



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**KARA HARDAL (*Brassica nigra*) BİTKİSİNDE BAKIR
STRESİYLE İLİŞKİLİ BAZI GENLERİN ANLATIMSAL
PROFİLLEMESİ**

Yasemin YILDIZHAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Botanik Programı

Danışman

Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ

II. Danışman

Dr. Birsen CEVHER KESKİN

Ocak, 2015

İSTANBUL

Bu çalışma 05/01/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Botanik programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Mümmner ÜNAL
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Meral ÜNAL
Marmara Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi



Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Selma ONARICI
TÜBİTAK, MAM
Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji
Enstitüsü

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 13114 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Hayatımın önemli bir aşamasını oluşturan bu süreci oldukça zorlu yollardan geçerek tamamladım. Umutsuzluğa kapıldığım zamanlarda ise hayatımda çok önemli yerleri olan yakın dostlarım ve değerli hocalarım bana her zaman destek oldular. Bu nedenle hepinize içtenlikle çok ama çok teşekkür ediyorum. Ancak, özellikle vurgulamak istediğim kişiler var;

Öncelikle, doktora eğitimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen çok değerli hocam, Botanik Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ'e, moleküler biyolojiyle ilgili tüm bilgilerini benimle paylaşan, sorularıma bıkmadan yanıt veren ve görüşleri ile beni her zaman yönlendiren ikinci danışmanım Dr. Birsen CEVHER KESKİN'e en derin saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım. Tez izleme komitesindeki jüri üyelerim, Prof. Dr. Muammer ÜNAL ve Prof. Dr. Meral ÜNAL'a destekleri ve anlayışları için ayrıca teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü (GMBE) Bitki Moleküler Biyolojisi Laboratuvarı'nın altyapısını kullanarak tamamladım. Bu süreçte aynı laboratuvarda omuz omuza çalıştığım Doç. Dr. Selma ONARICI ve Dr. Oktay KULEN'e yardım ve desteklerinden dolayı müteşekkirim. Tez çalışmaları temel olarak 104 O 211 kodlu "Sürdürülebilir Toprak Kullanımını ve Gıda Güvenliğini Arttırmak için Fitoteknolojiler" başlıklı COST 859 proje bütçesi ile desteklenmekle birlikte çalışmalar sırasında, CRP/TUR09-03 kodlu "Microarray Analysis and Functional Characterization of Drought Stress Related Genes in Wheat" başlıklı projenin maddi imkanlarından da yararlanıldı. Bu fırsatı benden esirgemeyen Doç. Dr. Bayram YÜKSEL ve Dr. Birsen CEVHER KESKİN'e teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında bana destek olan, güçlerini her zaman yanımda hissettiğim çok değerli dostlarım Özlem ERTEKİN, Melike ERSÖZ, Çiğdem EROL ve İbrahim HATİPOĞLU'na, tez çalışmaları sırasında kullandığım programlar ile ilgili sorularıma sabırla cevap veren arkadaşlarım Koray BALCIOĞLU ve Zelal ADIGÜZEL'e, SPSS analizleriyle ilgili yardımlarından dolayı Sinem KAPTAN ve Arzu TAŞ'a, çeviri ve literatür destekleri için Hande BAYBAR ve Halil Can MEMOĞLU'na teşekkürü borç bilirim.

İstanbul Üniversitesi, Botanik Anabilimdalı'nda doktora başladığım günden itibaren yardım ve desteklerini her zaman hissettiğim arkadaşlarım Dr. Eda DALYAN, Dr. Elif YÜZBAŞIOĞLU ve Dr. Taylan KÖSESAKAL'a çok ama çok teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan ve tüm eğitim hayatım boyunca hiçbir zaman maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen babam Ali YILDIZHAN ve annem Abide YILDIZHAN, sevgisini ve desteğini her zaman hissettiğim kardeşim Hasan YILDIZHAN ve amcam Cevat YILDIZHAN olmak üzere tüm AİLEM'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ocak, 2015

Yasemin YILDIZHAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET.....	xiv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	5
2.1. TOPRAKTA AĞIR METAL KİRLİLİĞİ VE BİTKİLER	5
2.1.1. Ağır metallere karşı bitki türlerinin değişen toleransı.....	7
2.1.2. Brassicaceae’de Hiperakümülatör Bitkiler	10
2.1.3. Metal Birikiminde Model Bitkiler	12
2.1.4.1. <i>Arabidopsis halleri</i>	12
2.1.4.2. <i>Thlaspi caerulescens</i> (<i>Noccaea caerulescens</i>).....	13
2.1.4.3. <i>Brassica juncea</i>	13
2.2. FİTOREMEDİYASYON.....	14
2.2.1. Fitoekstraksiyon (Bitkisel Özümleme)	17
2.2.2. Fitodegradasyon (Köklerle Bozunum)	17
2.2.3. Fitostabilizasyon (Köklerle sabitleme)	18
2.2.4. Fitovolatilizasyon (Bitkisel Buharlaştırma)	19
2.2.5. Rizofiltrasyon (Köklerle süzme)	20
2.3. BİTKİLERDE METAL BİRİKİMİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMASI.....	20
2.3.1. Ağır Metal Stresi Yanıtında Sinyal İletimi	20
2.3.1.1. <i>Ca-Kalmodulin Sistem</i>	21
2.3.1.2. <i>Ağır Metal Stresi Yanıtında Hormonlar</i>	21
2.3.1.3. <i>Reaktif Oksijen Türlerinin Rolü</i>	22
2.3.1.4. <i>MAP kinaz Kaskadı</i>	23

