılaştırılan iki örnekte ortalama normalleştirilmiş ifade değeri 3'ten küçük olan miRNA'lar çıkartılmıştır. FC değeri >1.2 olan miRNA'lar yukarı regüle edilmiş olarak; FC değeri <1/1.2 olan miRNA'lar aşağı regüle edilmiş olarak kabul edilmiştir.

3.4.6. Fonksiyonel Zenginleştirme Analizi

Fonksiyonel zenginleştirme analizi için, diferansiyel olarak ifade edilmiş miRNA'ların hedef genleri, varsayılan parametreler ile psRNATarget aracı kullanılarak tahmin edilmiştir (2017 güncellemesi, Xinbin ve ark., 2018). miRNA'ların hedef genleri için zenginleştirilmiş Gen Ontolojisi (GO) ve Kyoto Genomlar ve Genler Ansiklopedisi (KEGG) yollarını hipergeometrik test kullanılarak tanımlamak için fonksiyonel zenginleştirme analizi gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı terimleri p-değeri eşiği 0.01'e göre filtrelemek için Benjamini-Hochberg düzeltme (FDR) yöntemi kullanılmıştır. Zenginleştirme analizi ayrı ayrı (i) tüm miRNA-hedef genleri (EnrichmentAll), (ii) yukarı regüle edilmiş miRNA-hedef genleri (EnrichmentUp) ve (iii) aşağı regüle edilmiş miRNA-hedef genleri (EnrichmentDown) kullanılarak uygulanmıştır. Ayrıca, her bir zenginleştirme kaynağından (GO:BP (Biyolojik Süreç), GO:CC (Hücresel Bileşen), GO:MF (Moleküler Fonksiyon), KEGG) ayarlanan p-değerine göre belirlenen en önemli 10 terimi temsil eden kabarcık grafikleri, ggplot2 R paketi (sürüm 3.4.2) kullanılarak oluşturulmuştur (Wickham, 2016).

3.4.7. Ters Transkripsiyon – Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi ve Kontrolü

RNA dizilemeden sonra, izole edilen total RNA'lar Biorad iScript cDNA sentez kiti kullanılarak DNA komplementleri sentezlenmiştir. cDNA sentezi, iScript cDNA sentez kiti içerisinde mevcut olan tampon ve enzimler ilave edilerek gerçekleştirilmiştir. 4 µl 5X iScript reaction mix, 1 µl iScript reverse transcriptase, 1-5 µl RNA template ve toplam hacim 20 µl olacak şekilde nuclease-free su ilave edilen karışım hafifçe çalkalandıktan sonra santrifüjlenmiştir (Cevher-Keskin ve ark., 2019; Meraklı ve ark., 2022; Meraklı ve Memon, 2023a, 2023b).

Çizelge 3.2. Real time qPCR çalışmaları için tasarlanan primerlere ait diziler

Gene ID	Primer Sequence (5'-3')
Brassica juncea-BjUBQ9-F	GAAGACATGTTTCATTGGCA
BjUBQ9-R	ACACCTTAGTCCTAAAAGCCACCT
Brassica juncea-BjuRBOH-F	ACGGGGTGTGATAGAGATGC
BjuRBOH-R	TTTTTCCAGTTGGGTCTTGC
Brassica juncea-BjuFSD-F	TAGCTGTTTCTGGTGTGTCAGA
BjuFSD-R	GTAGCACAACCTCTTCCAATGAC
Brassica rapa-BraAPX-F	ATGACGAAGAACTACCCAGCTGTTA
BraAPX-R	TTAAGCATCAGCAAACCCGAGCTCA

Çizelge 3.3. cDNA uygulamasındaki sıcaklık ve inkübasyon süreleri

cDNA Reaksiyon Protokolü: Sıcaklık ve İnkübasyon süreleri	
Priming aşaması	25 °C'de 5 dk;
Reverse transcription aşaması	20 °C'de 46 dk;
RT inactivation	95 °C'de 1 dk
Optimal step	4 °C'de bekletilerek gerçekleştirilmiştir

3.4.8. Primer Tasarımı ve Gerçek Zamanlı qPCR (Real Time qPCR)

Çizelge 3.2'de belirtildiği gibi, RT-qPCR için seçilen genlere uygun primerler *B. juncea* (AABB) ve yakın ilişkili *B. rapa* (AA) gen dizilerine uygun olarak NCBI Primer-BLAST programı kullanılarak tasarlanmıştır (Koressaar ve Remm, 2007; Untergrasser ve ark., 2012). Kullanılan primerler, GC içeriğinin %45-55 arasında olmasına ve erime sıcaklığına (55-60°C) dikkat edilerek tasarlanmıştır. RT-qPCR'ler, Maxima SYBR Green RT-qPCR Master mix (Thermo Scientific) kullanılarak prosedürüne uygun bir şekilde LightCycler® 480'de (Roche, Almanya) gerçekleştirilmiştir (Memon ve ark., 2019). RT-qPCR için hazırlanan karışımın bileşimi Çizelge 3.4'te verilmiştir. Ayrıca, reaksiyonlar için izlenen qRT-PCR koşulları Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. RT-qPCR uygulamasında kullanılan bileşenler ve reaksiyon miktarları

RT-qPCR Reaksiyon Protokolü: 20 ul reaksiyon için	
iTaq universal SYBER Green reaction mix (2x)	10 ul
iScript reverse transcriptase	0.25 ul
Forward ve reverse primerler	Değişken
cDNA	Değişken
Nuclease-free H ₂ O	Değişken
Total hacim	20 ul

Çizelge 3.5. RT-PCR uygulaması için PCR cihazında kurulan program

Real-Time PCR Sistemi	Ayarlar/Ekran Modu	Reverse transkripsiyon Reaksiyonu	Polimeraz aktivasyonu ve DNA denatürasyonu	Amplifikasyon			Melt-Curve Analiz
				95 °C Denatürasyon	Bağlanma/ Uzama+ 60 °C** Plate okuma	Döngüler	
Roche LightCycler® 480	Hızlı	50 °C 10 dk	95 °C 1 dk	10 sn	10-30 sn	35-40	60-95 °C 0.5 °C’lik artış 2-5 sn/basamak (veya cihazın varsayılan ayarını kullanın)
	Standart				15-30 sn		
				60 sn			
				10-30 sn			
				60 sn			
				15 sn	30 sn		

3.5. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada yapılan tüm denemelerde, her örnek için kendi içinde 3 tekrarı olan 3 farklı deney kurulmuştur. Metal tayini verileri, istatistiksel analiz yazılımı Minitab-17'de GLM kullanılarak varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Elde edilen tüm ölçümler arasındaki önemli farklılıklar ($p < 0.001$) Tukey'in çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlenmiştir. Büyüme parametreleri için, kontrol ile karşılaştırıldığında farklı Cr uygulanan her bir tür için ölçülen fizyolojik özelliklerin her birindeki yüzde değişimleri (üç tekerrür dayalı olarak) MS Excel 2010 kullanılarak hesaplanmıştır.

Göreceli ekspresyon oranını hesaplamak için Delta-delta metodu ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) kullanılarak referans gen Ubiquitin ile her bir örnek için değerler hesaplanmıştır. RT-qPCR’de hedef ve referans genlerin ifade düzeyleri ve iki uygulama için ortalamaların ortalama hataları MS 365 Excel (sürüm 2409) programı kullanılarak hesaplanmıştır.



4. SONUÇLAR

4.1. Bitkide Biriken Ağır Metal Miktarı

B. juncea var. JS-13, Early raya, Sindh raya, S-9, Ganj sarhen ve THB-81 varyetelerinin vermikülit ortamda farklı CrCl_3 çözeltisi iki hafta (15 gün) boyunca uygulanmıştır (Şekil 4.1; 4.2; 4.3; 4.4; 4.5; 4.6). Bu süre sonunda, *B. juncea* varyetelerinin kontrol bitkileri ile farklı konsantrasyonlarda Cr-uygulanan deney bitkileri arasında morfolojik olarak olumsuz herhangi bir semptom gözlenmemiştir (Şekil.4.1-4.6). *B. juncea* varyeteleri, farklı krom seviyesine maruz bırakıldığında, tohum çimlenmesi açısından farklı tepkiler göstermiştir (Çizelge 4.1). Sonuçlar, düşük krom konsantrasyonunun (0–200 μM) tohum çimlenmesini etkilemediğini; ancak, 500 ve 1000 μM Cr’de yetiştirilen S-9, Sindh raya düşük çimlenme yüzdesi kaydedildiğini göstermiştir. Besin çözeltisinde 500 ve 1000 μM krom seviyelerinde çimlenme tepkileri açısından önemli bir farklılık gözlemlenmiştir. Genellikle *B. juncea* varyetelerinde maksimum çimlenme oranı, kontrol grubunda ve 10 μM kromda gözlemlenmiştir. Early raya, test edilen tüm krom konsantrasyonlarında verimli bir şekilde büyümüştür. Sindh raya ve S-9 tohumları, kontrol grubunda ve daha düşük Cr konsantrasyonlarında (10-100 μM) normal kök ve toprak üstü kısımlarla çimlenmiştir. Test edilen altı varyete arasında, Early raya, artan Cr konsantrasyonlarında dahi yüksek çimlenme oranı (%90-98) göstermiştir. Benzer şekilde, varyeteler arasında, THB-81 ve Ganj sarhen bitkilerinin çimlenmesi de yüksektir; ancak, bu bitkilerin yüksek Cr konsantrasyonlarında (200-1000 μM ’ye kadar olan konsantrasyonlarda) çimlenme oranlarında belirgin bir azalma gözlemlenmiştir. Sindh raya ve S-9 bitkileri, diğer varyetelere kıyasla daha düşük çimlenme oranı göstermiştir. Ayrıca, bu varyeteler de artan Cr konsantrasyonlarında (100-1000 μM ’ye kadar olan konsantrasyonlarda) çimlenme yüzdesinde azalma belirlenmiştir.

İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulamasına tabi tutulan *B. juncea* JS-13, Early raya, Sindh raya, S-9, Ganj sarhen ve THB-81 varyetelerine ait bitkilerin kontrol ve ağır metal uygulanan deney gruplarına ait kök, gövde ve yaprak kısımlarının görünimleri ve bitki büyümesi üzerindeki etkileri Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.’da verilmiştir. *B. juncea* varyeteleri iki haftalık (15 günlük) Cr uygulamasından sonra

hasat edilmiş ve Cr konsantrasyonlarının bitki morfolojisi üzerindeki etkileri Çizelge 4.1’de listelenmiştir.

Bitki boyu, bitkilerin strese ne kadar iyi adapte olduklarının görsel bir göstergesidir. Bitkilerin boyundaki değişiklikler, strese karşı verdikleri fizyolojik ve biyokimyasal tepkileri yansıtmaktadır. Bu nedenle, stres adaptasyonu çalışmalarında önemli bir parametre olarak değerlendirilmektedir. *B. juncea*, Early raya, S-9, JS-13, Ganj sarhen, Sindh raya ve THB-81 bitkileri Cr-yanıtta farklılıklar göstermiştir. Cr-uygulanan bitkilerde (10 μ M’den 1000 μ M’ye kadar olan konsantrasyonlarda) kök ve boy uzunlukları kontrol bitkileri (0 μ M) ile karşılaştırılabilir düzeydeydi. Genel olarak, Early raya, JS-13, Ganj sarhen, Sindh raya ve THB-81 bitkilerinin boyları, kontrol grubuna kıyasla Cr stresi sonrası artış göstermiştir. Bu bitkilerin kök ve boy uzunlukları, yüksek Cr konsantrasyonundaki (500 ve 1000 μ M konsantrasyonlarda) artışla birlikte kademeli olarak azalmıştır. Ancak, 1000 μ M Cr-uygulanan bitkilerde belirgin bir şekilde en kısa kök ve boy uzunluklarına sahip oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.1-4.6). Bu da yüksek Cr konsantrasyonunun (1000 μ M) bitki kök büyümesini engellediğini göstermektedir. Ayrıca, yüksek Cr konsantrasyonları, düşük konsantrasyon sonuçları ile karşılaştırıldığında bitki büyümesinde ciddi bir gerileme gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, S-9 bitkilerinde yüksek Cr konsantrasyonlarında (10-1000 μ M’ye kadar olan konsantrasyonlarda) belirgin bir artış gözlenmiştir. Ancak, Sindh raya, aynı Cr stresine maruz kaldığında diğer *B. juncea* varyetelerine göre daha hassas bir fenotip göstermiştir; bu durum, Sindh raya varyetesinde bitki büyümesinin ve bitki boyunun daha bodur (önemli ölçüde azalma) olmasıyla açıklanabilir.



Şekil 4.1. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan *B. juncea* var. Early raya bitkilerinin genel görünüm



Şekil 4.2. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan *B. juncea* var. Sindh raya bitkilerinin genel görünümü



Şekil 4.3. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan *B. juncea* var. Ganj sarhen bitkilerinin genel görünümü



Şekil 4.4. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan *B. juncea* var. JS-13 bitkilerinin genel görünümü



Şekil 4.5. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan *B. juncea* var. THB-81 bitkilerinin genel görünümü



Şekil 4.6. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan *B. juncea* var. S-9 bitkilerinin genel görünümü

Cr uygulamaları, *B. juncea* varyetelerinin biyokütlesinde (yaş ve kuru ağırlık) önemli ölçüde farklılıklara neden olmuştur. Boy ve kök uzunluğu açısından, incelenen Cr uygulamalarında benzer sonuçlar gözlemlenmiştir. Çizelge 4.1'deki veriler, farklı Cr seviyelerine yanıt olarak köklerin ve toprak üstü kısımların yaş ve kuru ağırlığını göstermektedir. THB-81, Ganj sarhen, Early raya ve JS-13 bitkilerinin yaş ve kuru ağırlıklarındaki artış Cr konsantrasyonuna bağlı olarak belirgin bir şekilde artış göstermiş

ve ayrıca bu varyetelerin yüksek biyokütle ürettikleri saptanmıştır (Çizelge 4.1). Artan Cr konsantrasyonları ile sırasıyla THB-81, Ganj sarhen ve Early raya bitkilerinin kökleri ve toprak üstü kısımlarının yaş ve kuru ağırlıkları en yüksek miktarı göstermiş ve bu varyetelerin en yüksek biyokütle ürettikleri kaydedilmiştir. Bunun yanı sıra, Cr uygulanan Sindh raya bitkilerinin (10 μ M'den 100 μ M'ye kadar olan konsantrasyonlarda) kontrol grubuna kıyasla yaş ve kuru ağırlıklarında artış gözlenmiştir; ancak, Cr konsantrasyonundaki artışla birlikte (200 μ M'den 1000 μ M'ye kadar olan konsantrasyonlarda) kademeli bir azalma göstermiştir. Dahası, Sindh raya bitkilerinin oldukça düşük bir biyokütle üretmesi nedeniyle yaş ve kuru ağırlıkları da THB-81, Ganj sarhen, Early raya ve JS-13 bitkilerinininkine nazaran önemli ölçüde düşük olduğu saptanmıştır. Sindh raya ve S-9, artan Cr konsantrasyonları ile birlikte en düşük biyokütle üreten varyeteler olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulamasının *B. juncea*, JS-13, Early raya, Sindh raya, S-9, Ganj sarhen ve THB-81 varyetelerine ait çimlenme oranı, bitkilerin kök uzunlukları, boy uzunlukları, yaş ağırlıkları ve kuru ağırlıkları

Early raya-Konsantrasyon	Çimlenme oranı (%) Ort±std	Kök uzunluğu Ort±std (cm)	Tüm bitki uzunluk Ort±std (cm)	Kök Yaş ağırlık Ort±std (g)	Kök Kuru ağırlık (g)	G+Y Yaş ağırlık Ort±std (g)	G+Y Kuru ağırlık (g)
0 μ M (Kontrol)	98.00±0.80	11.92±0.14	22.84±0.35	12.13±0.79	1.25	36.00±0.38	4.06
10 μ M	96.50±0.92	12.12±0.07	23.12±0.16	12.73±0.60	1.30	36.20±0.15	4.10
50 μ M	93.67±0.44	12.22±0.03	23.40±0.13	14.41±0.61	1.51	37.95±0.47	4.35
100 μ M	94.50±0.79	13.00±0.09	24.08±0.04	16.75±0.50	1.72	39.10±0.72	4.48
200 μ M	95.00±0.40	13.08±0.11	25.02±0.07	17.07±0.59	1.75	39.50±0.70	4.52
500 μ M	96.67±0.68	12.96±0.07	22.52±0.08	17.94±0.41	1.86	40.15±0.37	4.67
1000 μ M	90.33±1.11	11.58±0.10	21.58±0.11	20.73±0.25	2.10	39.28±0.76	4.40

Sindh raya-Konsantrasyon	Çimlenme oranı (%) Ort±std	Kök uzunluğu Ort±std (cm)	Tüm bitki uzunluk Ort±std (cm)	Kök Yaş ağırlık Ort±std (g)	Kök Kuru ağırlık (g)	G+Y Yaş ağırlık Ort±std (g)	G+Y Kuru ağırlık (g)
0 μ M (Kontrol)	88.67±1.98	10.80±0.08	19.88±0.45	5.01±0.10	0.70	23.34±0.89	2.45
10 μ M	81.00±0.72	10.87±0.11	20.02±0.16	5.35±0.11	0.60	23.61±0.71	2.48
50 μ M	74.50±0.94	11.80±0.06	20.81±0.18	6.14±0.06	0.55	23.69±0.31	2.50
100 μ M	72.50±0.92	12.27±0.12	21.13±0.20	7.41±0.12	0.49	24.36±0.34	2.63
200 μ M	68.67±2.10	10.49±0.04	19.83±0.10	4.79±0.04	0.47	22.85±0.24	2.36
500 μ M	63.33±2.12	10.29±0.07	19.65±0.09	4.33±0.07	0.43	22.10±0.32	2.25
1000 μ M	59.00±1.44	9.28±0.19	18.81±0.25	4.07±0.19	0.39	20.07±0.68	1.98

THB-81-Konsantrasyon	Çimlenme oranı (%) Ort±std	Kök uzunluğu Ort±std (cm)	Tüm bitki uzunluk Ort±std (cm)	Kök Yaş ağırlık Ort±std (g)	Kök Kuru ağırlık (g)	G+Y Yaş ağırlık Ort±std (g)	G+Y Kuru ağırlık (g)
0 μ M (Kontrol)	95.00±1.34	9.60±0.06	21.00±0.16	9.15±0.53	0.92	45.68±0.20	4.72
10 μ M	92.00±0.55	11.84±0.07	21.88±0.11	9.80±0.40	0.98	45.96±0.60	4.75
50 μ M	89.00±0.43	12.48±0.09	23.52±0.22	9.95±0.95	1.02	47.90±0.25	4.84
100 μ M	86.67±0.53	13.72±0.18	24.89±0.24	10.50±0.93	1.10	48.35±0.22	4.92
200 μ M	82.00±1.12	14.64±0.09	27.32±0.15	11.28±0.97	1.20	48.60±0.93	4.95
500 μ M	79.50±1.17	13.52±0.13	24.44±0.10	8.45±1.02	0.87	45.00±0.34	4.66
1000 μ M	75.00±0.91	9.44±0.11	19.92±0.19	7.78±1.09	0.80	34.93±0.40	3.55

Ganj sarhen-Konstrasyon	Çimlenme oranı (%) Ort±std	Kök uzunluğu Ort±std (cm)	Tüm bitki uzunluk Ort±std (cm)	Kök Yaş ağırlık Ort±std (g)	Kök Kuru ağırlık (g)	G+Y Yaş ağırlık Ort±std (g)	G+Y Kuru ağırlık (g)
0 µM (Kontrol)	97.00±0.87	11.54±0.21	23.00±0.20	7.30±0.08	0.70	37.15±0.89	3.82
10 µM	94.50±0.95	11.50±0.27	21.96±0.10	7.46±0.11	0.75	37.70±0.71	3.90
50 µM	90.67±1.06	10.58±0.10	21.88±0.19	9.56±0.06	0.96	39.15±0.31	4.14
100 µM	85.00±1.38	10.55±0.11	20.41±0.13	9.85±0.12	1.00	43.05±0.34	4.43
200 µM	79.00±1.11	10.50±0.13	20.21±0.11	10.03±0.04	1.03	46.20±0.24	4.75
500 µM	75.50±1.51	10.45±0.18	19.82±0.16	10.39±0.07	1.15	48.42±0.32	4.92
1000 µM	70.00±1.44	9.73±0.28	18.28±0.09	9.24±0.19	0.95	44.40±0.68	4.55

JS-13-Konstrasyon	Çimlenme oranı (%) Ort±std	Kök uzunluğu Ort±std (cm)	Tüm bitki uzunluk Ort±std (cm)	Kök Yaş ağırlık Ort±std (g)	Kök Kuru ağırlık (g)	G+Y Yaş ağırlık Ort±std (g)	G+Y Kuru ağırlık (g)
0 µM (Kontrol)	94.50±1.49	16.32±0.21	25.92±0.14	8.58±0.47	0.90	26.46±1.40	2.76
10 µM	92.00±0.64	16.28±0.17	25.15±0.13	9.57±0.66	1.03	29.97±0.72	3.12
50 µM	89.50±0.72	15.12±0.16	24.73±0.14	10.45±0.77	1.12	31.50±0.51	3.26
100 µM	85.00±0.97	12.60±0.11	23.60±0.18	13.06±0.30	1.38	32.75±0.78	3.38
200 µM	80.67±1.18	11.64±0.22	22.88±0.60	14.20±0.28	1.48	34.26±1.14	3.54
500 µM	76.33±0.99	11.04±0.11	22.56±0.13	15.58±0.60	1.61	37.75±0.67	3.89
1000 µM	74.00±1.46	10.48±0.12	16.80±0.13	17.74±0.19	1.85	35.46±0.66	3.65

S-9-Konstrasyon	Çimlenme oranı (%) Ort±std	Kök uzunluğu Ort±std (cm)	Tüm bitki uzunluk Ort±std (cm)	Kök Yaş ağırlık Ort±std (g)	Kök Kuru ağırlık (g)	G+Y Yaş ağırlık Ort±std (g)	G+Y Kuru ağırlık (g)
0 µM (Kontrol)	87.00±1.78	7.92±0.16	15.76±0.34	3.90±0.24	0.40	15.21±0.54	1.58
10 µM	84.00±1.48	8.62±0.13	15.86±0.16	4.10±0.19	0.42	16.54±0.22	1.70
50 µM	82.50±1.57	10.27±0.29	18.25±0.28	4.88±0.33	0.51	18.99±0.30	1.92
100 µM	80.00±2.05	11.30±0.11	18.87±0.24	6.64±0.17	0.70	21.95±0.23	2.20
200 µM	75.00±3.98	11.84±0.19	18.90±0.19	7.54±0.14	0.77	22.74±0.32	2.31
500 µM	70.33±2.07	11.91±0.12	20.06±0.91	8.42±0.10	0.86	23.20±0.73	2.35
1000 µM	65.67±2.24	10.68±0.19	19.91±0.73	8.69±0.32	0.93	18.67±0.42	1.90

İki hafta (15 gün) boyunca *B. juncea*, JS-13, Early raya, Sindh raya, S-9, Ganj sarhen ve THB-81 bitkilerinin kök, gövde ve yaprak kısımlarında biriken ağır metal miktarları (mg kg⁻¹KA) (± değerler standart sapmayı göstermektedir) Çizelge 4.2’de verilmiştir. Ayrıca, elde edilen sonuçların bitki çeşitleri arasında karşılaştırılmasının SPSS analiz değerlendirmesi Çizelge 4.2’de belirtilmiştir.

Çizelge 4.2. İki hafta (15 gün) boyunca farklı konsantrasyonlarda CrCl₃ çözeltisi uygulanan *B. juncea*, JS-13, Early raya, Sindh raya, S-9, Ganj sarhen ve THB-81 bitkilerinin kök, gövde ve yapraklarında biriken ağır metal miktarları (mg kg⁻¹KA) (± değerler standart sapmayı göstermektedir).

<i>B.juncea</i> var	O	G	N	Cr	Fe	Ca	K	Mg	Zn	Cu
Early raya	Yaprak	0	3	0.11±0.02f	5.40±0.08f	954.39±0.15g	819.87±0.17g	207.57±0.86g	8.71±0.28	0.341±0.20
		10	3	0.19±0.01f	5.59±0.04e	1115.88±0.04f	879.44±0.63f	276.58±0.1f	9.04±0.41	0.787±0.43
		50	3	0.91±0.02e	6.83±0.02d	1134.63±0.03e	903.75±0.1e	294.09±0.45e	9.587±0.65	0.802±0.65
		100	3	2.71±0.09d	6.93±0.03d	1177.92±0.13d	963.15±0.3d	298.71±0.83d	10.429±0.97	0.837±0.89
		200	3	5.22±0.08c	7.89±0.03c	1212.54±0.08c	975.69±0.78c	303.11±0.14c	10.666±1.42	0.875±0.97
		500	3	16.01±0.04b	8.57±0.07b	1213.17±0.06b	1109.33±0.69b	306.47±0.31b	10.676±1.88	0.915±1.08
		1000	3	23.93±0.19a	15.32±0.22a	1219.89±0.12a	1155.1±0.2a	357.86±0.58a	12.550±2.89	1.041±1.54
	Kök	0	3	0.13±0.06e	63.88±0.07g	134.89±0.01g	319.31±0.45g	86.13±0.49g	10.249±0.21	1.359±0.63

		10	3	0.43±0.02e	89.62±0.28f	140.93±0.01f	361.63±0.91f	105.50±0.25f	11.424±0.47	1.578±0.98
		50	3	8.31±1.05e	99.61±0.3e	153.10±0.04e	388.88±0.14e	109.39±0.46e	11.597±0.62	1.649±1.42
		100	3	54.62±7.01d	114.95±0.24d	158.93±0.03d	416.2±0.55d	130.53±0.29d	12.312±0.95	1.919±1.79
		200	3	145.31±6.46c	123.69±0.19c	203.85±0.01c	420.66±0.45c	142.95±0.84c	12.317±1.75	2.099±1.97
		500	3	330.42±31.68b	225.54±0.21b	210.70±0.02b	424.85±0.06b	232.78±0.11b	15.660±2.10	2.256±2.36
		1000	3	429.00±15.04a	298.49±0.45a	274.97±0.02a	518.21±0.51a	305.06±0.43a	15.907±2.71	2.347±2.63
	Gövde	0	3	0.02±0.01f	4.36±0.1f	280.14±0.01g	534.49±0.81g	35.59±1.36f	3.578±0.12	0.19±0.20
		10	3	0.2±0.01f	4.84±0.12e	297.36±0.04f	584.16±0.43f	40.38±0.57e	4.933±0.32	0.206±0.46
		50	3	1.87±0.03e	5.99±0.07d	327.09±0.12e	600.82±0.43e	47.57±0.37d	5.566±0.46	0.225±0.54
		100	3	6.80±0.03d	6.39±0.1c	345.19±0.14d	625.37±0.63d	56.55±0.29c	5.927±0.53	0.243±0.35
		200	3	11.29±0.22c	6.52±0.03b	349.88±0.04c	640.89±0.33c	61.61±0.13b	6.312±0.50	0.265±0.48
		500	3	49.05±0.18b	6.54±0.02b	358.84±0.04b	655.81±0.82b	61.78±0.19b	7.121±0.97	0.304±0.62
		1000	3	88.01±0.09a	7.12±0.01a	419.55±0.12a	753.22±0.35a	78.27±0.53a	9.957±1.23	0.355±1.20
<i>B.juncea</i> var	O	G	N	Cr	Fe	Ca	K	Mg	Zn	Cu
Sindh raya	Yaprak	0	3	0.03±0.01g	6.05±0.23e	550.51±0.01g	526.05±0.15f	117.50±0.49g	8.988±0.36	0.841±0.41
		10	3	0.09±0.01f	7.81±0.17d	569.82±0.03f	573.08±1.01e	123.91±0.1f	10.369±0.48	0.892±0.52
		50	3	0.30±0.01e	8.03±0.37d	598.34±0.3e	605.09±1.14d	136.20±0.02e	10.398±0.65	0.907±0.66
		100	3	0.46±0.01d	9.80±0.14c	632.03±0.3d	647.47±0.93c	139.88±0.11d	10.416±0.92	0.909±0.87
		200	3	0.71±0.03c	10.14±0.11bc	658.39±0.07c	718.50±1.38b	143.66±0.67c	10.506±1.02	0.984±1.03
		500	3	2.79±0.01b	10.25±0.21b	721.28±0.16b	718.69±0.1b	147.81±0.16b	10.596±1.25	1.035±1.16
		1000	3	4.03±0.03a	21.62±0.27a	732.81±0.09a	867.13±0.23a	155.49±0.42a	11.670±1.97	1.068±1.54
	Kök	0	3	0.11±0.01g	72.97±0.38g	87.44±0.11g	194.37±0.54g	76.08±0.42g	8.672±0.56	2.185±0.34
		10	3	0.34±0.01f	107.05±0.09f	127.99±0.01f	205.31±0.43f	110.28±0.08f	9.274±0.87	2.268±0.75
		50	3	0.42±0.01e	122.17±0.26e	134.25±0.12e	287.00±0.33e	129.44±0.28e	10.582±1.12	2.398±0.99
		100	3	0.71±0.02d	148.94±0.33d	154.28±0.04d	288.17±0.28d	143.74±0.22d	11.321±1.65	2.862±1.35
		200	3	1.05±0.02c	154.88±0.35c	172.88±0.22c	302.70±0.5e	153.19±0.45c	11.471±1.80	2.872±1.58
		500	3	2.85±0.05b	216.40±0.44b	182.71±0.17b	346.71±0.18b	207.44±0.27b	11.523±2.35	3.048±1.89
		1000	3	7.83±0.05a	259.68±0.73a	188.9±0.02a	370.06±0.91a	257.74±0.14a	11.537±2.80	3.238±2.46
	Gövde	0	3	0.02±0.01f	4.33±0.42f	118.93±0.27g	294.39±0.68f	22.43±0.26g	7.065±0.15	0.212±0.40
		10	3	0.05±0.01e	5.09±0.15e	128.33±0.19f	345.23±1.59e	22.81±0.08f	8.034±0.45	0.222±0.53
		50	3	0.17±0.01d	5.73±0.26d	135.88±0.03e	364.82±0.56d	26.16±0.31e	9.391±0.62	0.223±0.61
		100	3	0.18±0.01d	6.58±0.5c	136.8±0.01d	384.00±0.23c	26.64±0.05d	10.740±0.84	0.24±0.75
		200	3	0.31±0.01c	8.67±0.27b	150.86±0.04c	384.41±0.38c	27.70±0.14c	10.758±0.65	0.293±0.88
		500	3	0.89±0.01b	8.93±0.2b	162.14±0.28b	492.87±0.38b	31.50±0.35b	11.180±1.13	0.298±0.95
		1000	3	1.59±0.01a	10.62±0.55a	181.64±0.01a	613.14±0.41a	33.64±0.1a	12.733±1.87	0.318±0.82
<i>B.juncea</i> var	O	G	N	Cr	Fe	Ca	K	Mg	Zn	Cu
JS-13	Yaprak	0	3	0.03±0.01f	6.89±0.01f	891.36±0.33g	841.21±0.17g	252.26±0.9f	7.489±0.40	0.463±0.14
		10	3	0.25±0.03f	9.78±0.01e	959.31±0.64f	877.70±0.48f	313.71±0.65e	8.608±0.56	0.509±0.33
		50	3	0.76±0.05e	9.78±0.01e	968.87±0.43e	911.81±0.15e	313.83±0.37e	8.848±0.48	0.555±0.52
		100	3	1.09±0.03d	10.2±0.02d	1043.56±0.2d	918.43±0.32d	315.98±0.8d	9.067±0.75	0.68±0.75
		200	3	1.81±0.05c	10.91±0.01c	1054.21±0.21c	997.12±1.45c	321.78±0.64c	9.59±0.88	0.783±0.89
		500	3	9.27±0.29b	11.61±0.01b	1223.11±0.1b	1034.12±0.64b	356.08±0.2b	11.401±1.56	0.814±0.97
		1000	3	14.37±0.17a	11.70±0.02a	1241.67±0.19a	1185.21±0.43a	398.67±0.48a	11.585±2.56	0.858±1.03

	Kök	0	3	0.1±0.02g	160.07±0.08g	208.52±0.09g	374.49±1.07g	169.99±0.85g	8.53±0.32	0.844±0.45
		10	3	0.85±0.02f	166.38±0.1f	222.73±0.11f	385.84±0.11f	198.25±0.55f	9.315±0.50	0.993±0.63
		50	3	2.06±0.04e	305.39±0e	244.96±0.36e	471.36±1.01e	316.86±1.05e	9.849±0.74	1.232±0.81
		100	3	3.61±0.02d	321.31±0.14d	287.9±0.18d	481.23±0.44d	319.80±1.68d	10.325±0.90	1.294±1.32
		200	3	7.94±0.06c	325.57±0.08c	394.58±0.32c	578.02±0.37c	328.37±0.74c	10.462±1.44	1.36±1.68
		500	3	17.05±0.27b	350.94±0.01b	412.6±0.1b	582.14±0.16b	344.00±0.34b	11.328±1.80	1.552±1.97
		1000	3	67.72±0.61a	361.62±0.01	581.68±0.27a	668.00±0.68a	372.99±1.34a	12.409±2.55	1.714±2.60
	Gövde	0	3	0.02±0e	5.45±0.06g	177.85±0.25g	562.93±0.25g	28.68±1.57e	5.189±0.33	0.122±0.34
		10	3	0.13±0.01e	6.88±0.02f	194.51±0.23f	634.26±0.44f	41.92±0.41d	5.855±0.41	0.193±0.53
		50	3	0.33±0.03d	8.80±0.01e	199.61±0.2e	636.73±0.13e	44.78±0.84c	7.835±0.66	0.197±0.67
		100	3	0.38±0.02d	10.53±0.01d	201.71±0.36d	717.00±0.45d	45.30±0.47c	7.921±0.84	0.199±0.88
		200	3	0.83±0.06c	11.19±0.02c	223.31±0.15c	727.21±1.41c	49.35±0.54b	8.611±0.62	0.201±0.96
		500	3	1.69±0.06b	12.98±0.01b	269.57±0.29b	737.81±0.56b	50.16±0.65b	8.93±1.35	0.239±1.23
		1000	3	4.58±0.25a	15.54±0.02a	295.22±0.59a	758.67±0.23a	52.56±0.77a	10.559±2.03	0.267±1.05
B.junceae var	O	G	N	Cr	Fe	Ca	K	Mg	Zn	Cu
S-9	Yaprak	0	3	0.02±0.01f	3.99±0.01g	367.21±0.71g	370.15±0.48g	63.91±0.24g	5.088±0.53	0.432±0.36
		10	3	0.07±0.02f	4.17±0.05f	384.26±0.1f	388.29±0.27f	67.19±0.33f	6.037±0.70	0.719±0.58
		50	3	0.31±0.03e	5.53±0.02e	513.75±0.13e	555.34±0.72e	98.14±0.65e	7.635±0.88	1.113±0.79
		100	3	0.59±0.03d	6.73±0.03d	585.18±0.28d	557.56±0.75d	123.43±0.47d	7.683±1.20	1.293±0.64
		200	3	1.36±0.13c	7.80±0.01c	673.31±0.09c	567.46±0.43c	133.84±0.09c	8.634±1.45	1.393±0.95
		500	3	1.88±0.02b	8.45±0.02b	700.69±0.19b	631.41±0.46b	165.52±0.13b	9.859±1.70	1.587±1.26
		1000	3	4.21±0.22a	8.81±0a	708.41±0.51a	642.14±0.43a	174.18±0.94a	11.743±2.94	1.889±1.84
	Kök	0	3	0.06±0.01e	19.88±0.09g	48.2±1.11g	152.31±0.45g	25.65±0.2g	9.364±0.32	1.508±0.52
		10	3	0.17±0.02cd	50.98±0.02f	67.23±0.22f	165.79±0.2f	59.86±0.12f	9.516±0.75	1.906±0.87
		50	3	0.38±0.05cd	78.23±0.1e	71.75±0.51e	227.37±0.5e	86.47±0.27e	10.756±0.98	2.471±1.43
		100	3	0.50±0.05d	90.07±0.15d	77.47±0.21d	236.28±0.28d	96.20±0.38d	11.297±1.20	2.846±1.80
		200	3	1.09±0.03c	94.33±0.13c	137.10±0.3c	253.73±0.07c	125.17±0.33c	12.285±1.65	2.926±2.01
		500	3	6.44±0.12b	140.76±0.2b	189.58±0.24b	263.69±0.65b	155.75±0.15b	12.412±1.90	3.137±2.78
		1000	3	12.47±0.53a	161.96±0.06a	219.44±0.3a	271.15±0.36a	184.28±0.43a	12.545±2.25	3.461±3.10
	Gövde	0	3	0.02±0.01f	2.02±0.05e	63.44±0.31g	284.92±0.46g	9.01±0.19e	3.775±0.23	0.178±0.22
		10	3	0.05±0.01f	2.42±0.04d	66.73±0.13f	309.38±0.68f	9.32±0.18e	6.363±0.52	0.21±0.36
		50	3	0.15±0e	2.54±0.02c	72.92±0.97e	326.43±0.1e	12.79±0.21d	7.434±0.25	0.217±0.45
		100	3	0.30±0.04d	3.50±0.02b	100.42±0.65d	334.86±0.25d	18.45±0.28c	7.715±0.68	0.26±0.67
		200	3	0.37±0.01c	3.52±0.01b	101.96±0.5c	367.35±0.3c	18.83±0.02c	7.988±1.25	0.276±0.88
		500	3	0.78±0.02b	3.93±0.02a	122.75±0.32b	370.47±0.24b	21.63±0.38b	8.422±1.70	0.28±0.99
		1000	3	0.91±0.02a	3.96±0.01a	144.83±0.11a	404.1±0.3a	28.65±0.11a	9.981±2.35	0.295±1.36
B.junceae var	O	G	N	Cr	Fe	Ca	K	Mg	Zn	Cu
Ganj sarhen	Yaprak	0	3	0.12±0.01g	13.12±0.13f	2163.73±0.12g	68.85±0.42e	36.69±0.88f	9.195±0.46	1.051±0.23
		10	3	0.88±0.01f	13.25±0.14f	2513.98±0.01f	86.97±1.29d	38.00±0.55e	10.745±0.88	1.128±0.52
		50	3	2.79±0.03e	16.07±0.04e	2575.55±0.05e	87.34±0.56d	38.47±0.09e	12.369±1.02	1.16±0.77
		100	3	3.79±0.06d	16.45±0.05d	2584.62±0.01d	90.84±0.92c	40.78±0.19d	12.885±1.45	1.17±0.93
		200	3	7.49±0.03c	18.24±0.09c	2649.68±0.17c	90.88±0.29c	42.20±0.29c	12.947±1.77	1.195±1.13
		500	3	11.04±0.1b	19.86±0.07b	2774.17±0.14b	95.54±0.16b	48.31±0.65b	13.400±2.16	1.305±1.48

		1000	3	27.23±0.26a	21.44±0.08a	2893.38±0.26a	97.92±0.65a	49.58±0.23a	17.235±3.45	1.622±2.24
		0	3	0.14±0.04g	145.94±0.2g	281.24±0.11g	364.03±0.14f	156.37±0.13g	7.248±0.28	0.988±0.79
		10	3	4.53±0.02f	147.35±0.2f	403.91±0.05f	389.72±0.15e	164.37±0.12f	7.757±0.63	1.159±1.12
		50	3	5.9±0.17e	169.53±0.21e	555.97±0.02e	404.22±0.42d	180.32±0.25e	9.729±0.85	1.214±1.56
		100	3	6.65±0.09d	171.51±0.45d	569.78±0.16d	430.36±0.92c	188.75±0.08d	10.129±1.16	1.229±1.84
		200	3	13.79±0.21c	211.32±0.19c	608.85±0.01c	487.85±1.05b	226.67±0.24c	10.152±1.35	1.412±1.99
		500	3	21.07±0.15b	226.92±0.07b	671.30±0.17b	488.76±0.08a	227.13±0.42b	10.182±1.70	1.86±2.16
		1000	3	21.66±0.21a	340.09±0.18a	693.64±0.12a	535.39±0.62	330.42±0.14a	10.947±2.15	3.007±2.85
		0	3	0.08±0.01g	5.48±0.19g	411.08±0.08g	741.38±0.61g	74.68±0.21g	6.622±0.11	0.22±0.15
		10	3	0.7±0.03f	6.72±0.06f	442.44±0.05f	768.38±0.37f	80.57±0.11f	8.00±0.25	0.235±0.46
		50	3	1±0.02e	7.27±0.18e	463.74±0.14e	896.53±1.24c	82.25±0.11e	8.37±0.06	0.252±0.74
		100	3	1.83±0.03d	7.58±0.11d	471.48±0.03d	900.69±0.98d	95.31±0.06d	9.17±0.08	0.258±0.92
		200	3	2.02±0.02c	8.39±0.2c	564.36±0.05c	916.91±0.29c	97.47±0.19c	9.88±1.20	0.263±0.45
		500	3	4.88±0.15b	9.36±0.19b	583.06±0.08b	939.49±0.67b	111.32±0.11b	9.97±1.45	0.272±0.68
		1000	3	10.65±0.12a	10.64±0.01a	645.42±0.06a	1023.62±0.68a	118.31±0.35a	11.18±1.94	0.273±0.87
B.juncea var	O	G	N	Cr	Fe	Ca	K	Mg	Zn	Cu
THB-81	Yaprak	0	3	0.09±0.01g	4.83±0.21e	659.83±0.71g	623.55±0.82g	142.79±1.07c	8.53±0.44	0.371±0.33
		10	3	1.01±0.24f	5.18±0.17d	702.15±0.25f	643.05±0.4f	171.95±0.38bc	8.797±0.80	0.5±0.64
		50	3	1.8±0.13e	5.34±0.18d	729.07±0.31e	659.79±0.68e	176.34±0.12bc	8.81±1.10	0.562±0.87
		100	3	3.6±0.02d	6.45±0.13c	782.94±0.24d	683.15±1.15d	176.91±0.03bc	10.356±1.55	0.563±0.96
		200	3	5.16±0.23c	7.02±0.13b	821.37±0.24c	706.67±0.7c	223.41±0.11ab	10.359±1.82	0.7±1.16
		500	3	7.28±0.07b	8.27±0.04a	892.83±0.32b	738.2±1.68b	281.78±0.59a	11.371±2.40	0.744±1.49
		1000	3	26.29±0.36a	8.37±0.16a	935.77±0.61a	809.67±0.94a	283.5±0.14a	12.454±3.05	0.855±1.87
	Kök	0	3	0.22±0.02g	56.19±0.16g	334.69±0.28g	342.14±0.44g	101.77±0.79c	9.193±0.15	0.762±0.25
		10	3	14.36±0.35f	76.24±0.05f	441.29±0.29f	386.7±0.47f	121.96±0.1bc	10.787±0.55	0.915±0.64
		50	3	36.76±0.67e	81.05±0.06e	542.18±0.25e	392.61±0.6e	129.80±0.19abc	11.691±0.89	0.935±0.86
		100	3	108.72±0.67d	119.67±0.09d	594.27±0.15d	442.38±0.66d	212.15±0.75abc	12.073±1.15	0.997±1.31
		200	3	125.58±0.8c	204.65±0.18c	605.33±0.16c	483.44±1.17c	271.84±0.28abc	12.958±1.63	1.263±1.70
		500	3	242.52±0.57b	257.76±0.08b	724.54±0.23b	505.39±0.54b	299.18±1.16ab	13.792±2.04	1.399±1.93
		1000	3	552.28±0.51a	319.4±0.17a	811.36±0.15a	615.15±0.39a	313.58±0.75a	14.270±2.36	1.402±2.03
	Gövde	0	3	0.09±0.01f	5.48±0.09g	330.38±0.43g	459.43±0.79g	74.44±0.75f	8.015±0.42	0.144±0.14
		10	3	1.95±0.06e	6.72±0.16f	354.35±0.3f	507.07±0.54f	90.43±0.26e	8.034±0.58	0.163±0.33
		50	3	4.79±0.34d	7.27±0.18e	374.34±0.42e	567.87±1.59e	92.14±0.7d	9.031±0.40	0.178±0.45
		100	3	7.47±0.2c	7.58±0.18d	376.36±0.23d	593.48±0.49d	99.67±0.2c	9.095±0.75	0.193±0.67
		200	3	7.52±0.18c	8.39±0.03c	420.88±0.31c	596.44±0.16c	102.11±0.29b	9.139±0.89	0.22±0.78
		500	3	20.08±0.22b	9.36±0.28b	436.88±0.31b	663.49±1.02b	102.54±0.06b	9.668±1.5	0.262±0.69
		1000	3	43.93±0.66a	10.64±0.03a	472.5±0.27a	758.5±0.32a	113.17±0.52a	10.087±2.03	0.285±0.90

Not: Her sütun kendi arasında değerlendirilmiştir. a, b, c, d, e, f: $p<0.001$ değeri, kontrol örneklerine göre anlamlı farklılık gösteren deney örneklerini işaret etmektedir.