2.3.2. Toprakdan Metal İyonu Alınımı	24
2.3.2.1. <i>Metal İyonlarının Ekstraselüler Salgılara ve Hücre Çeperine Bağlanması</i>	25
2.3.2.2. <i>Metal İyonlarının Köklerde Plazma Membran Boyunca Aktif Taşınımı</i>	25
2.3.2.3. <i>Plazma membranında metal alış-verişi</i>	28
2.3.3. Metal İyonlarının Kökten Gövdeye Taşınımı	30
2.3.3.1. <i>Ağır Metal ATPaz (HMA) Taşıyıcı Ailesi</i>	30
2.3.3.2. <i>MATE Protein Ailesi</i>	31
2.3.3.3. <i>Oligopeptit Taşıyıcı Ailesi</i>	32
2.3.4. Şelasyon	32
2.3.4.1. <i>Fitokelatinler</i>	33
2.3.4.2. <i>Metallotiyoninler ve Ferritinler</i>	34
2.3.4.3. <i>Organik Asitler, Amino Asitler ve Fosfat Türevleri</i>	36
2.3.5. Ağır Metallerin Taşınmasında Rol Oynayan Taşıyıcı Proteinler	38
2.3.5.1. <i>ABC-Tipi Aile</i>	38
2.3.5.2. <i>CDF- Tipi Aile</i>	39
2.3.5.3. <i>Ağır metal ATPazlar</i>	41
2.3.5.4. <i>Kasyon/H⁺ antiportörler</i>	42
2.4. BİTKİLERDE AĞIR METAL METABOLİZMASI İLE İLİŞKİLİ GENLERİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER	43
2.4.1. Northern blot	44
2.4.2. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)	44
2.4.2.1. <i>Diziye Özgü Olmayan Saptama Metodu</i>	46
2.4.2.2. <i>Diziye Özgü Saptama Metodu</i>	50
2.4.3. Mikroarray Teknolojisi	53
3. MALZEME VE YÖNTEM	55
3.1. BİTKİSEL MATERYAL	55
3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN HARDAL EKOTİPLERİ VE ÖZELLİKLERİ	55
3.3. BİTKİLERİN YETİŞTİRİLMESİ	57
3.4. BİTKİLERE AĞIR METAL UYGULAMASI	58
3.4.1. Bitkilerin Hasat Edilmesi	59
3.5. BİTKİDE BİRİKEN AĞIR METAL MİKTARININ TAYİNİ	60
3.6. METAL AKÜMÜLASYONU İLE İLİŞKİLİ GENLERİN TANIMLANMASI VE İFADELERİNİN BELİRLENMESİ İÇİN KULLANILAN MOLEKÜLER YÖNTEMLER	61
3.6.1. Total RNA İzolasyonu	61

3.6.2. Total RNA Miktar Tayini.....	62
3.6.3. Total RNA'ların Formaldehitli Agaroz Jelde Ayrıştırılması	63
3.6.4. Total RNA'dan Genomik DNA'nın Uzaklaştırılması.....	63
3.6.5. DNazI Sonrası Bioanalyzer (Agilent) RNA Miktar Okumaları.....	65
3.6.6. Ters Transkripsiyon-Komplementer (Tamamlayıcı) DNA (cDNA) Sentezi ve Kontrolü.....	65
3.6.7. Primer Tasarımı.....	66
3.6.8. Yarı-Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	68
3.6.9. Karşılaştırmalı Transkriptom Profillemeye Yöntemiyle Metal Metabolizmasında Yer Alan Genlerin İrdelenmesi.....	69
3.6.10. Kantitatif Ters Yazılım Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)	70
3.6.11. İstatistiksel Analizler.....	72
4. BULGULAR	73
4.1. BİTKİDE BİRİKEN AĞIR METAL MİKTARI.....	73
4.2. AĞIR METAL UYGULAMASI YAPILAN BİTKİLERDE FARKLILIK GÖSTEREN GENLERİN TANIMLANMASI VE BELİRLENMESİ	78
4.2.1. Total RNA İzolasyonu	78
4.2.2. Total RNA'ların Saflaştırılması	82
4.2.3. Yarı-Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	89
4.2.4. Karşılaştırmalı Transkriptom Profillemeye Yöntemiyle Metal Metabolizmasında Yer Alan Genlerin İrdelenmesi.....	90
4.2.5. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR)	102
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	114
6. KAYNAKLAR.....	133
7. EKLER.....	170
8. ÖZGEÇMİŞ.....	194

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Brassicaceae familyasında takım düzeyinde metal birikimi yapan türlerin mevcut hipotez üzerine filogenetik ilişkileri (Kramer 2010'dan alınmıştır).	11
Şekil 2.2: Ağır metal varlığında reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretim yolları. Ağır metal (M) siyah noktalarla gösterilmiştir (Yıldız ve diğ., 2011'den alınmıştır).	23
Şekil 2.3: SYBR Green Tekniği (http://www.gene-quantification.de/chemistry.html).	47
Şekil 2.4: Erime eğrisi analizi. (A) Ham veri; DNA denatüre oldukça floresan azalır. (B) İkincil (türev) veri; eğrinin tepe noktası Tm (erime sıcaklığı) değerini gösterir (http://www.fatih.edu.tr/~abasiyanik/mfarg.htm).	48
Şekil 2.5: Kantitatif RT-PZR sonucu.	49
Şekil 3.1: 72 saat süreyle hidroponik ortamda Cu uygulaması yapılan CGN06625 ekotipinin genel görünümü (1. Gün).	59
Şekil 3.2: <i>Brassica nigra</i> Diyarbakır, CGN06625 ve CGN06626 ekotiplerinin kök, gövde ve yaprak dokularının mikrodalga kapalı sistem yaş yakma programı.	60
Şekil 4.1: Farklı konsantrasyonlarda 72 saat süreyle Cu uygulanmış 25 µM (B) , 50µM (C) ve uygulanmamış (kontrol) (A) <i>Brassica nigra</i> , CGN06625 ekotipine ait bitkilerin genel görünümü.	73
Şekil 4.2: Farklı konsantrasyonlarda 72 saat süreyle Cu uygulanmış 25 µM (B) , 50µM (C) ve uygulanmamış (kontrol) (A) <i>Brassica nigra</i> , CGN06626 ekotipine ait bitkilerin genel görünümü.	74
Şekil 4.3: Farklı konsantrasyonlarda 72 saat süreyle Cu uygulanmış 25 µM (B) , 50 µM (C) ve uygulanmamış (kontrol) (A) <i>Brassica nigra</i> Diyarbakır ekotipine ait bitkilerin genel görünümü.	74
Şekil 4.4: Hidroponik ortamda 25 µM ve 50 µM Cu uygulaması yapılan ve bakırdan morfolojik olarak negatif etkilenmiş CGN06626 (A, C) ve CGN06625 (B) ekotipine ait bitkilerin görünümü.	74
Şekil 4.5: Farklı konsantrasyonlarda bakır uygulaması yapılan CGN06625 ekotipinin kök, gövde ve yaprak kısımlarında biriken metal miktarlarının grafikte gösterimi, (mg/kgKA) (Hata çubukları, standart sapmayı göstermektedir), *: p< 0,05 değeri, kontrol gruplarına göre anlamlı farklılık gösteren deney gruplarını ifade etmektedir.	75

- Şekil 4.6:** Farklı konsantrasyonlarda bakır uygulaması yapılan CGN06626 ekotipinin kök, gövde ve yaprak kısımlarında biriken metal miktarlarının grafiklerle gösterimi (mg/kgKA). (Hata çubukları, standart sapmayı göstermektedir), *: $p < 0,05$ değeri, kontrol gruplarına göre anlamlı farklılık gösteren deney gruplarını ifade etmektedir.75
- Şekil 4.7:** Farklı konsantrasyonlarda bakır uygulaması yapılan Diyarbakır ekotipinin kök, gövde ve yaprak kısımlarında biriken metal miktarlarının grafiklerle gösterimi (mg/kgKA). (Hata çubukları, standart sapmayı göstermektedir), *: $p < 0,05$ değeri, kontrol gruplarına göre anlamlı farklılık gösteren deney gruplarını ifade etmektedir.76
- Şekil 4.8:** *B.nigra* CGN06625 ekotipinin farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 μ M) CuSO_4 çözeltisi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) bitkilerin, kök, gövde ve yaprak dokularından izole edilmiş olan total RNA'ların denatüran % 1'lik formaldehitli agaroz jel görüntüsü, A1-A14 (M=Marker: RiboRuler-High Range RNA Ladder, 200-6000 baz).81
- Şekil 4.9:** *B.nigra* CGN06625 ekotipinin farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 μ M) CuSO_4 çözeltisi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) bitkilerin, kök, gövde ve yaprak dokularından izole edilmiş olan total RNA'ların denatüran % 1'lik formaldehitli agaroz jel görüntüsü, A15-A27 (M=Marker: RiboRuler-High Range RNA Ladder, 200-6000 baz).81
- Şekil 4.10:** *B.nigra* CGN06626 ekotipinin farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 μ M) CuSO_4 çözeltisi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) bitkilerin, kök, gövde ve yaprak dokularından izole edilmiş olan total RNA'ların denatüran % 1'lik formaldehitli agaroz jel görüntüsü, B1-B14 (M=Marker: RiboRuler-High Range RNA Ladder, 200-6000 baz).81
- Şekil 4.11:** *B.nigra* CGN06626 ekotipinin farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 μ M) CuSO_4 çözeltisi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) bitkilerin, kök, gövde ve yaprak dokularından izole edilmiş olan total RNA'ların denatüran % 1'lik formaldehitli agaroz jel görüntüsü, B14-B27 (M=Marker: RiboRuler-High Range RNA Ladder, 200-6000 baz).82
- Şekil 4.12:** *B.nigra* Diyarbakır ekotipinin farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 μ M) CuSO_4 çözeltisi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) bitkilerin, kök, gövde ve yaprak dokularından izole edilmiş olan total RNA'ların denatüran % 1'lik formaldehitli agaroz jel görüntüsü, C1-C14 (M=Marker: RiboRuler-High Range RNA Ladder, 200-6000 baz).82
- Şekil 4.13:** *B.nigra* Diyarbakır ekotipinin farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 μ M) CuSO_4 çözeltisi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) bitkilerin, kök, gövde ve yaprak dokularından izole edilmiş olan total RNA'ların denatüran % 1'lik formaldehitli agaroz jel görüntüsü, C15-C27 (M=Marker: RiboRuler-High Range RNA Ladder, 200-6000 baz).82
- Şekil 4.14:** 72 saat boyunca 25 ve 50 μ M CuSO_4 çözeltisi uygulanan *B.nigra* CGN06625 (A) ekotipinin kök, gövde ve yaprak dokusundan elde edilen total RNA'ların DNazI uygulaması sonucu Bioanalyzer Agilent 2100 cihazında okuma sonrası her bir biyolojik tekrarına ait kromatogram görüntüleri (A1-A27).83