Çizelge 4.2’de görüldüğü üzere, farklı CrCl_3 çözeltisi uygulanan *B. juncea* varyetelerine ait kök, gövde ve yapraklarda biriken Cr, Fe, Ca, Mg, K, Zn ve Cu metallerinin miktarı verilmiştir. Bitki çeşidine ve organına bakılmaksızın, farklı CrCl_3 çözeltisi uygulamalarından elde edilen ICP-OES sonuçlarına göre, her bir bitki varyetesinde biriken Cr, Ca, Fe, Mg ve K miktarı, Cr-uygulanmayan (kontrol) bitkilerine kıyasla belirgin bir farkla artış göstermiştir; ancak, Zn ve Cu metalinin miktarında önemli bir farklılık saptanmamıştır (Çizelge 4.2). Yapraklar, gövdeler ve kökler arasında Fe konsantrasyonunda belirgin bir fark vardır ve genel olarak, kök Fe konsantrasyonu 161.96-361.62 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ arasında, yapraklarda 3.99-21.44 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ arasında değişmekte olup, kök Fe konsantrasyonu yapraklardakinden oldukça yüksek olduğu saptanmıştır. Örneğin, 500 ve 1000 μM Cr uygulamaları yapılan JS-13 bitkilerinin kök Fe miktarı (sırasıyla 350.94 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ ve 361.62 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$), 500 ve 1000 μM Cr uygulamalarına maruz kalan JS-13 bitkilerinin yaprak Fe miktarı (sırasıyla 11.61 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ ve 11.70 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$) ile karşılaştırıldığında sırasıyla 30.23 ve 30.92 kat daha fazla birikmiştir. Cr uygulaması, yapraklarda ve köklerde Mg miktarlarını önemli ölçüde arttırmıştır; en yüksek yaprak ve kök Mg miktarları sırasıyla 500 ve 1000 μM Cr uygulamalarında kaydedilmiştir. Örneğin 500 ve 1000 μM Cr-uygulanan JS-13 bitkisinde sırasıyla yapraklar 356.08 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ ve 398.67 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$; kökler 582.14 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ ve 668.00 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$; gövdeler 737.81 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ ve 758.67 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ biriktirmiştir; bu da kontrol grubuna göre oldukça yüksek miktarda olup, bu fark anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). Benzer bir şekilde, 500 ve 1000 μM Cr-uygulanan Early raya bitkisinde sırasıyla yapraklar 306.47 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ ve 357.86 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$; kökler 232.78 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ ve 305.06 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$; gövdeler 61.78 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ ve 78.27 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ biriktirmiştir; bu da kontrol grubuna göre yüksek miktarda olup, bu fark anlamlı bulunmuştur. Dahası, bitkilerde kök, gövde ve yaprak Ca ve K konsantrasyonuna gelince, Cr uygulamaları ile kontrol arasında önemli bir fark bulunmuştur ($p<0.001$). Ancak, bitkilerin kök, gövde ve yaprak Cu konsantrasyonunda, Cr uygulamaları ile kontrol arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Farklı Cr uygulamaları ile muamele edilen *B.juncea* bitkilerinde besin konsantrasyonu incelenmiştir. Bitkilerde konsantrasyonu anlamlı derecede artan besin elementleri, Early raya bitkilerinde en yüksek Ca, Mg ve K elementleri yapraklarda ve en yüksek Fe miktarı köklerde birikmişken; Ganj sarhen bitkilerinde en yüksek Ca miktarı

yapraklarda, en yüksek K ve Fe miktarları gövdelerde ve en yüksek Mg miktarı köklerde birikmiştir. JS-13 bitkilerinde en yüksek Ca, Mg ve K miktarları yapraklarda ve en yüksek Fe miktarı köklerde birikmişken; THB-81 bitkilerinde en yüksek Ca ve K miktarları yapraklarda, en yüksek Fe ve Mg miktarları köklerde birikmiştir. S-9 bitkilerinde en yüksek Ca ve K miktarları yapraklarda ve en yüksek Fe ve Mg miktarları köklerde birikmiştir. Sindh raya bitkilerinde en yüksek Ca ve K miktarları yapraklarda birikmiş olup, en yüksek Fe ve Mg miktarları köklerde birikmiştir. Bu sonuçlar, farklı Cr konsantrasyonlarına maruz kalan bitkilerde mineral besin maddelerinin alım ve taşınımının değiştiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, araştırılan Cr, Fe, K, Mg, Ca, Zn ve Cu elementlerinin, *B. juncea* varyetelerinin dokularında değişken konsantrasyonlarda akümüle ettikleri saptanmıştır. Cr-uygulamasında bitkinin farklı kısımlarında biriken total metal miktarlarına bakıldığında, krom (Cr) kök>gövde>yaprak; kalsiyum (Ca) yaprak>kök>gövde; demir (Fe) kök>yaprak>gövde; potasyum (K) yaprak>gövde>kök; magnezyum (Mg) kök>yaprak>gövde sıralama ile takip ettiği görülmektedir. Cr-uygulanan *B. juncea* varyetelerinde biriken metal miktarları açısından sıralama şu şekildedir: Early raya bitkisinde K>Ca>Mg>Cr>Fe; THB-81 bitkisinde Ca>K>Mg>Cr>Fe; Ganj sarhen bitkisinde Ca>K>Mg>Fe>Cr; JS-13 bitkisinde K>Ca>Mg>Fe>Cr; Sindh raya bitkisinde K>Ca>Mg>Fe>Cr; S-9 bitkisinde K>Ca>Mg>Fe>Cr. Metal birikimlerine göre büyüklük açısından sergiledikleri profiller sırasıyla şu şekildedir: krom (Cr) THB-81>Early raya>JS-13>Ganj sarhen>Sindh raya>S-9; kalsiyum (Ca) Ganj sarhen>THB-81>JS-13>Early raya>Sindh raya>S-9; demir (Fe) JS-13>Ganj sarhen>THB-81>Early raya>Sindh raya> S-9; potasyum (K) JS-13>Early raya>THB-81>Sindh raya>Ganj sarhen>S-9; magnezyum (Mg) JS-13>Early raya>THB-81> Sindh raya> Ganj sarhen>S-9.

Farklı Cr konsantrasyonlarına maruz bırakılan *B. juncea*, JS-13, Early raya, Sindh raya, S-9, Ganj sarhen ve THB-81 varyetelerinin çeşitli kısımlarındaki besin konsantrasyonları değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2). Elde edilen sonuçlar, farklı Cr konsantrasyonlarına maruz kalan bitkilerde mineral besinlerin alımı ve taşınımının değiştiğini göstermektedir.

4.2. Krom ve Mikro Elementler Arasındaki Korelasyon

Cr ile Fe, Ca, K, Mg, Zn ve Cu arasındaki ilişki Çizelge 'te belirtilmiştir. Cr ile K (0.002) hafif pozitif bir korelasyon gösterirken; Cr ile Fe (0.461**) ve Mg (0.280**) arasında anlamlı derecede pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir ($p < 0.001$). Ayrıca, Mg ile sırasıyla Fe (0.513**), K (0.487**), Cr (0.280**) ve Ca (0.165**) güçlü bir pozitif korelasyon göstermiştir. Cr ile Ca (-0.008) arasında hafif negatif korelasyon gözlenmiştir.

4.3. Krom (Cr) Birikimi

Bitkilerdeki Cr konsantrasyonu, kontrol hariç her uygulamada uygulanan Cr seviyesi ile tutarlı bir şekilde artmıştır; kontrol grubunda herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Çizelge 4.3). Örneğin, Early raya 500 μM Cr ve 1000 μM Cr'ye maruz bırakılan bitkilerin yaprak Cr konsantrasyonu, maruziyetten sonra sırasıyla kontrole kıyasla 145.55 ve 217.55 kat artmıştır. Early raya'da olduğu gibi, diğer *B. juncea* varyetelerinin yapraklarında ve köklerinde Cr konsantrasyonları Cr seviyesi ile birlikte belirgin bir artış göstermiştir (Çizelge 4.3). Ayrıca, bitki kısımları arasında Cr konsantrasyonu açısından belirgin bir fark olduğu ve köklerde yapraklardan daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu fark, Cr seviyesi arttıkça kademeli bir şekilde artmıştır. Örneğin, THB varyetesinde 500 μM Cr ve 1000 μM Cr'ye maruz kaldığında, köklerdeki Cr konsantrasyonu sırasıyla yapraklardan yaklaşık 33.31 ve 21.01 kat daha yüksek olmuştur. Cr-uygulanan *B. juncea* varyetelerinin dokularında biriken Cr miktarları aşağıdaki Çizelge 4.3'te detaylandırılmıştır.

Çizelge 4.3. İki hafta (15 gün) boyunca farklı konsantrasyonlarda CrCl_3 çözeltisi uygulanan *B. juncea*, JS-13, Early raya, Sindh raya, S-9, Ganj sarhen ve THB-81 bitkilerinin kök, gövde ve yapraklarında biriken krom (Cr) miktarları ($\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$) ($\pm$ değerler standart sapmayı göstermektedir).

<i>B. juncea</i> var	O	G	N	Early raya	Sindh raya	JS-13	S-9	Ganj sarhen	THB-81
Cr	Yaprak	0	3	0.11 $\pm$ 0.02f	0.03 $\pm$ 0.01g	0.03 $\pm$ 0.01f	0.02 $\pm$ 0.01f	0.12 $\pm$ 0.01g	0.09 $\pm$ 0.01g
		10	3	0.19 $\pm$ 0.01f	0.09 $\pm$ 0.01f	0.25 $\pm$ 0.03f	0.07 $\pm$ 0.02f	0.88 $\pm$ 0.01f	1.01 $\pm$ 0.24f
		50	3	0.91 $\pm$ 0.02e	0.30 $\pm$ 0.01e	0.76 $\pm$ 0.05e	0.31 $\pm$ 0.03e	2.79 $\pm$ 0.03e	1.8 $\pm$ 0.13e
		100	3	2.71 $\pm$ 0.09d	0.46 $\pm$ 0.01d	1.09 $\pm$ 0.03d	0.59 $\pm$ 0.03d	3.79 $\pm$ 0.06d	3.6 $\pm$ 0.02d
		200	3	5.22 $\pm$ 0.08c	0.71 $\pm$ 0.03c	1.81 $\pm$ 0.05c	1.36 $\pm$ 0.13c	7.49 $\pm$ 0.03c	5.16 $\pm$ 0.23c
		500	3	16.01 $\pm$ 0.04b	2.79 $\pm$ 0.01b	9.27 $\pm$ 0.29b	1.88 $\pm$ 0.02b	11.04 $\pm$ 0.1b	7.28 $\pm$ 0.07b
		1000	3	23.93 $\pm$ 0.19a	4.03 $\pm$ 0.03a	14.37 $\pm$ 0.17a	4.21 $\pm$ 0.22a	27.23 $\pm$ 0.26a	26.29 $\pm$ 0.36a
	Kök	0	3	0.13 $\pm$ 0.06e	0.11 $\pm$ 0.01g	0.1 $\pm$ 0.02g	0.06 $\pm$ 0.01e	0.14 $\pm$ 0.04g	0.22 $\pm$ 0.02g
		10	3	0.43 $\pm$ 0.02e	0.34 $\pm$ 0.01f	0.85 $\pm$ 0.02f	0.17 $\pm$ 0.02cd	4.53 $\pm$ 0.02f	14.36 $\pm$ 0.35f
		50	3	8.31 $\pm$ 1.05e	0.42 $\pm$ 0.01e	2.06 $\pm$ 0.04e	0.38 $\pm$ 0.05cd	5.9 $\pm$ 0.17e	36.76 $\pm$ 0.67e
		100	3	54.62 $\pm$ 7.01d	0.71 $\pm$ 0.02d	3.61 $\pm$ 0.02d	0.50 $\pm$ 0.05d	6.65 $\pm$ 0.09d	108.72 $\pm$ 0.67d
		200	3	145.31 $\pm$ 6.46c	1.05 $\pm$ 0.02c	7.94 $\pm$ 0.06c	1.09 $\pm$ 0.03c	13.79 $\pm$ 0.21c	125.58 $\pm$ 0.8c
		500	3	330.42 $\pm$ 31.68b	2.85 $\pm$ 0.05b	17.05 $\pm$ 0.27b	6.44 $\pm$ 0.12b	21.07 $\pm$ 0.15b	242.52 $\pm$ 0.57b
		1000	3	429.00 $\pm$ 15.04a	7.83 $\pm$ 0.05a	67.72 $\pm$ 0.61a	12.47 $\pm$ 0.53a	21.66 $\pm$ 0.21a	552.28 $\pm$ 0.51a
	Gövde	0	3	0.02 $\pm$ 0.01f	0.02 $\pm$ 0.01f	0.02 $\pm$ 0e	0.02 $\pm$ 0.01f	0.08 $\pm$ 0.01g	0.09 $\pm$ 0.01f
		10	3	0.2 $\pm$ 0.01f	0.05 $\pm$ 0.01e	0.13 $\pm$ 0.01e	0.05 $\pm$ 0.01f	0.7 $\pm$ 0.03f	1.95 $\pm$ 0.06e
		50	3	1.87 $\pm$ 0.03e	0.17 $\pm$ 0.01d	0.33 $\pm$ 0.03d	0.15 $\pm$ 0e	1 $\pm$ 0.02e	4.79 $\pm$ 0.34d
		100	3	6.80 $\pm$ 0.03d	0.18 $\pm$ 0.01d	0.38 $\pm$ 0.02d	0.30 $\pm$ 0.04d	1.83 $\pm$ 0.03d	7.47 $\pm$ 0.2c
		200	3	11.29 $\pm$ 0.22c	0.31 $\pm$ 0.01c	0.83 $\pm$ 0.06c	0.37 $\pm$ 0.01c	2.02 $\pm$ 0.02c	7.52 $\pm$ 0.18c
		500	3	49.05 $\pm$ 0.18b	0.89 $\pm$ 0.01b	1.69 $\pm$ 0.06b	0.78 $\pm$ 0.02b	4.88 $\pm$ 0.15b	20.08 $\pm$ 0.22b
		1000	3	88.01 $\pm$ 0.09a	1.59 $\pm$ 0.01a	4.58 $\pm$ 0.25a	0.91 $\pm$ 0.02a	10.65 $\pm$ 0.12a	43.93 $\pm$ 0.66a

Not: Her sütun kendi arasında değerlendirilmiştir. a, b, c, d, e, f: $p<0.001$ değeri, kontrol örneklerine göre anlamlı farklılık gösteren deney örneklerini işaret etmektedir.

B. juncea var. THB-81: Artan Cr konsantrasyonu ile bitkinin kök, gövde ve yapraklarında Cr birikimi önemli derecede artmıştır ($p<0.001$). Cr-uygulanan bitkilerin köklerinde en yüksek Cr miktarı 552.279 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ 'ya ulaşırken, Cr-uygulanmayan (kontrol) bitkilerde bu değer 0.22 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ 'dır. Artan Cr konsantrasyonu uygulanan bitkilerin kökleri sırasıyla, 14.36; 36.76; 108.72; 125.58 ve 552.28 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ biriktirirken, kontrol bitkileri 0.22 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ biriktirmiştir. 1000 μM Cr-uygulanan bitkilerin kökleri (552.28 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$), kontrole (0.22 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$) kıyasla 2520 kat daha fazla Cr biriktirmiştir. Gövdelerde (sırasıyla, 0.09; 1.95; 4.79; 7.47; 7.52; 20.08; 43.93 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$) ve

yapraklarda (sırasıyla, 0.09; 1.01; 1.8; 3.6; 5.16; 7.28; 26.29 mg kg⁻¹KA) kademeli olarak artan Cr içeriği belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

B. juncea var. Early raya: THB-81 varyetesinde olduğu gibi, artan Cr uygulamaları ile Cr içeriği sırasıyla kök, gövde ve yapraklarda önemli miktarlarda artmıştır. Cr-uygulanan bitkilerin köklerinde en yüksek Cr miktarı 429.00 mg kg⁻¹KA'ya ulaşırken, Cr-uygulanmayan (kontrol) bitkilerde bu değer 0.13 mg kg⁻¹KA'dır. Artan Cr konsantrasyonu ile bitkilerin kökleri sırasıyla, 0.43; 8.31; 54.62; 145.31; 330.42 ve 429.00 mg kg⁻¹KA biriktirirken, kontrol bitkileri 0.13 mg kg⁻¹KA biriktirmiştir (Çizelge 4.3). 1000 µM Cr- uygulanan bitkilerin kökleri (429.00 mg kg⁻¹KA), kontrole (0.13 mg kg⁻¹KA) kıyasla 3300 kat daha fazla Cr biriktirmiştir. Kökler en yüksek Cr içeriğine sahip olup, yapraklarda da (sırasıyla, 0.11; 0.19; 0.91; 2.71; 5.22; 16.01; 23.93 mg kg⁻¹KA) Cr miktarı belirgin bir farkla artış göstermiştir (p<0.001). Ayrıca, gövdelerde de (sırasıyla 0.022; 0.199; 1.869; 6.797; 11.292; 49.053; 88.008 mg kg⁻¹KA) kademeli bir artış söz konusudur. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, *B. juncea* varyeteleri arasında, Early raya'nın, Cr konsantrasyonundaki artışla birlikte kontrole kıyasla köklerinde yüksek miktarda Cr biriktirdiği ve ayrıca gövde kısımlarında en yüksek Cr içeriğine sahip varyete olduğu rapor edilmiştir (Çizelge 4.3).

B. juncea var. JS-13: Cr-uygulamada bitkinin farklı kısımlarında biriken Cr miktarlarına bakıldığında, en fazla miktarın köklerde (sırasıyla 0.10; 0.85; 2.06; 3.61; 7.94; 17.05; 67.72 mg kg⁻¹KA) olduğu saptanmıştır. Daha sonra, yapraklarda (sırasıyla 0.03; 0.25; 0.76; 1.09; 1.81; 9.27; 14.37 mg kg⁻¹KA) kademeli bir artış tespit edilmiştir. Uygulanan Cr konsantrasyonları ile ilişkili olarak, gövdelerde de (sırasıyla 0.02; 0.13; 0.33; 0.38; 0.83; 1.69; 4.58 mg kg⁻¹KA) artan Cr içeriği kaydedilmiştir (Çizelge 4.3).

B. juncea var. Ganj sarhen: JS-13 varyetesinde olduğu gibi, 1000 µM Cr-uygulanan bitkilerin köklerinde ve yapraklarında Cr birikimi en yüksek düzeyde bulunmuştur (sırasıyla 21.66 ve 27.23 mg kg⁻¹KA). Köklerde (sırasıyla 0.14; 4.53; 5.90; 6.65; 13.79; 21.07 ve 21.66 mg kg⁻¹KA) ve yapraklarda (sırasıyla 0.12; 0.88; 2.79; 3.79; 7.49; 11.04 ve 27.23 mg kg⁻¹KA) benzer bir Cr birikim profili saptanmıştır. JS-13 varyetesinde olduğu gibi, gövdelerde (sırasıyla 0.08; 0.70; 1.00; 1.83; 2.02; 4.88 ve 10.65 mg kg⁻¹KA), köklere ve yapraklara kıyasla Cr miktarı daha düşüktür (Çizelge 4.3).

B. juncea var. S-9: THB-81, Early raya, JS-13 ve Ganj sarhen varyeteleri ile karşılaştırıldığında kök, gövde ve yapraklarda biriken Cr miktarı oldukça düşüktür.

Kökler (sırasıyla 0.06; 0.17; 0.38; 0.50; 1.09; 6.44 ve 12.47 mg kg⁻¹KA) ve yapraklar (sırasıyla 0.02; 0.07; 0.31; 0.59; 1.36; 1.88 ve 4.21 mg kg⁻¹KA), gövdelerden (sırasıyla, 0.02; 0.05; 0.15; 0.30; 0.37; 0.78 ve 0.91 mg kg⁻¹KA) daha yüksek Cr miktarını içerdiği saptanmıştır. S-9, artan Cr konsantrasyonuna maruz kaldığında en düşük miktarda Cr biriktiren varyeteden biridir.

B. juncea var. Sindh raya: Sindh raya, artan Cr konsantrasyonuna maruz kaldığında THB-81, Early raya, JS-13 ve Ganj sarhen varyetelerine kıyasla Cr alımı ve birikimi açısından tam tersi bir durum sergilemiştir. *B. juncea* varyeteleri arasında, en düşük Cr birikimine sahip varyete olduğu saptanmıştır. Köklerde (sırasıyla 0.11; 0.34; 0.42; 0.71; 1.05; 2.85 ve 7.83 mg kg⁻¹KA) ve yapraklarda (sırasıyla 0.03; 0.09; 0.30; 0.46; 2.79 ve 4.03 mg kg⁻¹KA), gövdelerden (sırasıyla, 0.02; 0.05; 0.17; 0.18; 0.31; 0.89 ve 1.59 mg kg⁻¹KA) daha yüksek miktarda Cr birikmiştir (Çizelge 4.3). Sindh raya, Cr-dışlayıcı bir varyete olabilir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, biriken Cr miktarı bitkinin organına ve çeşidine göre farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Cr uygulamasında bitkilerin farklı kısımlarında biriken metal miktarlarına bakıldığında, en fazla metal miktarlarının köklerde biriktiği, bunu sırasıyla gövdelerin ve yaprakların takip ettiği görülmektedir.

Sonuç olarak, *B. juncea* varyeteleri Cr alımı ve birikimi açısından farklılıklar göstermiştir. Tüm varyetelerin kontrol grupları, 10 µM CrCl₃, 50 µM CrCl₃, 100 µM CrCl₃, 200 µM CrCl₃, 500 µM CrCl₃ ve 1000 µM CrCl₃ grupları ile karşılaştırıldığında ayrıca konsantrasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldığında p<0.001'e göre anlamlı farklılıkların olması deneysel çalışmanın güvenilirliğini göstermektedir (Çizelge 4.3). Cr uygulanan *Brassica juncea* varyeteleri karşılaştırıldığında, yüksek çimlenme oranı ve verimli büyüme göstermenin yanı sıra, daha fazla miktarda metal biriktirme kapasitesine de sahip olduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda, Early raya moleküler çalışmalar için Cr-akümülatör/toleranslı varyete olarak seçilmiştir. Benzer şekilde, Cr uygulanan *Brassica juncea* varyeteleri karşılaştırıldığında, Sindh raya'nın düşük çimlenme oranı ve verimli büyüme göstermenin yanı sıra, daha az miktarda metal biriktirme kapasitesine de sahip olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, Sindh raya moleküler çalışmalar için Cr-dışlayıcı/hassas varyete olarak seçilmiştir.

4.4. AĞIR METAL UYGULAMASI YAPILAN BİTKİLERDE ANLATIMI DEĞİŞEN GENLERİN TANIMLANMASI VE BELİRLENMESİ

4.4.1. *Brassica juncea* var. Early raya ve *Brassica juncea* var. Sindh raya Bitkilerinden Total RNA İzolasyonu

İki hafta (15 gün) boyunca farklı CrCl_3 çözeltisi uygulanan *B. juncea* var. Early raya ve *Brassica juncea* var. Sindh raya bitkilerinin kök dokularından, RNA izolasyon kiti kullanılarak total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyonu takiben, elde edilen total RNA'ların konsantrasyon miktarları ve saflık dereceleri (OD260/OD280) NanoDrop spektrofotometresinde yapılan ölçümler sonucunda 1.99 ile 2.10 arasında saptanmıştır. Her bir örnek için elde edilen RNA konsantrasyon miktarları ve kalite parametreleri Çizelge 4.4'te özetlenmiştir.

Çizelge 4.4. *B. juncea* var. Early raya ve *B. juncea* var. Sindh raya bitkisinin kök dokularına ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri

Konsantrasyon	Örnek Adı	RNA Konsantrasyon (ng/μl)	A260/280	A260/230	RNA bütünlük (integrity) numarası (RIN)
Kontrol- <i>B. juncea</i> var. Early raya	ER-1	762	1.99	2.4	7.50
	ER-1	683.3	2.00	2.27	7.50
	ER-1	806.2	2.05	2.00	7.50
1000 μM Cr- <i>B. juncea</i> var. Early raya	ER-3	602.7	2.01	2.30	7.80
	ER-3	627.2	2.05	2.11	7.60
	ER-3	222.4	2.07	2.28	7.80
Kontrol- <i>B. juncea</i> var. Sindh raya	SR-1	1237.2	2.02	2.37	7.50
	SR-1	1014.7	2.01	1.95	7.20
	SR-1	1010.8	2.10	2.25	7.40
1000 μM Cr- <i>B. juncea</i> var. Sindh raya	SR-3	225.2	2.06	1.95	7.60
	SR-3	292.8	2.08	2.23	7.70
	SR-3	394.9	2.10	2.01	7.50

* RIN; RNA bütünlük (integrity) numaraları. Bir RNA örneğinin RIN değeri 1 ile 10 arasında değişir; 10'luk bir RIN tamamen sağlamdır ve 1'lik bir RIN tamamen bozulmuştur. RNA dizi analizlerinde RIN (RNA Bütünlük Numarası) değeri 7'den yüksek olmalıdır.

Çizelge 4.4'te görüldüğü üzere, 1000 μM CrCl_3 çözeltisi uygulanan ve 3'er adet biyolojik tekrarı bulunan kontrol ve Cr-uygulanan deney bitkilerinin kök örneklerine ait total RNA'ların konsantrasyon miktarları ve RNA bütünlük (integrity) numaraları (RIN) belirtilmiştir. RNA konsantrasyon miktarının en düşük değeri *B. juncea* var. Early raya

örneği için 222.4 ng/μl ve *Brassica juncea* var. Sindh raya örneği için en yüksek 1237.2 ng/μl'dir. 260 nm ve 280 nm'deki absorbans oranı 1.99-2.10 civarında ve A260/A230 absorbans oranı 1.95 ile 2.40 arasında; RNA bütünlük numarası (RIN) değeri 7.20 ile 7.80 arasında olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.4). Bu sonuçlar, yüksek verimli dizileme (high-throughput sequencing) yapılan kök örneklerine ait RNA'ların sağlam olduklarını göstermektedir.

4.4.2. RNA Dizileme Analizinden Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi

4.4.2.1. RNA Dizileme ve Ham Veri Ön-işleme

Bu çalışmada iki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan ve 3 biyolojik tekrardan oluşan Early raya ve Sindh raya bitkilerinin kök kısımlarında RNA dizileme analiz yapılmıştır. Bitkilerde RNA dizileme, stres tepkilerine karşı yanıtları incelemek ve stres ile ilişkili mekanizmalarda ifade edilen ve yer alan genlerin transkriptom analizi için kullanılan yeni nesil yüksek verimli bir tekniktir. Bu teknik, bitkilerdeki gen ifade profillerini analiz etmek ve RNA moleküllerinin tam dizi bilgilerini elde etmek için kullanılan güçlü bir moleküler biyoloji yöntemidir.

RNA dizileme analizi için uygun, kaliteli bir RNA, aşağıdaki eşikler ile tutarlı olmalıdır: A260nm/280nm ve A260nm/230nm oranları 1,8'den yüksek, konsantrasyon değeri 200 ng/μl'den yüksek, RIN (RNA Bütünlük Numarası) değeri 7'den yüksek olmalıdır. RIN değerinin bu aralıklarda olması RNA dizileme analizi için RNA'ların uygunluğunu göstermektedir.

Metal metabolizmasında yer alan Cr ile ilişkili miRNA'ların ve onların hedef genlerinin belirlenmesi için Cr taraması sonucunda, Cr-toleransı yüksek olarak belirlenen Early raya bitkisinin ve Cr- dışlayıcı olarak belirlenen Sindh raya bitkisinin kök dokularında farklı anlatım yapan miRNA'ların ve onların hedef genlerine ait RNA dizileme sonuçlarından yararlanılmıştır. Cr-uygulanmayan (kontrol) ve 1000 μM Cr-uygulanan Early raya ve Sindh raya bitkilerinin köklerinde karşılaştırmalı transkriptom profillemeye yöntemiyle Cr ile ilişkili önemli genler tanımlanmıştır. Cr-toleranslı Early raya ve Cr-duyarlı Sindh raya bitkilerinin köklerinin toplam 12 bitkiden oluşan üç biyolojik tekrardan alınan RNA örnekleri RNA dizileme analizi için Lifescience Araştırma ve Uygulama Merkezi, Genoks Sağlık A.Ş., Ankara'ya gönderilmiştir.

RNA dizileme analiz sonucunda Lifescience Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde elde edilen ham veriler, gen ekspresyon analizi için gerekli çeşitli programlarda işlenmiş ve FASTQ formatında elde edilen ham veriler çeşitli programlara aktararak değerlendirilmiştir.

4.4.2.2. Verilerin Deney Kalitesi Bakımından Kontrolü ve Ön İşlenmesi

RNA dizileme Illumina NextSeq 550 cihazında gerçekleştirilmiştir. Dizilemeden elde edilen ham veriler kalitesi değerlendirilmiş ve FASTQ yazılımı kullanılarak baz kalitesi, GC içeriği incelenmiştir. Trimming işlemi öncesindeki ve sonrasındaki okumaları içeren iki dosya oluşturulmuştur (Çizelge 4.5). Dizilenen her örnek için Q20 değerleri, Q30 değerleri ve %GC içerikleri hesaplanmıştır. Q20 ve Q30 değerleri, dizileme (sequencing) verilerinin kalitesini değerlendirmek için kullanılan kalite skorlarıdır. Bu kalite skorları, baz çağırma doğruluğunu (base calling accuracy) ifade etmektedir ve Phred kalite skorları olarak da bilinirler. Sonuç olarak, Q skoru, bir bazın çağırılma olasılığının logaritmik bir ölçüsü olan Q skoru arttıkça bazın doğru çağırılma olasılığı ve dizileme verilerindeki bazların güvenilirliği de artmaktadır. Elde edilen verilere dayanarak, kontrol ve Cr-uygulanan örneklerin trimming öncesi ve sonrası Q20 değeri ve Q30 değerleri sırasıyla %100; %100 ve %96.2; %97.3 olarak hesaplanmıştır. Trimming işlemi öncesi ve sonrası sırasıyla 51.3 ve 52.5 olarak hesaplanan (%) GC içeriğinin dengeli olması verilerin doğruluğu ve güvenilirliğini göstermektedir. Kontrol ve Cr-uygulanan bitkilerin köklerine ait RNA örneklerinin, trimming öncesi tüm örnekten toplam 25,971,399 milyon okuma ile trimming sonrası toplam 8,244,522 milyon temiz okuma kaydedilmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Tüm örnekler üzerinden kalite kontrol ölçümlerinin ortalama değerlerini göstermektedir.

Trimming	Toplam Okuma Sayısı	Q20	Q30	(%) GC İçeriği
Öncesi	25,971,399	100	96.2	51.3
Sonrası	8,244,522	100	97.3	52.5

4.4.2.3. Pseudo-Hizalama ve miRNA Miktar Tespiti

Pseudo-hizalama, RNA dizileme (RNA-Seq) veri analizinde, RNA okumalarının hangi transkriptlerden (veya genlerden) kaynaklandığını tam olarak referans genomu veya transkriptoma hizalamadan belirlemeye yönelik bir tekniktir. *B. juncea*'nın bilinen miRNA'ları miRBase veritabanında (sürüm 22.1, Kozomara ve ark., 2019) bulunmasa da *Brassica napus*, *Brassica oleracea* ve *Brassica rapa* gibi diğer Brassicaceae (hardal ailesi) üyelerinin miRNA'ları veritabanında yer almaktadır. Bu *Brassica* türlerinin indirilen referans genomları ön-işlenmiş okumalara hizalanmıştır. Elde edilen bulgulara göre, *B. napus*, *B. juncea* örnekleri ile en yakın akraba tür olduğu saptanmış ve referans genom ile en yüksek hizalanma yüzdeleri sergilemiştir. Çizelge 4.6'da tüm örneklerin yüzde hizalamalarını göstermektedir.

Çizelge 4.6. Brassicaceae (Hardal ailesi) üyelerinin hizalama ölçümleri

Örnek	Eşsiz Okuma Sayısı	<i>Brassica juncea</i> ile Hizalama	<i>Brassica oleracea</i> ile Hizalama	<i>Brassica napus</i> ile Hizalama	<i>Brassica rapa</i> ile Hizalama
Kontrol- <i>B. juncea</i> var. Early raya	578,138	55.2	44.3	48.4	44.8
1000 μ M Cr- <i>B. juncea</i> var. Early raya	1,175,468	58.5	46.89	51.4	47.4
Kontrol- <i>B. juncea</i> var. Sindh raya	1,956,646	48.0	39.27	43.2	39.4
1000 μ M Cr- <i>B. juncea</i> var. Sindh raya	1,867,709	40.2	33.97	36.9	33.2

Dizilenen verilerdeki bilinen miRNA'lar, *B.napus* genomu referans alınarak miRBase veritabanında BLASTN fonksiyonu kullanılarak tanımlanmıştır. Çizelge 4.7'de gösterildiği gibi, her örnek için miRBase (v.22.1) veritabanında tespit edilen bilinen miRNA'ların sayısını temsil etmektedir.

Çizelge 4.7. miRBase’den tanımlanan olgun miRNA’lar

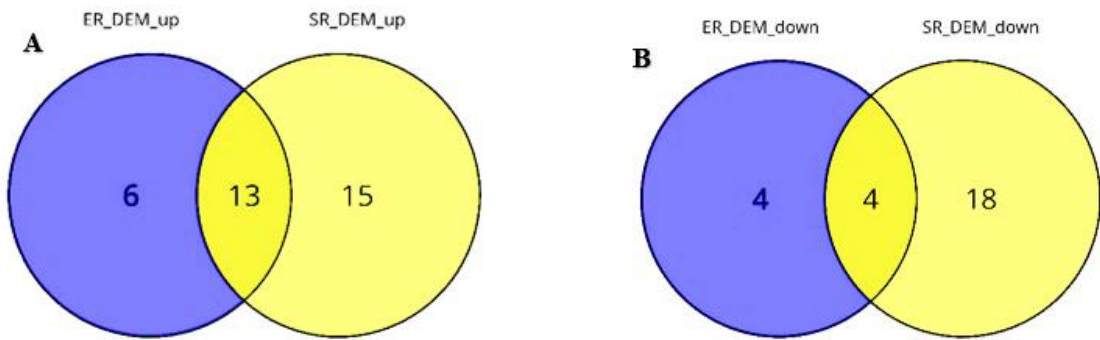
Örnek	miRBase’de Hizalanan Eşsiz miRNA Sayısı
Kontrol- <i>B. juncea</i> var. Early raya	56
1000 μ M Cr- <i>B. juncea</i> var. Early raya	45
Kontrol- <i>B. juncea</i> var. Sindh raya	79
1000 μ M Cr- <i>B. juncea</i> var. Sindh raya	73

İki hafta boyunca 1000 μ M CrCl₃ çözeltisi uygulanan Early raya ve Sindh raya bitkilerinin kontrol ve ağır metal uygulanan deney gruplarına ait kök örneklerinden elde edilen RNA dizileme sonuçları, DESeq2 R paket (sürüm 3.4.2) programına işlenerek, ham verilerin normalize edilmiş ve normalize edilmiş verilerin analizi sağlanmıştır. Her bir bağımsız deney ayrı ayrı normalize edildikten sonra kontrol ve deney grupları arasında farklı eksprese edilen genlerin tanımlanması için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanarak gen listeleri oluşturulmuştur. Karşılaştırmalı analizler için birçok farklı kıyaslama yapılmıştır. miRNA’ların kat değişim (FC- Fold change) değerleri, normalize edilmiş veriler kullanılarak tüm karşılaştırmalar için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Farklı olarak ifade edilen miRNA’lar, FC değerleri kullanılarak belirlenmiştir. Bu işlem gerçekleştirilirken, karşılaştırılan iki örnekte ortalama normalize ifade değerleri 3’ten küçük olan miRNA’lar çıkartılmıştır. FC değeri >1.2 olan miRNA’lar yukarı regüle edilen (ifadesi artan) olarak kabul edilirken; FC değeri <1/1.2 olan miRNA’lar aşağı regüle edilen (ifadesi azalan) olarak kabul edilmiştir (p<0.05). Çizelge 4.8’de her karşılaştırmada tespit edilen DEM (diferansiyel olarak ifade edilen miRNA) sayılarını göstermektedir.

Çizelge 4.8. Karşılaştırmada tespit edilen miRNA'ların sayısı

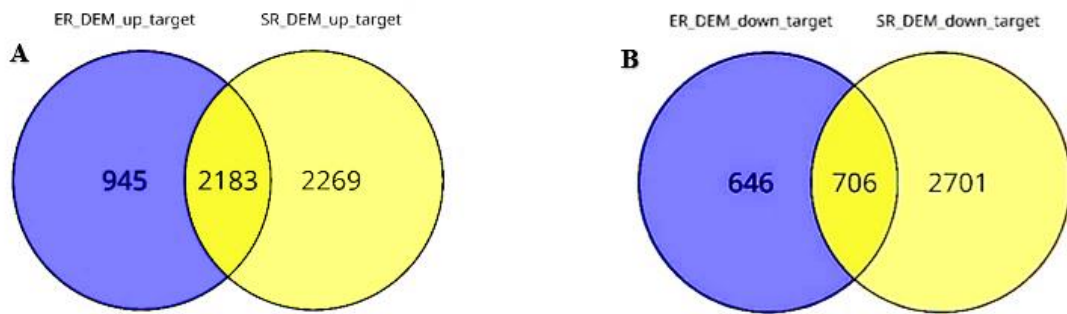
Karşılaştırma	Analiz edilen toplam miRNA sayısı	Yukarı regüle edilen miRNA'ların sayısı (FC>1.2)	Aşağı regüle edilen miRNA'ların sayısı (FC<0.83)	Korunan miRNA sayısı
Kontrol vs. 1000 μ M Cr- <i>B. juncea</i> var. Early raya	70	19	8	43
Kontrol vs. 1000 μ M Cr- <i>B. juncea</i> var. Sindh raya	80	28	22	30
Kontrol (<i>B. juncea</i> var. Early raya) vs. Kontrol (<i>B. juncea</i> var. Sindh raya)	79	22	23	34

Kontrol ile 1000 μ M Cr-uygulanan *B. juncea* var. Early raya karşılaştırmasında gözlemlenen farklı ifade edilen miRNA'lar (DEM'ler) ve onların hedef genleri; kontrol ile 1000 μ M Cr-uygulanan *B. juncea* var. Sindh raya karşılaştırmasında gözlemlenen farklı ifade edilen miRNA'lar (DEM'ler) ve onların hedef genleri karşılaştırılmıştır. Şekil 4.7(A) ve 4.7(B)'de, her iki *B. juncea* varyetesinde tespit edilen yukarı regüle edilen ve aşağı regüle edilen DEM sayılarını ve ayrıca ortak olanları göstermektedir. Benzer bir şekilde, Şekil 4.8(A) ve 4.8(B)'de, ilişkili farklı ifade edilen miRNA'ların-hedef gen çiftleri arasındaki karşılaştırma sonuçlarını vermektedir.



Şekil 4.7. Kontrol vs. 1000 μ M Cr-*B. juncea* var. Early raya ve Kontrol vs. 1000 μ M Cr-*B. juncea* var. Sindh raya karşılaştırmalarından elde edilen Venn diyagramı karşılaştırması. A) Yukarı regüle edilen DEM'ler ve B) Aşağı regüle edilen DEM'ler

B. juncea var. Early raya ve *B. juncea* var. Sindh raya karşılaştırmalarından elde edilen diferansiyel ifade analizi sonucuna göre bna-miR156a, bna-miR156b, bna-miR156c, bna-miR156d, bna-miR156f, bna-miR156g, bna-miR164a, bna-miR166f, bna-miR168a, bna-miR172a, bna-miR172b, bna-miR172c ve bna-miR172d olmak üzere toplamda 13 yukarı regüle edilen ortak miRNA ve bna-miR159, bna-miR169m, bna-miR6028, bna-miR6029 olmak üzere toplamda 4 aşağı regüle edilen ortak miRNA tespit edilmiştir. Early raya’da bna-miR162a, bna-miR171g, bna-miR395a, bna-miR395b, bna-miR395c ve bna-miR824 olmak üzere 6 miRNA’nın yukarı regüle edildiği; bna-miR390a, bna-miR390b, bna-miR390c ve bna-miR6031 olmak üzere 4 miRNA’nın aşağı regüle edildiği saptanmıştır. Sindh raya’da ise bna-miR1140, bna-miR156e, bna-miR164b, bna-miR164c, bna-miR164d, bna-miR167a, bna-miR167b, bna-miR167c, bna-miR167d, bna-miR171d, bna-miR171e, bna-miR2111d, bna-miR399a, bna-miR399b ve bna-miR6031 olmak üzere 15 miRNA’nın yukarı regüle edildiği; bna-miR162a, bna-miR169a, bna-miR169b, bna-miR169n, bna-miR171f, bna-miR171g, bna-miR393, bna-miR394a, bna-miR394b, bna-miR395a, bna-miR395b, bna-miR395c, bna-miR395d, bna-miR395e, bna-miR395f, bna-miR403, bna-miR6030, bna-miR824 olmak üzere 18 miRNA’nın aşağı regüle edildiği saptanmıştır. Benzer bir şekilde, Şekil 4.8(A) ve 4.8(B)’de ilişkili DEM’lerin miRNA-hedef gen çiftleri arasındaki karşılaştırma sonuçları sunulmuştur.