- Şekil 4.15:** 72 saat boyunca 25 ve 50 μM CuSO_4 çözeltisi uygulanan *B.nigra* CGN06625 ekotipinin kök, gövde ve yaprak dokusundan elde edilen total RNA'ların DNaz I uygulamasını takiben Bioanalyzer Agilent 2100 cihazında okuma sonrası her bir biyolojik tekrarına ait genel jel profili; **(A)** A1-A12, **(B)** A13-A18, **(C)** A19-A27.84
- Şekil 4.16:** 72 saat boyunca 25 ve 50 μM CuSO_4 çözeltisi uygulanan *B.nigra* CGN06626 (B) ekotipinin kök, gövde ve yaprak dokusundan elde edilen total RNA'ların DNaz I uygulaması sonucu Bioanalyzer Agilent 2100 cihazında okuma sonrası her bir biyolojik tekrarına ait kromatogram görüntüleri (B1-B27).85
- Şekil 4.17:** 72 saat boyunca 25 ve 50 μM CuSO_4 çözeltisi uygulanan *B.nigra* CGN06626 ekotipinin kök, gövde ve yaprak dokusundan elde edilen total RNA'ların DNaz I uygulamasını takiben Bioanalyzer Agilent 2100 cihazında okuma sonrası her bir biyolojik tekrarına ait genel jel profili; **(A)** B1-B12, **(B)** B13-B24, **(C)** B25-B27.....86
- Şekil 4.18:** 72 saat boyunca 25 ve 50 μM CuSO_4 çözeltisi uygulanan *B.nigra* Diyarbakır (C) ekotipinin kök, gövde ve yaprak dokusundan elde edilen total RNA'ların DNaz I uygulaması sonucu Bioanalyzer Agilent 2100 cihazında okuma sonrası her bir biyolojik tekrarına ait kromatogram görüntüleri (C1-C27).87
- Şekil 4.19:** 72 saat boyunca 25 ve 50 μM CuSO_4 çözeltisi uygulanan *B.nigra* Diyarbakır ekotipinin kök, gövde ve yaprak dokusundan elde edilen total RNA'ların DNaz I uygulamasını takiben Bioanalyzer Agilent 2100 cihazında okuma sonrası her bir biyolojik tekrarına ait genel jel görüntüsü; **(A)** C1-C12, **(B)** C13-C24, **(C)** C25-C27.....88
- Şekil 4.20:** *B.nigra* CGN06625 ekotipinin farklı konsantrasyonlarda (Kontrol, 25 ve 50 μM) CuSO_4 stresi uygulanmış bitkilerin kök, gövde ve yapraklarından elde edilen cDNA'ların β -aktin primer çiftleriyle yapılan PZR'nın % 2'lik agaroz jel görüntüsü (A= CGN06625 Ekotipi, A1-A9=Tekrar 1, A10-A18=Tekrar 2, A19-A27=Tekrar 3, M=Marker, -K= Negatif Kontrol).....89
- Şekil 4.21:** *B.nigra* CGN06626 ekotipinin farklı konsantrasyonlarda (Kontrol, 25 ve 50 μM) CuSO_4 stresi uygulanmış bitkilerin kök, gövde ve yapraklarından elde edilen cDNA'ların β -aktin primer çiftleriyle yapılan PCR'nın % 2'lik agaroz jel görüntüsü (B= CGN06626 Ekotipi, B1-B9=Tekrar 1, B10-B18=Tekrar 2, B19-B27=Tekrar 3, M=Marker, -K= Negatif Kontrol).....90
- Şekil 4.22:** *B.nigra* Diyarbakır ekotipinin farklı konsantrasyonlarda (Kontrol, 25 ve 50 μM) CuSO_4 stresi uygulanmış bitkilerin kök, gövde ve yapraklarından elde edilen cDNA'ların β -aktin primer çiftleriyle yapılan PZR'nın % 2'lik agaroz jel görüntüsü (C=Diyarbakır Ekotipi, C1-C9=Tekrar 1, C10-C18=Tekrar 2, C19-C27=Tekrar 3, M=Marker, -K= Negatif Kontrol).....90
- Şekil 4.23:** Çalışan primer çiftlerinin, 72 saat boyunca Cu uygulaması yapılan *B.nigra* GN06626 ekotipinin 50 μM CuSO_4 uygulama grubuna ait kök örneklerinden elde edilen cDNA'lar kullanılarak PZR'la kontrolünün %2'lik agaroz jel görüntüsü (M=Marker, +K= Pozitif kontrol; β -aktin primeri, -K= Negatif Kontrol).....102
- Şekil 4.24:** 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 μM) Cu uygulaması yapılan *B. nigra* CGN06625 **(A)**, CGN06626 **(B)** ve Diyarbakır **(C)** ekotiplerine ait kök, gövde ve yaprak dokularında, deney grubunun kontrol grubuna oranla farklı anlatım yapan *BnLOS2* genine ait normalize edilmiş nispi gen anlatımı oranı ($2^{\Delta\Delta\text{Cq}}$). (KK=Kontrol kök, 25K=25 Kök, 50K=50 Kök, KG= Kontrol gövde, 25G= 25 Gövde, 50G= 50 Gövde, KY= Kontrol yaprak, 25Y= 25 Yaprak, 50Y=50 Yaprak).103

- Şekil 4.25:** 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 µM) Cu uygulaması yapılan *B. nigra* CGN06625 ekotipine ait kök, gövde ve yaprak dokularında, deney grubunun kontrol grubuna oranla farklı anlatım yapan *BnPIP2;5* genine ait erime sıcaklığı grafiği.....104
- Şekil 4.26:** 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 µM) Cu uygulaması yapılan *B. nigra* CGN06626 (A) ve Diyarbakır (B) ekotiplerine ait kök, gövde ve yaprak dokularında, deney grubunun kontrol grubuna oranla farklı anlatım yapan *BnPIP2;5* genine ait normalize edilmiş nispi gen anlatımı oranı ($2^{\Delta\Delta Cq}$). (KK=Kontrol kök, 25K=25 Kök, 50K=50 Kök, KG= Kontrol gövde, 25G= 25 Gövde, 50G= 50 Gövde, KY= Kontrol yaprak, 25Y= 25 Yaprak, 50Y=50 Yaprak).105
- Şekil 4.27:** 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 µM) Cu uygulaması yapılan *B. nigra* CGN06625 (A), CGN06626 (B) ve Diyarbakır (C) ekotiplerine ait kök, gövde ve yaprak dokularında, deney grubunun kontrol grubuna oranla farklı anlatım yapan *BnMT1a* genine ait normalize edilmiş nispi gen anlatımı oranı ($2^{\Delta\Delta Cq}$). (KK=Kontrol kök, 25K=25 Kök, 50K=50 Kök, KG= Kontrol gövde, 25G= 25 Gövde, 50G= 50 Gövde, KY= Kontrol yaprak, 25Y= 25 Yaprak, 50Y=50 Yaprak).106
- Şekil 4.28:** 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 µM) Cu uygulaması yapılan *B. nigra* CGN06625 (A), CGN06626 (B) ve Diyarbakır (C) ekotiplerine ait kök, gövde ve yaprak dokularında, deney grubunun kontrol grubuna oranla farklı anlatım yapan *BnCAT3* genine ait normalize edilmiş nispi gen anlatımı oranı ($2^{\Delta\Delta Cq}$). (KK=Kontrol kök, 25K=25 Kök, 50K=50 Kök, KG= Kontrol gövde, 25G= 25 Gövde, 50G= 50 Gövde, KY= Kontrol yaprak, 25Y= 25 Yaprak, 50Y=50 Yaprak).107
- Şekil 4.29:** 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 µM) Cu uygulaması yapılan *B. nigra* CGN06625 (A), CGN06626 (B) ve Diyarbakır (C) ekotiplerine ait kök, gövde ve yaprak dokularında, deney grubunun kontrol grubuna oranla farklı anlatım yapan *BnCSD1* genine ait normalize edilmiş nispi gen anlatımı oranı ($2^{\Delta\Delta Cq}$). (KK=Kontrol kök, 25K=25 Kök, 50K=50 Kök, KG= Kontrol gövde, 25G= 25 Gövde, 50G= 50 Gövde, KY= Kontrol yaprak, 25Y= 25 Yaprak, 50Y=50 Yaprak).108
- Şekil 4.30:** 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 µM) Cu uygulaması yapılan *B. nigra* CGN06625 (A), CGN06626 (B) ve Diyarbakır (C) ekotiplerine ait kök, gövde ve yaprak dokularında, deney grubunun kontrol grubuna oranla farklı anlatım yapan *BnGAPC1* genine ait normalize edilmiş nispi gen anlatımı oranı ($2^{\Delta\Delta Cq}$). (KK=Kontrol kök, 25K=25 Kök, 50K=50 Kök, KG= Kontrol gövde, 25G= 25 Gövde, 50G= 50 Gövde, KY= Kontrol yaprak, 25Y= 25 Yaprak, 50Y=50 Yaprak).110
- Şekil 4.31:** 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 µM) Cu uygulaması yapılan *B. nigra* CGN06625 (A), CGN06626 (B) ve Diyarbakır (C) ekotiplerine ait kök, gövde ve yaprak dokularında, deney grubunun kontrol grubuna oranla farklı anlatım yapan *BnRBOH1* genine ait normalize edilmiş nispi gen anlatımı oranı ($2^{\Delta\Delta Cq}$). (KK=Kontrol kök, 25K=25 Kök, 50K=50 Kök, KG= Kontrol gövde, 25G= 25 Gövde, 50G= 50 Gövde, KY= Kontrol yaprak, 25Y= 25 Yaprak, 50Y=50 Yaprak).111
- Şekil 4.32:** 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 µM) Cu uygulaması yapılan *B. nigra* CGN06625 (A), CGN06626 (B) ve Diyarbakır (C) ekotiplerine ait kök, gövde ve yaprak dokularında, deney grubunun kontrol grubuna oranla farklı anlatım yapan *BnGSKB6* genine ait normalize edilmiş nispi gen anlatımı oranı ($2^{\Delta\Delta Cq}$). (KK=Kontrol kök, 25K=25 Kök, 50K=50 Kök, KG= Kontrol gövde, 25G= 25 Gövde, 50G= 50 Gövde, KY= Kontrol yaprak, 25Y= 25 Yaprak, 50Y=50 Yaprak).112

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Fitoremediyasyon yeteneğine sahip bitkilerin elde edilme stratejisi	16
Tablo 3.1: Hoagland Solüsyonu İçeriği (%100 1 litre).	57
Tablo 3.2: ICP-OES Çalışma Koşulları.	61
Tablo 3.3: DNazI uygulamasında kullanılan bileşenler ve reaksiyon miktarları	64
Tablo 3.4: cDNA kontrolü için PZR cihazında kurulan döngü programı.	66
Tablo 3.5: Tasarlanan primerlere ait diziler, Tm değerleri, GC oranı (%) ve ampikon uzunlukları.	67
Tablo 3.6: PZR uygulamasında kullanılan bileşenler ve reaksiyon miktarları (µl).	68
Tablo 3.7: β-aktin genine ait primer dizileri ve ampikon uzunluğu.....	68
Tablo 3.8: Kantitatif Real-Time PZR karışımının hazırlanması.	71
Tablo 3.9: Kantitatif RT-PZR’da kurulan PZR programı	72
Tablo 4.1: 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda CuSO ₄ çözeltisi uygulanan <i>B. nigra</i> CGN06625 (A), CGN06626 (B) ve Diyarbakır (C) ekotiplerinin kök, gövde ve yapraklarında akümüle edilen ağır metal miktarları (mg/kgKA) (± değerler standart sapmayı göstermektedir).....	76
Tablo 4.2: <i>B.nigra</i> CGN06625 (A) ekotipinin farklı konsantrasyonlarda kök, gövde ve yaprak dokularına ait RNA’ların spektrofotometrik değerleri.....	78
Tablo 4.3: <i>B.nigra</i> CGN06626 (B) ekotipinin farklı konsantrasyonlarda kök, gövde ve yaprak dokularına ait spektrofotometrik değerleri.....	79
Tablo 4.4: <i>B.nigra</i> Diyarbakır (C) ekotipinin farklı konsantrasyonlarda kök, gövde ve yaprak dokularına ait RNA’ların spektrofotometrik değerleri.....	80
Tablo 4.5: CGN06619 kök dokusunda, 25 µM bakır uygulanan bitkiyle kontrol bitkiler arasında farklılık (2 kat artmış veya 2 kat azalmış) gösteren genler (t testi uygulanmıştır).....	91
Tablo 4.6: Mikroarray analizi sonucunda ağır metal alınımı ve taşınmasında rol aldığı düşünülen genlerin yer aldığı yollar ve moleküler fonksiyonları.	100
Tablo 4.7: 72 saat boyunca Cu uygulaması yapılan CGN06619, CGN06625, CGN06626 ve Diyarbakır ekotiplerinin kök dokusunda deney gruplarının kontrol grubuna oranla,	

farklı anlatım gösteren hedef genlerin mRNA seviyesindeki değişikliklerin, kantitatif RT-PZR ve mikroarray analiz sonucunda kat değişimi olarak ifadesi.113