Şekil 4.8. Kontrol vs. 1000 μ M Cr-*B. juncea* var. Early raya ve Kontrol vs. 1000 μ M Cr-*B. juncea* var. Sindh raya DEM-hedef gen çiftlerinin Venn diyagram karşılaştırması

A) Yukarı regüle edilen Hedef genler ve B) Aşağı regüle edilen Hedef genler

Bu çalışmada Cr ile ilişkili genlerin belirlenmesi için Cr taramaları sonucunda, bu ağır metale karşı toleransı yüksek olarak belirlenen Early raya bitkisinin ve bu ağır metale karşı toleransı düşük olarak belirlenen Sindh raya bitkisinin iki hafta (15 gün) boyunca 1000 µM Cr uygulaması sonrası kök dokusunda farklı anlatım yapan genlere ait RNA dizileme sonuçlarından yararlanılmıştır. RNA dizileme analiz sonucunda metal ile ilişkili oksidatif strese yanıtta rol oynayan bazı önemli genler belirlenmiştir. Tespit edilen miRNA'lar ve onların hedef genleri ile birlikte kat değişimlerinin listesi Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.9'da belirtildiği üzere, Cr uygulaması yapılan Early raya bitkisinin kök kısımlarında, kontrol grubuna oranla deney grubunda (1000 µM Cr-uygulanan) ifadesi artan ve ifadesi azalan bazı miRNA'lar ve onların hedef genleri kat değişimleri ile birlikte verilmiştir. RNA analiz sonucunda, Çizelge 4.9'da belirtilen genler istatistiksel olarak anlamlı fark göstermektedir ($p < 0.05$).

Çizelge 4.9. *B. juncea* var. Early raya bitkisine ait kök örneklerinde, Cr1000 (deney grubunda) CK (kontrol grubuna) oranla farklı seviyede ifade edilen miRNA'lar ve onların “ifadesi artan (up) ve ifadesi azalan (down)” hedef genlerinin listesi

miRNA'lar	Hedef Genler	Düzenlenme (Regülasyon)	Kat Değişimi (Cr1000/CK)
bna-miR156a	Squamosa promoter-binding protein (SBP); Auxin efflux carrier component; Mitogen activated kinase kinase kinase ZIK9; Vacuolar protein sorting-associated protein; Golgi apparatus membrane protein TVP23, Amino acid permease 4-1	up	1,251
bna-miR156b	RING-type E3 ubiquitin transferase; Serine/arginine-rich splicing factor SC35; Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog; Squamosa promoter-binding protein (SBP); Formin-like protein; S-(hydroxymethyl) glutathione dehydrogenase; Beta-amylase	up	1,375
bna-miR156c	Serine/arginine-rich splicing factor SC35; Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog; Squamosa promoter-binding protein (SBP); Formin-like protein	up	1,375
bna-miR156d	Squamosa promoter-binding-like protein; Auxin efflux carrier component; Mitogen activated kinase kinase kinase ZIK9; Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog; AT-rich interactive domain-containing protein 4; Transmembrane 9 superfamily member; Endoglucanase; Tubby-like F-box protein	up	1,244
bna-miR156f	Squamosa promoter-binding-like protein; Auxin efflux carrier component; Mitogen activated kinase kinase kinase ZIK9; Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog; AT-rich interactive domain-containing protein 4; Tubby-like F-box protein	up	1,237
bna-miR156g	Serine/arginine-rich splicing factor SC35; Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog;	up	1,533

	Squamosa promoter-binding-like protein; Formin-like protein; Serine/threonine-protein phosphatase		
bna-miR164a	NAC transcription factor 92; Histone deacetylase complex subunit SAP18; PRA1 family protein; Bidirectional sugar transporter SWEET; Myb-like transcription factor 2; Acyl-CoA--sterol O-acyltransferase 1; WAT1-related protein	up	1,26
bna-miR166f	Protein detoxification; Purple acid phosphatase; Glutathione S-transferase; Beta-galactosidase; Thioredoxin reductase; Glycosyltransferase; Probable magnesium transporter	up	1,346
bna-miR168a	Mitogen-activated protein kinase (MAPK); Alpha-1,4 glucan phosphorylase; Kinesin-like protein; Protein detoxification	up	2,127
bna-miR172a	RING-type E3 ubiquitin transferase; KRR1 small subunit processome component; Methionine aminopeptidase; Calcium-transporting ATPase; Protein detoxification	up	1,39
bna-miR172b	Calcium-transporting ATPase; RING-type E3 ubiquitin transferase; KRR1 small subunit processome component; Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M; Replication protein A subunit	up	11,877
bna-miR172c	Calcium-transporting ATPase; RING-type E3 ubiquitin transferase; KRR1 small subunit processome component	up	11,877
bna-miR172d	RING-type E3 ubiquitin transferase; Methionine aminopeptidase; Calcium-transporting ATPase; Protein detoxification; Kinesin-like protein	up	3,732
bna-miR159	Hexosyltransferase; Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic; Serine/threonine-protein phosphatase; Pyruvate, phosphate dikinase; RNA-dependent RNA polymerase; Beta-hexosaminidase; Superoxide dismutase [Cu-Zn]	down	2,105
bna-miR169m	Diacylglycerol kinase (Fragment); Ferredoxin; Clathrin heavy chain; GATA transcription factor; Protein detoxification 23; Autophagy-related protein 3; Signal peptidase I; Exocyst subunit Exo70 family protein	down	6,529
bna-miR6028	HVA22-like protein; WRKY transcription factor; S-acyltransferase; Ammonium transporter; Putative tRNA (cytidine(32)/guanosine(34)-2'-O)-methyltransferase; Protein arginine N-methyltransferase; RNA-dependent RNA polymerase;	down	4,839
bna-miR6029	Patatin; ATP-dependent DNA helicase Pectinesterase; CO ₂ -response secreted protease Tubby-like F-box protein; Auxin-responsive protein; Acyl-[acyl-carrier-protein] hydrolase; tRNA-dihydrouridine(47) synthase [NAD(P)(+)] Proteasome subunit beta type; Histidinol dehydrogenase, chloroplastic; Phosphatidate cytidyltransferase	down	1,518
bna-miR162a	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase; RBR-type E3 ubiquitin transferase (Fragment) Phospholipid-transporting ATPase Conserved oligomeric Golgi complex subunit 8 AT-hook motif nuclear-localized protein Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase Pectinesterase; Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase; Transcriptional adapter; Phosphotransferase	up	1,239
bna-miR171g	3-isopropylmalate dehydrogenase; Charged multivesicular body protein 7; GATA transcription factor; S-acyltransferase Patatin; Exocyst subunit Exo70 family protein Dynein light chain; DNA-directed RNA polymerase subunit beta	up	1,258
bna-miR395a	ATP sulfurylase 4; Auxin-responsive protein; Replication protein A subunit; Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase; ATP-dependent DNA helicase Laccase; Histone deacetylase; Bifunctional	up	13.77

	dihydrofolate reductase-thymidylate synthase		
bna-miR395b	Auxin-responsive protein; ATP sulfurylase 4 Replication protein A subunit; Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase; ATP-dependent DNA helicase Laccase; Histone deacetylase; Bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase	up	13.77
bna-miR395c	ATP sulfurylase 4; Auxin-responsive protein Replication protein A subunit; Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase; ATP-dependent DNA helicase Laccase; Histone deacetylase	up	13.77
bna-miR824	Agamous-like protein 16; Transcription initiation factor IIA subunit 2 Pentatricopeptide repeat- containing protein At4g18840; Serine/threonine- protein phosphatase; Glycosyltransferase; Transmembrane 9 superfamily member; Protein detoxification	up	1,74
bna-miR390a	Rhomboid-like protein; WRKY20-1 transcription factor; Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit, chloroplastic; Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase PEPR2; Peptidylprolyl isomerase; Protein disulfide-isomerase; Pyruvate, phosphate dikinase; MLO-like protein; Non-specific serine/threonine protein kinase Hexosyltransferase	down	2,692
bna-miR390b	Rhomboid-like protein; WRKY20-1 transcription factor; Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit, chloroplastic; Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase PEPR2; Peptidylprolyl isomerase; Protein disulfide-isomerase; Pyruvate, phosphate dikinase; MLO-like protein; Non-specific serine/threonine protein kinase; Hexosyltransferase	down	2,681
bna-miR390c	Rhomboid-like protein; WRKY20-1 transcription factor; Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit, chloroplastic; Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase PEPR2 Peptidylprolyl isomerase; Protein disulfide- isomerase; Pyruvate, phosphate dikinase MLO-like protein; Non-specific serine/threonine protein kinase; Hexosyltransferase	down	2,692
bna-miR6031	Elongator complex protein 3; Serine/threonine- protein phosphatase; Dirigent protein; Patatin	down	3,428

Çizelge 4.9’da belirtildiği gibi, *B. juncea* var. Early raya’da bna-miR169a (12.106), bna-miR159 (2.105), bna-miR6028 (4.839), bna-miR6029 (1.518), bna-miR390a (2.692), bna-miR390b (2.681), bna-miR390c (2.692) ve bna-miR6031 (3.428) ifadesinin önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Diğer bir taraftan, bna-miR156a (1.251), bna-miR164a (1.26), bna-miR166f (1.346), bna-miR168a (2.127), bna-miR172b (11.877), bna-miR162a (1.239), bna-miR171g (1.258) ve bna-miR824’ün (1.74) ifadesinin önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Early raya bitkisine ait kök örneklerinde, CK (kontrol grubunda) anlatımı olamayan, ancak Cr1000 (deney grubunda) bna-miR395a (13.77), bna-miR395b (13.77) ve bna-miR395c (13.77) ifadesinin önemli ölçüde artış gösterdiği saptanmıştır.

Çizelge 4.9’da görüldüğü üzere, bna-miR156a, bna-miR156b, bna-miR156c, bna-miR156d, bna-miR156f, bna-miR156g, bna-miR164a, bna-miR166f, bna-miR168a, bna-miR172a, bna-miR172b, bna-miR172c ve bna-miR172d önemli ölçüde yukarı düzenlenmiştir. Bu miRNA’ların hedef genleri arasında Squamosa promoter-binding protein (SBP), WRKY transcription factor, WRKY20-1 transcription factor, GATA transcription factor, NAC transcription factor 92, MYB-like transcription factor 2, Agamous-like protein 16 gibi bazı önemli transkripsiyon faktörleri bulunmaktadır. Örneğin; Bna-miR156a ifadesi yukarı regüle olup, Squamosa promoter-binding protein (SBP), Auxin efflux carrier component, Mitogen activated kinase ZIK9, Vacuolar protein sorting-associated protein, Golgi apparatus membrane protein TVP23 önemli hedef genleri bulunmaktadır. Örneğin Squamosa promoter-binding (SBP) proteinleri, bitkilerde çeşitli genlerin transkripsiyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörleri olarak görev yapmaktadır. Bu genler, bitki büyümesi ve gelişimi, çiçeklenme zamanlaması, yaprak morfolojisi gibi önemli süreçlerde kritik roller üstlenmektedir. Diğer bir taraftan, Mitogen activated kinase kinase kinase ZIK9, Calcium-transporting ATPase, Mitogen-activated protein kinase (MAPK), Auxin-responsive protein gibi sinyal iletimi ile ilişkili hedef genlerde saptanmıştır. Bunun yanı sıra, HVA22-like protein, Rhomboid-like protein, Serine/threonine-protein phosphatase abiyotik stres ile ilişkili hedef genlerinin de ifadesinin değiştiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.9’da yer alan hedef genler incelendiğinde, genlerin daha çok oksidatif stres, antioksidan sistem ile ilişkili kloroplast, golgi aygıtı ve vakuol organellerindeki önemli süreçlere katılarak taşıyıcı aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Kloroplast, golgi aygıtı ve vakuol organelleri, bitki hücresinde oksidatif stresin oluşumunda ve etkilerinde önemli bir rol oynamaktadır. Bitkilerde oksidatif stresi yönetmek için bu organellerde antioksidan savunma mekanizmaları bulunur ve bu mekanizmalar, serbest radikalleri nötralize ederek hücreyi korumakta ve oksidatif hasarı azaltmaktadır. Örneğin; thioredoxin reductase, Glutathione S-transferase, Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic; Superoxide dismutase [Cu-Zn], CO₂-response secreted protease, Laccase, Vacuolar protein sorting-associated protein, Golgi apparatus membrane protein TVP23, Purple acid phosphatase (PAP), Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit, chloroplastic, Dirigent protein, Patatin antioksidan sistemde önemli roller üstlenen genler farklı ifade seviyeleri göstermiştir. Örneğin bna-miR156a ifadesi yukarı regüle olup,

Vacuolar protein sorting-associated protein, Golgi apparatus membrane protein TVP23 önemli hedef genleri bulunmaktadır. Golgi aygıtı zar proteini TVP23, Golgi cihazının membranında yer alan ve hücrelerde çeşitli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde kritik bir rol oynayan bir proteindir. Vacuolar protein sorting-associated protein (VPS protein), hücrelerdeki proteinlerin hücre içinde belirli organellere, özellikle de vakuollere, sınıflandırılması ve taşınmasıyla ilişkilidir. Bu proteinler, hücresel trafiği düzenleyen ve hücre içi proteinlerin doğru yerleştirilmesi için gerekli olan komplekslerin bir parçasıdır. Diğer bir taraftan, bna-miR159 metal ile indüklenen oksidatif strese yanıtta sorumlu genlerin transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bna-miR159, Cu/Zn süperoksit dismutazları (SOD) kodlayan sitozolik CSD1 ve kloroplastik CSD2 olmak üzere iki CSD transkriptini hedeflemektedir. Early raya yüksek Cr stresine (1000 μ M Cr) yanıtta bna-miR159 aşağı regüle edildiği ve miR159'un Superoxide dismutase [Cu-Zn] hedeflediği tespit edilmiştir. Early raya'da bna-miR166f'in Cr stresi altında önemli ölçüde yukarı regüle edildiği ve Glutathione S-transferase (GST), Protein detoksifikasyonu, Thioredoxin reductase, Glycosyltransferase, Beta-galactosidase ve Purple acid phosphatase gibi ROS ile ilişkili önemli genleri hedeflediği tespit edilmiştir. Örneğin bna-miR166f'in hedef geni thioredoxin redüktaz, bitkilerde oksidatif stresin yönetimi, protein katlanması, DNA sentezi ve onarımı, redoks düzenleme ve fotosentez gibi birçok hayati süreçte kritik bir rol oynamaktadır (Balmer ve ark., 2004; Kapoor ve ark., 2015). Kloroplastlarda lokalize olan Thioredoxin redüktaz (TrxR), fotosentez sırasında üretilen ROS'un detoksifikasyonunda yer alır ve bu sayede fotosentetik aparatın korunmasına yardımcı olmakta ve hücrelerde oksidatif stresi azaltmak için çalışmaktadır. Benzer bir şekilde, bna-miR166f hedef geni Purple acid phosphatase (PAP) bitkilerde fosfor metabolizması, fosfor eksikliğine yanıt, savunma mekanizmaları, antioksidan savunma ve genel büyüme ile gelişim süreçlerinde önemli roller üstlenmektedir. Bu enzim, bitkilerin çevresel streslere uyum sağlamasında ve optimal büyüme koşullarını sürdürmesinde kritik bir işlev görmektedir (Holmgren, 1995; Kapoor ve ark., 2015).

Bna-miR164a'nın hedef genlerinin NAC transcription factor 92; Histone deacetylase complex subunit SAP18; PRA1 family protein; Bidirectional sugar transporter SWEET; MYB-like transcription factor 2; Acyl-CoA--sterol O-acyltransferase 1; WAT1-related protein olduğu tespit edilmiştir. Bunlar arasında, PRA1 ailesi proteinleri bitkilerde Golgi aygıtında yapısal ve fonksiyonel organizasyonunda kilit

bir rol oynamaktadır (Alvim Kamei ve ark., 2008). Bu proteinler, hücre içi membran trafik süreçlerini düzenleyerek bitkilerin büyüme, gelişme ve stres yanıtlarını koordine etmektedir. Bu yönleriyle PRA1 proteinleri, hücrel membranların ve organellerin (özellikle Golgi aygıtının) doğru yerleşimini ve organizasyonunu sağlamakta ve hücre içinde ve hücreler arasında protein taşınmasını düzenler. Özellikle, Golgi cihazından dış ortama proteinlerin sekresyonunu düzenler ve bu süreçlerde membran trafik mekanizmalarını kontrol etmektedir. NAC (NAM, ATAF1/2 ve CUC2) transkripsiyon faktörleri, bitkilerde gen ifadesini düzenleyen ve çeşitli biyolojik süreçlerde önemli roller üstlenen büyük bir transkripsiyon faktörü ailesidir (Kikuchi ve ark., 2000; Puranik ve ark., 2012). NAC faktörleri, bitkilerin metal stresi gibi metal stresine yanıtta önemli rol oynamaktadır. Örneğin, bazı NAC faktörleri stres sinyallerine yanıt olarak stresin ve antioksidan enzimlerin üretimini düzenlemektedir. WAT1 (Walls Are Thin 1) ile ilişkili proteinler, bitkilerde hücre duvarı biyosentezi ve organizasyonunda önemli roller üstlenen bir protein ailesidir (Miedes ve ark., 2014). Özellikle bitkilerin hücre duvarının yapısal bütünlüğünü sağlamada ve çeşitli fizyolojik süreçlerde rol oynamaktadırlar. Bazı WAT1 ile ilişkili proteinler, bitkilerde iyon taşıma kanalları veya taşıyıcılar olarak işlev görmektedir. Özellikle minerallerin kökten yukarı taşınmasında ve bitki beslenmesinde önemli rol oynamaktadırlar.

Bna-miR168a ifadesi yüksek Cr stresi altında önemli ölçüde yukarı regüle olduğu saptanmıştır. Bna-miR168a'nın hedef genleri arasında Mitogen-activated protein kinase (MAPK); Alpha-1,4 glucan phosphorylase; Kinesin-like protein; Protein detoxification olduğu tespit edilmiştir. Mitogen-activated protein kinazları (MAPK'ler), bitkilerde çeşitli hücrel süreçlerde sinyal iletiminde kritik rol oynayan bir protein kinaz ailesidir (Ichimura ve ark., 2002; Cristina ve ark., 2010). Bu kinazlar, büyüme, gelişme, farklılaşma ve çevresel streslere yanıt gibi çeşitli hücrel süreçlerde önemli işlevlere sahiptirler. Cr stresi altında, Bna-miR172a/b/c/d ifadesi yukarı regüle olduğu ve hedef genleri arasında RING-type E3 ubiquitin transferase, Methionine aminopeptidase (MetAP), Calcium-transporting ATPase, Protein detoxification; Kinesin-like protein olduğu tespit edilmiştir. Kalsiyum, bitki hücrelerinde sinyal molekülü olarak kullanılmaktadır. Kalsiyum-taşıma ATPaz (Ca-ATPaz), Ca^{2+} seviyelerini düzenleyerek, bitkide büyüme, gelişme, stres yanıtları ve diğer fizyolojik süreçlerde önemli rol oynayan kalsiyum sinyal yollarını modüle etmektedir (Wan ve Zhang, 2012; Ghosh ve ark., 2022).

Bna-miR172d'in hedef geni kinesin-benzeri proteinler (kinesin-like proteins, KLPs), bitki hormonlarının taşınmasında ve sinyal iletiminde önemli rol oynayan ve bitkilerde hücre içi taşımada kritik rol oynayan motor proteinleridir. Bu proteinler, hücre içindeki mikrotübüller boyunca hareket ederek çeşitli hücresel bileşenlerin taşınmasını sağlamaktadır.

Çizelge 4.10'da görüldüğü üzere, Cr uygulaması yapılan *B. juncea* var. Sindh raya bitkisinin kök kısımlarında, kontrol grubuna oranla deney grubunda (1000 μ M Cr-uygulanan) ifadesi artan ve ifadesi azalan bazı miRNA'lar ve onların hedef genleri kat değişimleri ile birlikte verilmiştir. RNA analiz sonucunda, Çizelge 4.10'da belirtilen genler istatistiksel olarak anlamlı fark göstermektedir ($p < 0.05$).

Çizelge 4.10. *B. juncea* var. Sindh raya bitkisine ait kök örneklerinde, Cr1000 (deney grubunda) CK (kontrol grubuna) oranla farklı seviyede ifade edilen miRNA'lar ve onların "ifadesi artan (up) ve ifadesi azalan (down)" hedef genlerinin listesi

miRNA'lar	Hedef Genler	Regulated	Kat Değişimi (Cr1000/CK)
bna-miR156a	Squamosa promoter-binding-like protein; Auxin efflux carrier component Mitogen activated kinase kinase kinase ZIK9; Vacuolar protein sorting-associated protein; AT-rich interactive domain-containing protein 4 Golgi apparatus membrane protein TVP23; Amino acid permease 4-1 Hexosyltransferase; Lipoyl synthase, mitochondrial; RING-type E3 ubiquitin transferase	up	2,62
bna-miR156b	Serine/arginine-rich splicing factor SC35; Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog; Squamosa promoter-binding-like protein Formin-like protein; S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase RING-type E3 ubiquitin transferase; Serine/threonine-protein phosphatase; Beta-amylase	up	1,395
bna-miR156c	Serine/arginine-rich splicing factor SC35; Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog; Squamosa promoter-binding-like protein; Formin-like protein; S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase; RING-type E3 ubiquitin transferase; Serine/threonine-protein phosphatase; Beta-amylase	up	1,395
bna-miR156d	Squamosa promoter-binding-like protein; Auxin efflux carrier component Mitogen activated kinase kinase kinase ZIK9; Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog; AT-rich interactive domain-containing protein 4; Transmembrane 9 superfamily member; Endoglucanase; Tubby-like F-box protein	up	2,618
bna-miR156f	Squamosa promoter-binding-like protein; Auxin efflux carrier component Mitogen activated kinase kinase kinase ZIK9; Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog; AT-rich interactive domain-containing protein 4; Transmembrane 9 superfamily member; Endoglucanase; Tubby-like F-box protein	up	2,609
bna-miR156g	Serine/arginine-rich splicing factor SC35; Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog; Squamosa promoter-binding-like protein; Formin-like protein; S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase; RING-type E3 ubiquitin transferase; Serine/threonine-protein phosphatase; Beta-amylase	up	1,428
bna-miR164a	NAC transcription factor 92; Histone deacetylase complex subunit SAP18; PRA1 family protein; tRNA dimethylallyltransferase 9-3; Bidirectional sugar transporter SWEET; MYB-like transcription factor 2; Acyl-CoA--sterol O-acyltransferase 1; WAT1-related protein	up	1,333
bna-miR166f	Protein detoxification; Purple acid phosphatase; Glutathione S-transferase; Phosphoinositide phospholipase C; Beta-galactosidase; Peptidylprolyl isomerase; Histone H3; Thioredoxin reductase;	up	1,869

	Glycosyltransferase; Importin subunit alpha; Proteasome subunit alpha type; SLR1 glycoprotein Probable magnesium transporter		
bna-miR168a	Mitogen-activated protein kinase; tRNA (adenine(58)-N(1))-methyltransferase; Alpha-1,4 glucan phosphorylase; Kinesin-like protein; Protein detoxification	up	1,879
bna-miR172a	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase-like 3; RING-type E3 ubiquitin transferase; KRR1 small subunit processome component; Methionine aminopeptidase; Calcium-transporting ATPase; Protein detoxification Endoglucanase; Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M	up	1,385
bna-miR172b	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase-like 3; Calcium-transporting ATPase; RING-type E3 ubiquitin transferase; KRR1 small subunit processome component; Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M; Replication protein A subunit	up	1,914
bna-miR172c	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase-like 3; Calcium-transporting ATPase; KRR1 small subunit processome component; Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M; Endoglucanase	up	1,914
bna-miR172d	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase-like 3; RING-type E3 ubiquitin transferase; Calcium-transporting ATPase; Protein detoxification; Kinesin-like protein	up	1,796
bna-miR159	Hexosyltransferase; Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic Serine/threonine-protein phosphatase; Pyruvate, phosphate dikinase RNA-dependent RNA polymerase; Beta-hexosaminidase; Superoxide dismutase [Cu-Zn]	down	1,769
bna-miR169m	Diacylglycerol kinase (Fragment); Clathrin heavy chain; GATA transcription factor; Ferredoxin; Protein detoxification 23; Autophagy-related protein 3; Signal peptidase I; Exocyst subunit Exo70 family protein	down	7,566
bna-miR6028	HVA22-like protein; WRKY transcription factor; S-acyltransferase Ammonium transporter; Putative tRNA (cytidine(32)/guanosine(34)-2'-O)-methyltransferase; Protein arginine N-methyltransferase; Beta-galactosidase; RNA-dependent RNA polymerase	down	1,273
bna-miR6029	Patatin; ATP-dependent DNA helicase; Pectinesterase; CO(2)-response secreted protease; Tubby-like F-box protein; Auxin-responsive protein Acyl-[acyl-carrier-protein] hydrolase; tRNA-dihydrouridine(47) synthase [NAD(P)(+)] ; Proteasome subunit beta type; Histidinol dehydrogenase, chloroplastic; Phosphatidate cytidylyltransferase CPK5-2.1	down	1,83
bna-miR1140	Ubiquitinyl hydrolase 1; Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit Non-specific serine/threonine protein kinase; Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F; Protein detoxification 28; Proteasome subunit beta type	up	1,309
bna-miR156e	Vacuolar protein sorting-associated protein 28 homolog; Squamosa promoter-binding-like protein; Auxin efflux carrier component; Mitogen activated kinase kinase kinase ZIK9; AT-rich interactive domain-containing protein 4; Transmembrane 9 superfamily member; Endoglucanase; Tubby-like F-box protein	up	2,729
bna-miR164b	NAC transcription factor 92; Histone deacetylase complex subunit SAP18; PRA1 family protein; tRNA dimethylallyltransferase 9-3; MYB-like transcription factor 2; Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein; Bidirectional sugar transporter SWEET; Acyl-CoA--sterol O-acyltransferase 1; Pectinesterase	up	1,557
bna-miR164c	NAC transcription factor 92; Histone deacetylase complex subunit SAP18; PRA1 family protein; tRNA dimethylallyltransferase 9-3; MYB-like transcription factor 2; Branched-chain-amino-acid aminotransferase; Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein; Bidirectional sugar transporter SWEET; Acyl-CoA--sterol O-acyltransferase 1	up	1,557
bna-miR164d	NAC transcription factor 92; Histone deacetylase complex subunit SAP18; PRA1 family protein; tRNA dimethylallyltransferase 9-3; Myb-like transcription factor 2; Branched-chain-amino-acid aminotransferase Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein; Bidirectional sugar transporter SWEET; Acyl-CoA--sterol O-acyltransferase 1; Pectinesterase	up	1,557
bna-miR167a	Hexosyltransferase; Peroxidase; Auxin response factor; Peptidylprolyl isomerase; Endoglucanase; Signal peptidase I; Pectinesterase; Protein detoxification; DNA topoisomerase 2; HVA22-like protein; Exocyst subunit Exo70 family protein; Threonine dehydratase; Histone-lysine N-methyltransferase	up	1,335
bna-miR167b	Hexosyltransferase; Peroxidase; Auxin response factor; Endoglucanase Signal peptidase I; Protein detoxification; DNA topoisomerase 2 HVA22-like protein; Exocyst subunit Exo70 family protein; Threonine dehydratase; Histone-lysine N-methyltransferase	up	1,335
bna-miR167c	Hexosyltransferase; Peroxidase; Auxin response factor; Endoglucanase	up	1,352

	Signal peptidase I; Protein detoxification; DNA topoisomerase 2 HVA22-like protein; Exocyst subunit Exo70 family protein; Threonine dehydratase; Histone-lysine N-methyltransferase		
bna-miR167d	Hexosyltransferase; Peroxidase; Auxin response factor; Endoglucanase Signal peptidase I; Protein detoxification; DNA topoisomerase 2 HVA22-like protein; Exocyst subunit Exo70 family protein; Threonine dehydratase; Histone-lysine N-methyltransferase	up	1,372
bna-miR171d	Exocyst subunit Exo70 family protein; Expansin; Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha, mitochondrial; Peroxidase; Sister chromatid cohesion 1 protein 3; S-acyltransferase	up	1,239
bna-miR171e	Exocyst subunit Exo70 family protein; Expansin; Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha, mitochondrial; Peroxidase; Sister chromatid cohesion 1 protein 3; S-acyltransferase	up	1,239
bna-miR2111d	Purple acid phosphatase; Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 homolog; Pyruvate kinase; Profilin; Serine/threonine-protein kinase TOR; DNA repair protein REV1; Hexosyltransferase	up	8,238
bna-miR399a	Terpene cyclase/mutase family member; Protein SAD1/UNC-84 domain protein 1; Lon protease homolog 2, peroxisomal; Tubby-like F-box protein; Glycosyltransferase; Katanin p60 ATPase-containing subunit A1 ATP-dependent DNA helicase; Probable inorganic phosphate transporter 1-5; RING-type E3 ubiquitin transferase	up	7,642
bna-miR399b	Terpene cyclase/mutase family member; Protein SAD1/UNC-84 domain protein 1; Lon protease homolog 2, peroxisomal; Tubby-like F-box protein; Glycosyltransferase; Katanin p60 ATPase-containing subunit A1 ATP-dependent DNA helicase; Probable inorganic phosphate transporter 1-5; RING-type E3 ubiquitin transferase	up	7,642
bna-miR6031	Branched-chain-amino-acid aminotransferase; Elongator complex protein 3; Serine/threonine-protein phosphatase; Dirigent protein; Patatin	up	1,688
bna-miR162a	RBR-type E3 ubiquitin transferase (Fragment); Phospholipid-transporting ATPase; Conserved oligomeric Golgi complex subunit 8 AT-hook motif nuclear-localized protein; Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase; Pectinesterase; Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase; Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase Tubulin beta chain; Transcriptional adapter; Phosphotransferase	down	1,259
bna-miR169a	Clathrin heavy chain; Exocyst subunit Exo70 family protein Carboxypeptidase; Transcription factor subunit NF-YC11B; ABC transporter B family member 7; Kinesin-like protein; Exocyst subunit Exo70 family protein; 3-ketoacyl-CoA synthase; Malate dehydrogenase Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP18-1	down	12,106
bna-miR169b	Clathrin heavy chain; Exocyst subunit Exo70 family protein Carboxypeptidase; Transcription factor subunit NF-YC11B; ABC transporter B family member 7; Kinesin-like protein; Exocyst subunit Exo70 family protein; 3-ketoacyl-CoA synthase; Malate dehydrogenase Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP18-1	down	12,106
bna-miR169n	Clathrin heavy chain; Exocyst subunit Exo70 family protein; Carboxypeptidase; Transcription factor subunit NF-YC11B; ABC transporter B family member 7; Kinesin-like protein; Exocyst subunit Exo70 family protein; Beta-galactosidase; Diacylglycerol kinase (Fragment); Phospholipid-transporting ATPase; 3-ketoacyl-CoA synthase; ATP-citrate synthase beta chain protein 2; Malate dehydrogenase	down	17,294
bna-miR171f	3-isopropylmalate dehydrogenase; Charged multivesicular body protein 7 S-acyltransferase; Patatin; GATA transcription factor; Exocyst subunit Exo70 family protein; Dynein light chain	down	1,642
bna-miR171g	3-isopropylmalate dehydrogenase; Charged multivesicular body protein 7 S-acyltransferase; Patatin; GATA transcription factor; Exocyst subunit Exo70 family protein; Dynein light chain	down	1,317
bna-miR393	Protein serine/threonine kinase BNK1; Phosphoserine aminotransferase Phosphatidate cytidyltransferase; Thiamine thiazole synthase, chloroplastic; Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic; GPI mannosyltransferase 2	down	1,33
bna-miR394a	Reticulon-like protein; AP-2 complex subunit alpha; Signal recognition particle 54 kDa protein; ATP-dependent 6-phosphofructokinase Bidirectional sugar transporter SWEET; Exocyst subunit Exo70 family protein; Pectate lyase	down	1,874
bna-miR394b	Reticulon-like protein; AP-2 complex subunit alpha; Signal recognition particle 54 kDa protein; ATP-dependent 6-phosphofructokinase Bidirectional sugar transporter SWEET; Exocyst subunit Exo70 family protein; Pectate lyase	down	1,789
bna-miR395a	ATP sulfurylase 4; Auxin-responsive protein; Replication protein A	down	3,701

	subunit; Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase; ATP-dependent DNA helicase; Laccase; Histone deacetylase; Potassium transporter; Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E; Bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase		
bn-miR395b	ATP sulfurylase 4; Auxin-responsive protein; Replication protein A subunit; Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase; ATP-dependent DNA helicase; Laccase; Histone deacetylase; Potassium transporter; Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E; Bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase	down	3,701
bn-miR395c	ATP sulfurylase 4; Auxin-responsive protein; Replication protein A subunit; Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase; ATP-dependent DNA helicase; Laccase; Histone deacetylase; Potassium transporter; Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E; Bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase	down	3,701
bn-miR395d	ATP sulfurylase 4; Auxin-responsive protein; Disease resistance protein ADR1; Replication protein A subunit; Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase; ATP-dependent DNA helicase; Phosphatidylinositol 4-kinase alpha 2; Laccase; Pectinesterase; RING-type E3 ubiquitin transferase Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	down	3,505
bn-miR395e	ATP sulfurylase 4; Auxin-responsive protein; Disease resistance protein ADR1; Replication protein A subunit; Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase ; ATP-dependent DNA helicase; Phosphatidylinositol 4-kinase alpha 2; Laccase; Pectinesterase; RING-type E3 ubiquitin transferase Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	down	3,505
bn-miR395f	ATP sulfurylase 4; Auxin-responsive protein; Disease resistance protein ADR1; Replication protein A subunit; Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase ; ATP-dependent DNA helicase; Phosphatidylinositol 4-kinase alpha 2; Laccase; Pectinesterase; RING-type E3 ubiquitin transferase Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	down	3,505
bn-miR403	Reticulon-like protein; Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1; Tubulin beta chain; Glutamate decarboxylase; Ferritin-4, chloroplastic	down	3,304
bn-miR6030	ABA-responsive element binding factor 3; Patatin; Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 13; Transmembrane 9 superfamily member; Vacuolar cation/proton exchanger; Phospholipase D	down	2,849
bn-miR824	Agamous-like protein 16; Transcription initiation factor IIA subunit 2 Pentatricopeptide repeat-containing protein At4g18840; Serine/threonine-protein phosphatase; Glycosyltransferase; Transmembrane 9 superfamily member; Protein detoxification	down	1,244

B. juncea var. Sindh raya bitkisinde Cr-stresine duyarlı miRNA'ların her biri için 10'dan fazla hedefi olan birçok hedef geni bulunmaktadır. Bu strese duyarlı bn-miR162a'nın hedef genleri, RBR-type E3 ubiquitin transferase (Fragment), Phospholipid-transporting ATPase, Conserved oligomeric Golgi complex subunit 8, AT-hook motif nuclear-localized protein, Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, Pectinesterase, Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase, Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase, Tubulin beta chain, Transcriptional adapter, Phosphotransferase olmak üzere birçok önemli yolakta rol oynayan diğer genleri de kodlamaktadır. Diğer bir taraftan, bn-171g'in hedef genleri arasında 3-isopropylmalate dehydrogenase, Charged multivesicular body protein 7, S-acyltransferase, Patatin, GATA transcription factor, Exocyst subunit Exo70 family protein, Dynein light chain bulunmaktadır. Dahası, Cr-stresinde Bn-miR395a/b/c'nin aşağı regüle olduğu ve bu miRNA'ların bazı önemli hedef genleri arasında ATP sulfurylase 4 (AP 4), Auxin-

responsive protein (ARF), Replication protein A subunit, Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, ATP-dependent DNA helicase, Laccase, Histone deacetylase, Potassium transporter, Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E, Bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase olduğu saptanmıştır. Cr-stresine karşı aşağı düzenlenen diğer bir miRNA olan bna-miR824'ün hedef genleri ise Agamous-like protein 16, Transcription initiation factor IIA subunit 2, Pentatricopeptide repeat-containing protein At4g18840, Serine/threonine-protein phosphatase, Glycosyltransferase, Transmembrane 9 superfamily member, Protein detoksifikasyondur. Sindh raya'da, Cr-stresi altında, bna-miR162a, bna-miR171g, bna-miR395a/b/c ve bna-miR824 aşağı regüle edilirken; bu miRNA'lar Early raya'da yukarı regüle edilmiştir. Cr-stresi altında, Sindh raya'da bna-miR6031 yukarı regüle edilmiş olduğu ve Branched-chain-amino-acid aminotransferase, Elongator complex protein 3, Serine/threonine-protein phosphatase, Dirigent protein ve Patatin genlerini hedeflediği saptanmıştır. Sindh raya ile karşılaştırıldığında Early raya'da bna-miR6031'in aşağı regüle edildiği saptanmıştır.

Çizelge 4.10'da gösterildiği üzere, *B. juncea* var. Sindh raya'da bna-miR169a (12.106), bna-miR169b (12.106), bna-miR169n (17.294), bna-miR395a (3.701), bna-miR395b (3.701), bna-miR395c (3.701), bna-miR395d (3.505), bna-miR395e (3.505), bna-miR395f (3.505), bna-miR403 (3.304), bna-miR169m (7.556) ve bna-miR6030'un (2.849) ifadesinin önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Diğer bir taraftan, bna-miR2111d (8.238), bna-miR399a (7.642), bna-miR399b (7.642), bna-miR156d (2.618), bna-miR156f (2.609), bna-miR156a (2.62), bna-miR156e (2.729) ve bna-miR156d'in (2.618) ifadesinin önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir.

4.4.3.4. Fonksiyonel Zenginleştirme Analizi

Fonksiyonel zenginleştirme analizi için, farklı seviyelerde ifade edilen miRNA'ların hedef genleri psRNATarget aracı (2017 güncellemesi, Xinbin ve ark., 2018) kullanılarak varsayılan parametrelerle tahmin edilmiştir. Benjamini-Hochberg (BH) düzeltme yöntemi, çoklu hipotez testlerinde yanlış keşif oranını (False Discovery Rate, FDR) kontrol etmek için kullanılan istatistiksel bir yöntemdir. Bu yöntem, p-değerlerinin sıralanarak belirli bir eşikçe göre düzeltilmesini sağlar ve bu sayede yanlış pozitif sonuçların oranını minimize etmektedir. Benjamini-Hochberg (BH) düzeltme (FDR) yöntemi, p-değeri eşikçi 0.01'e göre istatistiksel olarak anlamlı terimleri filtrelemek için

kullanılmıştır. Zenginleştirme analizi, ayrı ayrı (i) tüm miRNA'ların hedef genleri, (ii) yukarı regüle edilen miRNA'ların hedef genleri ve (iii) aşağı regüle edilen miRNA'ların hedef genleri kullanılarak uygulanmıştır.

miRNA'ların hedef genleri için fonksiyonel zenginleştirme analizi, zenginleştirilmiş Gen Ontolojisi (GO) ve Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (KEGG) yollarını belirlemek amacıyla hipergeometrik test kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, her zenginleştirme kaynağından (GO: BP (Biyolojik Süreç), GO: CC (Hücrel Bileşen), GO: MF (Moleküler Fonksiyon), KEGG) elde edilen ayarlanmış p-değerine göre belirlenen en önemli 10 terimi temsil eden balon grafikleri ggplot2 R paketi (sürüm 3.4.2) (Wickham, 2016) kullanılarak oluşturulmuştur. Zenginleştirme analizinin sonuçlarının özeti Çizelge 4.11'de sunulmuştur.

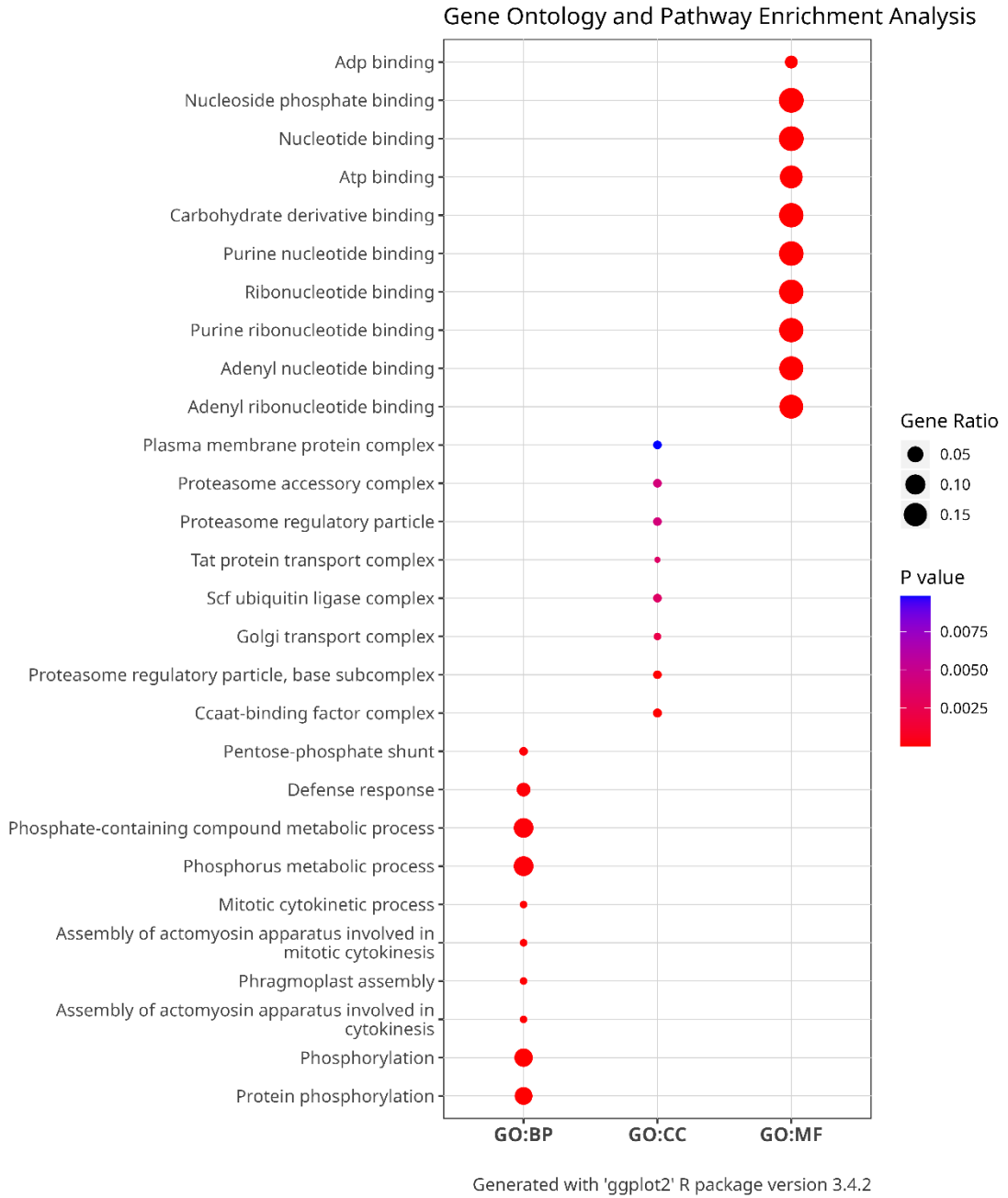
Çizelge 4.11'de Early raya ve Sindh raya bitkilerinin deney kök örneklerinde kontrol kök örneklerine oranla anlamlı fark gösteren genlerin, gen ontolojisine göre fonksiyonel kategorizasyonları verilmiştir. Tüm organizmalarda genlerin rollerini ve gen ürünlerini tanımlamak amacıyla kullanılan gen ontolojisi; hücrel bileşen, biyolojik süreç ve moleküler fonksiyon olarak 3 ana kategori altında organize etmektedir.

Çizelge 4.11. FC değeri >1.2 ve <0.83 olan genler için karşılaştırma başına zenginleştirilmiş terim sayısı

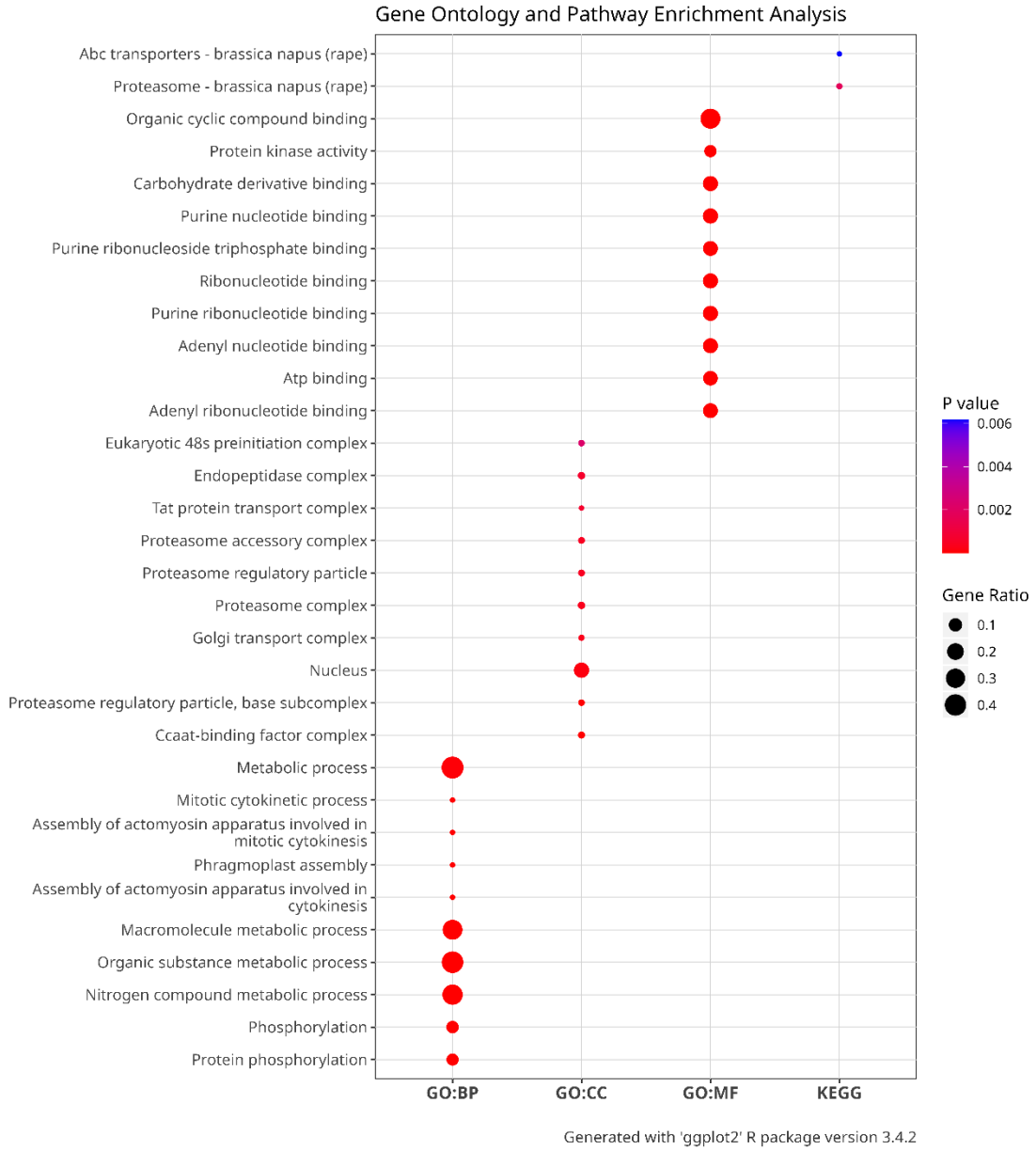
Karşılaştırma	Kaynak	Tüm Genler için Zenginleştirme	Yukarı Regüle Edilen Genler için Zenginleştirme	Aşağı Regüle Edilen Genler için Zenginleştirme
Kontrol- <i>B. juncea</i> var. Early raya vs 1000 µM Cr- <i>B. juncea</i> var. Early raya	GO: BP	61	58	32
	GO:CC	16	10	3
	GO:MF	45	38	35
	KEGG	2	ND	ND
Kontrol- <i>B. juncea</i> var. Sindh raya vs 1000 µM Cr- <i>B. juncea</i> var. Sindh raya	GO: BP	19	24	32
	GO:CC	15	7	6
	GO:MF	40	20	44
	KEGG	1	1	ND
Kontrol- <i>B. juncea</i> var. Early raya vs Kontrol- <i>B. juncea</i> var. Sindh raya	GO: BP	35	57	25
	GO:CC	8	8	2
	GO:MF	56	56	47
	KEGG	ND	ND	ND

GO fonksiyon analizinde, Early raya'nın kontrol grubu ve Sindh raya'nın kontrol grubunun köklerinde yapılan zenginleştirme eğilimleri Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Karşılaştırmadan elde edilen tüm DEM'lerin hedef genleri için zenginleştirme analizinin her kaynağından (GO: BP, GO:CC, GO:MF, KEGG) en önemli 10 terimi gösteren balon grafiği ile belirtilmiştir. Kökte farklı ifade edilen miRNA'ların köklerdeki hedef genlerinin fonksiyonu üç kategori ile açıklanmıştır: biyolojik süreçler, hücresel bileşenler ve moleküler fonksiyonlar. Bu kategoriler arasında en çok moleküler fonksiyonlar anotlanmıştır (Şekil 4.9; 4.10; 4.11). Moleküler fonksiyonlarda, gen fonksiyonları genel olarak iyon bağlanması, ATP bağlanması, Nükleotit bağlanması, Karbonhidrat türevi bağlanması olarak anotlanmıştır. Hücresel bileşenler ağırlıklı olarak Fosforilasyon, Protein fosforilasyonu, fosfor metabolik süreç ve fosfat içeren bileşen metabolik süreçlerinde yoğunlaşmıştır.

Early raya'nın kontrol grubu ve 1000 μ M Cr grubunun, GO fonksiyon analizinde, köklerinde yapılan zenginleştirme eğilimleri Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Karşılaştırmadan elde edilen tüm DEM'lerin hedef genleri için zenginleştirme analizinin her kaynağından en önemli 10 terimi gösteren balon grafiği ile belirtilmiştir. Kökte yapılan GO fonksiyon analizinde moleküler fonksiyonlar önemli bir rol oynamaktadır. Bu fonksiyonlar arasında organik döngüsel (siklik) bileşiklerin bağlanması, karbonhidrat türevi bağlanması, nükleotit bağlanması, ATP bağlanması en çok anotlanmıştır (Şekil 4.9; 4.10; 4.11). Hücresel bileşenler ağırlıklı olarak metabolik süreç, makromolekül metabolik süreci, organik madde metabolik süreci ve azot bileşikleri metabolik süreçlerinde yoğunlaşmıştır. Sindh raya'nın kontrol grubu ve 1000 μ M Cr grubunun, GO fonksiyon analizinde, köklerinde yapılan zenginleştirme eğilimleri Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Karşılaştırmadan elde edilen tüm DEM'lerin hedef genleri için zenginleştirme analizinin her kaynağından en önemli 10 terimi gösteren balon grafiği ile belirtilmiştir. Kökte yapılan GO fonksiyon analizinde moleküler fonksiyonlar önemli bir rol oynamaktadır. Bu fonksiyonlar arasında anyon bağlanması, nükleozid fosfat bağlanması, nükleotit bağlanması, ribonükleotit bağlanması, karbonhidrat türevi bağlanması ve ATP bağlanması en çok anotlanmıştır. Hücresel bileşenler ağırlıklı olarak NADPH metabolik süreci, NADPH regenerasyonu, protein polimerizasyonunun düzenlenmesi, Glukoz-6-fosfat metabolik süreci, Pentoz fosfat yolu, protein katabolizmasının düzenlenmesi ve phragmoplast oluşumu bulunmaktadır.



Şekil 4.9. Kontrol-*B. juncea* var. Early raya ve Kontrol-*B. juncea* var. Sindh raya karşılaştırmasından elde edilen tüm DEM'lerin hedef genleri için zenginleştirme analizinin her kaynağından (GO:BP, GO:CC, GO:MF, KEGG) en önemli 10 terimi gösteren balon grafiği (Şekillerdeki gen oranı, analizdeki ilgili terime atanan gen sayısının analizdeki toplam gen sayısına oranını temsil ederken, p-değeri yanlış keşif oranı (FDR) için düzeltilmiş p-değerini temsil etmektedir)



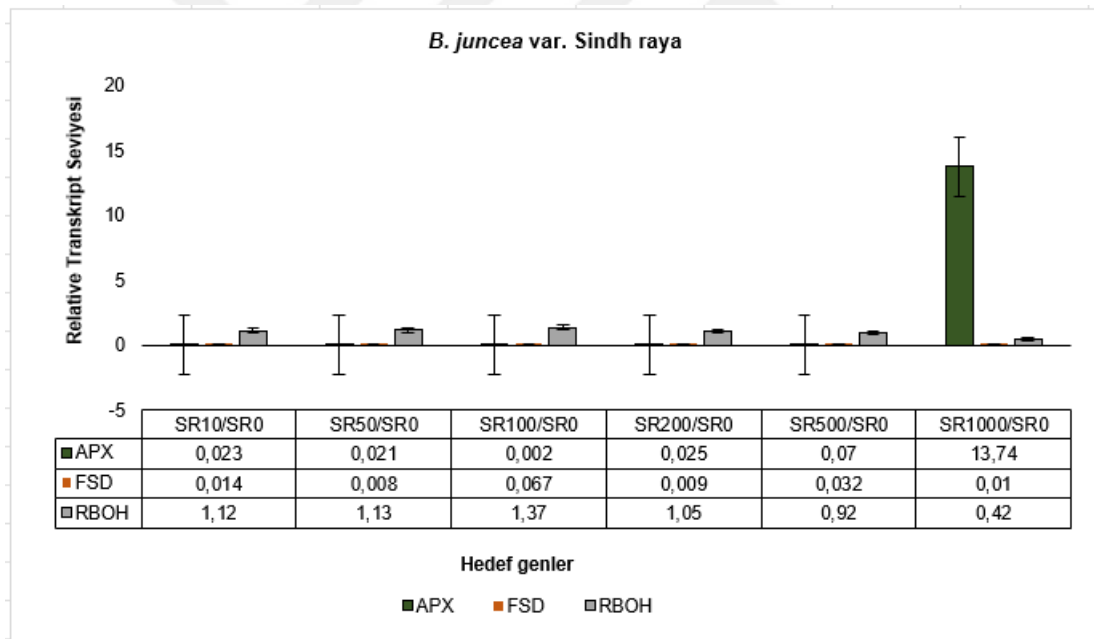
Şekil 4.10. Kontrol-*B. juncea* var. Early raya ve 1000 μ M Cr-*B. juncea* var. Early raya karşılaştırmasından elde edilen tüm DEM'lerin hedef genleri için zenginleştirme analizinin her kaynağından (GO: BP, GO:CC, GO:MF, KEGG) en önemli 10 terimi gösteren balon grafiği. Şekillerdeki gen oranı, analizdeki ilgili terime atanan gen sayısının analizdeki toplam gen sayısına oranını temsil ederken, p-değeri yanlış keşif oranı (FDR) için düzeltilmiş p-değerini temsil etmektedir.



Şekil 4.11. Kontrol-*B. juncea* var. Sindh raya ve 1000 μ M Cr-*B. juncea* var. Sindh raya karşılaştırmasından elde edilen tüm DEM'lerin hedef genleri için zenginleştirme analizinin her kaynağından (GO: BP, GO:CC, GO:MF, KEGG) en önemli 10 terimi gösteren balon grafiği (Şekillerdeki gen oranı, analizdeki ilgili terime atanan gen sayısının analizdeki toplam gen sayısına oranını temsil ederken, p-değeri yanlış keşif oranı (FDR) için düzeltilmiş p-değerini temsil etmektedir)

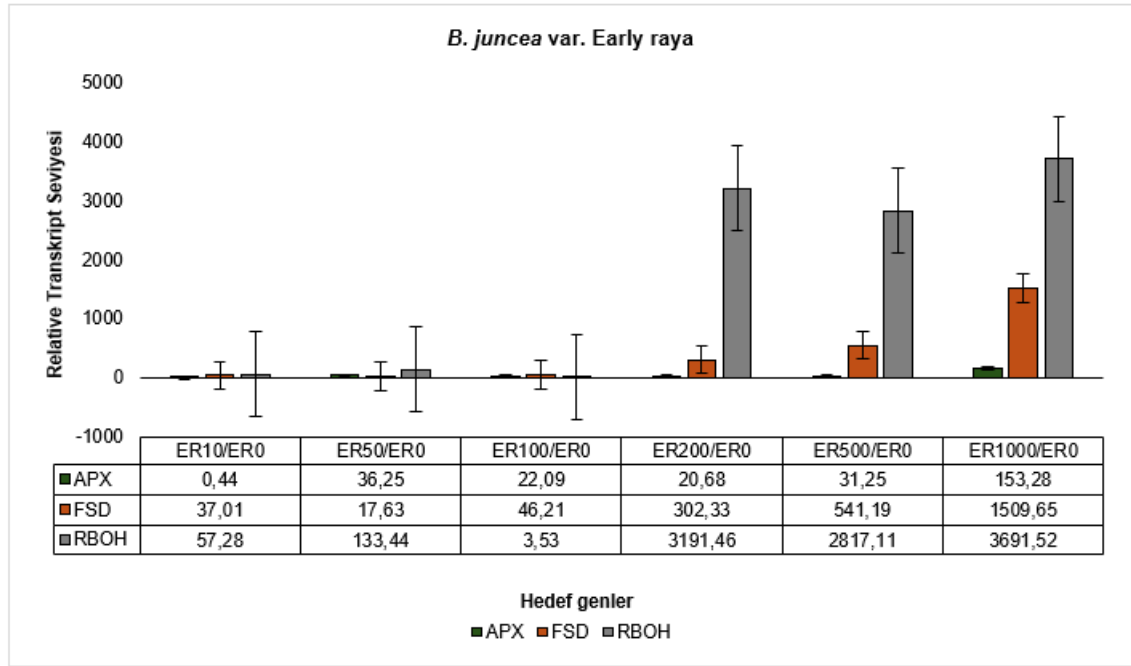
4.5. Seçilen Bazı Hedef Genlerin RT-qPCR Analizleri

RNA dizileme analiz sonuçları değerlendirildiğinde, kök dokusundan Cr stresi ile ilişkili olarak belirlenen toplam 3 adet gen mRNA seviyesinde yapılacak olan daha ayrıntılı çalışmalar için seçilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda bunlar arasından APX (Askorbat peroksidaz), Fe-SOD (Demir süperoksit dismutaz) ve RBOH (Solunum Patlaması Oksidaz Homologu/ Respiratory Burst Oxidase Homolog) genlerinin RT-qPCR çalışmaları için uygun olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.12 ve 4.13'te yer alan genler incelendiğinde, genlerin daha çok ROS ile ilişkili olduğu ve antioksidan savunma sisteminde rol oynadıkları tespit edilmiştir. Ayrıca, bu yolaklarda yer alan birçok genin oksidatif strese yanıtta görev aldığı bilinmektedir. Bu genlere ait primer çiftleri Primer3 programı kullanılarak tasarlanmış ve Gen Era firmasından hizmet alımı yapılarak sentezletilmiştir.



Şekil 4.12. APX, FSD ve RBOH genlerinin *B. juncea* var. Sindh raya bitkisinin kök kısımlarının deney grubunda kontrol grubuna oranla Cr^{3+} stresi altında ifade profili qRT-PCR analizi ile gösterilmiştir. İki hafta (15 gün) boyunca farklı Cr^{3+} konsantrasyonları uygulanmıştır. Kök örneklerinden RNA ekstrakte edilmiş ve cDNA sentezinden sonra qRT-PCR gerçekleştirilmiştir, bu işlem önceki çalışmamıza benzer şekilde uygulanmıştır (Cevher-Keskin ve ark., 2019). Referans gen olarak Ubiquitin kullanılmıştır.

İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan *B. juncea* var. Sindh raya bitkisinin köklerinde Cr stresine karşı APX (Askorbat peroksidaz), Fe-SOD (Demir süperoksit dismutaz) ve RBOH (Solunum Patlaması Oksidaz Homologu / Respiratory Burst Oksidase Homolog) hedef genlerinin ekspresyonu RT-qPCR ile tespit edilmiştir. Şekil 4.12’de Cr uygulamaları yapılan Sindh raya bitkisinin köklerinde hedef genlerin ekspresyonunu gösterilmiştir. Cr uygulanan bitkilerin köklerinde ROS ile ilişkili olan hedef genlerin değişimi incelendiğinde, FSD ve RBOH genlerinin anlatım düzeyinde bir farklılık oluşmazken; APX geninin anlatımının ise en fazla miktarda bir artış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.12). Bu genler arasında kontrol grubuna kıyasla deney grubunda en fazla artış gösteren gen APX’tir. Sindh raya bitkisinin köklerinde farklı olarak 1000 μM Cr uygulamasında APX, kontrol örneği ile karşılaştırıldığında en yüksek seviyede anlatım göstermiştir.



Şekil 4.13. APX, FSD ve RBOH genlerinin *B. juncea* var. Early raya bitkisinin kök kısımlarının deney grubunda kontrol grubuna oranla Cr^{3+} stresi altında ifade profili qRT-PCR analizi ile gösterilmiştir. İki hafta (15 gün) boyunca farklı Cr^{3+} konsantrasyonları uygulanmıştır. Kök örneklerinden RNA ekstrakte edilmiş ve cDNA sentezinden sonra qRT-PCR gerçekleştirilmiştir, bu işlem önceki çalışmamıza benzer şekilde uygulanmıştır (Cevher-Keskin ve ark., 2019). Referans gen olarak Ubiquitin kullanılmıştır.

İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan *B. juncea* var. Early raya bitkisinin köklerinde Cr stresine karşı APX (Askorbat peroksidaz), FSD (Demir süperoksit dismutaz) ve RBOH (Solunum Patlaması Oksidaz Homologu / Respiratory Burst Oxidase Homolog) hedef genlerinin ekspresyonu RT-qPCR ile tespit edilmiştir. Şekil 4.13'te Cr uygulamaları yapılan Early raya bitkisinin köklerinde hedef genlerin ekspresyonunu gösterilmektedir. Cr uygulanan bitkilerin köklerinde ROS ile ilişkili olan hedef genlerin değişimi incelendiğinde, APX, FSD ve RBOH genlerinin anlatımı önemli ölçüde artış göstermiştir (Şekil 4.13). Bu genler arasında kontrol grubuna kıyasla deney grubunda en fazla kat değişimi gösteren gen RBOH'dir. Bu çalışmada, Cr elementinin bitki köklerinde RBOH gen anlatımında önemli bir artışa neden olduğu gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA

Brassica juncea, çeşitli temel ve temel olmayan ağır metalleri tolere edebilen, biriktirebilen ve taşıyabilen allotetraploid bir bitkidir (Broadley ve ark., 2001; Anjum ve ark., 2012; Roychoudhury ve ark., 2012; You ve ark., 2024). Örneğin kurşun, kadmiyum, krom, bakır, çinko ve uranyum gibi çeşitli ağır metalleri (Das ve ark., 2011) biriktirme ve toprak üstü kısımlarına taşıma yeteneği, hızlı büyüme ve yüksek biyokütle üretme özellikleriyle birleştiğinde çevresel biyoteknoloji için ideal bir aday olmaktadır. *B. juncea*'nın ağır metal metabolizmasıyla ilişkili birçok çalışma olmasına rağmen, Cr toksisitesine karşı toleransı ve birikim özelliğinin moleküler mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir (Das ve ark., 2011). Ayrıca, *B. juncea*, Cr toksisitesine karşı toleransı açısından az incelenmiş *Brassica* türlerinden biridir. Bu bağlamda, farklı *B. juncea* varyetelerinin gen havuzlarını kapsamlı bir şekilde araştırmak ve bu havuzların farklı stres koşullarına karşı tolerans seviyelerini belirlemek oldukça önemlidir. Ayrıca, gen havuzlarındaki toleransla ilişkili genlerin belirlenmesi ve bu genlerin modern çeşitlere aktarılması, günümüz genotiplerinde metal toksisitesine karşı tolerans geliştirmek bakımından oldukça etkili bir yöntemdir.

Bu çalışmada, *B. juncea* var. JS-13, Early raya, Sindh raya, S-9, Ganj sarhen ve THB-81 bitkilerine iki hafta (15 gün) boyunca farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 50, 100, 200, 500 ve 1000 μM CrCl_3) uygulanan Cr elementine karşı gösterdikleri tolerans ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir. Cr uygulamalarından sonra, *B. juncea*'nın altı varyetesine ait kök, gövde ve yaprak dokularının içerdiği Cr, Ca, K, Mg, Fe, Zn ve Cu miktarı son derece hassas bir yöntem olan ICP-OES analizleriyle belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde anlamlı sonuçlar elde edilmiş ve deney güvenilirliği doğrulanmıştır (Çizelge 4.2). Ayrıca, Cr birikimi ile ilişkili olarak bitki metabolizmasında teşvik edilen veya baskılanan bazı genler tanımlanmış ve bu genlerle ilgili detaylı çalışmalar yapılmıştır. Yapılan moleküler çalışmalar sonucunda krom stresine yanıtta ROS ile ilişkili olan bazı genler belirlenmiştir. Bu genlerin, metal metabolizmasındaki rollerinin daha iyi anlaşılabilmesi için mRNA düzeyindeki anlatım seviyeleri, daha güvenilir ve güçlü ifade düzeyi nedeniyle RT-qPCR yöntemiyle doğrulanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda Cr uygulanan deney bitkilerinin kök dokularında bu genlerin anlatım farklılıkları analiz edilmiştir.

Mevcut çalışma, *B. juncea*'da kromun köklere alınımı, taşınması, toleransı ve birikimi mekanizmalarının fizyolojik ve moleküler seviyelerde araştırmak ve fitoremediasyon tekniğinin geliştirilmesine katkıda bulunmak amacıyla yürütülmüştür. Ayrıca, *B. juncea*'daki Cr birikiminin farklı kapasitelerinin altında yatan mikroRNA (miRNA) aracılı transkripsiyon sonrası düzenlemeyi araştırmayı amaçladık. Bu çalışmada, *B. juncea* varyetelerinin farklı Cr birikim kapasitesine sahip oldukları tespit edilmiş ve bu da düşük Cr birikimi özelliğinin genetik temelini araştırmak için uygun bir model sunmuştur. Cr stresine maruz bırakılan *B. juncea*'nın düşük Cr-biriktiren Sindh raya varyetesi ile yüksek Cr-biriktiren Early raya varyetesinin kökleri için miRNA dizileme analizi gerçekleştirilmiştir. Köklerin karşılaştırmalı analizleri, iki varyete arasında Cr alımı, birikimi ve detoksifikasyonunda miRNA aracılı gen düzenlemelerinin farklı rollerini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Ayrıca, Cr birikimi ve toleransı ile ilişkili moleküler mekanizmada açıklanamamış noktalara katkı sağlamak için, yeni nesil RNA dizileme tekniği kullanılarak yüksek Cr-biriktiren Early raya ve düşük Cr-biriktiren Sindh raya varyetelerinin kök dokularındaki miRNA'lar ve onların hedef genleri tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Elde edilen veriler dahilinde Cr detoksifikasyonunda etkin olduğu düşünülen bazı genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyeleri, her iki bitkinin deney gruplarının köklerinde belirlenerek, bu genlerin metal homeostazisindeki rollerinin moleküler seviyede anlaşılması ve buna bağlı olarak fitoremediasyon için kullanılabilirliğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Farklı deneysel koşullarda Cr'nin önemli miktarlarını bünyesine alan *B. juncea*, Cr gibi toksik metalleri yükdek oranda kök sisteminde akümüle etmektedir. Örneğin *B. juncea* bitkisinin hem gövde hem de köklerinde, konsantrasyona bağlı bir şekilde dikkate değer miktarda Cr (krom) kaydedilmiştir; bu durumda köklerin Cr tutma eğilimi daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Bluskov, 2005). Benzer şekilde, Salt ve ark. (1995), *B. juncea*'nın hidroponik ortamda ve nispeten düşük Cr^{6+} konsantrasyonunda (yani, 0.4 mg L^{-1} Cr) yetiştirildiğinde, köklerinde $2,194 \text{ mg kg}^{-1}$ Cr biriktirdiğini bildirmişlerdir. Shahandeh ve Hossner (2000) tarafından yapılan bir çalışmada, 100 mg kg^{-1} Cr^{3+} veya Cr^{6+} mg kg^{-1} toprak ile yetiştirilen *B. juncea* bitkilerinin köklerinde sırasıyla, 191 ve $4.6 \text{ Cr}^{3+} \text{ mg kg}^{-1}$ ve 431 ve $44.7 \text{ Cr}^{6+} \text{ mg kg}^{-1}$ biriktiği rapor edilmiştir. Bu türün fitoremediasyonda kullanılmasının diğer faydaları, hızlı büyüme (ekimden 8-10 hafta sonra olgunlaşmış) ve nispeten kısa sürelerde yüksek miktarda biyokütle üretme (2.5 ayda

18 t/ha) yeteneğidir (Blaylock ve ark., 1997). Bu çalışmaların bulguları, farklı bitki türlerinde benzer konsantrasyona bağlı olarak Cr birikimi bildiren Sundaramoorthy ve ark. (2010), Ali ve ark. (2015), ve Gill ve ark. (2015a) ile tutarlı olduğu rapor edilmiştir. Köklerdeki Cr içeriğinin gövdelere göre daha yüksek olması, *Oryza sativa* (Zeng ve ark., 2011), *Triticum aestivum* (Ali ve ark., 2015) ve *Brassica napus* (Gill ve ark., 2015a) gibi çeşitli bitki genotiplerinde de kaydedilmiştir. Cr akümüasyonu için bitkinin en önemli kısmının kökler olduğu yapılan birçok araştırmayla teyit edilmiştir.

Bu çalışmada, *B. juncea* var. JS-13, Early raya, Sindh raya, S-9, Ganj sarhen ve THB-81 bitkilerine iki hafta (15 gün) boyunca 0, 10, 50, 100, 200, 500 ve 1000 μM CrCl_3 çözeltisi uygulandıktan sonra, Cr konsantrasyonlarının artışla birlikte, Cr birikiminin de arttığı ve bu birikimin en yoğun şekilde köklerde gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, Cr-uygulanan deney gruplarının dokularına Cr alımı ve birikimi *B. juncea* bitkilerinin yeteneklerine göre farklılık göstermiştir. Örneğin, 1000 μM Cr uygulanan Early raya bitkilerinin köklerinde 429.00 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$, toprak üstü organları (gövde+yapraklar)'nda ise 111,94 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ Cr'nin akümüle edildiği bulunmuştur. 1000 μM Cr uygulanan THB-81 bitkilerinin köklerinde 552.28 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$, toprak üstü organları (gövde+yapraklar)'nda ise 70.22 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ Cr'nin akümüle edildiği bulunmuştur. 1000 μM Cr uygulanan Ganj sarhen bitkilerinin köklerinde 21.66 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$, toprak üstü organları (gövde+yapraklar)'nda ise 37.88 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ Cr'nin akümüle edildiği bulunmuştur. 1000 μM Cr uygulanan JS-13 bitkilerinin köklerinde 67.72 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$, toprak üstü organları (gövde+yapraklar)'nda ise 18.95 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ Cr'nin akümüle edildiği saptanmıştır. 1000 μM Cr uygulanan S-9 bitkilerinin köklerinde 12.47 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$, toprak üstü organları (gövde+yapraklar)'nda ise 5.12 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ Cr'nin akümüle edildiği saptanmıştır. 1000 μM Cr uygulanan Sindh raya bitkilerinin köklerinde 7.83 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$, toprak üstü organları (gövde+yapraklar)'nda ise 5.62 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ Cr'nin akümüle edildiği saptanmıştır (Çizelge 4.3). Early raya ve THB-81 bitkileri kök ve toprak üstü organlarında (gövde+yapraklar) en fazla miktarda Cr biriktirirken, Sindh raya ve S-9 bitkileri kök ve toprak üstü organlarında (gövde+yapraklar) en az miktarda Cr biriktirdiği rapor edilmiştir.

Yapılan denemeler sonucunda, *B. juncea* var. JS-13, Early raya, Sindh raya, S-9, Ganj sarhen ve THB-81 bitkilerine Cr uygulaması sonrasında, en fazla Cr alımının köklerde gerçekleştiği ve köklerdeki oranın toprak üstü organlardan daha fazla miktarda

olduğu saptanmıştır. Elde edilen bulgular, krom bitkiler tarafından alındıktan sonra, köklerde tutulmuş ve toprak üstü organlara taşınmaması birçok çalışma bulguları ile benzer olduğu rapor edilmiştir (Çizelge 4.2). Cr uygulamasından sonra köklerden toprak üstü organlara taşınımın azaldığı ve genellikle *B. juncea* varyetelerinin farklı kısımlarında Cr akümülyasyonunun kök>gövde>yaprak sırasını takip ettiği rapor edilmiştir.

Baker ve Brooks (1989) tarafından önerilen, kuru yaprak dokusunda $>1000 \text{ mg kg}^{-1}$ Cr konsantrasyonu kriterine göre, yalnızca iki tür krom hiperakümülatörü olarak nitelendirilebilir (Reeves ve Baker, 2000); bunların Zimbabwe’de bulunan *Dicoma niccolifera* Wild (1974) ve *Sutera fodina* Wild (Baker ve Brooks, 1989) türleri olduğunu bildirmiştir. Bu türlerin kuru yapraklarındaki maksimum Cr içeriği sırasıyla 1500 mg kg^{-1} ve 2400 mg kg^{-1} ’dir. Bu çalışmada, THB-81 ve Early raya bitkilerinin $1000 \mu\text{M}$ Cr’de büyüme yetenekleri ile köklerinde biriken Cr miktarları, bu bitkilerin potansiyel olarak “Cr-akümülatör/toleranslı” olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan Cr sonucunda elde edilen veriler, THB-81 ve Early Raya varyetelerinin diğer varyetelere kıyasla kroma karşı daha yüksek tolerans gösterdiğini ortaya koymuştur. Diğer taraftan, Sindh raya ve S-9 bitkilerinin $1000 \mu\text{M}$ Cr’de büyüme yeteneği göstermesi ve köklerinde biriken Cr miktarı, bu bitkilerin potansiyel olarak “Cr-duyarlı (hassas)/dışlayıcı” olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir. Farklı konsantrasyonlarda Cr uygulanmasıyla elde edilen veriler, Sindh raya ve S-9 varyetelerinin diğer varyetelere kıyasla köklerinde daha az Cr biriktirdiğini ve Cr’nin toprak üstü kısımlarına taşınmadığını göstermiştir (Çizelge 4.3). Genel olarak, *B. juncea* varyetelerinde Cr’nin köklerde yoğunlaştığı ve bu durumun toprak üstü kısımlara Cr taşınımını azalttığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, *B. juncea* varyetelerinin Cr^{3+} toleransı ve detoksifikasyon yeteneği sergilediğini ve bu bitkilerdeki spesifik bazı mekanizmaların Cr stresi altında bitkinin hayatta kalmasında önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir; bu da *B. juncea*’yı fitostabilizasyon için potansiyel bir aday haline getirebilir. Benzer bir çalışmada, *B. juncea*’nın Cr^{6+} için etkili bir fitostabilizatör olduğu bildirilmiştir (Shahandeh ve Hossner, 2000).

Yüksek bitkilerin yaşam döngüsündeki en kritik aşamalar, tohumun çimlenmesi ve fide gelişimidir (Bewley, 1997). Çimlenme, kuru tohumun su alması (imbibisyon) ile başlar ve embriyo ekseninin uzamasıyla (genellikle kök ucu ya da radikula) tamamlanır (Bewley ve Black, 1994). Bu süreç, tohumun aktif hale geçmesini ve bitkinin büyümeye

başlamasını sağlar. Krom (Cr) alımı ve toleransında tür içi önemli farklılıklar bulunmaktadır. *B. juncea* tohumunun Cr^{3+} stresi altında çimlenmesiyle ilgili çok az bilgi mevcuttur. Bununla birlikte, diğer türler üzerinde yapılan birçok araştırma, tohum çimlenmesinin Cr konsantrasyonuna ve genotipe/çeşide bağlı olarak farklılık göstermiştir (Jun ve ark., 2009; Hou ve ark., 2014). di Toppi ve ark. (2002), domatesin çimlenme yüzdesinin uygulama ($5 \text{ mg L}^{-1} \text{ Cr(VI)}$) ve kontroller arasında önemli bir fark göstermediğini gözlemlemiştir. Örneğin bazı baklagil bitkileri için Cr(VI) yüksek konsantrasyonda (2,0–3,2 mM) bile tohum çimlenme yüzdesi üzerinde önemli bir inhibisyon etkisi göstermemiştir (López-Luna ve ark., 2016; Mathur ve ark., 2016). Farklı varyetelerin Cr stresine karşı tohum çimlenme yeteneğindeki farklılık, onların genetik çeşitliliğinden kaynaklanmış olabilir. Bu çalışmada, iki hafta (15 gün) boyunca vermikülit ortamda farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 50, 100, 200, 500 ve 1000 $\mu\text{M CrCl}_3$) Cr uygulanan *B. juncea* var. JS-13, Early raya, Sindh raya, S-9, Ganj sarhen ve THB-81'in tohumlarının çimlenmesi, kontrol grubuna oranla yüzde olarak sunulmuştur (Çizelge 4.1). Cr^{3+} uygulanan deney grupları ile kontrol grubu arasında çimlenmesi açısından önemli bir inhibisyon etkisi göstermemiştir. Ancak, altı *B. juncea* varyetesinde JS-13, Early raya, Sindh raya, S-9, Ganj sarhen ve THB-81 çimlenmede farklı şekilde tepki göstermesine rağmen en yüksek Cr konsantrasyonunda (1000 μM) kontrole göre bir azalma gözlenmiştir. Akinci ve Akinci (2010), Cr ile muamele edilen çoğu genotipin çimlenmesinin gecikmesini, yüksek Cr konsantrasyonu ile çimlenme süresi ile ilişkili olabileceğini belirtmiştir. Çimlenme oranındaki farklılık bitki türleri arasındaki farklı duyarlılık, tohum boyutu ve tohum kabuğunun kalınlığındaki farklılığa da bağlanabilir, ancak çoğu bitkinin fizyoloji ve biyokimyadaki içsel mekanizması henüz net değildir.

Cr^{3+} toksisitesinin kök büyümesi üzerindeki etkisi konsantrasyona bağlı analizle değerlendirilmiştir. 0, 10, 50, 100, 200, 500 ve 1000 $\mu\text{M Cr}^{3+}$ konsantrasyonları ile iki hafta (15 gün) boyunca yapılan uygulamadan sonra, kök uzama uzunlukları belirlenmiştir (Şekil 4.1-4.6). Kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında, genellikle 100 $\mu\text{M Cr}^{3+}$ ile muamele edilen bitkilerde kök büyümesinde belirgin bir azalma gözlenmiştir. 1000 $\mu\text{M Cr}^{3+}$ konsantrasyonunda ise büyüme güçlü bir şekilde engellenmiştir (Şekil 4.1-4.6). Altı *B. juncea* varyetelerinde 1000 $\mu\text{M Cr}^{3+}$ konsantrasyonda büyüme üzerinde engelleyici bir etki saptanmıştır. 1000 $\mu\text{M Cr}^{3+}$ uygulaması, kök ve boy uzunluğunu önemli etkileyerek azalmasına neden olmuştur. Bitki boyundaki azalmanın, büyük ölçüde kök büyümesinin

azalmasından ve bunun sonucunda bitkinin üst kısımlarına daha az besin ve su taşınmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, kromun bitkinin üst kısmına besin ve su taşınmasını engellemesi, toprak üstü kısımların hücre metabolizması üzerinde doğrudan bir etki yaparak bitki boyunun azalmasına neden olabilir (Shanker ve ark., 2005). Kökün, toprak üstü kısımlarından daha fazla etkilendiği tespit edilmiştir. Bunun nedeni, ağır metallerin Cr^{3+} kökün hücre duvarına bağlanarak köklerde birikmesi ve hücre bölünmesi ile hücre uzamasını engellemesi olabilir (Woolhouse, 1983).

Krom birikimi ve toleransı, bir bitki türü içinde genotipler arasında farklılık göstermektedir (Zeng ve ark., 2008a). Dolayısıyla Cr toleransının olası mekanizmasını araştırmak için *B. juncea* varyeteleri arasında Cr stresinin mineral besinlerin hücre altı dağılımı ve kimyasal formu üzerindeki etkilerini incelemek önemlidir. Cr'nin toksik etkileri, özellikle değişken değerlikleri nedeniyle Cr'nin temel besin elementleriyle etkileşimlerine bağlı olabilmektedir (Turner ve Rust, 1971). Birçok çalışmada, Cr'nin Zn, Fe, Ca, Mg, Mn ve Cu gibi besinlerin alımı üzerindeki olumsuz etkisi rapor edilmiştir (Turner ve Rust, 1971; Chatterjee ve Chatterjee, 2000; Gardea-Torresdey ve ark., 2004). Örneğin, pirinç köklerinde, Cr konsantrasyonu Mg konsantrasyonu ile anlamlı bir pozitif korelasyona, ancak Ca, Zn ve Fe konsantrasyonları ile anlamlı bir negatif korelasyona sahip olduğu bildirilmiştir (Cheng ve ark., 2006; Zeng ve ark., 2010).

Bu çalışma, *B. juncea* var. JS-13, Early raya, Sindh raya, S-9, Ganj sarhen ve THB-81'in Cr'yi absorbe etme kapasitesini değerlendirmek amacıyla, bu bitkilerin Cr^{3+} formunu biriktirme yeteneği rapor edilmiştir. Ayrıca, bu çalışmada, Cr konsantrasyonu yanı sıra makro besin (Ca, K, Mg) ve mikro besin (Fe, Zn ve Cu) elementlerinin içeriği de belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Bu bitkilerin kök, gövde ve yaprak dokularındaki inorganik besin konsantrasyonlarına ilişkin sonuçlar Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, incelenen her bir inorganik besin elementi, bitkinin farklı kısımlarında farklı davranış sergilemiştir. Bu nedenle, yapraklarda ve gövdelerde kalsiyum (Ca), artan Cr^{3+} uygulamasında artmıştır. Aslında, Cr^{3+} olarak sağlanan Cr içeriği ile gövde ve yapraklardaki yüksek Ca içeriği arasında negatif bir ilişki, bu bitki kısımlarında Cr'nin, Ca alımı ile rekabet edebileceğini veya Ca alımını kısıtlayabileceğini göstermektedir. Çizelge 4.12'de görüldüğü gibi, örneğin Early raya kontrol bitkileri yapraklarda ortalama (954.39 ± 0.15 mg kg^{-1} KA) Ca gösterirken, Cr^{3+} uygulanan bitkilerde

bulunan en yüksek Ca ($1219.89 \pm 0.12 \text{ mg kg}^{-1}\text{KA}$) konsantrasyonuna ulaşılmıştır, yani neredeyse %30 daha fazla olduğu görülmektedir.