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler

Açıklama

μl	: Mikrolitre
μg	: Mikrogram
Ag	: Gümüş
Al	: Alüminyum
As	: Arsenik
Au	: Altın
Cd	: Kadmiyum
Co	: Kobalt
Cu	: Bakır
Fe	: Demir
GuHCl	: Guanidine hydrochloride
Hg	: Civa
HNO ₃	: Nitrik asit
mg	: Miligram
Mn	: Mangan
mL	: Mililitre
ng	: Nanogram
Ni	: Nikel
Pb	: Kurşun
Zn	: Çinko

Kısaltmalar

Açıklama

°C	: Celsius
ABA	: Absciscic Acid-Absisik Asit
ABC	: ATP-bağlayıcı kaset
AMV-RT	: Avian Myeloblastosis Virus-Reverse Transcriptase
AtIRT1	: <i>Arabidopsis thaliana</i> 'da demir-düzenlenmiş taşıyıcı gen
AtPDR8	: ABC transporter G family member 36
ATP-PRT	: ATP fosforibosiltransferaz geni
CAT3	: Catalase 3
CAX	: Cation/H ⁺ antiport
CaCA	: Katyon/H ⁺ antiportırları
CDF	: Katyon-difüzyon hızlandırıcı
CSD1	: Copper/Zinc superoxide dismutase 1
CT	: Threshold cycle (eşik döngü değeri)
CTR	: Bakır taşıyıcı proteinler (The copper transporters)
COPT	: Copper transporter gene
DD	: Differential Display (Farklılık gösterim tekniği)
DEPC	: Dietil pirokarbonat
DIG	: Digoksinin

EcMT	: Buğdayda metallotiyonin geni
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EIN2	: Etilen duyarsız 2 geni (ethylene-insensitive 2 gene)
ENO1	: İnsan enolaz geni
EPA	: Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
EST	: Expressed sequence tag
FAM	: Carboxyfluorescein
FDR3	: Fe-deficiency-related gene
FRET	: Fluorescence resonance energy transfer (Floresans rezonans enerji transferi)
GAPC1	: Phosphorylating glyceraldehyde-3P dehydrogenase C subunit1
GAPDH	: Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz
GLN1;3	: Glutamine synthetase 1;3
GS	: Glutasyon sentetaz
GSH	: Glutasyon
GSKB6	: Glutamine Synthase Clone KB6
His	: Histidin
HMAS	: Ağır metal ATPazlar
ICP-OES	: İndüktif Eşlenmiş Plazma-Optik Emisyon Spektrometre
IRT	: (Iron-regulated transporter)
KA	: Kuru ağırlık
LOS2	: Low expression of osmotically responsive genes 2
MAPK	: Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz
MAPKK	: MAPK Kinaz (MAP2K)
MAPKKK	: MAPK Kinaz Kinaz (MAP3K)
MATE	: Multidrug and toxin efflux
MDR	: Çoklu ilaç direnç proteinleri
MHX	: Mg^{2+}/H^{+} antiport
MIP	: Major intrinsic protein
MRP	: Çoklu ilaç direnciyle ilişkili proteinler
MMLV-RT	: Moloney murine leukemia virus- reverse transcriptase
MOPS	: Morfolino-propan sülfonik asit
MT	: Metallotiyoninler
MTP	: Metal taşıyıcı proteinler
NA	: Nikotinamin
NAS	: NA sentaz
Nramp	: Doğal dirençle ilişkili makrofaj protein
NtCBP4	: Tütünde kalmodulin bağlayıcı protein
OPT	: Oligopeptit taşıyıcı gen ailesi
OsFRDL3	: Pirinçte FRD3 benzeri gen (FRD3-Like gene)
OsNramp	: Pirinçte doğal dirençle ilişkili makrofaj protein
PAH	: Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
PC	: Fitokelatinler
PIP2;5	: Plasma membrane intrinsic protein 2;5
RBOH1	: Respiratory Burst Oxidase Homologue D
RIN	: RNA bütünlük numaraları
RNAseq	: RNA dizileme
RT-PZR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
ROT	: Reaktif oksijen türleri

SA	: Salisilik asit
SAGE	: Serial analysis of gene expression (serisel gen anlatım analizi)
SIP	: Small basic intrinsic proteins
SMT	: Selenosistein metiltransferaz geni
SODs	: Süperoksit dizmutazlar
TAIR	: The Arabidopsis information resource
TAMRA	: Carboxy-tetramethyl-rhodamine
TAH	: Türler arası hibridizasyon
TIP	: Tonoplast intrinsic proteins
TİH	: Tür içindeki hibridizasyon
Tm	: Melting temperature (erime sıcaklığı)
YSL	: Yellow Stripe-like proteins
ZIP	: Çinko-demir permeaz
ZmYS1	: Mısırdaki Sarı Şerit 1 Proteinini (yellow stripe 1 protein)
ZRT	: Çinko-düzenlenmiş taşıyıcı (zinc-regulated transporter)