Farklı Cr^{3+} konsantrasyonlarıyla yetiştirilen *B. juncea* bitkilerinin kök dokusundaki Ca, K, P, Mg, Fe, Cu ve Zn içerikleri, kök dokularındaki Cr içeriği ve inorganik besin içeriği arasındaki ilişki Pearson korelasyon katsayılarıyla belirlenmiştir. Gösterildiği gibi (10 ve 1000 μM) Cr^{3+} uygulaması bitkinin köklerinde Ca alımını önemli ölçüde arttırmıştır. Bu uygulamalarda Ca emiliminin artmış olması ve böylece detoks edici bir madde olarak kullanılabileceği söylenebilir (Wallace ve ark., 1955; Gardea-Torresdey ve ark., 2005). Ayrıca, kök dokularındaki Cr içeriğine karşı Fe ve Mg alımı için Pearson korelasyon katsayıları güçlü bir pozitif ilişki göstermiştir ($p < 0.001$); bu da kök dokularındaki Cr konsantrasyonu arttıkça Fe ve Mg alımının arttığı anlamına gelebilir. Verilere göre, örneğin, Early raya kontrol bitkilerinin kökleri 63.88 ve 86.13 sırasıyla $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ Fe ve Mg içeriğine sahipken; 1000 μM Cr'de köklerdeki Fe ve Mg konsantrasyonunun, kontrol bitkilerinde bulunan aynı elementlerin konsantrasyonuna kıyasla sırasıyla 298.49 ve 305.06 $\text{mg kg}^{-1}\text{KA}$ önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermektedir ($p < 0.001$). Cr uygulanan bitkilerin Zn ve Cu konsantrasyonu kontrol bitkileriyle karşılaştırıldığında birikimini etkilenmemiştir. Cr uygulamasının bitkilerde Ca, K, Mg ve Fe alımını arttırması, Ca ve Fe'nin bitkiler tarafından Cr detoksifikasyonunda rol oynayabileceğini ve artan Ca, Mg, K ve Fe alımının, kontrol grubuna göre kaydedilen artan biyokütle ile Cr'ye karşı yüksek toleransına katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

B. juncea var. JS-13, Early raya, Sindh raya, S-9, Ganj sarhen ve THB-81 bitkilerinin farklı kısımlarında biriken ağır metal miktarları belirlendikten sonra, metal akümülayonu ve toleransının moleküler mekanizmasının açıklanmasına yönelik moleküler çalışmalara geçilmiştir. Cr'nin bitki gen ekspresyonuna etkisi sonucunda anlatımı değişen miRNA'ların ve onların hedef genlerinin tanımlanması ile ilişkili çalışmaların çok sınırlı bulunması ve Cr akümülayonunda bitkideki en önemli kısmın kökler olması nedeniyle iki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan ve Cr-toleransı yüksek olarak belirlenen *B. juncea* var. Early raya bitkisinin ve *B. juncea* var. Cr-dışlayıcı olarak belirlenen Sindh raya bitkisinin kök örneklerinde RNA dizileme analizi yapılmıştır.

Bu çalışmada, Cr akümülayonu ve toleransıyla ilişkili moleküler mekanizmada açıklanamamış noktalara katkı sağlamak için, yüksek verimli dizileme (high throughput sequencing) kullanıldığı RNA dizileme tekniğı ile Cr³⁺'nin Early raya bitkisi ve Sindh raya bitkisinin kök kısımlarında miRNA'ların rolleri ve onların hedef genlerinin ekspresyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. miRNA'ların temel düzenleyiciler olduğu olgusu göz önüne alındığında, ağır metal stresine karşı gen düzenleyici ağların yanıtının çekirdeğini oluşturmaktadırlar. Bu çalışmada, Cr³⁺ uygulamasına tabi tutulan Early raya ve Sindh raya bitkilerinde miRNA dizilimi için Illumina NextSeq 550 platformu kullanılmıştır. Bu çalışmanın amacı, Cr-duyarlı miRNA'ları ve birincil potansiyel hedeflerini belirlemek ve Cr stresine toleransta yer alan olası yolları araştırmaktır. Elde edilen veriler doğrultusunda, ROS ile ilişkili mekanizmada etkin olduğu düşünülen bazı genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyeleri, Cr uygulanan bitkilerin köklerinde belirlenerek, bu genlerin metal homeostazisindeki rollerinin moleküler seviyede anlaşılması ve buna bağlı olarak Cr-akümülatör ve Cr-dışlayıcı *B. juncea* bitkilerinde karşılaştırmalı olarak RNA dizileme tekniğı ile ortaya konulması amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, Cr-akümülatör olarak belirlenen Early raya bitkisi ile Cr-dışlayıcı olarak belirlenen Sindh raya bitkisinin Cr stresi yanıtındaki moleküler mekanizmalarını açıklığa kavuşturmak ve fitoremediasyon stratejilerinin geliştirilmesi için değerli biyoenerji kaynakları sağlamak amaçlanmaktadır.

RNA dizileme analiz sonucunda elde edilen ham veriler "FastQC" programına işlenerek verilerin karşılaştırmalı analizi yapılmıştır. İki hafta (15 gün) boyunca Cr³⁺ uygulaması yapılan Cr-toleransı yüksek olarak belirlenen Early raya bitkisinin kök kısımlarında, kontrol grubuna oranla deney grubunda toplam 70 adet genin farklı eksprese olduğu ve bu genlerden sadece 27 tanesinin istatistiksel olarak anlam ifade ettiği gösterilmiştir (p<0.05). Anlamli fark gösteren genlerin 19 tanesinin teşvik edilen, 8 tanesinin baskılanan gen olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.8). İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulaması yapılan Cr- toleransı düşük olarak belirlenen Sindh raya bitkisinin ise kök kısımlarında, kontrol grubuna oranla deney grubunda toplam 80 adet genin farklı eksprese olduğu ve bu genlerden sadece 50 tanesinin istatistiksel olarak anlam ifade ettiği gösterilmiştir (p<0.05). Anlamli fark gösteren genlerin 28 tanesinin teşvik edilen, 22 tanesinin baskılanan gen olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.8).

Cr-akümülatör Early raya bitkisinin kök kısımlarında, yukarı ve aşağı düzenlenen genlerin GO (Gen Ontolojisi) sınıflandırması, biyolojik süreç grubunda en artış gösteren GO terimlerinin metabolik ve hücrel süreçler olduğunu göstermiştir; hücrel bileşenlerde en artış gösteren GO terimleri ise zar, hücre ve hücre parçasıdır; moleküler fonksiyonda ise en artış gösteren GO terimleri bağlanma aktivitesi ve katalitik aktivitedir (yayınlanmamış veri). GO zenginleştirme sonuçları, hücrel bileşenlerde, metabolik süreç, fosfor metabolik süreci, protein fosforilasyonu, fosforilasyon, makromolekül metabolik süreç ile ilişkili genlerin Cr^{3+} toksisitesi altında önemli ölçüde artış göstermiştir (Şekil 4.9-4.11). Diğer bir taraftan, Cr- dışlayıcı Sindh raya bitkisinin kök kısımlarında, yukarı ve aşağı regüle edilen genlerin GO (Gen Ontolojisi) sınıflandırması, biyolojik süreç grubunda en artış gösteren GO terimlerinin metabolik ve hücrel süreçler olduğunu göstermiştir; hücrel bileşenlerde en artış gösteren GO terimleri ise zar, hücre ve hücre parçasıdır; moleküler fonksiyonda ise en artış gösteren GO terimleri bağlanma aktivitesi ve katalitik aktivitedir (yayınlanmamış veri). GO zenginleştirme sonuçları, hücrel bileşenlerde, NADPH metabolik süreci, NADPH rejenerasyonu, protein polimerizasyonunun düzenlenmesi, Glukoz-6-fosfat metabolik süreci, Pentoz fosfat yolu, protein katabolizmasının düzenlenmesi ile ilişkili genlerin Cr^{3+} toksisitesi altında önemli ölçüde arttığını göstermiştir (Şekil 4.9; 4.10; 4.11).

Bu genlerin fonksiyonel kategorizasyonları incelendiğinde, büyük oranda hücre içi bileşenlerde lokalize oldukları, hücrel süreçlere katıldıkları ve ROS ile ilişkili antioksidan aktivitesinde rol aldıkları belirlenmiştir. Biyolojik süreç gruplandırmasında, artan genler arasında oksidatif strese yanıt, reaktif oksijen türleri metabolik süreci, hidrojen peroksit metabolik süreci ve hidrojen peroksit katabolik süreci ile ilişkili genler yer almaktadır. Bu sonuçlar, *Brassica* spp. Cr toksisite toleransı üzerine daha önce yapılan çalışmalarla uyusmaktadır.

Cr-stresi ile ilişkili olası miRNA hedeflerinin belirlenmesi, bitki ağır metal stres tepkilerinde yer alan miRNA'lar ve hedef genleri arasındaki moleküler etkileşimi anlamak için önemli bir adımdır (Gupta ve ark., 2014). Mevcut çalışmada, miRNA hedef gen tahmin analizi, Cr^{3+} stresine yanıtta miRNA'ların bitkilerin büyümesi ve gelişimi (miR156, miR168a, miR164, miR169, miR6029, miR824, miR403 ve miR395), redoks homeostazı (miR403, miR164, miR169m, miR167, miR171d, miR166f, miR395 ve miR159), ağır metal alımı ve detoksifikasyonu (miR166f, miR169, miR172, miR395,

miR2111d ve miR6028), sinyal iletimi (miR6030, miR394a/b, miR824, miR171, miR156, miR168a, miR2111d , miR403 ve miR172), hücre sinyalizasyonu (miR156, miR169m, miR172, miR171 ve miR6030), hücre duvarı modifikasyonu (miR6029, miR162a, miR164, miR167 ve miR395d/d/f), DNA onarımı (miR167, miR399, miR172.) vb. rol oynadıkları rapor edilmiştir (Çizelge 4.8; 4.9). Elde edilen bulgular, farklı miRNA'ların Cr³⁺ stresıyla başa çıkmak için gen ifadesinin aracılığıyla birçok fizyolojik süreçleri düzenlemede önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Yukarı düzenlenen miRNA'lar Hedef Genler

miR156a/b/c/d/f/g/e ↑	Squamosa promoter-binding protein Mitogen activated kinase kinase kinase ZIK9 Tubby-like F-box protein	TF Sinyal iletimi TF
miR164a/b/c/d ↑	NAC transkripsiyon faktör 92 MYB-like transkripsiyon faktör 2 PRA1 family protein (Rab-GTPaz)	TF TF Veziküler taşıma
miR166f ↑	Glutathyon S-transferaz (GSTH) Magnezyum taşıyıcı Tiyoredoksin redüktaz	ROS Metal taşınımı ROS
miR172a/b/c/d ↑	Kalşiyum-taşıyıcı ATPaz Protein detoksifikasyon	Metal taşınımı-Sinyal iletimi ROS
miR1140 ↑	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit Protein detoksifikasyon 28 Ubiquitinyl hydrolase 1	Fotosentez ROS Sinyal iletimi
miR167a/b/c/d ↑	Peroksidaz Auxin response factor Exocyst subunit Exo70 family protein Protein detoksifikasyon	ROS Biotik Büyüme ve Gelişimi ROS ROS
miR171d/e ↑	Peroksidaz Exocyst subunit Exo70 family protein	ROS ROS
miR2111d ↑	Purple acid phosphatase Serine/threonine-protein kinase TOR DNA repair protein REV1	Sinyal iletimi Sinyal iletimi DNA onarımı
miR399a/b ↑	Tubby-like F-box protein Probable inorganic fosfat taşıyıcı 1-5	TF Fosfat taşınımı
miR6031 ↑	Dirigent protein Serine/threonine-protein phosphatase	Savunma TF

Aşağı düzenlenen miRNA'lar Hedef Genler

miR159 ↓	Superoxide dismutase [Cu-Zn] Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	ROS Fotosentez
miR169a/b/m/n ↓	ABC transporter B family member 7 Fenolesterin GATA transkripsiyon faktör Protein detoksifikasyon 23 Diacylglycerol kinase Transkripsiyon faktör subunit NF-YC11B	Fotosentez Metal taşınımı Fotosentez TF ROS Sinyal iletimi TF
miR6028 ↓	WRKY transkripsiyon faktör Amoonyum taşıyıcı	TF Metal taşınımı
miR6029 ↓	CO ₂ -response secreted protease Auxin-responsive protein Tubby-like F-box protein	Fotosentez Biotik Büyüme ve Gelişimi Sinyal iletimi
miR162a ↓	Fosfolipid-taşıyıcı ATPase Conserved oligomeric Golgi complex subunit 8 (COG8)	Hücre membranı fonksiyonu Veziküler taşıma
miR171f/g ↓	Exocyst subunit Exo70 family protein GATA transkripsiyon faktör	ROS TF
miR393 ↓	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic Protein serine/threonine kinase BNK1	Fotosentez Sinyal iletimi
miR394a/b ↓	AP-2 complex subunit alpha Exocyst subunit Exo70 family protein	Veziküler taşıma ROS
miR395a/b/c/d/e/f ↓	ATP sulfurylase 4 Auxin-responsive protein Laccase Potasyum taşıyıcı	ROS Biotik Büyüme ve Gelişimi ROS Metal taşınımı
miR403 ↓	Ferritin-4, chloroplastic Reticulon-like protein	Fotosentez Hücre içi organizasyon
miR6030 ↓	ABA-responsive element binding factor 3 Vacuolar cation/proton exchanger	TF Vakuol içi taşıma
miR824 ↓	Agamous-like protein 16 (AGL16) Protein detoksifikasyon	TF ROS

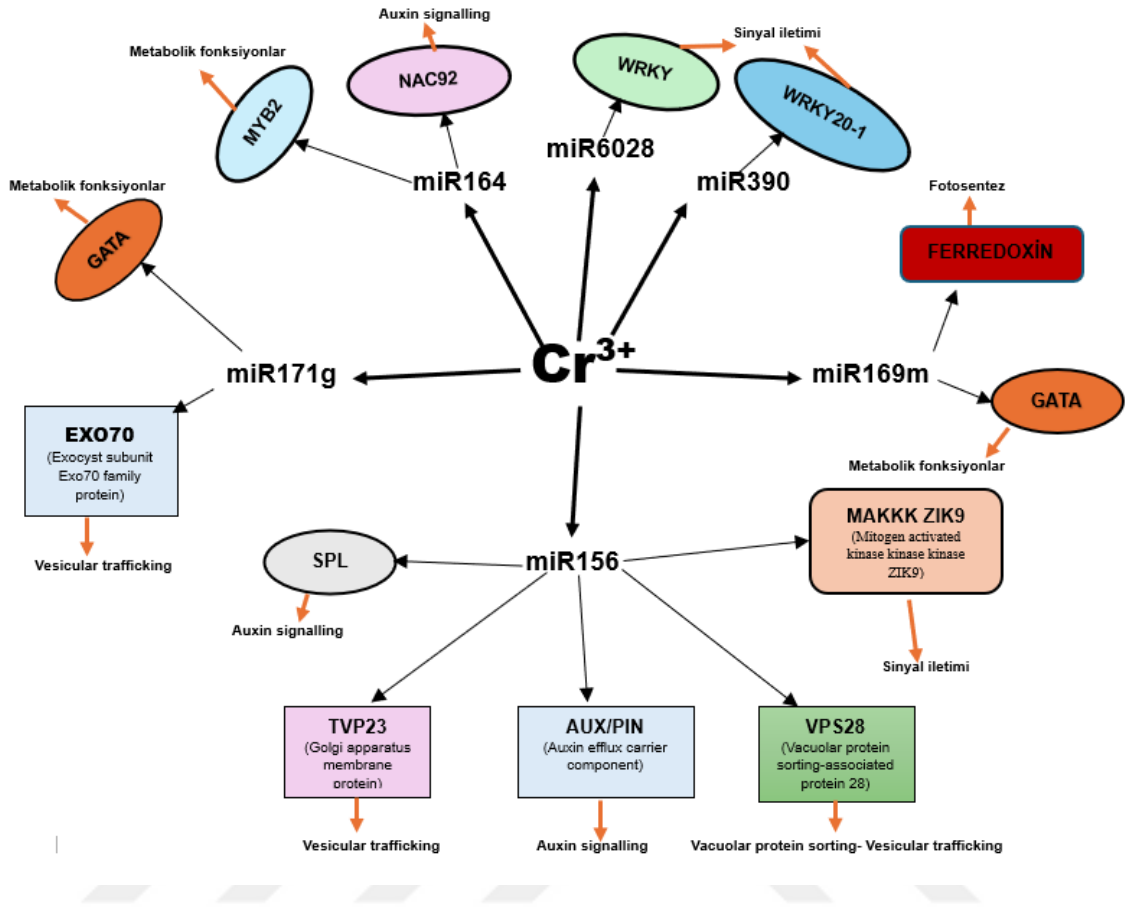
Şekil 5.1. *B. juncea* var. Sindh raya bitkisine ait kök örneklerinde, Cr1000 (deney grubunda) CK (kontrol grubuna) oranla farklı seviyede ifade edilen bazı miRNA'lar ve onların hedef genleri

Yukarı düzenlenen miRNA'lar			Hedef Genler		
Aşağı düzenlenen miRNA'lar			Hedef Genler		
miR156a/b/c/d/f/g ↑	Squamosa promoter-binding protein (SPL) Mitogen activated kinase kinase kinase ZIK9	TF Sinyal iletimi	miR159 ↓	Süperoksit dismutaz [Cu-Zn] Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	ROS Fotosentez
miR164a ↑	NAC transkripsiyon faktör 92 MYB-like transkripsiyon faktör 2	TF TF	miR169m ↓	Ferredoxin GATA transkripsiyon faktör Protein detoksifikasyon 23 Diacylglycerol kinase	Fotosentez TF ROS Sinyal iletimi
miR166f ↑	Glutathion S-transferaz (GSTH) Magnezyum taşıyıcı Tiyoredoksin redüktaz (TRXa)	ROS Metal taşınımı ROS	miR6028 ↓	WRKY transkripsiyon faktör Amonyum taşıyıcı	TF Metal taşınımı
miR168a ↑	Mitogen-activated protein kinase (MAPK) Protein detoksifikasyon	Sinyal iletimi ROS	miR6029 ↓	CO ₂ -response secreted protease Auxin-responsive protein Tubby-like F-box protein	Fotosentez Bitki Büyüme ve Gelişimi Sinyal iletimi
miR172a/b/c/d ↑	Kalsiyum-taşıyıcı ATPaz	Metal taşınımı-Sinyal iletimi	miR6031 ↓	Dirigent protein (DIR) Serine/threonine-protein phosphatase	Savunma Sinyal iletimi
miR162a ↑	Fosfolipid-taşıyıcı ATPaz Conserved oligomeric Golgi complex subunit 8 (COG8)	Hücre membran fonksiyonu Veziküler taşıma	miR390a/b/c ↓	WRKY20-1 transkripsiyon faktör Rhomboid-like protein	TF Sinyal iletimi
miR171g ↑	GATA transkripsiyon faktör Exocyst subunit Epx70 family protein	TF Hücreler arası veziküler taşıma-ROS			
miR395a/b/c ↑	ATP sülfurylaze 4 (AP54) Auxin-responsive protein Laktaz	ROS Bitki Büyüme ve Gelişimi ROS			
miR824 ↑	Agamous-like protein 16 (AGL16) Protein detoksifikasyon	TF ROS			

Şekil 5.2. *B. juncea* var. Early raya bitkisine ait kök örneklerinde, Cr1000 (deney grubunda) CK (kontrol grubuna) oranla farklı seviyede ifade edilen bazı miRNA'lar ve onların hedef genleri

5.1. Early raya ve Sindh raya'da Cr-stresine yanıtta rol oynayan TF'ler ve sinyal iletimi

Birçok transkripsiyon faktörü (TF) ailesinin, ağır metal stresine karşı duyarlı genlerin ifade profillerinin düzenlenmesinde kritik rol oynadığı kanıtlanmıştır. Strese duyarlı genlerin başlıca düzenleyicileri olan transkripsiyon faktörleri (TF'ler), stres toleransını arttırmada potansiyel adaylardır. Örneğin, NAC, WRKY, MYB, GATA, SPL ve AP2/EREBP gibi birçok aile, çeşitli abiyotik stresleri düzenleyen TF'leri içermektedir (Peng ve ark., 2014; Aksoy ve Kayıhan, 2022). Mevcut çalışmada, bitkilerde krom ile ilişkili transkripsiyonel süreçleri düzenleyebilen bazı önemli transkripsiyon faktörü ailelerinin MYB, ARF, SPL, NAC, WRKY ve GATA gibi gruplara ait olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.8; 4.9).



Şekil 5.3. Tespit edilen bazı miRNA'lar ve hedef genleri

En büyük transkripsiyon faktörü (TF) ailelerinden biri, bitki türüne özgü WRKY TF'lerden oluşmaktadır. WRKY TF'lerinin, bitki hormonlarının sinyal iletim yollarını kontrol ederek birçok abiyotik ve biyotik stresle ilişkilendirildiği belirtilmiştir (Eulgem ve Somssich, 2007; Lee ve ark., 2007). WRKY genlerinin ifadesi, patojen savunması ve tepki sinyal molekülleri gibi biyolojik stresler, ayrıca kuraklık, düşük sıcaklık ve ağır metaller gibi çevresel stresler altında indüklenebilmektedir. Mevcut çalışmada, Early raya'da WRKY ve WRKY ile ilişkili (WRKY20-1) ailelerin TF'leri miR6028 (4,839 kat) ve miR390a/b/c (2,692 kat) tarafından hedeflendiği ve Cr^{3+} stresine yanıtta aşağı düzenlendiği saptanmıştır. Sindh raya'da ise WRKY ailelerin TF'leri sadece aşağı düzenlenen miR6028 (1,273 kat) tarafından hedeflendiği bulunmuştur. Hem Cr -akümülatör hem de Cr -dışlayıcı bitkilerinin köklerinde Cr^{3+} stresi altında WRKY20-1 önemli ölçüde aşağı düzenlenmiştir. Bu transkripsiyon faktörü absisik asit (ABA) ve

H₂O₂ tarafından indüklenir ve biyolojik ve biyolojik olmayan hasara karşı pozitif bir düzenleyici faktördür (Chen ve ark., 2010). Bu transkripsiyon faktörünün Cr stresine yanıtta önemli rol oynadığı tahmin edilmektedir. Early raya'da birçok miRNA tarafından hedeflenen WRKY20-1, bitkilerin savunma, stres yanıtı, hormon sinyal düzenlemesi ve gelişim süreçlerinde yer alan bir transkripsiyon faktörüdür. Bu transkripsiyon faktörü, Early raya'da Cr-stres koşullarına uyum sağlamasında kilit rol oynadığı söylenebilir. Çalışmamızda, her iki bitkinin köklerinde Cr³⁺ toksisitesi altında WRKY20-1 transkripsiyon faktörünün önemli ölçüde artış göstermesi, önceki birçok çalışma ile uyumludur (Ali ve ark., 2023; Mitra ve ark., 2023). Örneğin, Kayıhan ve ark. (2017), hem B toleranslı hem de B'ye duyarlı buğday genotiplerinin köklerinde yüksek B altında WRKY40 ve WRKY53'ün önemli ölçüde aşağı düzenlendiğini gözlemlemiştir (Pandey ve ark., 2022). Benzer bir çalışmada, Feng ve ark. (2021), AtWRKY47 TF'sinin aşağı düzenlenmesinin bitkilerde B toksisitesi toleransına yol açtığını belirlemiştir. Aksine, *A. thaliana*'da, Cr³⁺ ve Cr⁶⁺ muamelesi sonunda, WRKY8 (AT5G46350) önemli ölçüde yukarı düzenlendiği tespit edilmiştir.

MYB proteinleri, hücre bölünmesi ve gelişimi, embriyogenez, kök ve çiçek gelişimi, flavonoid, antosiyanin, lignin sentezi ve hormonlara, ışık, kuraklık, sıcak, soğuk ve biyotik strese yanıt dahil olmak üzere birçok süreci düzenleyen en büyük bitki transkripsiyon faktörü ailelerinden birini oluşturur. MYB transkripsiyon faktörleri, *A. thaliana*'da tanımlanan yaklaşık 130 üye ile bitkilerdeki en çok ve işlevsel olarak çeşitli transkripsiyon faktörü ailelerinden birini temsil etmektedir (Dubos ve ark., 2010). *A. thaliana*'da, Cr³⁺ ve Cr⁶⁺ muamelesi sonunda, MYB45, MYB62 ve MYB79 önemli ölçüde yukarı düzenlenmiştir (Liu ve ark., 2020). Bunlar arasında MYB62'nin fosfat noksanlığına yanıtla ilişkili olduğu ve gibberellik asit biyosentezini düzenlediği bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada, turpta (*Raphinus sativus*), miR159, miR319 ve miR858 tarafından hedeflenen MYB ailesinin bazı üyelerinin (MYB3, 13, 101, 104 ve 305) Cr⁶⁺ stresi altında yukarı düzenlendiği rapor edilmiştir (Liu ve ark., 2015). Ayrıca, *T. caerulea*'te, R2R3-MYB TF, yüksek Cd konsantrasyonu altında yüksek miktarda ifade edildiği belirlenmiştir. Benzer bir şekilde, R2R3 MYB TF'lerinin B toksisitesine karşı yanıtta rol oynadıkları arpada da tespit edilmiştir (Zhang ve Lu, 2024). Bu çalışmada, Early raya'da miR164a tarafından hedeflenen bir MYB üyesi (MYB2) TF; Sindh raya'da miR164a/b/c/d tarafından hedeflenmiş olup, Cr³⁺ stresi altında her iki

bitkinin köklerinde yukarı düzenlendiği tanımlanmıştır (Çizelge 4.8; 4.9). Bu durum, MYB2'nin, Cr^{3+} stresine bağlı genlerin ifade profillerini düzenlemede önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

NAC TF'leri, yüksek bitkilere özgü bir transkripsiyon faktörü sınıfıdır. Bu ailenin N-ucu, yaklaşık 150 amino asitlik korunan bir NAC domain içerirken, C-ucu ise oldukça değişken bir transkripsiyon aktivasyon bölgesi olup, bitki yönelimi ve stres tepkilerinde çok önemli bir rol oynamaktadır (Nakashima ve ark., 2012). Mevcut çalışmada, Early raya'da miR164a tarafından hedeflenen NAC transkripsiyon faktör 92; Sindh raya'da miR164a/b/c/d tarafından hedeflenmiş olup, yüksek Cr^{3+} stresi altında köklerinde yukarı düzenlendiği tanımlanmıştır (Çizelge). NAC TF, H_2O_2 tarafından indüklenmektedir. Hem Cr-akümülatör hem de Cr-dışlayıcı *B. juncea* bitkisinin köklerinde Cr^{3+} stresi altında oksidatif hasarın H_2O_2 birikimine yol açabileceği ve dolayısıyla NAC92'nin yukarı regülasyonunu tetikleyebileceği öne sürülebilir. Benzer bir şekilde, *A. thaliana*'da NAC042, Cr muamelesi altında anlamlı şekilde yukarı düzenlendiği rapor edilmiştir. Ek olarak, Ochiai ve ark. (2011) tarafından pirinçte benzer sonuçlar elde edilmiş olup, Boron Excess Tolerant1 (BET1) adlı NAC benzeri TF geninin baskılanması, Cr toksisitesine karşı tolerans sağladığı bildirilmiştir.

Bna-miR156 tarafından Squamosa promoter-binding-like protein (SPL) gen ailesi hedef alınmıştır. Early raya'da miR156a/b/c/d/f/g SPL hedef alırken; Sindh raya'da miR156a/b/c/d/f/g'ye ek olarak miR156e'de dahil olmuştur. miR156'nın SPL'leri hedef olarak her iki bitkide de Cr^{3+} homeostazında önemli düzenleyiciler olabileceği çıkarımı yapılabilir. Benzer bir çalışmada, turpta Cr^{6+} muamelesi sonrası, üç miRNA ailesinin (miR156/157, miR159 ve miR5293), SPL gen ailesinin beş farklı sınıfına ait SPL3, SPL6, SPL9, SPL13 ve SPL15'i hedeflediği tespit edilmiştir. SPL'i hedef olarak miR156/157, miR159 ve miR5293'ün turpta Cr^{6+} homeostazında kritik öneme sahip düzenleyiciler olarak fonksiyon gördükleri sonucuna varılmıştır. Ek olarak, *A. thaliana*'da miR156 tarafından hedeflenen SPL transkripsiyon faktörlerinin çiçeklenme, yaprak gelişimi, sürgün olgunlaşması ve metal homeostazisi gibi süreçlerde rol oynayan önemli bir gen ailesidir. SPL transkripsiyon faktörleri, özellikle miR156 tarafından hedef alınarak, çiçeklenme, yaprak gelişimi, sürgün olgunlaşması ve metal homeostazı gibi süreçlerinde yer aldığı ortaya konulmuştur. Örneğin, SPL gen ailesinin, *A. thaliana*'da Cu homeostazını düzenleyen metal içeren transkripsiyon faktörleri olduğu rapor edilmiştir

(Yamasaki ve ark., 2009; Andrés-Colás ve ark., 2013). Ayrıca, elde edilen sonuçlar, Cr^{3+} uygulamasına yanıt olarak bazı transkripsiyon faktörü (TF) aileleri de ifade edilmiştir. Örneğin, Early raya'da aşağı düzenlenen Bna-miR6029'un oksin sinyalizasyonu F-box proteinini hedef aldığı ve ARF transkripsiyon faktörlerinin Cr^{3+} uygulamasına yanıt verdiği tespit edilmiştir. Kısaca, TF'lerin Cr^{3+} yanıtındaki doğrudan veya dolaylı rollerine dair mevcut kanıtlar oldukça sınırlıdır. Çalışmamız, gelecekteki araştırmalar için transkripsiyon seviyesinde Cr tolerans mekanizmalarına ilişkin bazı temel bilgilerin elde edilmesine katkı sağlayabilir.

5.2. Early raya ve Sindh raya'da miRNA aracılı Cr stresine yanıtta düzenleyici ağlar

Strese bağlı miRNA'ların potansiyel hedeflerinin karakterize edilmesi, miRNA aracılı düzenleyici ağların bitkilerin ağır metal streslerine yanıtlarıyla ilişkili olarak anlaşılması açısından önemli bir aşamadır. Ağır metal stresine yanıt olarak miRNA'lar için birçok hedef belirlenmeye yönelik çeşitli çalışmalar yapılmakta ve bu çalışmalar, miRNA'ların ve hedef genlerinin bitkilerde ağır metal toksisitesi yanıtlarındaki kritik rolünü açığa çıkarmaya yardımcı olmaktadır. Kalsiyum (Ca^{2+}) ve protein kinazlar, bitkilerde çevresel strese yanıt olarak oluşan sinyal yollarında önemli roller üstlenirler. Bitkilerin ağır metal stresine yanıt olarak düzenleyici ağlarının önemli bileşenlerini temsil eden sinyal iletim yolları, kalsiyum bağlayıcı proteinler ve mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK'lar) gibi çeşitli sinyal proteinlerinden oluşur. Protein kinazlar ve protein fosfatazlar, bitkilerde sinyal iletimi ve çevresel uyaranlara yanıt olarak proteinlerin geri dönüşümlü fosforilasyonunu düzenlemede kritik bir rol oynamaktadır (Stone ve Walker, 1995; Li ve Liu, 2021).

Mitogen-aktif protein kinazlar (MAPK'lar), çoğu ökaryotik hücrenin sinyal iletiminde önemli rol oynayan bileşenlerdir. Ağır metal stresine yanıt olarak MAPK'ların aktivasyonu, NADPH oksidazlar, reaktif oksijen türleri (ROS), kalsiyum bağımlı protein kinazlar (CDPK), fosfatidil inositol 3-kinaz (PI3K) ve diğer MAPK'lar aracılığıyla başlatılmaktadır (Yeh ve ark., 2007; Islam ve ark., 2015). Birçok çalışma, MAPK kaskadlarının bitkilerde ekstraselüler uyaranların hücre içi yanıtlara iletilmesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir (Zhang ve Klessig, 2001; Meng ve Zhang, 2013). Farklı çalışmalarda, *A. thaliana*'da MPK3 ve MPK6'nın hidrojen peroksit tarafından indüklendiği bildirilmiştir (Rentel ve ark., 2004; Nakagami ve ark., 2006). Roelofs ve ark.

(2008) ise MAPK sinyalleme sinin ağır metal stresi sırasında baskılanan yanıtların düzenlenmesinde rol oynayan bZIP, MYC ve MYB transkripsiyon faktörlerini aktive ettiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, WRKY ve TGA gibi transkripsiyon faktörlerinin gen ekspresyonu, MAPK tarafından aktive edilerek veya baskılanarak düzenlenmektedir. Mevcut çalışmada, miR156 ve miR168'in yukarı düzenlendiği ve miR156 tarafından Mitogen activated kinase kinase kinase ZIK9 hedeflenirken; miR168 tarafından Mitogen-activated protein kinase hedeflendiği rapor edilmiştir. Early raya'da miR156a/d/f tarafından MAKKK ZIK9 hedeflenirken; Sindh raya'da miR156a/d/f/e tarafından MAKKK ZIK9 hedeflenmiştir (Çizelge 4.8). Dahası, hem Cr-akümülatör hem de Cr-dışlayıcı her iki bitkinin köklerinde Cr³⁺ stresi altında miR168a tarafından Mitogen-activated protein kinase (MAPK) hedeflenmiştir.

Bitkiler, ağır metal stresine yanıt olarak kök yapısını yeniden düzenleyerek bu strese karşı etkili bir şekilde başa çıkabilmektedir. Kök oluşumunu düzenleyen bitki büyüme hormonları, özellikle oksin ve sitokinin, ağır metal stresine yanıt olarak kök sistemi yapısını şekillendirir (Krishnamurthy ve Rathinasabapathi 2013). Yapılan çalışmada, Early raya'da Auxin response factor (oksin yanıt faktörü) hedeflenmediği; ancak, Sindh raya'da miR167a/b/c/d tarafından 23 adet Auxin response factor (oksin yanıt faktörü) hedeflendiği gözlenmiştir; Cr³⁺ stresi altında miR167'in yukarı düzenlenmesi, Cr stresine karşı oksin seviyesinin azalmasına yol açmaktadır. Ek olarak, Early raya'da yukarı düzenlenen miR156a/d/f tarafından Auxin efflux carrier component hedeflediği ve aşağı düzenlenen miR6029'un ve yukarı düzenlenen miR395a/b/c'nin Auxin response proteini hedeflediği; Sindh raya'da yukarı düzenlenen miR156a/d/f/e tarafından Auxin efflux carrier component hedeflendiği ve aşağı düzenlenen miR395a/b/c/d/e/f'nin ise Auxin response proteini hedeflendiği rapor edilmiştir. Benzer bir çalışmada, Osa-miR160'ın ARF'yi (oksin tepki faktörü) hedef aldığı gözlemlenmiştir; dolayısıyla, Cr stresi altında Osa-miR160'ın aşağı düzenlenmesi, Cr stresine mücadele için gerekli olan oksinin yüksek ifadesine neden olabildiği rapor edilmiştir. Ayrıca, kök başlığı oluşumunu düzenlemede Osa-miR160'ın benzer ARF aracılı yanıtı daha önce *A. thaliana*'da bildirilmiştir (Wang, 2005). Ancak, metal stresinde oksin sinyalizasyonu ile MAPK sinyalizasyonu arasındaki ilişki halen tam olarak anlaşılmamıştır. Diğer bir taraftan, IAA, ARF ve PIN adı verilen oksin sinyal genlerinin MAPK sinyalleme sinin tarafından baskılandığı bildirilmiştir (Zhao ve ark. 2014). Verilerimiz, bu çalışmada kullanılan *B.*

juncea çeşitlerinde oksinin Cr taşınımının düzenlenmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir.

Protein kinazlar ve protein fosfatazlar, bitkilerde sinyal iletimi ve çevresel uyarıcılara yanıt olarak proteinlerin geri dönüşümlü fosforilasyonunun düzenlenmesinde kritik öneme sahiptir. Hem Early raya'da hem de Sindh raya'da miR162a tarafından Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PIP5K) enziminin hedeflendiği saptanmıştır. Ancak, Early raya'da miR162a yukarı düzenlenirken; Sindh raya'da miR162a aşağı düzenlenmiştir. Ek olarak, Sindh raya'da aşağı düzenlenen miR162a ve miR395e/f tarafından phosphatidylinositol 4-kinase alpha 2 enziminin hedeflendiği de belirlenmiştir. Phosphatidylinositol 4-kinase alpha 2 enzimi, hücre içi sinyal iletiminde, hücre zarı organizasyonunda ve veziküler taşıma süreçlerinde kritik roller oynar; bu da bitkilerin büyüme, gelişim ve stres yanıtları üzerinde doğrudan etkili olmaktadır (Wang ve ark., 2006; Ruelland ve ark., 2015). Sindh raya'da, phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PIP5K), hücre zarında bulunan ve fosfatidilinositol 4-fosfatı (PI4P) fosfatidilinositol 4,5-bisfosfata (PI(4,5)P₂) dönüştüren bir enzimdir. PI(4,5)P₂, hücresel sinyal iletiminde, hücre iskeletinin düzenlenmesinde, hücre zarı dinamiklerinde ve diğer birçok hücresel süreçte önemli bir rol üstlenen bir fosfoinositid türüdür. Diğer bir taraftan, Early raya'da yukarı düzenlenen miR824 ve miR156g'nin Serine/threonine-protein phosphatase hedeflediği ve aynı şekilde aşağı düzenlenen miR159 ve miR6031'in Serine/threonine-protein phosphatase hedeflediği tespit edilmiştir. Sindh raya'da ise yukarı düzenlenen miR156b/c/g'nin Serine/threonine-protein phosphatase hedeflediği ve aşağı düzenlenen miR159 ve miR824'ün Serine/threonine-protein phosphatase hedeflediği tespit edilmiştir. Ek olarak, Early raya'da aşağı düzenlenen miR390a/b/c'nin hedefi olarak tanımlanan Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase PEPR2'nin seviyesinin artmasına yol açmaktadır. Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase PEPR2, bitkilerde savunma mekanizmasında rol oynayan önemli bir reseptör protein kinazdır. Bu da Cr stresi altında Early raya'da PEPR2'nin hücre duvarında meydana gelen hasarı algılayarak reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini ve diğer savunma sinyal yollarını tetikleyerek bitki savunmasını güçlendirebileceğini gösterebilir.

5.3. Early raya ve Sindh raya'da miRNA aracılı Cr stresine yanıtta oksidatif stres ile ilişkili genler

Tanımlanan genlerin fonksiyonel kategorizasyonları incelendiğinde, bu genlerin büyük oranda hücre içi bileşenlerde lokalize oldukları, hücresel süreçlere katıldıkları, ROS ile ilişkili oldukları ve antioksidan savunma aktivitelerinde rol oynadıkları görülmektedir. Ayrıca, genellikle bu genlerin benzer işlevleri yerine getirdiği anlaşılmaktadır (Şekil 5.1; 5.2).

Reaktif oksijen türleri (ROS), bitki hücrelerinde normal metabolik süreçlerin bir yan ürünü olarak doğal bir şekilde üretilmektedir. ROS kloroplastlar, mitokondriler ve peroksizomlarda sürekli olarak aerobik süreçler tarafından üretilmektedir (Sandalio ve ark., 2013; Farooq ve ark., 2019). Krom (Cr), bitki hücresine çeşitli demir taşıyıcı benzeri proteinlerin etkisiyle girdikten sonra, aşırı miktarda reaktif oksijen türleri (ROS) oluşabilmektedir. Bu durumda, Cr, detoksifikasyon mekanizmalarını, sinyal moleküllerini ve şaperonları aktive edebilir; bu da Cr stresine adaptasyonu ve/veya tolerans seviyesini arttırabilir. Bitki hücreleri Cr iyonlarını algıladıktan sonra, Cr-indükleyen aşırı ROS seviyesini ve oksidatif hasarı azaltmak için bazı ağır metal stresine yanıtta hormonları ve sinyal moleküllerini (örneğin etilen, ABA, F-box proteini, Tioredoksin benzeri protein vb.) aktive edebilir. Bu çalışmada, Bna-miR166f'in varsayılan hedefi olarak Protein detoxification, Purple acid phosphatase, Glutathione S-transferase, Beta-galactosidase, Thioredoxin reductase, Glycosyltransferase, Probable magnesium transporter tanımlanmıştır. Cr³⁺ stresinde, her iki bitkide de miR166f'in yukarı düzenlendiği ve hedef olan tioredoksin redüktazın baskılandığı gözlemlenmiştir.

Lakkaz (LAC), bitkilerde lignin biyosentezinden hücre duvarı modifikasyonuna, savunma mekanizmalarından detoksifikasyona kadar birçok önemli biyolojik süreçte görev alan bir enzimdir. Lakkaz enzimi, bitki hücre duvarının lignifikasyonu ve kalınlaşmasında rol oynar (Schuetz ve ark., 2014; Srivastava ve ark., 2016). LAC'ların ifade düzeyleri, miRNA hedeflemesi ile post-transkripsiyonel olarak düzenlenebilir. Örneğin miR397 (Li ve ark., 2019a; Huang ve ark., 2021), miR408 (Li ve ark., 2019a; Gao ve ark., 2022) ve miR857 (Abdel-Ghany ve Pilon, 2008) bitki LAC'larının mRNA'sını hedef alarak ifade düzeylerini düzenlediği bulunmuştur. Ayrıca miR397, miR408, miR857 ve miR528 (Liu ve ark., 2020) ile miR6034 (Ping ve ark., 2019) gibi

diğer miRNA'ların, LAC ailesinin üyelerinin post-transkripsiyonel ifadesini olumsuz şekilde düzenlediği doğrulanmış veya öngörülmüştür. Krom, kadmiyum, arsenik ve kurşun gibi ağır metal stresi, pirinç LAC'larının ifadesini de önemli ölçüde etkilemiştir. Liu ve ark., OsLAC17 ve OsLAC23/29'un, pirinç krom, kadmiyum veya arsenik stresine maruz kaldığında belirgin bir şekilde yukarı düzenlendiğini bildirmiştir. Örneğin OsLAC10'un krom, arsenik ve kurşun tarafından; OsLAC24'ün ise krom, kadmiyum ve kurşun stresleri tarafından yukarı düzenlendiği tespit edilmiştir (Liu ve ark., 2017). Mısırdaki ise ZmLAC1 ifadesi 10 mM CdCl₂ ile muamele edildiğinde önemli ölçüde yukarı düzenlenmiştir, ancak kök uzamasında belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir (Liang ve ark., 2006). Ancak, bazı LAC'lar diğer bitkilerde ağır metal iyonu stresıyla aşağı düzenlenmiştir. Örneğin, *Brassica parachinensis*'te kadmiyum stresi altında miR397 ifadesi yukarı düzenlenirken, hedef genleri LAC2/4/17'nin ifadesi belli bir ölçüde aşağı düzenlenmiştir. Kısaca, pirinçte, OsLAC17/23/24/29 kadmiyum stresıyla önemli ölçüde yukarı düzenlenirken, *Brassica parachinensis*'teki LAC2/4/17 kadmiyum stresıyla aşağı düzenlenmiştir. Farklı lakkaz genleri, çeşitli bitkilerde ya farklı işlevlere sahip olabilir ya da birbirleri arasında benzer ve tekrarlayan işlevler gösterebilir. Mevcut çalışmada, Early raya'da yukarı düzenlenen miR395a/b/c tarafından hedeflenen Lakkaz enzimi; Sindh raya'da aşağı düzenlenen miR395a/b/c/d/e/f tarafından hedeflenmiştir. Sonuç olarak Early raya'da lignin içeriği azalmıştır (Liu ve ark., 2020b). Sindh raya'da ise lignin içeriğinin artmasının iyonların denge durumunu düzenleyebileceği ve ağır metal iyonlarının hücrelere olan toksisitesini azaltabileceği düşünülmektedir. LAC'lar, ağır metal iyonu stresleri altında çeşitli bitkilerde farklı ifade paternleri göstermekte olup, bu durum stres toleransındaki farklı yeteneklerini ortaya koymaktadır. Elde edilen sonuçlar, Cr stresinin özellikle Sindh raya köklerinde miR395 aracılığıyla lakkaz genlerinin ifadesini güçlü bir şekilde indüklediğini göstermiştir. Çoğu bitkide olduğu gibi, Lakkaz apoplasta salındıktan sonra, Sindh raya köklerinde Cr detoksifikasyonu ile ilgili olan ekstrasellüler lignin oluşumuna katılabilir. Bu, miR395a/b/c/d/e/f tarafından hedeflenen lakkazın Sindh raya köklerinin Cr stresine yanıtında önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Sonuç olarak, köklerde lignifikasyon yoluyla fazla Cr emilimini önleyerek krom stresine karşı toleransını ortaya koymaktadır. Bu durum, Sindh raya bitkisinde lakkazların hem lignin üretiminde hem de Cr stresine karşı toleransta birbirini tamamlayan roller üstlenebileceğini göstermektedir. Benzer bir çalışmada, turpta, iki

lakkaz geninin miR397a ve rsa-miRn35'in hedeflediği rapor edilmiş (Liu ve ark., 2015); bu da miRNA'ların metal stresi altında hücre duvarı sentezini düzenleyebileceğini göstermektedir.

Vezikül taşıma mekanizması, bitkinin Cr stresine yanıtını düzenlenmede önemli bir rol oynar. Hücre, plazma membranından ve plazma membranına olan taşıma hızını düzenleyerek stresin etkilerinin yönetebilir (Levine, 2002). Veziküler trafik ile ilişkili sinyal iletim yolları, membran geri dönüşümü veya temel materyallerin hedefe daha iyi ulaştırılması, streslerle mücadelede birlikte çalışabilir (Sutter ve ark., 2007; Wang ve ark., 2020). Dahası, ekzosist kompleksi Golgi-plazma membranı vezikül taşımasında işlev görebilir (Cai ve ark., 2007). Bitkilerde, ekzosist kompleksi 8 alt birimden oluşur: Ekzosist (Exo)70p ve Exo84p, Sekretuar (Sec)3p, Sec5p, Sec6p, Sec8p, Sec10p, Sec15p. *Oryza sativa* ve *Arabidopsis thaliana*'nın sırasıyla 41 ve 23 Exo70 genine sahip olduğu bildirilmiştir (Chong ve ark., 2010). Dahası, Cr (VI) kaynaklı streste vezikül trafiğiyle ilişkili 5 Exo70 geninin ifadesi söğüt (*Salix alba*) köklerinde tespit edilmiştir (Quaggiotti ve ark., 2007; Trinh ve ark., 2014). Ek olarak, Exo70 genlerinin artan ifadeleri, Cu stresine yanıtta huş ağacında (*Betula pendula*) tespit edilmiştir (Keinänen ve ark. 2007). Mevcut çalışmada, Exocyst subunit Exo70 family protein, Early raya'da aşağı düzenlenen Bna-miR169m tarafından hedeflenmiştir. Dahası, Sindh raya'da Bna-miR167a/b/c/d ve Bna-miR171d/e'nin yukarı düzenlendiği ortaya konmuştur. Bu miRNA'ların hedeflerinden biri Exocyst subunit Exo70 family proteindir. Cr³⁺ stresine yanıtta farklı birçok miRNA tarafından hedeflendiği ve aktivitesinin değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, Cr stresine yanıt veren bitkilerin köklerinde Exo70 genlerinin potansiyel olarak rol oynayabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada, Early raya'da miR169 ailesinden sadece miR169m'in (6,529 kat) aşırı ifadesi aşağı düzenlenmiş olarak tespit edilmiştir. Bna-miR169m için yapılan hedef analizi Diacylglycerol kinase (Fragment), Ferredoxin, Clathrin heavy chain, GATA transkripsiyon faktör, Protein detoksifikasyon 23, Autophagy-related protein 3, Signal peptidase I'i düzenleme eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. Cr³⁺ stresine yanıt olarak, bu proteinlerin ve faktörlerin artış göstermesi, hücre veya organizmanın belirli biyokimyasal süreçlere yanıt olarak kendini uyarladığını veya savunma mekanizmalarını güçlendirdiğini göstermektedir. Her birinin artışı, hücrede belirli süreçlerin veya stres yanıtlarının aktif olduğunu işaret etmektedir.

Diacylglycerol Kinase (Fragment), diasilgliserolü (DAG) fosforik aside dönüştürerek hücredeki sinyal yollarını düzenler. Artışı, hücre sinyal yollarının (özellikle fosfolipid sinyali) aktif olduğunu gösterebilir ve hücredeki çeşitli biyolojik süreçlerin (örneğin hücre büyümesi, farklılaşma) düzenlenmesine yardımcı olabilir. Bitki DGK genleri üzerine yapılan çalışmalar, bu genlerin bilinen bazı faydalı elementler, örneğin sodyum (Na) ve alüminyum (Al), ile arsenik (As), gümüş (Ag), krom (Cr), kadmiyum (Cd) ve cıva (Hg) gibi diğer metal ve metaloid iyonları arasındaki önemli etkileşimlerini göstermiştir (Escobar-Sepúlveda ve ark., 2017; Tang ve ark., 2020). Bu faydalı elementler, farklı hücre bölmelerinde yer almakta ve farklı roller üstlenmektedir. Bu durum, DGK genlerinin bitki hücresinde geniş bir şekilde dağıldığını, geçiş aktivitelerine sahip olduğunu ve DGK genlerinin homeostazis indükleyen elementlere karşı bitki tepkilerini düzenleyebileceğini düşündürmüştür. Son çalışmalar, diasilgliserol kinazı (DGK) iki önemli ikinci habercinin dengelenmesini kontrol ederek çeşitli hücresel reaksiyonları düzenleyen kilit bir enzim olarak tanımlamıştır (Kue Foka ve ark., 2020). Ayrıca, DGK enzimleri flavonoid ve lignin biyosentezi sırasında kritik bir indirgenmiş koenzim olan NADPH'nin üretilmesini sağlar. DGK enzimleri tarafından aktive edilen tütün NADPH oksidaz bağımlılığı, kriptogenik stres uygulaması sırasında önemli ölçüde artış göstermiştir (Kue Foka ve ark., 2020). Ek olarak, çoğu bitki patojen reaksiyonunda apoplastik oksidatif reaksiyon sırasında reaktif oksijen türlerinin üretimi NADPH oksidazlar tarafından yönlendirilmektedir (Sagi ve Fluhr, 2006). Bu çalışmada, Early raya'da aşağı düzenlenen miR169m tarafından hedeflenen diasilgliserol kinaz (DGK); Sindh raya'da aşağı düzenlenen miR169m/n tarafından hedeflenmiştir. Krom stresi altında, DGK enzimlerinin her iki bitkinin büyümesi, gelişimi ve çevresel uyarıcılara ve streslere verdikleri yanıtlar temel süreçlerde önemli bir rol üstlendiğini göstermektedir. Benzer şekilde, Ferredoksinin artışı, fotosentez, oksidatif stres yanıtı veya enerji metabolizması gibi süreçlerde artan bir ihtiyaç olduğunu gösterebilir. Bu artış, hücrenin enerji üretiminde veya stresle başa çıkma kapasitesinde bir artış anlamına gelebilir. Clathrin Heavy Chain: Klathrin, hücre içi taşıma ve endositoz süreçlerinde rol oynar. Bu proteinin artışı, hücrede aktif bir endositoz veya membran geri dönüşümünün olduğunu gösterebilir (McMahon ve Boucrot, 2011; Paez Valencia ve ark., 2016). Bu, hücre yüzey reseptörlerinin yeniden düzenlenmesi veya besin maddelerinin alımının artmasıyla ilişkili olabilir. GATA Transkripsiyon Faktörü: GATA faktörleri, gen ekspresyonunun

düzenlenmesinde kritik rol oynar (Reyes ve ark., 2004; Zhu ve ark., 2020). Artışı, belirli genlerin aktivasyonuna ihtiyaç olduğunu veya hücredeki belirli gelişimsel süreçlerin düzenlendiğini gösterebilir. Örneğin, hücre farklılaşması veya Cr^{3+} stres yanıtları ile ilişkili olabilir. Protein Detoksifikasyon 23: Bu proteinin artışı, hücrenin detoksifikasyon süreçlerini artırdığını gösterir. Bu, toksik maddelerin birikmesine yanıt olarak hücrenin kendini savunma mekanizmalarını devreye soktuğuna işaret eder. Autophagy-Related Protein 3: Otofaji, hücrelerin hasarlı organelleri veya proteinleri sindirme ve geri dönüştürme sürecidir. Bu proteinin artışı, hücrede otofajinin aktif olduğunu ve hücrenin stres koşulları altında hasarlı bileşenleri temizlediğini veya enerji sağlamak için otofajik süreçleri kullandığını gösterebilir. Signal Peptidase I: Bu enzim, sinyal peptidlerini proteinlerden ayırarak proteinlerin doğru katlanmasını ve işlevsellik kazanmasını sağlar. Bu proteinin artışı, hücrenin protein sentezini artırdığını ve yeni proteinlerin hücre zarına veya sekresyon yollarına dahil edildiğini gösterebilir. Bu durumda, bu proteinlerin ve faktörlerin genel artışı, hücrenin çevresel stresler, enerji talepleri, sinyal iletimi ve detoksifikasyon süreçlerine yanıt olarak adaptasyon geliştirdiğini ve hücre hayatta kalma stratejilerinin devreye sokulduğunu gösterir. Bu, hücrelerin homeostazı koruma ve stresle başa çıkma yeteneğini artırmaya yönelik bir yanıt olabilir.

Sindh raya'da ise miR169'un birçok üyesi miR169a/b/m/n aşağı düzenlenmiştir. Bunların varsayılan hedef analizi Clathrin heavy chain; Exocyst subunit Exo70 family protein; Carboxypeptidase; Transcription factor subunit NF-YC11B; ABC transporter B family member 7; Kinesin-like protein; Exocyst subunit Exo70 family protein; Beta-galactosidase; Diacylglycerol kinase (Fragment); Phospholipid-transporting ATPase; 3-ketoacyl-CoA synthase; ATP-citrate synthase beta chain protein 2; Malate dehydrogenase olduğu tespit edilmiştir. Sindh raya'da Early raya'ya kıyasla miR169a/b/n'in de aşırı ifadesi belirlenmiş olup, Exocyst subunit Exo70 family protein, ABC transporter B family member 7, Transcription factor subunit NF-YC11B gibi bazı önemli TF'ler ve fotosentez ve ROS ile ilişkili proteinler tanımlanmıştır. Bu bulgular, bu proteinlerin genel stres yanıtı ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, Bna-miR169'un Sindh raya bitkisinde Cr dışlanmasıyla sorumlu olabileceğini ileri sürmektedir.

Dış çevresel koşullar değiştiğinde, organizmalar hızla kendi gen ekspresyon programlarını düzenler ve oluşan değişikliklere uyum sağlamak için koruma mekanizmalarını başlatırlar. RNA dizileme sonuçları, Cr^{3+} stresine yanıtı ile ilişkili bazı

genlerin ekspresyon kat sayısının Early raya ve Sindh raya'da önemli ölçüde değiştiğini göstermiştir (Çizelge 4.9; 4.10). Bu farklı şekilde eksprese olan bazı önemli genler, Cr^{3+} muamelesi sonrasında ekspresyon profilleri kontrol grubundakilerden önemli ölçüde farklı olduğunu göstermektedir.

Süperoksit dismutaz [Cu-Zn]: Mevcut çalışmada, Cr^{3+} uygulaması sonrası hem Early raya'da hem de Sindh raya'da miR159'un aşağı regüle olduğu ve hedeflediği süperoksit dismutaz [Cu-Zn] geninin ifade seviyesi önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir.

Peroksidaz: Cr^{3+} muamelesi sonrası, Early raya'da peroksidaz anlatımı olmazken; Sindh raya'da miR167a/b/c/d ve miR171d'nin yukarı düzenlendiği ve hedefi olan birçok peroksidazın ifade seviyeleri önemli ölçüde baskılandığı tespit edilmiştir. Bu durum, Sindh raya'daki oksidatif hasar nedeniyle kloroplast peroksidasyonu ile ilişkili olabilir.

ABC taşıyıcı proteinleri: Çoğu ABC taşıyıcısı, organizmalarda taşıma aktivitesine sahiptir ve substratların hücre içi ve dışı arasında transmembran taşımalarını sağlamak için ATP hidrolizinden elde edilen enerjiyi kullanır. Substratlar arasında polisakkaritler, peptitler, ağır metal şelat kompleksleri, alkaloidler ve ilaçlar bulunur. Bitkiler, hayvanlar veya mikroorganizmalardan daha fazla sayıda ABC taşıyıcı proteinine sahiptir. Örneğin, pirinçte 128 çeşidi ve *A. thaliana*'da 129 çeşidi bulunmaktadır; bunların çoğu daha fazla araştırma gerektirmektedir. Bilinen bitki ABC taşıyıcı proteinleri, stres direnci ve ağır metal detoksifikasyonu ile ilişkilidir. Mevcut çalışmada, Cr^{3+} muamelesi üzerine, Early raya'da ABC taşıyıcı proteininin anlatımı olmazken; Sindh raya'da miR169a/b/n'in hedefi olarak ABC transporter B family member 7'in ifade seviyesi önemli ölçüde aşağı düzenlendiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, Sindh raya'da bulunan miR169a/b/n ailesi Early raya'da bulunmadığı saptanmıştır. Bu durum, Cr'nin detoksifikasyonu ile ilişkili olabileceği ve Cr^{3+} iyonlarını hücre dışına taşımak ve/veya vakuole aktarmak için aktive edilmiş olabileceği düşünülmektedir. ABCB7'nin artan ifadesi, Sindh raya'nın Cr'nin neden olduğu stresi yönetmek için bu taşıyıcı proteini arttırarak savunma yanıtını tetiklediğini gösterebilir. Ayrıca, ABCB7'nin mitokondriyal fonksiyonlarla ilişkili olduğu bilinir ve hücre içindeki demir ve kükürt gruplarının düzenlenmesine katkıda bulunabilir. Cr^{3+} stresi altında, bu taşıyıcı proteinin artışı, mitokondriyal fonksiyonun ve enerji metabolizmasının korunması için önemli olabilir, çünkü Cr, hücresel enerji üretimini etkileyebilir. Ek olarak, süperoksit dismutazın aktive, glutatyon S-transferaz ve peroksidazın Cr^{3+} 'ye yanıt olarak ROS üretimi yoluyla inaktive edildiğini gösterilmiştir.

RNA dizileme analizimiz, Cr^{3+} 'nin oluşturduğu toksik etkiler nedeniyle her iki bitkinin tolerans mekanizmasını engellemede önemli bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. Ek olarak, protein kinazları ve vezikül trafiği de dahil olmak üzere sinyal iletiminde yer alan proteinler, her iki bitkide de Cr^{3+} stresine yanıtta önemli rollere sahiptir.

5.6. *B. juncea* var., Early raya ve Sindh raya Bitkilerinin Köklerinde ROS ile İlişkili Saptanan Bazı Genler

Tanımlanan hedef genlerin Cr'ye duyarlı miRNA'lar tarafından gerçekten düzenlenip düzenlenmediğini araştırmak için, üç hedef genin (APX, FSD ve RBOH) ekspresyon seviyeleri, yedi farklı Cr konsantrasyonu uygulanan Cr-akümülatör bitki *B. juncea* var. Early raya ve Cr-dışlayıcı bitki *B. juncea* var. Sindh raya kök dokularında RT qPCR yöntemi ile ölçülmüştür.

5.6.1. RBOH (Solunum Patlaması Oksidaz Homolog)

Hücre dışı ortamla etkileşime giren önemli komplekslerden biri olan NADPH oksidaz hücre zarına-bağlı bir enzimdir (Hu ve ark., 2020). NOX'u kodlayarak H_2O_2 üretiminde rol oynayabilen solunum patlaması oksidaz homolog (RBOH) geni, bu süreçte önemli bir görev üstlenmektedir (Wang ve ark., 2018). NOX, RBOH gen ailesi tarafından ifade edilen önemli bir enzim olup, bu genlerin çeşitliliği ve dağılımı hücre, doku ve organlara bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Li ve ark., 2019). NOX, süperoksit serbest radikalının üretimini katalizleyerek NADPH'ten oksijene bir elektron aktarılmasını sağlar. Bu süreçte H_2O_2 hücre dışından hücre içine taşınırken, H^+ iyonları hücre dışına taşınır (Sagu ve Fluhr, 2011). Normal koşullar altında, NOX kompleksi inaktif durumda bulunur; ancak solunum patlaması sırasında zar üzerinde aktifleşerek bir araya gelir. Aktif NOX, bitki sinyal iletiminde rol oynayan süperoksit üretir (Gill ve Tuteja, 2010). Süperoksit ayrıca, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığıyla hızla hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturabilir ve bu da daha sonra başka reaksiyonlar geçirerek diğer reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturur (Mishra ve Sharma, 2019). Bunun yanı sıra, hücrede dengeli bir şekilde ROS seviyesini korumak için NOX aktivitesinin hassas bir şekilde düzenlenmesi kritik öneme sahiptir (Considine ve Foyer, 2021). Peroksitler, süperoksit, hidroksil radikali, tekli oksijen ve alfa oksijen, sinyal iletim molekülleri olarak

işlev gören farklı ROS türleridir (Karuppanapandian ve ark., 2011). Biyolojik literatüre göre, ROS, oksijen metabolizmasının doğal bir yan ürünü olarak oluşur (Kärkönen ve Kuchitsu, 2015). Bitkilerde, fotosentez, solunum ve fotosolunum gibi yan ürün olarak ROS üreten temel hücresel işlemler ve glukoz oksidaz, ksantin oksidaz ve farklı genel bitki peroksidazları gibi ROS üretici enzimlerden oluşan bir ağ bulunmaktadır. Bu ağın önemli bir parçası, RBOH veya NADPH oksidaz enzimleridir. RBOH'ler, ROS üretimindeki kalsiyum, protein fosforilasyonu ve lipid gibi farklı sinyal iletim yollarına dahil oldukları için bitkilerdeki diğer ROS üretim mekanizmaları arasında farklı bir yere sahiptir (Chapman ve ark., 2019).

Bitkilerin metallere karşı duyarlılığı ve tepkileri, fizyolojik ve genetik yapılarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Macnair, 1993). Cr stres koşullarında, NADPH oksidaz, bitki savunma mekanizmalarını aktive eden sinyal molekülleri olarak işlev gören ROS'un üretiminde rol oynar (Trinh ve ark., 2014). Diğer yandan, NADPH oksidaz, proton pompasını aktive ederek ve plazma zarı boyunca bir proton gradyanı oluşturarak dolaylı olarak toksik Cr iyonlarını uzaklaştırır (Keunen ve ark., 2011). Yapılan çalışmalarda, *Arabidopsis*, domates, tütün ve patates gibi diğer bitki türlerinde de farklı RBOH genleri tanımlanmıştır (Chen ve Yang, 2020; Zhang ve ark., 2021). Ayrıca, metal stresi ile ilgili olarak Cuypers ve ark. (2023) *Arabidopsis thaliana* bitkisinin Cd stresi altında, RBOH geninin farklı izoformları olan RBOHC, RBOHD ve RBOHF mRNA'larında belirgin bir artış olduğunu tespit etmişlerdir. Bununla beraber, aynı çalışmayla Cu elementinin dokularda RBOHD gen anlatımında önemli bir artışa neden olduğu gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada, CdCl₂ uygulanan *Citrullus colocynthis* bitkilerindeki RBOH kodlayan genlerin transkriptlerinin kontrolle karşılaştırıldığında önemli ölçüde arttığı rapor edilmiştir (Khafi ve ark., 2020). Dahası, RBOH ekspresyon bulguları, 300 µM Cd muamelesinde RBOH ekspresyonunun kontrole kıyasla 17 kat daha fazla arttığı ve bu artışın oldukça önemli olduğu vurgulanmıştır. Diğer bir çalışmada, RBOH'lerin H₂O₂ üretimini farklı şekillerde düzenleyebildiğini gösterilmiş ve bu koşullar altında en önemli ROS kaynağının RBOHC olduğunu belirlenmiştir (Gupta ve ark., 2017); antioksidatif savunmalar da farklı şekillerde düzenlenmektedir, RBOHC tarafından SOD'un düzenlenmesi ile RBOHC ve RBOHD tarafından GSH/GSSG redoks çifti oranının düzenlenmesi ve RBOHF tarafından ASA/DHA'nın düzenlenmesi en önemli faktörler olduğu rapor edilmiştir. AtRBOH'lardan elde edilen yapraklarda

gözlemlenen farklı yanıtlar, farklı AtRBOH'lerden Cd ve besin maddelerinin alımı ve taşınmasının farklı düzenlenmesiyle açıklanmıştır. RBOH'lerin farklı dokularda ve bitki organlarında farklı şekilde ifade edildiği şu şekilde açıklanmıştır: RBOHD ve RBOHF'nin bitkinin tamamında ekspresyon gösterdiği, RBOHA-C, G, E ve I'nin daha çok köklerde, RBOHH ve J'nin ise polende ekspresyon gösterdiği bilinmektedir (Sagi ve Fluhr, 2006). RBOH'ler, hücrenin metallere verdiği tepkileri yöneten karmaşık ağın düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır. Sonuçlar, ayrıca RBOH'lerin besin düzenleme mekanizmasında önemli genler olabileceğini ve örneğin, biyoteknolojide Cr gibi bazı elementlerin aşırı miktarlarının bitkinin toprak üstü kısımlarındaki hücrelerine zarar vermesini önlemek için yeni stratejiler geliştirilmesinde potansiyel adaylar olabileceğini göstermektedir. Bu tez çalışmasında, Cr-dışlayıcı bitki olan Sindh raya'nın kök dokusunda RBOH geninin anlatım seviyesinde bir farklılık oluşmazken, Cr-akümülatör bitki olan Early raya'nın kök dokusunda RBOH geninin anlatımında anlamlı bir artış belirlenmiştir (Şekil 4.12; 4.13). Toleransı yüksek olan Early raya'nın kök dokusunda kontrole kıyasla yüksek Cr konsantrasyonları (200-1000 μ M) uygulanan bitki köklerinde RBOH'nin anlatımında gözlenen artış oldukça yüksektir. Bu artış, Early raya bitkisinin krom stresine uyum sağlamasında RBOH geninin yüksek ekspresyonu ile açıklanabilir. RBOH geninin yüksek ekspresyonu, bitkinin krom stresine karşı adaptasyon yeteneğini destekleyen bir mekanizma olarak değerlendirilir.

5.6.2. Fe-SOD (FSD-Demir Süperoksit Dismutaz)

Antioksidan sistemler arasında yer alan SOD, süperoksit radikallerinin etkili bir şekilde ortadan kaldırılmasıyla ROS detoksifikasyonunda kritik bir rol oynamaktadır. SOD'lar (Süperoksit dismutazlar), $O_2^{\bullet-}$ radikalının H_2O_2 ve O_2 'ye dismutasyonunu katalize eden ve $OH^{\bullet}$, peroksinitrat ($ONOO^-$) ile hipoklorit (ClO^-) gibi zararlı reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşum zincirlerini engelleyen kritik öneme sahip metaloproteinlerdir (Saibi ve Brini, 2018). Bitkilerin oksidatif strese karşı ilk savunma mekanizmasını oluşturarak $O^{\bullet-2}$ ve H_2O_2 gibi iki Haber-Weiss reaksiyonu substratının miktarını doğrudan düzenlerler (Sharma ve ark., 2012). Bitkilerde, SOD'lar aktif merkezlerinde bulunan metal kofaktörlerine göre bakır ve çinko (Cu-ZnSOD), demir (Fe-SOD) ve mangan (Mn-SOD) olarak sınıflandırılabilir (Su ve ark., 2021). Yapılan bir çalışmada, Alüminyum-toleranslı cv. Vandana bitkilerinin hem köklerinde hem de

sürgünlerinde Fe-SOD aktivitesinin belirgin bir şekilde bulunduğu ve Alüminyum-hassas çeşidinde tamamen yok olduğu rapor edilmiştir (Bhoomika ve ark., 2013). Ayrıca, Al-toleranslı cv. Vandana bitkilerinde artan Al konsantrasyonu ve uygulama süresiyle Fe-SOD aktivitesinde önemli ve kademeli bir artış gözlemlenmiştir. Bu durum, Fe-SOD'nin bu çeşitte Al toleransında kritik bir rol oynadığını göstermektedir. Ancak, önceki çalışmalar Fe-SOD'nin pirinç ve diğer tek çenekli bitkilerde bulunmadığını göstermektedir. Fe-SOD'nin Al-toleranslı çeşitte tespit edilmesi, Al-kaynaklı oksidatif strese karşı koruma sağlaması açısından büyük önem taşımaktadır. Transgenik bütün bitkilerinde Fe-SOD'nin aşırı üretilmesinin, Mn-SOD'nin aşırı üretilmesine kıyasla oksidatif strese daha fazla tolerans sağladığı bildirilmiştir (Allen, 1995). Panda ve Matsumoto (2010), bezelye (*Pisum sativum* L.) köklerinde Al uygulamasının artan konsantrasyonu ve süresi altında Fe-SOD geninin oldukça önemli ve kademeli bir şekilde arttığını ve ifadesindeki kat artışının köklerde sürgünlerden çok daha fazla olduğunu bildirmiştir.

Mevcut çalışmada, Fe-SOD geninin anlatımı, Cr-akümülatör bitki Early raya'da kontrol örnekleriyle kıyaslandığında Cr-uygulanan bitkilerin köklerinde belirgin bir artış göstermiştir. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulanan Early raya bitkilerinde önemli sonuçlar elde edilmiş olup, en yüksek gen anlatımının 1000 μ M Cr uygulamasında olduğu belirlenmiştir. Cr-dışlayıcı bitki Sindh raya'da ise Fe-SOD geninin anlatımında herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.12). Bu sonuçlar, önceki yapılan çalışmalarla benzer sonuçlar göstermiştir. Elimizdeki bilgilere göre, Fe-SOD aktivitesi ile Cr toleransı arasındaki ilişkiyi, özellikle köklerde, gösteren herhangi bir rapor bulunmamaktadır. Bu çalışmada, Fe-SOD enziminin O_2^{2-} 'yi etkili bir şekilde uzaklaştırmadaki potansiyel rolünü, Cr toksisitesi ve toleransı bağlamında, özellikle Cr-akümülatör ve Cr-dışlayıcı bitkilerin köklerindeki aktivitesi üzerinden ele aldık. Cr-akümülatör bitki Early raya'da Fe-SOD'nin tolerans mekanizmasındaki kilit rolü ve Cr-dışlayıcı bitki Sindh raya'da Fe-SOD'nin aktivitesinin neden bulunmadığı sorusu merak konusudur. Şöyle ki, Fe-SOD'nin eksikliği muhtemelen yüksek H_2O_2 seviyelerine bağlıdır; çünkü, Fe-SOD, H_2O_2 'ye karşı duyarlıdır. Dolayısıyla, H_2O_2 'nin etkin bir şekilde uzaklaştırılması da hücrenin Cr stresine tolerans göstermesi için kritik bir gereksinimdir; çünkü H_2O_2 birikimi, SOD aktivitesini engelleyebilir. Ayrıca, H_2O_2 'nin birikimi fotosentezi bozarak ve NAD(P)H-bağımlı oksidazı aktive ederek ROS üretimini arttırabilir. Bu nedenle,

H₂O₂'nin giderilmesine katılan enzimlerin Cr toleransındaki rolü göz ardı edilemez.

5.6.3. APX (Askorbat Peroksidaz)

APX, birçok yüksek bitkide tespit edilmiş olup, bu enzimin çok genli yapısı ortaya konmuştur. Sitozol, kloroplast stroması ve tilakoitlerde çeşitli APX izozimleri gözlemlenmiştir. Bu izozimler, elektron vericisi olarak askorbik asit (AsA) kullanarak H₂O₂'yi uzaklaştırır ve bitki hücrelerini H₂O₂'nin potansiyel yıkıcı etkilerine karşı korur. (Celi ve ark., 2023). APX, Foyer-Halliwell-Asada Yolağındaki kilit enzimlerden biri olarak kabul edilir. Askorbik asidin yokluğunda APX'ler kararsızdır ve askorbik asidin konsantrasyonu 20 µM'nin altına düştüğünde hızla aktivitesini kaybederler. Benzer şekilde, Fe metali de APX'in aktivitesi için gereklidir (Anjum ve ark., 2016). APX'in bitkilerde farklı alt hücrel yerlerde bulunduğu bildirilmiştir; örneğin, sitozol, mitokondri, kloroplast ve membran bağlı organeller, örneğin peroksizomlarda. Askorbat enzimleri genellikle kloroplastlarda, ayrıca diğer hücrel organellerde ve sitoplazmada lokalize olup, oksidatif stresle mücadelede önemli bir rol oynarlar.

Yapılan bir çalışmada, su sümbülünde artan APX (askorbat peroksidaz) aktivitesi, Pb metal iyonlarının neden olduğu artan aktif oksijen türlerine (AOS) karşı bir adaptif mekanizması olarak değerlendirilmektedir. Yaprak ve kök dokularında, Pb konsantrasyonunun 1000 mg/L'ye kadar artmasıyla APX aktivitesi önemli ölçüde artmıştır. APX aktivitesi ile aşırı ROS arasındaki pozitif korelasyon, H₂O₂ içeriğinin etkili bir şekilde uzaklaştırılmasına ve Pb stresi altında bitkilerin oksidatif hasara karşı korunmasına bağlanabilir (Malar ve ark., 2016). Bu çalışmada gözlemlenen sonuçlara benzer şekilde, bitkilerde ağır metallerin maruziyeti sonrası APX aktivitesinde artış, Piotrowska ve ark. (2009) ile Li ve ark. (2013) tarafından bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada, neredeyse tüm OsAPX genlerinin transkript seviyelerinin 20 ppm Al uygulamasından 8 saat sonra önemli ölçüde arttığını gözlemlemiştir (Rosa ve ark., 2010). Fasulye bitkilerinde, APX'in bitkilerin yapraklarında mRNA seviyelerinde Fe aşırı yüklenmesine yanıt olarak indüklendiğini bulmuştur (Pekker ve ark., 2002).

Mevcut çalışmada, APX geninin anlatımı, Cr-akümülatör bitki Early raya'da kontrol örnekleriyle kıyaslandığında Cr-uygulanan bitkilerin köklerinde belirgin bir artış göstermiştir. İki hafta (15 gün) boyunca Cr uygulanan Early raya bitkilerinde önemli sonuçlar elde edilmiş olup, en yüksek gen anlatımının 1000 µM Cr uygulamasında olduğu

belirlenmiştir (Şekil 4.13). Cr-dışlayıcı bitki Sindh raya'da kontrol örneği ile karşılaştırıldığında en yüksek seviyede APX geninin anlatımı 1000 μ M Cr uygulamasında gözlenmiştir (Şekil 4.12). Cr-dışlayıcı bitki Sindh raya'da RBOH ve Fe-SOD kıyasla en fazla artış gösteren gen APX olarak belirlenmiştir.

Sonuç

Bu çalışmada, farklı Cr biriktirme kapasitesine sahip iki *B. juncea* varyetesinde Cr-yanıtta miRNA aracılı düzenleyici ağların önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bu yeni bulgular, düşük Cr biriktirme özelliğinin genetik mekanizmalarına ilişkin yeni bakış açıları sağlayabilir ve *B. juncea*'nın düşük Cr-biriktiren varyetelerinin moleküler destekli tarama ve ıslah çalışmalarının geliştirilmesine katkıda bulunabilir. Sonuçlarımızın, Cr birikimi ve taşınmasının moleküler mekanizmalarına yeni bir bakış açısı sağlayacağı ve *B. juncea*'da Cr fitoremediasyonu için moleküler destekli tarama veya ıslah çalışmalarına faydalı olacağı beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Ghany, S.E., Pilon, M. (2008). MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in Arabidopsis. *J Biol Chem.* 283 (23), 15932–15945.
- Abd Elnabi, M. K., Elkaliny, N. E., Elyazied, M. M., Azab, S. H., Elkhailifa, S. A., Elmasry, S., Mouhamed, M. S., Shalamesh, E. M., Alhorieny, N. A., Abd Elaty, A. E., Elgendy, I. M., Etman, A. E., Saad, K. E., Tsigkou, K., Ali, S. S., Kornaros, M., Mahmoud, Y. A. (2023). Toxicity of Heavy Metals and Recent Advances in Their Removal: A Review. *Toxics*, 11(7), 580.
- Abdel-Ghany, S. E., Pilon, M. (2008). MicroRNA-mediated systemic down-regulation of copper protein expression in response to low copper availability in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 15932-15945.
- Agency for Toxic Substance and Disease Registry. (2015). Toxicological Profile for Chromium. U.S Department of Health and Human Services, Public Health Services, ATSDR, Atlanta.
- Ajeesh Krishna, T. P., Maharajan, T., Victor Roch, G., Ignacimuthu, S., Antony Ceasar, S. (2020). Structure, function, regulation and phylogenetic relationship of ZIP family transporters of plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 662.
- Akhter, Z., Bi, Z., Ali, K., Sun, C., Fiaz, S., Haider, F. U., Bai, J. (2021). In response to abiotic stress, DNA methylation confers epigenetic changes in plants. *Plants*, 10(6), 1096.
- Akinci, I.E., Akinci, S. (2010). Effect of chromium toxicity on germination and early seedling growth in melon (*Cucumis melo* L.). *African Journal of Biotechnology*, 9(29), 4589-4594.
- Aksoy, E., Kayıhan, C. (2022). Transcription factors and target genes involved in plant responses to high boron adaptation. In *Boron in Plants and Agriculture*, 207-231s, Academic Press.
- Aleel, K. (2009) Grennan identification of genes involved in metal transport in plants. *Plant Physiol.*, 149(4):1623–1624.
- Alford, É. R., Pilon-Smits, E. A., Paschke, M. W. (2010). Metallophytes—a view from the rhizosphere. *Plant and soil*, 337, 33-50.
- Ali, S., Mir, R. A., Tyagi, A., Manzar, N., Kashyap, A. S., Mushtaq, M., Bae, H. (2023). Chromium toxicity in plants: signaling, mitigation, and future perspectives. *Plants*, 12(7), 1502.
- Ali, Z., Waheed, H., Gul, A., Afzal, F., Anwaar, K., Imran, S. (2017). Brassicaceae plants: Metal accumulation and their role in phytoremediation. *Oilseed Crops: Yield and*

- Adaptations under Environmental Stress*, 207-223.
- Ali, H., Khan, E., Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869-881.
- Allen, R. D. (1995). Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant physiology*, 107(4), 1049.
- Alvim Kamei, C. L., Boruc, J., Vandepoele, K., Van den Daele, H., Maes, S., Russinova, E., De Veylder, L. (2008). The PRA1 gene family in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 147(4), 1735-1749.
- Andrés-Colás, N., Perea-García, A., Mayo de Andrés, S., Garcia-Molina, A., Dorcey, E., Rodríguez-Navarro, S., ... Peñarrubia, L. (2013). Comparison of global responses to mild deficiency and excess copper levels in Arabidopsis seedlings. *Metallomics*, 5(9), 1234-1246.
- Anjum, N. A., Ahmad, I., Pereira, M. E., Duarte, A. C., Umar, S., Khan, N. A. (Eds.). (2012). *The plant family Brassicaceae: contribution towards phytoremediation*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Anjum, N. A., Sharma, P., Gill, S. S., Hasanuzzaman, M., Khan, E. A., Kachhap, K., ... Tuteja, N. (2016). Catalase and ascorbate peroxidase—representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental science and pollution research*, 23, 19002-19029.
- Annamalainathan, K., Joseph, J., Alam, B., Satheesh, P. R., Jacob, J. (2013). Seasonal changes in xylem sap flow rate in mature rubber plants. *J. Plant Crop*, 41(3), 343-349.
- Arantza, S. J., Hiram, M. R., Erika, K., Chávez-Avilés, M. N., Valiente-Banuet, J. I., Fierros-Romero, G. (2022). Bio-and phytoremediation: Plants and microbes to the rescue of heavy metal polluted soils. *SN Applied Sciences*, 4(2), 59.
- Argüello, J. M., Eren, E., González-Guerrero, M. (2007). The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. *Biometals*, 20, 233-248.
- Ashraf, M., Ozturk, M., Ahmad, M. S. A. (Eds.). (2010). *Plant adaptation and phytoremediation*, 481s. New York: Springer.
- Ashraf, M. A., Maah, M. J., Yusoff, I. (2011). Heavy metals accumulation in plants growing in ex tin mining catchment. *International journal of environmental science and technology*, 8, 401-416.
- Balmer, Y., Vensel, W. H., Tanaka, C. K., Hurkman, W. J., Gelhaye, E., Rouhier, N., vd. (2004). Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101, 2642–2647.

- Baker, A. J. (1981). Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of plant nutrition*, 3(1-4), 643-654.
- Baker A. J. M., Brooks R. R. (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. – *Biorecovery* 1; 81-126.
- Baker, A. J., McGrath, S. P., Reeves, R. D., Smith, J. A. C. (2020). Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. *Phytoremediation of contaminated soil and water*, 85-107.
- Baker, A. J., Walker, P. L. (1990). Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*, 2, 155-165.
- Baoddh, K., Singh, R. P. (2012). Cadmium tolerance and its phytoremediation by two oil yielding plants *Ricinus communis* (L.) and *Brassica juncea* (L.) from the contaminated soil. *International journal of phytoremediation*, 14(8), 772-785.
- Bennett, L. E., Burkhead, J. L., Hale, K. L., Terry, N., Pilon, M., Pilon-Smits, E. A. (2003). Analysis of transgenic Indian mustard plants for phytoremediation of metal-contaminated mine tailings. *Journal of Environmental Quality*, 32(2), 432-440.
- Berti, W. R., Cunningham, S. D. (2000). Phytostabilization of metals. *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. Wiley, New York, 71-88.
- Bewley, J. D., Black, M., Bewley, J. D., Black, M. (1994). *Seeds: germination, structure, and composition*, 1-33s. Springer Us.
- Bewley, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. *The plant cell*, 9(7), 1055.
- Bhaduri, A. M., Fulekar, M. H. (2012). Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 11, 55-69.
- Bhoomika, K., Pyngrope, S., Dubey, R. S. (2013). Differential responses of antioxidant enzymes to aluminum toxicity in two rice (*Oryza sativa* L.) cultivars with marked presence and elevated activity of Fe SOD and enhanced activities of Mn SOD and catalase in aluminum tolerant cultivar. *Plant growth regulation*, 71, 235-252.
- Blaylock, M. J., Salt, D. E., Dushenkov, S., Zakharova, O., Gussman, C., Kapulnik, Y., ... Raskin, I. (1997). Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. *Environmental Science and Technology*, 31(3), 860-865.
- Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*, 91(2), 179-194.
- Bluskov, S. (2005). Distribution of chromium and its effect on morphology and anatomy of *Brassica juncea* (Indian mustard) and soil microorganisms. University of Northern

British Columbia.

Bothe, H. (2011). Plants in heavy metal soils. *Detoxification of heavy metals*, 35-57.

Bothe, H., Słomka, A. (2017). Divergent biology of facultative heavy metal plants. *Journal of Plant Physiology*, 219, 45-61.

Bradl, H. B. (2005). Sources and origins of heavy metals. In *Interface science and technology*, 6, 1-27s. Elsevier.

Briffa, J., Sinagra, E., Blundell, R. (2020). Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon*, 6(9).

Broadley, M.R., Willey, N.J., Wilkins, J.C., Baker, A.J.M., Mead, A., White, P.J. (2001) Phylogenetic variation in heavy metal accumulation in angiosperms. *New Phytol.*, 152, 9–27.

Budak, H., Akpinar, B. A. (2015). Plant miRNAs: biogenesis, organization and origins. *Functional and integrative genomics*, 15, 523-531.

Cai, H., Reinisch, K., Ferro-Novick, S. (2007). Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Developmental cell*, 12(5), 671-682.

Celi, G. E. A., Gratão, P. L., Lanza, M. G. D. B., Dos Reis, A. R. (2023). Physiological and biochemical roles of ascorbic acid on mitigation of abiotic stresses in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 107970.

Cevher-Keskin, B., Yıldızhan, Y., Yüksel, B., Dalyan, E., Memon, A. R. (2019). Characterization of differentially expressed genes to Cu stress in Brassica nigra by Arabidopsis genom arrays. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 299-311.

Chapman, J. M., Muhlemann, J. K., Gayomba, S. R., Muday, G. K. (2019). RBOH-dependent ROS synthesis and ROS scavenging by plant specialized metabolites to modulate plant development and stress responses. *Chemical research in toxicology*, 32(3), 370-396.

Chatterjee, J., Chatterjee, C. (2000). Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. *Environmental Pollution*, 109, 69-74.

Chen, L., Wang, T., Zhao, M., Tian, Q., Zhang, W. H. (2012). Identification of aluminum-responsive microRNAs in Medicago truncatula by genome-wide high-throughput sequencing. *Planta*, 235, 375-386.

Chen, F., Shen, J., Min, D., Ke, L., Tian, X., Korpelainen, H., Li, C. (2018). Male Populus cathayana than female shows higher photosynthesis and less cellular injury through ABA-induced manganese transporting inhibition under high manganese

condition. *Trees*, 32, 255-263.

Chen, X. (2005). MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Letters*, 579(26), 5923-5931.

Chen, F., Zhu, Z., Tong, L., Guo, X., Xu, S., Chen, J., ... Zhu, Z. (2020). Production of allohexaploid Brassica hybrid between tuber mustard (*Brassica juncea* L. var. *crassicaulis* Chen and Yang) and Chinese kale (*Brassica oleracea* var. *alboglabra* Bailey). *Scientia Horticulturae*, 270, 109412.

Chen, Q., Yang, G. (2020). Signal function studies of ROS, especially RBOH-dependent ROS, in plant growth, development and environmental stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39(1), 157-171.

Chen, L., Long, C., Wang, D., Yang, J. (2020). Phytoremediation of cadmium (Cd) and uranium (U) contaminated soils by *Brassica juncea* L. enhanced with exogenous application of plant growth regulators. *Chemosphere*, 242, 125112.

Cheng, W. D., Zhang, G. P., Yao, H. G., Wu, W., Xu, M. (2006). Genotypic and environmental variation in cadmium, chromium, arsenic, nickel, and lead concentrations in rice grains. *Journal of Zhejiang University Science B*, 7(7), 565-571.