ÖZET

DOKTORA TEZİ

KARA HARDAL (*Brassica nigra*) BİTKİSİNDE BAKIR STRESİYLE İLİŞKİLİ BAZI GENLERİN ANLATIMSAL PROFİLLEMESİ

Yasemin YILDIZHAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ

II. Danışman : Dr. Birsen CEVHER KESKİN

Topraktaki ağır metal kirliliğini ortadan kaldırmak için çevreye zararlı ve oldukça pahalı olan fiziksel arıtım (remediyasyon) teknolojileri yerine bitkiler kullanılmakta ve bu teknolojiler “Fitoremediyasyon Teknolojisi” olarak adlandırılmaktadır. Bazı bitkiler ağır metal detoksifikasyonu ile ilişkili potansiyel mekanizmalara sahip olduğundan metal stresi altında canlılıklarını sürdürebilmektedir. Ağır metal toleransı ve birikimi ile ilgili mekanizmaların daha iyi anlaşılmasında bu bitkilerde yapılan moleküler çalışmalar büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada fitoteknolojik yaklaşımların geliştirilmesi ve daha etkin hale getirilmesi için ağır metal metabolizmasındaki düzenleyici mekanizmaların belirlenmesi hedeflenmiştir. İlgili mekanizmalarda yer alan bazı genlerin bakır (Cu) stresi altında oluşan anlatım farklılıkları detaylı olarak incelenmiştir. Bu kapsamda kara hardal (*Brassica nigra* L.) bitkisinin, temel ağır metal kirleticilerden biri olan bakıra karşı gösterdiği tepkiler, farklı deneysel yaklaşımlarla analiz edilmiştir. Bitkiler için yaşamsal bir element olan, ancak fazla birikimi toksik etki oluşturan Cu, düşük konsantrasyonlarda (25 ve 50 μM CuSO_4) 72 saat boyunca farklı ekotiplere uygulanmıştır. Yüksek bakır içeren topraklarda kolaylıkla yetişebilen, Diyarbakır ili civarından toplanan *Brassica nigra* bitkisinin bu metale karşı toleransı, aynı bitkinin farklı ekotipleriyle (CGN06625 ve CGN06626, Etiyopya kökenli) karşılaştırılmıştır. Ekotiplerin kök, gövde ve yapraklarında bulunan Cu miktarları ICP-OES (İndüktif Eşlenmiş Plazma-Optik Emisyon Spektrometre) tekniği kullanılarak belirlenmiş ve

Diyarbakır ekotipinin diğer ekotiplere nazaran Cu stresine karşı toleransının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, yapılan istatistiksel analizlerle sonuçların kendi içinde anlamlı olduğu doğrulanmıştır.

Brassica nigra'nın Cu stresi altında kök dokusunda farklı anlatım yapan genlere ait mikroarray verileri temel alınarak, ağır metal metabolizması ve metal homeostazisi ile ilişkili olan 23 adet gen tespit edilmiştir. Bu genlerden seçilen 8 tanesinin doğrulama çalışmaları, daha güvenilir bir metot olan kantitatif RT-PZR (Ters Yazılım Polimeraz Zincir Reaksiyonu) analizi ile yapılmıştır. Toleranslı olan ve olmayan ekotiplerin kök, gövde ve yaprak dokularında bu genlerin, farklı konsantrasyonlarda Cu stresi altındaki mRNA anlatım profilleri detaylı olarak incelenmiştir. Genlerin anlatımlarında tespit edilen bu farklılıklar, bitkilerde Cu metabolizmasıyla ilişkili yolların aydınlatılmasına ve fitoremediyasyon amaçlı transgenik çalışmalara önemli katkılar sağlayacaktır.

Ocak 2015, 213 sayfa

Anahtar kelimeler: *Brassica nigra*, fitoremediyasyon, Cu akümülatörü, ağır metal stresi, gen anlatımı

SUMMARY

Ph.D THESIS

THE EXPRESSION PROFILING OF SOME GENES ASSOCIATED WITH COPPER STRESS FROM BLACK MUSTARD (*Brassica nigra*)

Yasemin YILDIZHAN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ

Co-Supervisor : Dr. Birsen CEVHER KESKİN

The use of plants to bioremediate of heavy metals from contaminated soil is called “Phytoremediation Technology” which is considered less harmful and cheaper than physicochemical approaches. Some plants can survive under metal stress since they have the potential mechanisms to detoxify heavy metals. Molecular studies conducted with these plants are considerably important for better understanding of the mechanisms related with heavy metal tolerance and accumulation.

In this study, we aimed to identify regulatory mechanisms of heavy metal metabolism in response to heavy metal copper (Cu) to develop and increase the efficiency of phytotechnological approaches. Detailed studies were completed to find out differentially expressed genes under Cu stress, one of the environmental important heavy metal contaminant. For this aim, the response of black mustard (*Brassica nigra* L.) to Cu, was thoroughly evaluated using different experimental approaches. Copper is an essential trace element for plants, but it can be toxic in case of high levels of accumulation. Low concentrations (25 and 50 μ M CuSO₄) of Cu were applied to different ecotypes for 72 hours. *Brassica nigra* plants collected from Diyarbakır, Turkey, which can survive at high level Cu concentrations, and two other ecotypes (CGN06625 and CGN06626, Ethiopian origin) were compared for Cu tolerance. Heavy metal accumulation in root, shoot and leaves of these ecotypes were detected using ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy). It was shown that Diyarbakır ecotype had higher Cu tolerance than the

other ecotypes. Also, statistical analyses were conducted to confirm the consistency of the results.

Twenty-three genes related to heavy metal mechanism and metal homeostasis were defined from *Brassica nigra* microarray data which performed with root tissue under Cu stress. Among the these genes, 8 genes were selected for the validation with more robust technique quantitative RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). Detailed mRNA expression profiles of these genes were evaluated in roots, shoots and leaves of three tolerant and non-tolerant *Brassica nigra* ecotypes exposed to different concentrations of Cu. Genes shown to be differentially expressed will provide important contributions to understand pathways related to Cu metabolism and transgenic studies for phytoremediation applications of plants.