Chigbo, C., Batty, L., Bartlett, R. (2013). Interactions of copper and pyrene on phytoremediation potential of *Brassica juncea* in copper-pyrene co-contaminated soil. *Chemosphere*, 90(10), 2542-2548.

Cristina, M. S., Petersen, M., Mundy, J. (2010). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual review of plant biology*, 61(1), 621-649.

Chmielowska-Bak, J., Arasimowicz-Jelonek, M., Izbianska, K., Frontasyeva, M., Ziniovsciaia, I., Guianca-Varela, C., Deckert, J. (2017). NADPH oxidase is involved in regulation of gene expression and ROS overproduction in soybean (*Glycine max* L.) seedlings exposed to cadmium. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 86(2).

Chong, Y. T., Gidda, S. K., Sanford, C., Parkinson, J., Mullen, R. T., Goring, D. R. (2010). Characterization of the *Arabidopsis thaliana* exocyst complex gene families by phylogenetic, expression profiling, and subcellular localization studies. *New Phytologist*, 185(2), 401-419.

Clemens, S. (2001). Developing tools for phytoremediation: towards a molecular understanding of plant metal tolerance and accumulation. *Int J Occup Med Environ Health*, 14, 235-239.

Clemens, S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212(4), 475-486.

Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms

- of tolerance in plants. *Biochimie*, 88(11), 1707-1719.
- Clemente, R., Walker, D. J., Bernal, M. P. (2005). Uptake of heavy metals and As by *Brassica juncea* grown in a contaminated soil in Aznalcóllar (Spain): the effect of soil amendments. *Environmental pollution*, 138(1), 46-58.
- Cobbett, C. S. (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant physiology*, 123(3), 825-832.
- Considine, M. J., Foyer, C. H. (2021). Oxygen and reactive oxygen species-dependent regulation of plant growth and development. *Plant Physiology*, 186(1), 79-92.
- Curie, C., Alonso, J. M., JEAN, M. L., Ecker, J. R., Briat, J. F. (2000). Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochemical Journal*, 347(3), 749-755.
- Cuypers, A., Vanbuel, I., Iven, V., Kunnen, K., Vandionant, S., Huybrechts, M., Hendrix, S. (2023). Cadmium-induced oxidative stress responses and acclimation in plants require fine-tuning of redox biology at subcellular level. *Free Radical Biology and Medicine*, 199, 81-96.
- Çelik, Ö., Akdaş, E. Y. (2019). Tissue-specific transcriptional regulation of seven heavy metal stress-responsive miRNAs and their putative targets in nickel indicator castor bean (*R. communis* L.) plants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 170, 682-690.
- da Conceicao Gomes, M. A., Hauser-Davis, R. A., Suzuki, M. S., Vitoria, A. P. (2017). Plant chromium uptake and transport, physiological effects and recent advances in molecular investigations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 140, 55-64.
- Dai, X., Zhuang, Z., Zhao, P. X. (2018). psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic acids research*, 46(W1), W49-W54.
- DalCorso, G., Farinati, S., Maistri, S., Furini, A. (2008). How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. *Journal of integrative plant biology*, 50(10), 1268-1280.
- DalCorso, G. (2012). Heavy metal toxicity in plants. *Plants and heavy metals*, 1-25.
- DalCorso, G., Manara, A., Furini, A. (2013). An overview of heavy metal challenge in plants: from roots to shoots. *Metallomics*, 5(9), 1117-1132.
- DalCorso, G., Manara, A., Piasentin, S., Furini, A. (2014). Nutrient metal elements in plants. *Metallomics*, 6(10), 1770-1788.
- DalCorso, G., Fasani, E., Manara, A., Visioli, G., Furini, A. (2019). Heavy metal pollutions: state of the art and innovation in phytoremediation. *International journal of molecular sciences*, 20(14), 3412.

- Dalvi, A. A., Bhalerao, S. A. (2013). Response of plants towards heavy metal toxicity: an overview of avoidance, tolerance and uptake mechanism. *Ann Plant Sci*, 2(9), 362-368.
- Das, K., Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in environmental science*, 2, 53.
- Das, S., Sen, M., Saha, C., Chakraborty, D., Das, A., Banerjee, M., Seal, A. (2011). Isolation and expression analysis of partial sequences of heavy metal transporters from *Brassica juncea* by coupling high throughput cloning with a molecular fingerprinting technique. *Planta*, 234, 139–156.
- Dechamps, C., Roosens, N. H., Hotte, C., Meerts, P. (2005). Growth and mineral element composition in two ecotypes of *Thlaspi caerulescens* on Cd contaminated soil. *Plant and soil*, 273, 327-335.
- De Vos, C. R., Vonk, M. J., Vooijs, R., Schat, H. (1992). Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant physiology*, 98(3), 853-858.
- di Toppi, L. S., Fossati, F., Musetti, R., Mikerezi, I., Favali, M. A. (2002). Effects of hexavalent chromium on maize, tomato, and cauliflower plants.
- Ding, Y. F., Zhu, C. (2009). The role of microRNAs in copper and cadmium homeostasis. *Biochemical and biophysical research communications*, 386(1), 6-10.
- Ding, Y., Ding, L., Xia, Y., Wang, F., Zhu, C. (2020). Emerging roles of microRNAs in plant heavy metal tolerance and homeostasis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(7), 1958-1965.
- Doğru, A., Altundağ, H., Dündar, Ş. (2021). Bitkilerde Ağır Metal Hiperakümüülasyonu ve Fitoremediasyon. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2(2), 32-55.
- Domínguez-Solís, J. R., López-Martín, M. C., Ager, F. J., Ynsa, M. D., Romero, L. C., Gotor, C. (2004). Increased cysteine availability is essential for cadmium tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology Journal*, 2(6), 469-476.
- Dong, Q., Hu, B., Zhang, C. (2022). microRNAs and their roles in plant development. *Frontiers in plant science*, 13, 824240.
- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in plant science*, 15(10), 573-581.
- Dubey, S., Shri, M., Gupta, A., Rani, V., Chakrabarty, D. (2018). Toxicity and detoxification of heavy metals during plant growth and metabolism. *Environmental*

Chemistry Letters, 16, 1169-1192.

- Dubey, S., Shri, M., Misra, P., Lakhwani, D., Bag, S. K., Asif, M. H., ... Chakrabarty, D. (2014). Heavy metals induce oxidative stress and genome-wide modulation in transcriptome of rice root. *Functional and integrative genomics*, 14, 401-417.
- Dumanović, J., Nepovimova, E., Natić, M., Kuča, K., Jaćević, V. (2021). The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: A concise overview. *Frontiers in plant science*, 11, 552969.
- Duruibe, J. O., Ogwuegbu, M. O. C., Egwurugwu, J. N. (2007). Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of physical sciences*, 2(5), 112-118.
- Dutta, S., Mitra, M., Agarwal, P., Mahapatra, K., De, S., Sett, U., Roy, S. (2018). Oxidative and genotoxic damages in plants in response to heavy metal stress and maintenance of genome stability. *Plant signaling and behavior*, 13(8), e1460048.
- Duquene, L., Vandenhove, H., Tack, F., Meers, E., Baeten, J., Wannijn, J., (2009). Enhanced phytoextraction of uranium and selected heavy metals by Indian mustard and ryegrass using biodegradable soil amendments. *Sci. Total Environ.*, 407, 1496–1505.
- Egan, A. N., Schlueter, J., Spooner, D. M. (2012). Applications of next-generation sequencing in plant biology. *American journal of botany*, 99(2), 175-185.
- Eleftheriou, E. P., Adamakis, I. D. S., Panteris, E., Fatsiou, M. (2015). Chromium-induced ultrastructural changes and oxidative stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. *International journal of molecular sciences*, 16(7), 15852-15871.
- El-Sappah, A. H., Abbas, M., Rather, S. A., Wani, S. H., Soaud, N., Noor, Z., ... Li, J. (2023). Genome-wide identification and expression analysis of metal tolerance protein (MTP) gene family in soybean (*Glycine max*) under heavy metal stress. *Molecular Biology Reports*, 50(4), 2975-2990.
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., Xie, Y. (2015). Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *The scientific world journal*, 2015(1), 756120.
- Eng, B. H., Guerinot, M. L., Eide, D., Saier, M. H. (1998). Sequence analyses and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport proteins. *The Journal of membrane biology*, 166, 1-7.
- Eren, E., Arguello, J. M. (2004). *Arabidopsis* HMA2, a divalent heavy metal-transporting PIB-type ATPase, is involved in cytoplasmic Zn²⁺ homeostasis. *Plant Physiology*, 136(3), 3712-3723.
- Ernst, W. H. O., Verkleij, J. A. C., Schat, H. (1992). Metal tolerance in plants. *Acta*

- botanica neerlandica*, 41(3), 229-248.
- Ernst, W. (1996). Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. *App. Geochem.* 11, 163–167.
- Escobar-Sepúlveda, H. F., Trejo-Téllez, L. I., Pérez-Rodríguez, P., Hidalgo-Contreras, J. V., Gómez-Merino, F. C. (2017). Diacylglycerol kinases are widespread in higher plants and display inducible gene expression in response to beneficial elements, metal, and metalloid ions. *Frontiers in Plant Science*, 8, 129.
- Fageria, N. K. (2012). Role of soil organic matter in maintaining sustainability of cropping systems. *Communications in soil science and plant analysis*, 43(16), 2063-2113.
- Faizan, M., Alam, P., Hussain, A., Karabulut, F., Tonny, S. H., Cheng, S. H., ..., Hayat, S. (2024). Phytochelatins: A key regulator against heavy metal toxicity in plants. *Plant Stress*, 100355.
- Fan, S. K., Fang, X. Z., Guan, M. Y., Ye, Y. Q., Lin, X. Y., Du, S. T., Jin, C. W. (2014). Exogenous abscisic acid application decreases cadmium accumulation in Arabidopsis plants, which is associated with the inhibition of IRT1-mediated cadmium uptake. *Frontiers in plant science*, 5, 721.
- Farhangi-Abriz, S., Ghassemi-Golezani, K. (2023). Improving electrochemical characteristics of plant roots by biochar is an efficient mechanism in increasing cations uptake by plants. *Chemosphere*, 313, 137365.
- Farooq, M. A., Niazi, A. K., Akhtar, J., Farooq, M., Souri, Z., Karimi, N., Rengel, Z. (2019). Acquiring control: The evolution of ROS-Induced oxidative stress and redox signaling pathways in plant stress responses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 141, 353-369.
- Feigl, G., Kumar, D., Lehotai, N., Tugyi, N., Molnár, Á., Ördög, A., ... Kolbert, Z. (2013). Physiological and morphological responses of the root system of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.) and rapeseed (*Brassica napus* L.) to copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 94, 179-189.
- Feng, Y., Cui, R., Huang, Y., Shi, L., Wang, S., Xu, F. (2021). Repression of transcription factor AtWRKY47 confers tolerance to boron toxicity in Arabidopsis thaliana. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 220, 112406.
- Fornes, F., García-de-la-Fuente, R., Belda, R. M., Abad, M. (2009). ‘Alperujo’ compost amendment of contaminated calcareous and acidic soils: effects on growth and trace element uptake by five Brassica species. *Bioresource technology*, 100(17), 3982-3990.
- Fox, T. C., Guerinot, M. L. (1998). Molecular biology of cation transport in plants. *Annual review of plant biology*, 49(1), 669-696.

- Franić, M., Galić, V. (2019). As, Cd, Cr, Cu, Hg: Physiological implications and toxicity in plants. *Plant Metallomics and Functional Omics: A System-Wide Perspective*, 209-251.
- Fu, Y., Mason, A. S., Zhang, Y., Lin, B., Xiao, M., Fu, D., Yu, H. (2019). MicroRNA-mRNA expression profiles and their potential role in cadmium stress response in *Brassica napus*. *BMC plant biology*, 19, 1-20.
- Gardea-Torresdey, J., Peralta-Videa, J., Montes, M., De la Rosa, G., Corral-Diaz, B. (2004). Bioaccumulation of cadmium, chromium and copper by *Convolvulus arvensis* L.: impact on plant growth and uptake of nutritional elements. *Bioresource Technology*, 92, 229-235.
- Gardea-Torresdey, J. L., De la Rosa, G., Peralta-Videa, J. R., Montes, M., Cruz-Jimenez, G., Cano-Aguilera, I. (2005). Differential uptake and transport of trivalent and hexavalent chromium by tumbleweed (*Salsola kali*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48, 225-232.
- Gao, Y., Feng, B., Gao, C., Zhang, H., Wen, F., Tao, L., ... Xiong, J. (2022). The evolution and functional roles of miR408 and its targets in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 530.
- Ghori, N. H., Ghori, T., Hayat, M. Q., Imadi, S. R., Gul, A., Altay, V., Ozturk, M. (2019). Heavy metal stress and responses in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16, 1807-1828.
- Gill, S. S., Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Gill, S. S., Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Macovei, A., Tuteja, N. (2013). Importance of nitric oxide in cadmium stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 63, 254-261.
- Gill, S. S., Anjum, N. A., Gill, R., Yadav, S., Hasanuzzaman, M., Fujita, M., ... Tuteja, N. (2015). Superoxide dismutase—mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environmental science and pollution research*, 22, 10375-10394.
- Ghori, Z., Iftikhar, H., Bhatti, M. F., Sharma, I., Kazi, A. G., Ahmad, P. (2016). Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soil. In *Plant metal interaction*, 385-409s. Elsevier.
- Ghori, N. H., Ghori, T., Hayat, M. Q., Imadi, S. R., Gul, A., Altay, V., Ozturk, M. (2019). Heavy metal stress and responses in plants. *International journal of environmental science and technology*, 16, 1807-1828.
- Ghosh, S., Bheri, M., Bisht, D., Pandey, G. K. (2022). Calcium signaling and transport machinery: Potential for development of stress tolerance in plants. *Current Plant*

Biology, 29, 100235.

- Gohre, V., Paszkowski, U. (2006). Contribution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis to heavy metal phytoremediation. *Planta*, 223, 1115–1122.
- Goswami, S., Das, S. (2015). A study on cadmium phytoremediation potential of Indian mustard, *Brassica juncea*. *International journal of phytoremediation*, 17(6), 583-588.
- Grennan, A. K. (2011). Metallothioneins, a diverse protein family. *Plant Physiology*, 155(4), 1750-1751.
- Greipsson, S. (2011). Phytoremediation. *Nature Education Knowledge* 3 (10): 7 <http://www.nature.com/scitable/knowledge/library/phytoremediation-...> 1 of 5 1/1/2015 11: 41 PM. *Figure*, 2, 2.
- Guo, W. J., Bundithya, W., Goldsbrough, P. B. (2003). Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytologist*, 369-381.
- Guo, H. S., Xie, Q., Fei, J. F., Chua, N. H. (2005). MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for *Arabidopsis* lateral root development. *Plant Cell*, 17, 1376–1386.
- Gupta, D. K., Chatterjee, S. (2017). Arsenic contamination in the environment: the issues and solutions. Springer.
- Gupta, N., Ram, H., Kumar, B. (2016). Mechanism of Zinc absorption in plants: uptake, transport, translocation and accumulation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 15, 89-109.
- Gupta, D. K., Pena, L. B., Romero-Puertas, M. C., Hernández, A., Inouhe, M., Sandalio, L. M. (2017). NADPH oxidases differentially regulate ROS metabolism and nutrient uptake under cadmium toxicity. *Plant, cell and environment*, 40(4), 509-526.
- Gupta, S. D. (2010). Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants* (pp. 193-220). CRC Press.
- Gupta, D. K., Vandenhove, H., Inouhe, M. (2013). *Role of phytochelatins in heavy metal stress and detoxification mechanisms in plants*, 73-94s. Springer Berlin Heidelberg.
- Gupta, O. P., Sharma, P., Gupta, R. K., Sharma, I. (2014). MicroRNA mediated regulation of metal toxicity in plants: present status and future perspectives. *Plant molecular biology*, 84(1), 1-18.
- Gupta, N., Debnath, S., Sharma, S., Sharma, P., Purohit, J. (2017). Role of nutrients in controlling the plant diseases in sustainable agriculture. *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture: Volume 2: Applications in Crop Production*

and Protection, 217-262.

- Gustin, J. L., Zanis, M. J., Salt, D. E. (2011). Structure and evolution of the plant cation diffusion facilitator family of ion transporters. *BMC evolutionary biology*, 11, 1-13.
- Hall, J. Á., Williams, L. E. (2003). Transition metal transporters in plants. *Journal of experimental botany*, 54(393), 2601-2613.
- Hasan, S. A., Fariduddin, Q., Ali, B., Hayat, S., Ahmad, A. (2009). Cadmium: toxicity and tolerance in plants. *J. Environ Biol.*, 30(2), 165-174.
- Hawkes, J.S. (1997). Heavy metals. *J. Chem. Edu.* 74,1369–1374.
- He, L., Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews genetics*, 5(7), 522-531.
- Holmgren, A. (1995). Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure* 3, 239–243.
- Hossain, M. A., Piyatida, P., da Silva, J. A. T., Fujita, M. (2012). Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Journal of botany*, 2012(1), 872875.
- Hossain, Z., Komatsu, S. (2013). Contribution of proteomic studies towards understanding plant heavy metal stress response. *Frontiers in Plant Science*, 3, 310.
- Hooda, V. (2007). Phytoremediation of toxic metals from soil and waste water. *Journal of Environmental Biology*, 28(2), 367.
- Hou, J., Liu, G. N., Xue, W., Fu, W. J., Liang, B. C., Liu, X. H. (2014). Seed germination, root elongation, root-tip mitosis, and micronucleus induction of five crop plants exposed to chromium in fluvo-aquic soil. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(3), 671-676.
- Hu, C. H., Wang, P. Q., Zhang, P. P., Nie, X. M., Li, B. B., Tai, L., ... Chen, K. M. (2020). NADPH oxidases: The vital performers and center hubs during plant growth and signaling. *Cells*, 9(2), 437.
- Huang, T. L., Nguyen, Q. T. T., Fu, S. F., Lin, C. Y., Chen, Y. C., Huang, H. J. (2012). Transcriptomic changes and signalling pathways induced by arsenic stress in rice roots. *Plant molecular biology*, 80, 587-608.
- Huang, B., Xu, C. (2008). Identification and characterization of proteins associated with plant tolerance to heat stress. *Journal of integrative plant biology*, 50(10), 1230-1237.
- Huang, S. C., Lu, G. H., Tang, C. Y., Ji, Y. J., Tan, G. S., Hu, D. Q., ... Yang, Y. H. (2018). Identification and comparative analysis of aluminum-induced microRNAs

- conferring plant tolerance to aluminum stress in soybean. *Biologia Plantarum*, 62(1), 97-108.
- Huang, S., Zhou, J., Gao, L., Tang, Y. (2021). Plant miR397 and its functions. *Funct Plant Biol.* 48 (4), 361–370.
- Huang, S. Q., Xiang, A. L., Che, L. L., Chen, S., Li, H., Song, J. B., Yang, Z. M. (2010). A set of miRNAs from *Brassica napus* in response to sulphate deficiency and cadmium stress. *Plant Biotechnology Journal*, 8(8), 887-899.
- Hutton, M., Symon, C. (1986). *Sci. Total Environ.*, 57, 129-150.
- Huysen, T. V., Terry, N., Pilon-Smits, E. A. H. (2004). Exploring the selenium phytoremediation potential of transgenic Indian mustard overexpressing ATP sulfurylase or cystathionine- γ -synthase. *International Journal of Phytoremediation*, 6(2), 111-118.
- Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., ... Mapk Group. (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in plant science*, 7(7), 301-308.
- Islam, E., Khan, M. T., Irem, S. (2015). Biochemical mechanisms of signaling: perspectives in plants under arsenic stress. *Ecotoxicology and environmental safety*, 114, 126-133.
- Iqbal, M., Ahmad, A., Ansari, M. K. A., Qureshi, M. I., Aref, I. M., Khan, P. R., ... Hakeem, K. R. (2015). Improving the phytoextraction capacity of plants to scavenge metal(loid)-contaminated sites. *Environmental Reviews*, 23(1), 44-65.
- Jabeen, R., Ahmad, A., Iqbal, M. (2009). Phytoremediation of heavy metals: physiological and molecular mechanisms. *The Botanical Review*, 75, 339-364.
- Jagadeeswaran, G., Li, Y. F., Sunkar, R. (2014). Redox signaling mediates the expression of a sulfate-deprivation-inducible micro RNA 395 in *A. rabidopsis*. *The Plant Journal*, 77(1), 85-96.
- Jain, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for gene expression profiling in plants. *Briefings in functional genomics*, 11(1), 63-70.
- Jamla, M., Patil, S., Joshi, S., Khare, T., Kumar, V. (2021). MicroRNAs and their exploration for developing heavy metal-tolerant plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-17.
- Jan, S., Parray, J. A. (2016). *Approaches to heavy metal tolerance in plants*, 1-18s, Singapore: Springer
- Jan, S., Parray, J. A., Jan, S., Parray, J. A. (2016). Heavy metal uptake in plants. *Approaches to Heavy Metal Tolerance in Plants*, 1-18.

- Jeelani, N., Yang, W., Zhu, H. L., An, S. (2020). Phytoremediation for co-contaminated soils of cadmium and pyrene using *Phragmites australis* (common reed). *International Journal of Phytoremediation*, 22(13), 1385-1395.
- Jian, H., Yang, B. O., Zhang, A., Ma, J., Ding, Y., Chen, Z., ... Liu, L. (2018). Genome-wide identification of microRNAs in response to cadmium stress in oilseed rape (*Brassica napus* L.) using high-throughput sequencing. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 1431.
- Jiang, W., Liu, D.M., Hou, W. (2000). Hyperaccumulation of Lead by Roots, Hypocotyls, and Shoots of *Brassica juncea*. *Biol. Plant.*, 43, 603–606.
- Jogawat, A., Yadav, B., Chhaya, Narayan, O. P. (2021). Metal transporters in organelles and their roles in heavy metal transportation and sequestration mechanisms in plants. *Physiologia plantarum*, 173(1), 259-275.
- Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular cell*, 14(6), 787-799.
- Joshi, R., Dkhar, J., Singla-Pareek, S. L., Pareek, A. (2019). Molecular mechanism and signaling response of heavy metal stress tolerance in plants. *Plant-metal interactions*, 29-47.
- Jun, R., Ling, T., Guanghua, Z. (2009). Effects of Chromium on seed germination, root elongation and coleoptile growth in six pulses. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 6(4), 571-578.
- Kabata-Pendias, A., Mukherjee, A.B. (2007). Trace elements from soil to humans. Springer, Heidelberg, 561s.
- Kapoor, D., Sharma, R., Handa, N., Kaur, H., Rattan, A., Yadav, P., ... Bhardwaj, R. (2015). Redox homeostasis in plants under abiotic stress: role of electron carriers, energy metabolism mediators and proteinaceous thiols. *Frontiers in Environmental Science*, 3, 13.
- Karuppanapandian, T., Moon, J. C., Kim, C., Manoharan, K., Kim, W. (2011). Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*, 5(6), 709-725.
- Kärkönen, A., Kuchitsu, K. (2015). Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants. *Phytochemistry*, 112, 22-32.
- Kayihan, C., Öz, M.T., Eyidoğan, F., Yücel, M., Öktem, H.A. (2017). Physiological, Biochemical, and Transcriptomic Responses to Boron Toxicity in Leaf and Root Tissues of Contrasting Wheat Cultivars. *Plant Mol. Biol. Report.*, 35, 97–109.

- Keinänen, S. I., Hassinen, V. H., Kärenlampi, S. O., Tervahauta, A. I. (2007). Isolation of genes up-regulated by copper in a copper-tolerant birch (*Betula pendula*) clone. *Tree Physiology*, 27(9), 1243-1252.
- Keunen, E., Remans, T., Bohler, S., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2011). Metal-induced oxidative stress and plant mitochondria. *International journal of molecular sciences*, 12(10), 6894-6918.
- Khafi, A. S., Iranbakhsh, A., Safipour Afshar, A., Khavari Nejad, R. A. (2020). RBOH expression and ROS metabolism in *Citrullus colocynthis* under cadmium stress. *Brazilian Journal of Botany*, 43, 35-43.
- Khraiweh, B., Zhu, J. K., Zhu, J. (2012). Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 137-148.
- Kikuchi, K., Ueguchi-Tanaka, M., Yoshida, K.T., Nagato, Y., Matsusoka, M., Hirano, H.Y. (2000). Molecular analysis of the NAC gene family in rice. *Mol. Gen. Genet.*, 262, 1047-1051.
- Kochian, L. V. (1991). Mechanisms of micronutrient uptake and translocation in plants. *Micronutrients in agriculture*, 4, 229-296.
- Kolaj-Robin, O., Russell, D., Hayes, K. A., Pembroke, J. T., Soulimane, T. (2015). Cation diffusion facilitator family: structure and function. *FEBS letters*, 589(12), 1283-1295.
- Kolde, R. (2019). pheatmap: Pretty Heatmaps. R package version 1.0.12.
- Komal, T., Mustafa, M., Ali, Z., Kazi, A. G. (2015). Heavy metal uptake and transport in plants. *Heavy metal contamination of soils: Monitoring and remediation*, 181-194.
- Ku, Y. S., Cheng, S. S., Ng, M. S., Chung, G., Lam, H. M. (2022). The tiny companion matters: the important role of protons in active transports in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2824.
- Kue Foka, I. C., Ketehouli, T., Zhou, Y., Li, X. W., Wang, F. W., Li, H. (2020). The emerging roles of diacylglycerol kinase (DGK) in plant stress tolerance, growth, and development. *Agronomy*, 10(9), 1375.
- Kumar, A., Prasad, M. N. V. (2018). Plant-lead interactions: transport, toxicity, tolerance, and detoxification mechanisms. *Ecotoxicology and environmental safety*, 166, 401-418.
- Kumar, R. (2014). Role of microRNAs in biotic and abiotic stress responses in crop plants. *Applied biochemistry and biotechnology*, 174, 93-115.
- Kumar, P. N., Dushenkov, V., Motto, H., Raskin, I. (1995). Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental science and*

technology, 29(5), 1232-1238.

- Kumar, V., Khare, T., Shriram, V., Wani, S. H. (2018). Plant small RNAs: the essential epigenetic regulators of gene expression for salt-stress responses and tolerance. *Plant Cell Reports*, 37, 61-75.
- Kumar, S., Verma, S., Trivedi, P. K. (2017). Involvement of small RNAs in phosphorus and sulfur sensing, signaling and stress: current update. *Frontiers in plant science*, 8, 285.
- Kumar, S., Kumar, S., Mohapatra, T. (2021). Interaction between macro-and micro-nutrients in plants. *Frontiers in Plant Science*, 12, 665583.
- Kumar, K., Shinde, A., Aeron, V., Verma, A., Arif, N. S. (2023). Genetic engineering of plants for phytoremediation: advances and challenges. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 32(1), 12-30.
- Lasat, M.M. 2002. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *J. Environ. Qual.*, 31: 109–120.
- Laspina, N. V., Groppa, M. D., Tomaro, M. L., Benavides, M. P. (2005). Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. *Plant science*, 169(2), 323-330.
- Lee, S., Kim, Y. Y., Lee, Y., An, G. (2007). Rice P1B-type heavy-metal ATPase, OsHMA9, is a metal efflux protein. *Plant Physiology*, 145(3), 831-842.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843-854.
- Lenntech, W. (2004). Water Treatment and Air Purification, 54 s. Rotterdam: Lenntech.
- Levine, A. (2002). Regulation of stress responses by intracellular vesicle trafficking?. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6-8), 531-535.
- Li, S., Zhou, X., Huang, Y., Zhu, L., Zhang, S., Zhao, Y., ..., Chen, R. (2013). Identification and characterization of the zinc-regulated transporters, iron-regulated transporter-like protein (ZIP) gene family in maize. *BMC Plant Biology*, 13, 1-14.
- Li, D., Wu, D., Li, S., Dai, Y., & Cao, Y. (2019). Evolutionary and functional analysis of the plant-specific NADPH oxidase gene family in *Brassica rapa* L. *Royal Society Open Science*, 6(2), 181727.
- Li, X., Yang, Y., Jia, L., Chen, H., Wei, X. (2013). Zinc-induced oxidative damage, antioxidant enzyme response and proline metabolism in roots and leaves of wheat plants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 89, 150-157.

- Li, S., Han, X., Lu, Z., Qiu, W., Yu, M., Li, H., ... Zhuo, R. (2022). MAPK cascades and transcriptional factors: regulation of heavy metal tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4463.
- Li, J., Wang, Y., Zheng, L., Li, Y., Zhou, X., Li, J., ... Zhang, W. (2019). The intracellular transporter AtNRAMP6 is involved in Fe homeostasis in Arabidopsis. *Frontiers in plant science*, 10, 1124.
- Li, F. T., Qi, J. M., Zhang, G. Y., Lin, L. H., Fang, P. P., Tao, A. F., Xu, J. T. (2013). Effect of cadmium stress on the growth, antioxidative enzymes and lipid peroxidation in two kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) plant seedlings. *Journal of Integrative Agriculture*, 12(4), 610-620.
- Li, P., Liu, J. (2021). Protein phosphorylation in plant cell signaling. *Plant Phosphoproteomics: Methods and Protocols*, 45-71.
- Liang, G., Yang, F., Yu, D. (2010). MicroRNA395 mediates regulation of sulfate accumulation and allocation in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 62(6), 1046-1057
- Liang, M., Haroldsen, V., Cai, X., Wu, Y. (2006). Expression of a putative laccase gene, ZmLAC1, in maize primary roots under stress. *Plant Cell Environ.*, 29 (5), 746–753.
- Liu, W. W., Meng, J., Cui, J., Luan, Y. S. (2017). Characterization and function of microRNA* s in plants. *Frontiers in plant science*, 8, 2200.
- Liu, J., Li, Y., Wang, W., Gai, J., Li, Y. (2016). Genome-wide analysis of MATE transporters and expression patterns of a subgroup of MATE genes in response to aluminum toxicity in soybean. *BMC genomics*, 17, 1-15.
- Liu, Q., Zhang, H. (2012). Molecular identification and analysis of arsenite stress-responsive miRNAs in rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(26), 6524-6536.
- Liu, W., Xu, L., Wang, Y., Shen, H., Zhu, X., Zhang, K., ... Liu, L. (2015). Transcriptome-wide analysis of chromium-stress responsive microRNAs to explore miRNA-mediated regulatory networks in radish (*Raphanus sativus* L.). *Scientific reports*, 5(1), 14024.
- Liu, Q., Luo, L., Wang, X., Shen, Z., Zheng, L., 2017. Comprehensive Analysis of Rice Laccase Gene (OsLAC) Family and Ectopic Expression of OsLAC10 Enhances Tolerance to Copper Stress in Arabidopsis. *Int J Mol Sci* 18 (2). <https://doi.org/10.3390/ijms18020209>.
- Liu, Y., Liu, S., Deng, Y., You, C., Zhang, W., Zhou, J., Chen, X., Gao, L., Tang, Y. (2020b). Genome-wide mRNA and small RNA transcriptome profiles uncover cultivar- and tissue-specific changes induced by cadmium in *Brassica parachinensis*. *Environmental and Experimental Botany*, 180, 104207.

- Liu, J., Ding, G., Gai, Z., Zhang, W., Han, Y., Li, W. (2020). Changes in the gene expression profile of *Arabidopsis thaliana* under chromium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 193, 110302.
- López-Luna, J., Silva-Silva, M. J., Martínez-Vargas, S., Mijangos-Ricardez, O. F., González-Chávez, M. C., Solís-Domínguez, F. A., Cuevas-Díaz, M. C. (2016). Magnetite nanoparticle (NP) uptake by wheat plants and its effect on cadmium and chromium toxicological behavior. *Science of the Total Environment*, 565, 941-950.
- Love, M. I., Huber, W., Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15(12), 1-21.
- Lubkowitz, M. (2006). The OPT family functions in long-distance peptide and metal transport in plants. *Genetic Engineering: Principles and Methods*, 35-55.
- Lubkowitz, M. (2011). The oligopeptide transporters: a small gene family with a diverse group of substrates and functions?. *Molecular Plant*, 4(3), 407-415.
- Lv, S., Nie, X., Wang, L., Du, X., Biradar, S. S., Jia, X., Weining, S. (2012). Identification and characterization of microRNAs from barley (*Hordeum vulgare* L.) by high-throughput sequencing. *International journal of molecular sciences*, 13(3), 2973-2984.
- Ma, X., Tang, Z., Qin, J., Meng, Y. (2015). The use of high-throughput sequencing methods for plant microRNA research. *RNA Biology*, 12(7), 709-719.
- Macnair, M. R. (1993). The genetics of metal tolerance in vascular plants. *New phytologist*, 124(4), 541-559.
- Malar, S., Shivendra Vikram, S., JC Favas, P., Perumal, V. (2016). Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)]. *Botanical studies*, 55, 1-11.
- Mallory, A. C., Vaucheret, H. (2006). Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nature genetics*, 38(6), 31-36s.
- Małecka, A., Konkolewska, A., Hanć, A., Ciszewska, L., Staszak, A. M., Jarmuszkiewicz, W., Ratajczak, E. (2021). Activation of antioxidative and detoxificative systems in *Brassica juncea* L. plants against the toxicity of heavy metals. *Scientific Reports*, 11(1), 22345.
- Manara, A. (2012). Plant responses to heavy metal toxicity. *Plants and heavy metals*, 27-53.
- Mani, D., Kumar, C. (2014). Biotechnological advances in bioremediation of heavy metals contaminated ecosystems: an overview with special reference to phytoremediation. *International journal of environmental science and*

technology, 11, 843-872.

- Martinez, G., Forment, J., Llave, C., Pallas, V., Gomez, G. (2011). High-throughput sequencing, characterization and detection of new and conserved cucumber miRNAs. *PloS one*, 6(5), e19523.
- Martinoia, E., Massonneau, A., Frangne, N. (2000). Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants. *Plant and Cell Physiology*, 41(11), 1175-1186.
- Martinoia, E., Maeshima, M., Neuhaus, H. E. (2007). Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *Journal of experimental botany*, 58(1), 83-102.
- Masindi, V., Muedi, K. L. (2018). Environmental contamination by heavy metals. *Heavy metals*, 10(4), 115-133.
- Masindi, V., Mkhonza, P., Tekere, M. (2021). Sources of heavy metals pollution. *Remediation of Heavy Metals*, 419-454.
- Massoura, S. T., Echevarria, G., Leclerc-Cessac, E., Morel, J. L. (2004). Response of excluder, indicator, and hyperaccumulator plants to nickel availability in soils. *Soil Research*, 42(8), 933-938.
- Mathur, P., Tripathi, D. K., Baluška, F., Mukherjee, S. (2022). Auxin-mediated molecular mechanisms of heavy metal and metalloid stress regulation in plants. *Environmental and Experimental Botany*, 196, 104796.
- Mathur, S., Kalaji, H. M., Jajoo, A. (2016). Investigation of deleterious effects of chromium phytotoxicity and photosynthesis in wheat plant. *Photosynthetica*, 54(2), 185-192.
- Mazzucotelli, E., Mastrangelo, A. M., Crosatti, C., Guerra, D., Stanca, A. M., Cattivelli, L. (2008). Abiotic stress response in plants: when post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. *Plant Science*, 174(4), 420-431.
- Mbangi, A., Muchaonyerwa, P., Zengeni, R. (2018). Accumulation of multiple heavy metals in plants grown on soil treated with sewage sludge for more than 50 years presents health risks and an opportunity for phyto-remediation. *Water SA*, 44(4), 569-576.
- McGrath, S. P., Zhao, F. J. (2003). Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. *Current opinion in biotechnology*, 14(3), 277-282.
- McMahon, H. T., Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(8), 517-533.
- Mei B., Puryear J.D., Newton R.J. (2002). Assessment of Cr tolerance and accumulation in selected plants species. *Plant Soil*, 247, 223-231.

- Memon, A. R., Aktopraklıgil, D., Özdemir, A., Vertii, A. (2001). Heavy metal accumulation and detoxification mechanisms in plants. *Turkish Journal of Botany*, 25(3), 111-121.
- Memon, A. R. (2016). Metal hyperaccumulators: mechanisms of hyperaccumulation and metal tolerance. *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants*, 3, 239-268.
- Memon, A. R., Schröder, P. (2009). Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 16, 162-175.
- Mendoza-Soto, A. B., Sánchez, F., Hernández, G. (2012). MicroRNAs as regulators in plant metal toxicity response. *Frontiers in Plant Science*, 3, 105.
- Meraklı, N., Bulduk, İ., Memon, A. (2022). Identification of genes regulated in response to Cu exposure in *Brassica nigra* L. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 23(1), 15-27.
- Meraklı, N., Memon, A. (2023a). Expression of heavy metal ATPases (HMA1 and HMA3) in *Brassica nigra* and *B. juncea* grown at different Cu levels. *Botanica Serbica*, 47(2), 309-316.
- Meraklı, N., Memon, A. (2023b). Gene Expression of Metal Transporting P-Type ATPases HMA2 and HMA4 in *Brassica juncea* L. Grown at Different Zn Levels. *Russian Journal of Plant Physiology*, 70(3), 34.
- Meers, E., Qadir, M., De Caritat, P., Tack, F. M. G., Du Laing, G., Zia, M. H. (2009). EDTA-assisted Pb phytoextraction. *Chemosphere*, 74(10), 1279-1291.
- Meng, J. G., Zhang, X. D., Tan, S. K., Zhao, K. X., Yang, Z. M. (2017). Genome-wide identification of Cd-responsive NRAMP transporter genes and analyzing expression of NRAMP 1 mediated by miR167 in *Brassica napus*. *Biometals*, 30, 917-931.
- Meng, X., Zhang, S. (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual review of phytopathology*, 51(1), 245-266.
- Meyers, D. E., Auchterlonie, G. J., Webb, R. I., Wood, B. (2008). Uptake and localisation of lead in the root system of *Brassica juncea*. *Environmental Pollution*, 153(2), 323-332.
- Mhalappa, N. J., Kulkarni M., Puranik, P. (2013). *Trends Bio Res*, 2, 1-19.
- Michlewski, G., Cáceres, J. F. (2019). Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA*, 25(1), 1-16.
- Miedes, E., Vanholme, R., Boerjan, W., Molina, A. (2014). The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Frontiers in plant science*, 5, 358.

- Min Yang, Z., Chen, J. (2013). A potential role of microRNAs in plant response to metal toxicity. *Metallomics*, 5(9), 1184-1190.
- Mishra, P., Sharma, P. (2019). Superoxide Dismutases (SODs) and their role in regulating abiotic stress induced oxidative stress in plants. *Reactive oxygen, nitrogen and sulfur species in plants: production, metabolism, signaling and defense mechanisms*, 53-88.
- Mitra, M., Agarwal, P., Roy, S. (2023). Plant response to heavy metal stress: An insight into the molecular mechanism of transcriptional regulation. In *Plant Transcription Factors*, 337-367s. Academic Press.
- Mittal, U., Kumar, V., Kukreja, S., Singh, B., Pandey, N. K., Goutam, U. (2023). Role of beneficial elements in developing resilience to abiotic and biotic stresses in plants: present status and future prospects. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(6), 3789-3813.
- Mohamed, A. A., Castagna, A., Ranieri, A., di Toppi, L. S. (2012). Cadmium tolerance in Brassica juncea roots and shoots is affected by antioxidant status and phytochelatin biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57, 15-22.
- Montanini, B., Blaudez, D., Jeandroz, S., Sanders, D., Chalot, M. (2007). Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC genomics*, 8, 1-16.
- Moreira, H., Pereira, S. I., Mench, M., Garbisu, C., Kidd, P., Castro, P. M. (2021). Phytomanagement of metal (loid)-contaminated soils: options, efficiency and value. *Frontiers in Environmental Science*, 9, 661423.
- Mourato, M. P., Moreira, I. N., Leitão, I., Pinto, F. R., Sales, J. R., Louro Martins, L. (2015). Effect of heavy metals in plants of the genus Brassica. *International journal of molecular sciences*, 16(8), 17975-17998.
- Nabais, C., Gonçalves, S. C., Freitas, H. (2007). Phytoremediation in Portugal: present and future. *Phytoremediation: Methods and Reviews*, 405-421.
- Nagaharu, U. (1935). Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of B. napus and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany*, 7, 389- 452
- Nadeem, F., Hanif, M. A., Majeed, M. I., Mushtaq, Z. (2018). Role of macronutrients and micronutrients in the growth and development of plants and prevention of deleterious plant diseases-a comprehensive review. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*, 13, 31-52.
- Nakagami, H., Soukupová, H., Schikora, A., Zárský, V., Hirt, H. (2006). A mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(50), 38697-38704.

- Nakashima, K., Takasaki, H., Mizoi, J., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 97-103.
- Napoli, M., Cecchi, S., Grassi, C., Baldi, A., Zanchi, C. A., Orlandini, S. (2019). Phytoextraction of copper from a contaminated soil using arable and vegetable crops. *Chemosphere*, 219, 122-129.
- Nazir, F., Hussain, A., Fariduddin, Q. (2019). Hydrogen peroxide modulate photosynthesis and antioxidant systems in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants under copper stress. *Chemosphere*, 230, 544-558.
- Nazir, F., Fariduddin, Q., Khan, T. A. (2020). Hydrogen peroxide as a signalling molecule in plants and its crosstalk with other plant growth regulators under heavy metal stress. *Chemosphere*, 252, 126486.
- Nelson, P., Kiriakidou, M., Sharma, A., Maniatakis, E., Mourelatos, Z. (2003). The microRNA world: small is mighty. *Trends in biochemical sciences*, 28(10), 534-540.
- Nilova, I. A., Repkina, N. S., Kaznina, N. M. (2023). Influence of Excess Zinc on the Activity of Components of the Antioxidant System in *Brassica juncea* L.(Czern.) and *Sinapis alba* L. Plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 70(5), 96.
- Noctor, G., Reichheld, J. P., Foyer, C. H. (2018). ROS-related redox regulation and signaling in plants. In *Seminars in cell and developmental biology*, 80, 3-12s. Academic Press.
- Noman, A., Sanaullah, T., Khalid, N., Islam, W., Khan, S., Irshad, M. K., Aqeel, M. (2019). Crosstalk between plant miRNA and heavy metal toxicity. *Plant metallomics and functional omics: a system-wide perspective*, 145-168.
- Noman, A., Aqeel, M. (2017). miRNA-based heavy metal homeostasis and plant growth. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 10068-10082.
- Noman, A., Sanaullah, T., Khalid, N., Islam, W., Khan, S., Irshad, M. K., Aqeel, M. (2019). Crosstalk between plant miRNA and heavy metal toxicity. *Plant metallomics and functional omics: a system-wide perspective*, 145-168.
- Nouairi, I., Ben Ammar, W., Ben Youssef, N., Ben Miled, D. D., Ghorbal, M. H., Zarrouk, M. (2009). Antioxidant defense system in leaves of Indian mustard (*Brassica juncea*) and rape (*Brassica napus*) under cadmium stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31, 237-247.
- Nriagu, J.O. (1989). A global Assessment of Natural Sources of Atmospheric Trace Metals, *Nature*. 338, 47-49.

- Oladoye, P. O., Olowe, O. M., Asemoloye, M. D. (2022). Phytoremediation technology and food security impacts of heavy metal contaminated soils: A review of literature. *Chemosphere*, 288, 132555.
- Paez Valencia, J., Goodman, K., Otegui, M. S. (2016). Endocytosis and endosomal trafficking in plants. *Annual review of plant biology*, 67(1), 309-335.
- Page, V., Feller, U. (2015). Heavy metals in crop plants: transport and redistribution processes on the whole plant level. *Agronomy*, 5(3), 447-463.
- Panda, S. K., Choudhury, S. (2005). Chromium stress in plants. *Brazilian journal of plant physiology*, 17, 95-102.
- Panda, S. K., Matsumoto, H. (2010). Changes in antioxidant gene expression and induction of oxidative stress in pea (*Pisum sativum* L.) under Al stress. *Biometals*, 23, 753-762.
- Pandey, R. (2015). Mineral nutrition of plants. *Plant Biology and Biotechnology: Volume I: Plant Diversity, Organization, Function and Improvement*, 499-538.
- Pandey, N. (2018). Role of plant nutrients in plant growth and physiology. *Plant nutrients and abiotic stress tolerance*, 51-93.
- Pandey, A., Khan, M. K., Hamurcu, M., Brestic, M., Topal, A., Gezgin, S. (2022). Insight into the root transcriptome of a boron-tolerant *Triticum zhukovskyi* genotype grown under boron toxicity. *Agronomy*, 12(10), 2421.
- Pandhair, V., Sekhon, B. S. (2006). Reactive oxygen species and antioxidants in plants: an overview. *Journal of plant Biochemistry and Biotechnology*, 15, 71-78.
- Pasricha, S., Mathur, V., Garg, A., Lenka, S., Verma, K., Agarwal, S. (2021). Molecular mechanisms underlying heavy metal uptake, translocation and tolerance in hyperaccumulators-an analysis: Heavy metal tolerance in hyperaccumulators. *Environmental Challenges*, 4, 100197.
- Patel, M., Surti, M., Ashraf, S. A., Adnan, M. (2021). Physiological and molecular responses to heavy metal stresses in plants. *Harsh Environment and Plant Resilience: Molecular and Functional Aspects*, 171-202.
- Patel, P., Yadav, K., Ganapathi, T. R., Penna, S. (2019). Plant miRNAome: cross talk in abiotic stressful times. *Genetic Enhancement of Crops for Tolerance to Abiotic Stress: Mechanisms and Approaches*, I, 25-52.
- Pedas, P., Ytting, C. K., Fuglsang, A. T., Jahn, T. P., Schjoerring, J. K., Husted, S. (2008). Manganese efficiency in barley: identification and characterization of the metal ion transporter HvIRT1. *Plant physiology*, 148(1), 455-466.

- Pegler, J. L., Oultram, J. M. J., Nguyen, D. Q., Grof, C. P. L., Eamens, A. L. (2021). MicroRNA-Mediated Responses to Cadmium Stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plants* 2021, 10, 130.
- Pekker, I., Tel-Or, E., Mittler, R. (2002). Reactive oxygen intermediates and glutathione regulate the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during iron-mediated oxidative stress in bean. *Plant Molecular Biology*, 49, 429-438.
- Peláez, P., Trejo, M. S., Iñiguez, L. P., Estrada-Navarrete, G., Covarrubias, A. A., Reyes, J. L., Sanchez, F. (2012). Identification and characterization of microRNAs in *Phaseolus vulgaris* by high-throughput sequencing. *BMC genomics*, 13, 1-18.
- Peng, X., Wang, Y., He, R., Zhao, M., Shen, S. (2014). Global transcriptomics identification and analysis of transcriptional factors in different tissues of the paper mulberry. *BMC plant biology*, 14, 1-15.
- Pineau, C., Loubet, S., Lefoulon, C., Chalies, C., Fizames, C., Lacombe, B., ... Richard, O. (2012). Natural variation at the FRD3 MATE transporter locus reveals cross-talk between Fe homeostasis and Zn tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ; genetics*, 8(12), e1003120.
- Piotrowska, A., Bajguz, A., Godlewska-Żyłkiewicz, B., Czerpak, R., Kamińska, M. (2009). Jasmonic acid as modulator of lead toxicity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae). *Environmental and Experimental Botany*, 66(3), 507-513.
- Preston, J. C., Hileman, L. C. (2013). Functional evolution in the plant Squamosa-Promoter Binding Protein-Like (SPL) gene family. *Frontiers in plant science*, 4, 80.
- Printz, B., Lutts, S., Hausman, J. F., Sergeant, K. (2016). Copper trafficking in plants and its implication on cell wall dynamics. *Frontiers in plant science*, 7, 601.
- Puranik, S., Sahu, P. P., Srivastava, P. S., Prasad, M. (2012). NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends in plant science*, 17(6), 369-381.
- Rahman, Z., Singh, V. P. (2019). The relative impact of toxic heavy metals (THMs) (arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr)(VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview. *Environmental monitoring and assessment*, 191, 1-21.
- Raj, D., Kumar, A., Maiti, S. K. (2020). Brassica juncea (L.) Czern.(Indian mustard): a putative plant species to facilitate the phytoremediation of mercury contaminated soils. *International Journal of Phytoremediation*, 22(7), 733-744.
- Rana, S. V. S. (2020). Endoplasmic reticulum stress induced by toxic elements—a review of recent developments. *Biological Trace Element Research*, 196(1), 10-19.
- Ranocha, P., Dima, O., Nagy, R., Felten, J., Corratgé-Faillie, C., Novák, O., ... Goffner, D. (2013). Arabidopsis WAT1 is a vacuolar auxin transport facilitator required for

- auxin homoeostasis. *Nature communications*, 4(1), 2625.
- Rascio, N., Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting?. *Plant science*, 180(2), 169-181.
- Raza, A., Hussain, S., Javed, R., Hafeez, M. B., Hasanuzzaman, M. (2021). Antioxidant defense systems and remediation of metal toxicity in plants. *Approaches to the remediation of inorganic pollutants*, 91-124.
- Rathore, S. S., Shekhawat, K., Dass, A., Kandpal, B. K., Singh, V. K. (2019). Phytoremediation mechanism in Indian mustard (*Brassica juncea*) and its enhancement through agronomic interventions. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 89, 419-427.
- Rea, P. A. (2007). Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58(1), 347-375.
- Reeves, R. D. (2006). Hyperaccumulation of trace elements by plants. In *Phytoremediation of metal-contaminated soils*, 25-52s. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Reeves, R. D., Brooks, R. R. (1983). European species of *Thlaspi* L. (Cruciferae) as indicators of nickel and zinc. *Journal of Geochemical Exploration*, 18(3), 275-283.
- Reichman, S. (2002). The responses of plants to metal toxicity: a review focusing on copper, Manganese and Zinc. Australian Minerals and Energy Environment Foundation Melbourne.
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., ... Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772), 901-906.
- Rentel, M. C., Lecourieux, D., Ouaked, F., Usher, S. L., Petersen, L., Okamoto, H., ... Knight, M. R. (2004). OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 427(6977), 858-861.
- Reyes, J. C., Muro-Pastor, M. I., Florencio, F. J. (2004). The GATA family of transcription factors in *Arabidopsis* and rice. *Plant physiology*, 134(4), 1718-1732.
- Ricachenevsky, F. K., Menguer, P. K., Sperotto, R. A., Williams, L. E., Fett, J. P. (2013). Roles of plant metal tolerance proteins (MTP) in metal storage and potential use in biofortification strategies. *Frontiers in plant science*, 4, 144.
- Richau, K. H., Kozhevnikova, A. D., Seregin, I. V., Vooijs, R., Koevoets, P. L., Smith, J. A. C., ... Schat, H. (2009). Chelation by histidine inhibits the vacuolar sequestration of nickel in roots of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, 183(1), 106-116.

- Rijstenbil, J. W., Gerringa, L. J. A. (2002). Interactions of algal ligands, metal complexation and availability, and cell responses of the diatom *Ditylum brightwellii* with a gradual increase in copper. *Aquatic Toxicology*, 56(2), 115-131.
- Riolo, G., Cantara, S., Marzocchi, C., Ricci, C. (2020). miRNA targets: from prediction tools to experimental validation. *Methods and protocols*, 4(1), 1.
- Rodríguez-Llorente, I. D., Pérez-Palacios, P., Doukkali, B., Caviedes, M. A., Pajuelo, E. (2010). Expression of the seed-specific metallothionein mt4a in plant vegetative tissues increases Cu and Zn tolerance. *Plant Science*, 178(3), 327-332.
- Roelofs, D., Aarts, M. G. M., Schat, H., Van Straalen, N. M. (2008). Functional ecological genomics to demonstrate general and specific responses to abiotic stress. *Functional Ecology*, 22(1), 8-18.
- Rosa, S. B., Caverzan, A., Teixeira, F. K., Lazzarotto, F., Silveira, J. A., Ferreira-Silva, S. L., ... Margis-Pinheiro, M. (2010). Cytosolic APX knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice. *Phytochemistry*, 71(5-6), 548-558.
- Roychowdhury, R., Roy, M., Zaman, S., Mitra, A. (2017). Bioaccumulation of heavy metals in *Brassica juncea*: an indicator species for phytoremediation. *International Journal for Innovative Research in Multidisciplinary Field*, 3(9), 92-95.
- Roychoudhury, A., Pradhan, S., Chaudhuri, B., Das, K. (2012). 11 Phytoremediation of Toxic Metals and the Involvement of *Brassica* Species.
- Sagi, M., Fluhr, R. (2006). Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant physiology*, 141(2), 336-340.
- Saibi, W., Brini, F. (2018). Superoxide dismutase (SOD) and abiotic stress tolerance in plants: An overview. *Superoxide Dismutase: Structure, Synthesis and Applications; Magliozzi, S., Ed*, 101-142.
- Saibo, N. J., Lourenço, T., Oliveira, M. M. (2009). Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of botany*, 103(4), 609-623.
- Saier, M. H., Trevors, J. T. (2010). Phytoremediation. *Water, Air, and Soil Pollution*, 205, 61-63.
- Saha, R. (2011). Sources and toxicity of hexavalent chromium. *Coord Chem*. 64, 1782–1806.
- Sahan, M., Meraklı, N., Memon, A. (2022). Kadmiyum stresi altında yetiştirilen *Brassica rapa* ‘da bazı metal taşıyıcı ATPaz ‘ların anlatımı. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 10, 2685-2690.

- Sahay, S., Gupta, M. (2017). An update on nitric oxide and its benign role in plant responses under metal stress. *Nitric Oxide*, 67, 39-52.
- Saleem, M. H., Afzal, J., Rizwan, M., Shah, Z. U. H., Depar, N., Usman, K. (2022). Chromium toxicity in plants: consequences on growth, chromosomal behavior and mineral nutrient status. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 46(3), 371-389.
- Salt, D. E., Blaylock, M., Kumar, N. P., Dushenkov, V., Ensley, B. D., Chet, I., Raskin, I. (1995). Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology*, 13(5), 468-474.
- Samad, A. F., Sajad, M., Nazaruddin, N., Fauzi, I. A., Murad, A. M., Zainal, Z., Ismail, I. (2017). MicroRNA and transcription factor: key players in plant regulatory network. *Frontiers in Plant Science*, 8, 565.
- Sancenón, V., Puig, S., Mira, H., Thiele, D. J., Peñarrubia, L. (2003). Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 51, 577-587.
- Sandalio, L. M., Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C., del Río, L. A. (2013). Role of peroxisomes as a source of reactive oxygen species (ROS) signaling molecules. *Peroxisomes and their key role in cellular signaling and metabolism*, 231-255.
- Saradhi, P. P. (1991). Proline accumulation under heavy metal stress. *Journal of Plant Physiology*, 138(5), 554-558.
- Sarma, H. (2011). Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. *J Environ Sci Technol.*, 4, 118–138.
- Saurabh, S., Vidyarthi, A. S., Prasad, D. (2014). RNA interference: concept to reality in crop improvement. *Planta*, 239, 543-564.
- Saxena, G., Purchase, D., Mulla, S. I., Saratale, G. D., Bharagava, R. N. (2020). Phytoremediation of heavy metal-contaminated sites: eco-environmental concerns, field studies, sustainability issues, and future prospects. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 249, 71-131.
- Schat, H., Llugany, M., Vooijs, R., Hartley-Whitaker, J., Bleeker, P. M. (2002). The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *Journal of experimental botany*, 53(379), 2381-2392.
- Schuetz, M., Benske, A., Smith, R. A., Watanabe, Y., Tobimatsu, Y., Ralph, J., ... Samuels, A. L. (2014). Laccases direct lignification in the discrete secondary cell wall domains of protoxylem. *Plant physiology*, 166(2), 798-807.

- Sebastian, A., Prasad, M. N. V. (2015). Trace element management in rice. *Agronomy*, 5(3), 374-404.
- Shah, V., Daverey, A. (2020). Phytoremediation: A multidisciplinary approach to clean up heavy metal contaminated soil. *Environmental Technology and Innovation*, 18, 100774.
- Shahandeh, H., Hossner, L. R. (2000). Plant screening for chromium phytoremediation. *International journal of phytoremediation*, 2(1), 31-51.
- Shahbaz, M., Pilon, M. (2019). Conserved Cu-microRNAs in *Arabidopsis thaliana* function in copper economy under deficiency. *Plants*, 8(6), 141.
- Shahid, M., Shamshad, S., Rafiq, M., Khalid, S., Bibi, I., Niazi, N. K., ... Rashid, M. I. (2017). Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: A review. *Chemosphere*, 178, 513-533.
- Shahid, M., Dumat, C., Khalid, S., Schreck, E., Xiong, T., Niazi, N. K. (2017). Foliar heavy metal uptake, toxicity and detoxification in plants: A comparison of foliar and root metal uptake. *Journal of hazardous materials*, 325, 36-58.
- Shanker, A. K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment international*, 31(5), 739-753.
- Sharma, D., Tiwari, M., Lakhwani, D., Tripathi, R. D., Trivedi, P. K. (2015). Differential expression of microRNAs by arsenate and arsenite stress in natural accessions of rice. *Metallomics*, 7(1), 174-187.
- Sharma, A., Kapoor, D., Wang, J., Shahzad, B., Kumar, V., Bali, A. S., ... Yan, D. (2020). Chromium bioaccumulation and its impacts on plants: an overview. *Plants*, 9(1), 100.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012(1), 217037.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. (2019). Oxidative stress and antioxidative defense system in plants growing under abiotic stresses. In *Handbook of Plant and Crop Stress*, 4, 93-136s. CRC press.
- Sharma, P., Pandey, A. K., Udayan, A., Kumar, S. (2021). Role of microbial community and metal-binding proteins in phytoremediation of heavy metals from industrial wastewater. *Bioresource technology*, 326, 124750.
- Sharma, A., Kapoor, D., Wang, J., Shahzad, B., Kumar, V., Bali, A. S., ... Yan, D. (2020). Chromium bioaccumulation and its impacts on plants: an overview. *Plants*, 9(1), 100.
- Sheoran, V., Sheoran, A. S., Poonia, P. (2010). Role of hyperaccumulators in phytoextraction of metals from contaminated mining sites: a review. *Critical Reviews*

in Environmental Science and Technology, 41(2), 168-214.

- Shivaraj, S. M., Vats, S., Bhat, J. A., Dhakte, P., Goyal, V., Khatri, P., ... Deshmukh, R. (2020). Nitric oxide and hydrogen sulfide crosstalk during heavy metal stress in plants. *Physiologia plantarum*, 168(2), 437-455.
- Shrivastava, M., Khandelwal, A., Srivastava, S. (2019). Heavy metal hyperaccumulator plants: the resource to understand the extreme adaptations of plants towards heavy metals. *Plant-metal interactions*, 79-97.
- Shrivastav, P., Prasad, M., Singh, T. B., Yadav, A., Goyal, D., Ali, A., Dantu, P. K. (2020). Role of nutrients in plant growth and development. *Contaminants in agriculture: Sources, impacts and management*, 43-59.
- Singh, H. P., Mahajan, P., Kaur, S., Batish, D. R., Kohli, R. K. (2013). Chromium toxicity and tolerance in plants. *Environmental Chemistry Letters*, 11, 229-254.
- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V. P., Prasad, S. M. (2016). Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in plant science*, 6, 1143.
- Singh, A., Kumar, A., Yadav, S., Singh, I. K. (2019). Reactive oxygen species-mediated signaling during abiotic stress. *Plant Gene*, 18, 100173.
- Singh, P. K., Yadav, J. S., Kumar, I., Kumar, U., Sharma, R. K. (2024). Screening of mustard cultivars for phytoremediation of heavy metals contamination in wastewater irrigated soil systems. *Environmental Monitoring and Assessment*, 196(3), 321.
- Srivastava, D., Tiwari, M., Dutta, P., Singh, P., Chawda, K., Kumari, M., Chakrabarty, D. (2021). Chromium stress in plants: toxicity, tolerance and phytoremediation. *Sustainability*, 13(9), 4629.
- Srivastava, S., Srivastava, A. K., Suprasanna, P., D'souza, S. F. (2013). Identification and profiling of arsenic stress-induced microRNAs in Brassica juncea. *Journal of Experimental Botany*, 64(1), 303-315.
- Srivastava, S., Srivastava, A. K., Sablok, G., Deshpande, T. U., Suprasanna, P. (2015). Transcriptomics profiling of Indian mustard (Brassica juncea) under arsenate stress identifies key candidate genes and regulatory pathways. *Frontiers in Plant Science*, 6, 646.
- Srivastava, A. K., Sablok, G., Hackenberg, M., Deshpande, U., Suprasanna, P. (2017). Thiourea priming enhances salt tolerance through co-ordinated regulation of microRNAs and hormones in Brassica juncea. *Scientific reports*, 7(1), 45490.
- Singh, A., Prasad, S. M. (2011). Reduction of heavy metal load in food chain: technology assessment. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 10, 199-214.

- Singh, S., Assumi, R., Bhadrecha, P. (2023). Crosstalk of MicroRNAs with Phytohormone Signalling Pathways. In *Plant MicroRNAs and Stress Response*, 257-276s. CRC Press.
- Song, Y., Jin, L., Wang, X. (2017). Cadmium absorption and transportation pathways in plants. *International journal of phytoremediation*, 19(2), 133-141.
- Song, W. Y., Park, J., Eisenach, C., Maeshima, M., Lee, Y., Martinoia, E. (2014). ABC transporters and heavy metals. *Plant ABC transporters*, 1-17.
- Su, W., Raza, A., Gao, A., Jia, Z., Zhang, Y., Hussain, M. A., ... Zou, X. (2021). Genome-wide analysis and expression profile of superoxide dismutase (SOD) gene family in rapeseed (*Brassica napus* L.) under different hormones and abiotic stress conditions. *Antioxidants*, 10(8), 1182.
- Sun, G. (2012). MicroRNAs and their diverse functions in plants. *Plant molecular biology*, 80, 17-36.
- Sun, X., Zhang, Y., Zhu, X., Korir, N. K., Tao, R., Wang, C., Fang, J. (2014). Advances in identification and validation of plant microRNAs and their target genes. *Physiologia plantarum*, 152(2), 203-218.
- Sun, R. L., Zhou, Q. X., Jin, C. X. (2006). Cadmium accumulation in relation to organic acids in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newly found cadmium hyperaccumulator. *Plant and soil*, 285, 125-134.
- Sundaramoorthy, P., Chidambaram, A., Ganesh, K. S., Unnikannan, P., Baskaran, L. (2010). Chromium stress in paddy:(i) nutrient status of paddy under chromium stress;(ii) phytoremediation of chromium by aquatic and terrestrial weeds. *Comptes rendus biologies*, 333(8), 597-607.
- Sunkar, R., Kapoor, A., Zhu, J.K. (2006). Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell*, 18, 2051–2065.
- Sutter, J. U., Sieben, C., Hartel, A., Eisenach, C., Thiel, G., Blatt, M. R. (2007). Absciscic acid triggers the endocytosis of the *Arabidopsis* KAT1 K⁺ channel and its recycling to the plasma membrane. *Current Biology*, 17(16), 1396-1402.
- Stone, J. M., Walker, J. C. (1995). Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant physiology*, 108(2), 451-457.
- Sytar, O., Kumari, P., Yadav, S., Brestic, M., Rastogi, A. (2019). Phytohormone priming: regulator for heavy metal stress in plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38, 739-752.
- Sytar, O., Ghosh, S., Malinska, H., Zivcak, M., Brestic, M. (2021). Physiological and molecular mechanisms of metal accumulation in hyperaccumulator

- plants. *Physiologia plantarum*, 173(1), 148-166.
- Szczyglowska, M., Piekarska, A., Konieczka, P., and Namiesnik, J. 2011. Use of Brassica plants in the phytoremediation and biofumigation processes. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 7760–7771.
- Tang, F., Xiao, Z., Sun, F., Shen, S., Chen, S., Chen, R., ... Qu, C. (2020). Genome-wide identification and comparative analysis of diacylglycerol kinase (DGK) gene family and their expression profiling in Brassica napus under abiotic stress. *BMC Plant Biology*, 20, 1-17.
- Tangahu, B. V., Sheikh Abdullah, S. R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., Mukhlisin, M. (2011). A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International journal of chemical engineering*, 2011(1), 939161.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment, *Molecular, clinical and environmental toxicology*. 3, 133-164.
- Thalassinou, G., Petropoulos, S. A., Grammenou, A., Antoniadis, V. (2023). Potentially toxic elements: a review on their soil behavior and plant attenuation mechanisms against their toxicity. *Agriculture*, 13(9), 1684.
- Thakur, S., Singh, L., Wahid, Z. A., Siddiqui, M. F., Atnaw, S. M., Din, M. F. M. (2016). Plant-driven removal of heavy metals from soil: uptake, translocation, tolerance mechanism, challenges, and future perspectives. *Environmental monitoring and assessment*, 188, 1-11.
- Thapa, G., Sadhukhan, A., Panda, S. K., Sahoo, L. (2012). Molecular mechanistic model of plant heavy metal tolerance. *Biometals*, 25, 489-505.
- Trinh, N. N., Huang, T. L., Chi, W. C., Fu, S. F., Chen, C. C., Huang, H. J. (2014). Chromium stress response effect on signal transduction and expression of signaling genes in rice. *Physiologia plantarum*, 150(2), 205-224.
- Tripathi, R., Tewari, R., Singh, K. P., Keswani, C., Minkina, T., Srivastava, A. K., De Corato, U., Sansinenea, E. (2022). Plant mineral nutrition and disease resistance: A significant linkage for sustainable crop protection. *Frontiers in Plant Science*, 13, 883970.
- Tripathi, D. K., Singh, S., Singh, S., Mishra, S., Chauhan, D. K., Dubey, N. K. (2015). Micronutrients and their diverse role in agricultural crops: advances and future prospective. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37, 1-14.
- Tripathi, D. K., Singh, V. P., Kumar, D., Chauhan, D. K. (2012). Impact of exogenous silicon addition on chromium uptake, growth, mineral elements, oxidative stress, antioxidant capacity, and leaf and root structures in rice seedlings exposed to hexavalent chromium. *Acta physiologiae plantarum*, 34, 279-289.

- Turner, M. A., Rust, R. H. (1977). Effects of Cr on growth and mineral nutrition of soybeans. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 35, 755–758.
- Unver, T., Namuth-Covert, D. M., Budak, H. (2009). Review of current methodological approaches for characterizing microRNAs in plants. *International journal of plant genomics*, 2009(1), 262463.
- Unamba, C. I., Nag, A., Sharma, R. K. (2015). Next generation sequencing technologies: the doorway to the unexplored genomics of non-model plants. *Frontiers in plant science*, 6, 1074.
- Ochiai, K., Shimizu, A., Okumoto, Y., Fujiwara, T., Matoh, T. (2011). Suppression of a NAC-like transcription factor gene improves boron-toxicity tolerance in rice. *Plant physiology*, 156(3), 1457-1463.
- Qin, L., Han, P., Chen, L., Walk, T. C., Li, Y., Hu, X., Liao, X. (2017). Genome-wide identification and expression analysis of NRAMP family genes in soybean (*Glycine max* L.). *Frontiers in plant science*, 8, 1436.
- Quaggiotti, S., Barcaccia, G., Schiavon, M., Nicolé, S., Galla, G., Rossignolo, V., ... Malagoli, M. (2007). Phytoremediation of chromium using *Salix* species: cloning ESTs and candidate genes involved in the Cr response. *Gene*, 402(1-2), 68-80.
- Xiao, H., Yin, L., Xu, X., Li, T., Han, Z. (2008). The iron-regulated transporter, MbNRAMP1, isolated from *Malus baccata* is involved in Fe, Mn and Cd trafficking. *Annals of Botany*, 102(6), 881-889.
- Xie, F.L., Huang, S.Q., Guo, K., Xiang, A.L., Zhu, Y.Y., Nie, L., Yang, Z.M. (2007). Computational identification of novel microRNAs and targets in *Brassica napus*. *FEBS Lett*, 581, 1464–1474.
- Xu, M. Y., Zhang, L., Li, W. W., Hu, X. L., Wang, M. B., Fan, Y. L., ... Wang, L. (2014). Stress-induced early flowering is mediated by miR169 in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, 65(1), 89-101.
- Xu, L., Wang, Y., Zhai, L., Xu, Y., Wang, L., Zhu, X., ... Liu, L. (2013). Genome-wide identification and characterization of cadmium-responsive microRNAs and their target genes in radish (*Raphanus sativus* L.) roots. *Journal of experimental botany*, 64(14), 4271-4287.
- Xu, L., Wang, Y., Zhai, L., Xu, Y., Wang, L., Zhu, X., Gong, Y., Yu, R., Limera, C., Liu, L. (2013b). Genome-wide identification and characterization of cadmium-responsive microRNAs and their target genes in radish (*Raphanus sativus* L.) roots. *J Exp Bot*, 64, 4271–4287.
- Vardhan, K. H., Kumar, P. S., Panda, R. C. (2019). A review on heavy metal pollution, toxicity and remedial measures: Current trends and future perspectives. *Journal of*

Molecular Liquids, 290, 111197.

- Varkey, M., Lal, N., Khan, Z. H. (2012). Phytoremediation: strategies to enhance the potential for toxic metal remediation of Brassica oilseed species. *Phytotechnologies: remediation of environmental contaminants*. Taylor and Francis, New York, 293-308.
- Vatansever, R., Ozyigit, I. I., Filiz, E. (2017). Essential and beneficial trace elements in plants, and their transport in roots: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 181, 464-482.
- Venkateswarlu, K., Nirola, R., Kuppusamy, S., Thavamani, P., Naidu, R., Megharaj, M. (2016). Abandoned metalliferous mines: ecological impacts and potential approaches for reclamation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 15, 327-354.
- Vernay, P., Gauthier-Moussard, C., Hitmi, A. (2007). Interaction of bioaccumulation of heavy metal chromium with water relation, mineral nutrition and photosynthesis in developed leaves of *Lolium perenne* L. *Chemosphere*, 68(8), 1563-1575.
- Yadav, S. K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African journal of botany*, 76(2), 167-179.
- Yamasaki, H., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M., Kobayashi, Y., Shikanai, T., Pilon, M. (2007). Regulation of copper homeostasis by micro-RNA in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.*, 282, 16369–16378.
- Yan, A., Wang, Y., Tan, S. N., Mohd Yusof, M. L., Ghosh, S., Chen, Z. (2020). Phytoremediation: a promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. *Frontiers in plant science*, 11, 359.
- Yang, Y., Saand, M. A., Huang, L., Abdelaal, W. B., Zhang, J., Wu, Y., ... Wang, F. (2021). Applications of multi-omics technologies for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 12, 563953.
- Yang, Y., Huang, J., Sun, Q., Wang, J., Huang, L., Fu, S., ... He, Y. (2022). microRNAs: Key players in plant response to metal toxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8642.
- Yang, J., Liu, X., Xu, B., Zhao, N., Yang, X., Zhang, M. (2013). Identification of miRNAs and their targets using high-throughput sequencing and degradome analysis in cytoplasmic male-sterile and its maintainer fertile lines of *Brassica juncea*. *BMC genomics*, 14, 1-16.
- Yang, X., Feng, Y., He, Z., Stoffella, P. J. (2005). Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 18(4), 339-353.

- Yeh, C. M., Chien, P. S., Huang, H. J. (2007). Distinct signalling pathways for induction of MAP kinase activities by cadmium and copper in rice roots. *Journal of experimental botany*, 58(3), 659-671.
- Yi-Bin, L., Yi-Ping, Q., Lin-Tong, Y., Guo, P., Li, Y., Li-Song, C. (2015). Boron-deficiency-responsive microRNAs and their targets in *Citrus sinensis* leaves. *BMC Plant Biology*, 15.
- You, L., Sheng, J., Jiang, G., Chen, H., Yuan, Y., Gong, S., ... Liu, X. (2024). Molecular characterization and expression patterns of MTP genes under heavy metal stress in mustard (*Brassica juncea* L.). *Scientific Reports*, 14(1), 17857.
- Yruela, I. (2009). Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology*, 36(5), 409-430.
- Yuan, M., Li, X., Xiao, J., Wang, S. (2011). Molecular and functional analyses of COPT/Ctr-type copper transporter-like gene family in rice. *BMC plant biology*, 11, 1-12.
- Walker, R. B., Walker, H. M., Ashworth, P. R. (1955). Calcium-magnesium nutrition with special reference to serpentine soils. *Plant physiology*, 30(3), 214.
- Wan, L., Zhang, H. (2012). Cadmium toxicity: effects on cytoskeleton, vesicular trafficking and cell wall construction. *Plant Signaling and Behavior*, 7(3), 345-348.
- Wang, L., Bei, X., Gao, J., Li, Y., Yan, Y., Hu, Y. (2016). The similar and different evolutionary trends of MATE family occurred between rice and *Arabidopsis thaliana*. *BMC plant biology*, 16, 1-19.
- Wang, J., Meng, X., Dobrovolskaya, O. B., Orlov, Y. L., Chen, M. (2017). Non-coding RNAs and their roles in stress response in plants. *Genomics, proteomics and bioinformatics*, 15(5), 301-312.
- Wang, W., Chen, D., Zhang, X., Liu, D., Cheng, Y., Shen, F. (2018). Role of plant respiratory burst oxidase homologs in stress responses. *Free Radical Research*, 52(8), 826-839.
- Wang, L., Li, P., Brutnell, T. P. (2010). Exploring plant transcriptomes using ultra high-throughput sequencing. *Briefings in functional genomics*, 9(2), 118-128.
- Wang, Y., Xu, L., Chen, Y., Shen, H., Gong, Y., Limera, C., Liu, L. (2013). Transcriptome profiling of radish (*Raphanus sativus* L.) root and identification of genes involved in response to lead (Pb) stress with next generation sequencing. *Plos one*, 8(6), e66539.
- Wang, X., Xu, M., Gao, C., Zeng, Y., Cui, Y., Shen, W., Jiang, L. (2020). The roles of endomembrane trafficking in plant abiotic stress responses. *Journal of integrative plant biology*, 62(1), 55-69.

- Weil, R. R., Magdoff, F. (2004). Significance of soil organic matter to soil quality and health. *Soil organic matter in sustainable agriculture*, 1-43.
- Weis, J. S., Weis, P. (2004). Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. *Environment international*, 30(5), 685-700.
- Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Williams, L. E., Pittman, J. K., Hall, J. L. (2000). Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1-2), 104-126.
- Williams, L. E., Mills, R. F. (2005). P1B-ATPases—an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. *Trends in plant science*, 10(10), 491-502.
- Woolhouse, H. W. (1983). Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. In *Physiological plant ecology III: Responses to the chemical and biological environment*, 245-300s. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Wu, L., Luo, Y., Song, J. (2007). Manipulating soil metal availability using EDTA and low-molecular-weight organic acids. *Phytoremediation: Methods and Reviews*, 291-303.
- Wuana, R.A., Okieimen, F.E. (2011). Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecology*, 2011, 1–20.
- Zandi, P., Schnug, E. (2022). Reactive oxygen species, antioxidant responses and implications from a microbial modulation perspective. *Biology*, 11(2), 155.
- Zayed, A. M., Terry, N. (2003). Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant and soil*, 249, 139-156.
- Zeng, H., Wang, G., Hu, X., Wang, H., Du, L., Zhu, Y. (2014). Role of microRNAs in plant responses to nutrient stress. *Plant and Soil*, 374, 1005-1021.
- Zeng, F., Mao, Y., Cheng, W., Wu, F., Zhang, G. (2008). Genotypic and environmental variation in chromium, cadmium and lead concentrations in rice. *Environmental pollution*, 153(2), 309-314.
- Zeng, F., Ali, S., Qiu, B., Wu, F., Zhang, G. (2010). Effects of chromium stress on the subcellular distribution and chemical form of Ca, Mg, Fe, and Zn in two rice genotypes. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 173(1), 135-148.

- Zhang, L.W., Song, J.B., Shu, X.X., Zhang, Y., Yang, Z.M. (2013). miR395 is involved in detoxification of cadmium in *Brassica napus*. *J Hazard Mater.*, 251, 204–211.
- Zhang, H., Lu, L. (2024). Transcription factors involved in plant responses to cadmium-induced oxidative stress. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1397289.
- Zhang, B., Pan, X., Wang, Q., Cobb, G. P., Anderson, T. A. (2006). Computational identification of microRNAs and their targets. *Computational biology and chemistry*, 30(6), 395-407.
- Zhang, Y., Chen, K., Zhao, F. J., Sun, C., Jin, C., Shi, Y., ... Lian, X. (2018). OsATX1 interacts with heavy metal P1B-type ATPases and affects copper transport and distribution. *Plant Physiology*, 178(1), 329-344.
- Zhang, X., Li, Q., Xu, W., Zhao, H., Guo, F., Wang, P., ... Wei, C. (2020). Identification of MTP gene family in tea plant (*Camellia sinensis* L.) and characterization of CsMTP8. 2 in manganese toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 202, 110904.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., Anderson, T. A. (2006). Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact. *Developmental biology*, 289(1), 3-16.
- Zhang, L. W., Song, J. B., Shu, X. X., Zhang, Y., Yang, Z. M. (2013). miR395 is involved in detoxification of cadmium in *Brassica napus*. *Journal of Hazardous Materials*, 250, 204-211.
- Zhang, J., Xie, Y., Ali, B., Ahmed, W., Tang, Y., Li, H. (2021). Genome-wide identification, classification, evolutionary expansion and expression of Rboh family genes in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Tropical Plant Biology*, 14, 251-266.
- Zhang, S., Klessig, D. F. (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in plant science*, 6(11), 520-527.
- Zhao, M., Ding, H., Zhu, J. K., Zhang, F., Li, W. X. (2011). Involvement of miR169 in the nitrogen-starvation responses in *Arabidopsis*. *New phytologist*, 190(4), 906-915.
- Zhao, F. Y., Wang, K., Zhang, S. Y., Ren, J., Liu, T., Wang, X. (2014). Crosstalk between ABA, auxin, MAPK signaling, and the cell cycle in cadmium-stressed rice seedlings. *Acta physiologiae plantarum*, 36, 1879-1892.
- Zhao, Y., Lin, S., Qiu, Z., Cao, D., Wen, J., Deng, X., ... Li, X. (2015). MicroRNA857 is involved in the regulation of secondary growth of vascular tissues in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 169(4), 2539-2552.
- Zhou, J., Goldsbrough, P. B. (1994). Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 6(6), 875-884.

- Zhou, Z. S., Song, J. B., Yang, Z. M. (2012). Genome-wide identification of *Brassica napus* microRNAs and their targets in response to cadmium. *Journal of Experimental Botany*, 63(12), 4597-4613.
- Zhou, Z. S., Zeng, H. Q., Liu, Z. P., Yang, Z. M. (2012). Genome-wide identification of *Medicago truncatula* microRNAs and their targets reveals their differential regulation by heavy metal. *Plant, Cell and Environment*, 35(1), 86-99.
- Zhou, Z. S., Song, J. B., Yang, Z. M. (2012). Genome-wide identification of *Brassica napus* microRNAs and their targets in response to cadmium. *Journal of experimental botany*, 63(12), 4597-4613.
- Zhu, W., Guo, Y., Chen, Y., Wu, D., Jiang, L. (2020). Genome-wide identification, phylogenetic and expression pattern analysis of GATA family genes in *Brassica napus*. *BMC plant biology*, 20, 1-12.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad soyadı : Nuriye Meraklı

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Uşak Üniversitesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2019
Lisans	Uşak Üniversitesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2016
Lise	Adnan Menderes Lisesi	2012

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Memon, AR., Meraklı, N., Kusur, F., Demircan, O, Memon, M. 2019. Heavy metal induced gene expression in plants. International J Scientific and Technological Research, 5:179-195. doi: 10.7176/JSTR/5-12-20
2. Meraklı, N., Memon, AR. 2020. Role of Plant Growth Promoting Bacteria (PGPR) in Plant Growth and Development: Soil-Plant Relationship. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(12), 2590-2602.
3. Meraklı N, Bulduk İ, Memon AR. 2022. Identification of Genes Regulated in Response to Cu Exposure in *Brassica nigra* L. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 23(1):15- 27.
4. Sahan, M., Meraklı, N., Memon, AR. (2022). Expression of Some Metal Transporter ATPases in *Brassica rapa* Grown under Cadmium Stress. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 10(sp1), 2685-2690.
5. Memon, A., Meraklı, N. (2022). Comparative Structural Analysis of Heavy Metal ATPases in *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis halleri*, *Brassica rapa*, and *Brassica juncea*. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 10(sp2), 2988-2995.

6. Meraklı, N., Memon, A. Gene Expression of Metal Transporting P-Type ATPases HMA2 and HMA4 in *Brassica juncea* L. Grown at Different Zn Levels. *Russ J Plant Physiol* 70, 34 (2023).

7. Meraklı, N., Memon, A. Expression of heavy metal ATPases (HMA1 and HMA3) in *Brassica nigra* and *Brassica juncea* grown at different Cu levels. *Botanica Serbica* 47 (2), 309-316.

Kitap Bölümü

1. Memon, A., Meraklı, N. (2023). Structure and Function of Heavy Metal Transporting ATPases in *Brassica* Species. In: Newman, L., Ansari, A.A., Gill, S.S., Naeem, M., Gill, R. (eds) *Phytoremediation*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-17988-4_5.

Bildiriler

1. Meraklı, N., İltas, O, Memon, A. R. 2016, "Structural and functional analysis of heavy metal transporting ATPases in *Brassica* sps.", Poster Presentation, International Conference on Biological Sciences (ICBS)", Konya/ Turkey, October 21-23, PP-77.

2. Meraklı, N., Şahan M. N., Memon, A. R. 2017, "Expression of Heavy Metal ATPase HMA1 and HMA2 in *Brassica juncea* and *Brassica nigra* grown at Different Levels of Cu and Cd", Poster Presentation, Global Conference on Plant Science and Molecular Biology, Valencia/Spain, September 11-13.

3. Meraklı, N., Çetindoğan M., Memon, A. R. 2017, Poster Presentation, "Metal Induced Gene Expression In Medically Important Crop Plants in *Brassica* sps." 1st International Congress On Medicinal and Aromatic Plants (TABKON17), Konya/ Turkey, May 10-12.

4. Meraklı, N., Çetindoğan M., Memon, A. R. 2017, "Expression of Heavy Metal ATPase HMA1 (PAA1), HMA2 and HMA4 in *Brassica juncea* grown at Different Levels of Cu and Zn", Poster Presentation, Plant Biology (ASPB), Honolulu/ Hawaii, June 24-28.

5. Meraklı, N., Memon, A. R. 2019, 1. Uluslararası Sağlık Bilimleri ve Biyoteknoloji Kongresi, Sözlü Bildiri, Tam Bildiri, Expression of HMA1, P_{1B} ATPase in *Brassica nigra* and *Brassica juncea* grown at different levels of Cu.

6. Sahan, M., Meraklı, N., Bhutto, L.A., Memon, A. R. 2022, VI. International Anatolian Agriculture, Food, Environment and Biology Congress, Sözlü Bildiri, Expression of Some Metal Transporter ATPases in *Brassica rapa* Grown Under Cadmium Stress,

Kütahya, October 7-9.

7. Dillioğlu, B., Meraklı, N., Bhutto, L.A., Memon, A. R. 2022, VI. International Anatolian Agriculture, Food, Environment and Biology Congress, Sözlü Bildiri, Tam Bildiri, Effect of Cr-Stress on the Glutathione Reductase (GR) Gene Expression in *B. juncea* L. var. S-9, Kütahya, October 7-9.

8. Memon, A. R., Meraklı, N. 2022, VI. International Anatolian Agriculture, Food, Environment, and Biology Congress, Sözlü Bildiri, Comparative structural analysis of heavy metal ATPases in *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis halleri*, *Brassica rapa* and *Brassica juncea*, Kütahya, October 7-9.

Projeler

1. 2016/MF010- Transcriptome analysis of metal accumulator and non-accumulator ecotype of *Brassica nigra* grown at different levels of Cu. BAP project, Project supervisor: Prof. Dr. Abdülrezzak Memon, Turkey, October 2016-September 2018.

2. 2016/MF005- Expression of Heavy metal ATPases (HMA1, HMA2 and HMA4) in *B. juncea* and *B. nigra* grown at different levels of Cu, Cd and Zn. BAP project, Project supervisor: Prof. Dr. Abdülrezzak Memon, Turkey, June 2016-May 2018.

3. 2017/TP042- Expression of genes encoding (γ -glutamyl EC (γ -EC) and phytochelatase) two enzymes important in the glutathione (GSH) pathway, of metal transporting of P1B-type ATPases, in *B. nigra* and *B. juncea* grown at different Cu levels. BAP project (Yüksek Lisans Projesi), Project supervisor: Prof. Dr. Abdülrezzak Memon, Turkey, 2017-2018.

4. 2024/MF002- *Brassica juncea* L.'de (kahverengi hardal) krom (Cr) stresine duyarlı miRNA'lar ve onların hedef genlerinin high throughput dizileme ile tanımlanması. BAP project, Project supervisor: Prof. Dr. Abdülrezzak Memon ve Prof. Dr. Ahmet Kahraman, Turkey, 2024-Devam ediyor.