January 2015, 213 pages

Keywords: *Brassica nigra*, phytoremediation, Cu accumulator, heavy metal stress, gene expression

1. GİRİŞ

Toprak kirliliği, dünya genelinde yaygın olarak görülen büyük bir çevre sorunudur. Özellikle, yirminci yüzyılın başından itibaren gelişen teknolojiyle beraber, modern tarıma geçilmesi ve hızlı sanayileşmeyle birlikte doğal kaynaklar ve ekosistemler tahrip edilmiş ve kirlenmiştir. Günümüzde ise, giderek artan dünya nüfusu ve sanayileşmeden dolayı oluşan endüstriyel atıklar nedeniyle topraklar önemli ölçüde kirlenmeye devam etmekte ve kullanılabilir tarım alanları her geçen gün azalmaktadır (TKKY, 2005). Toprak kirliliğine neden olan organik ve inorganik kirleticiler arasında yer alan, en tehlikeli ve öncelikli kirletici kaynaklardan biri de ağır metallerdir. Mikro kirleticiler sınıfına giren bu inorganik kirleticilerin çok düşük konsantrasyonları bile bitkiler üzerinde toksik etki gösterebilmektedir (Inoue, 2013). Ağır metaller hem doğal süreçler sonucu hem de madencilik, enerji ve yakıt üretimi, aşırı pestisit ve gübre kullanımı gibi endüstriyel aktiviteler sonucu daha çok insanın neden olduğu etkilerden dolayı (antropojenik etki) önemli miktarlarda çevreye yayılmaktadır (Samarghandi ve diğ., 2007). Toprakta bulunan ağır metal miktarı normal şartlar altında belli bir konsantrasyondadır. Bu oranın yüksek seviyelere çıkması toprağın yapısının bozulmasına, ürün verim ve kalitesinin azalmasına neden olmaktadır (Cuypers ve diğ., 2009). Ayrıca, yüksek konsantrasyonda bulunan ağır metaller, bitkide birçok metabolik olay üzerine toksik etki göstermekte ve bu nedenle bitkinin gelişimini olumsuz etkilemektedir. Bazı ağır metaller ise bitkiler için son derece önemli olup eser miktarda tüm bitkilerde bulunan mikro elementlerdir. Örneğin bakır (Cu), bitkinin büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan birçok metabolik sürece katılarak proteinlerin ve enzimlerin katalitik ve yapısal bileşenlerinde kofaktör olarak yer almaktadır. Ancak, diğer ağır metaller gibi Cu elementinin de ortamda fazla miktarda birikimi bitkilerde toksik etkiye neden olmaktadır. Bakır toksisitesi, genellikle bitkinin kök sistemlerinde açığa çıkmakta ve bitki bünyesinde protein sentezi, fotosentez, solunum, iyon alımı ve hücre membran stabilitesi gibi bazı fizyolojik olayların bozulmasına neden olmaktadır (Yruela, 2005). Ayrıca, Cu gibi ağır metallerin toprakta birikmesinin sadece toprak verimliliği ve ekosistem üzerinde değil aynı zamanda hayvan ve insan sağlığı üzerinde de önemli

etkileri vardır. Besin zinciri yoluyla hayvanlara ve insanlara ulaşabilen Cu elementi, DNA’da hasara neden olarak insan sağlığını tehdit edebilir boyuta gelebilmektedir.

Çevre kirliliğinin ortadan kaldırılmasında, doğal kaynakların kirleticilere karşı korunmasının yanında, kirlenmiş alanların temizlenmesi de son derece önemlidir. Ağır metallere kirlenmiş alanların iyileştirilmesinde (remediyasyonunda) birçok fiziksel, kimyasal ve termal yöntemler kullanılmaktadır (Mulligan ve diğ., 2001). Ancak, bu yöntemlerin arıtım masraflarının yüksek olması ve arıtım sonucunda ortaya çıkan farklı kirlenici formların gideriminde yaşanan zorluklar nedeniyle çevresel açıdan kullanımı tercih edilmemektedir. Son yıllarda, bu sorunları gidermek için mevcut yöntemler yerine daha düşük maliyetli ve çevre dostu olan teknikler üzerine çalışmalara yoğunlaşmıştır (Tangahu ve diğ., 2011). Bunlar arasında “Biyoremediyasyon Teknolojisi” çevre kirliliğini ortadan kaldırmak amacıyla günümüzde çok sık kullanılan alternatif bir yöntemdir (Baker ve Herson, 1994; Atlas ve Philp, 2005). Kirlenmiş su ve toprakta birikmiş olan toksik metal ve organik kirleticileri temizlemek amacıyla düşük maliyetinden dolayı özellikle bitkiler tercih edilmekte ve bu yöntemler “Fitoteknolojiler” olarak adlandırılmaktadır (EPA, 2000; Mengoni ve diğ., 2000; Pence ve diğ., 2000). “Yeşil ıslah” olarak da adlandırılan fitoteknolojiler, toprak ve su kirliliğinin giderilmesinde temel olarak kullanılmakla beraber, inorganik ve organik kirleticilerin bitkilere taşınımını önlemede de uygulanabilir bir yöntemdir. Böylelikle fitoteknolojik yöntemler yardımıyla bitkilerin besin değeri iyileştirilebilmektedir. Bitkilerde kirleticilerin birikimi ve detoksifikasyon mekanizmaları üzerinde yapılan çalışmalar son derece önem taşımaktadır. Bu çalışmaların daha sağlıklı bir çevrenin oluşmasına, kirleticilerin toprak, su ve havaya taşınımının engellenmesine önemli katkıları olmaktadır.

Ağır metallerce zengin olan maden yatakları gibi alanlar incelendiğinde bu ortamlarda yaşamaya uyum sağlamış birçok karakteristik bitki türünün olduğu görülmüştür. Bu türlerden bazıları ağır metalleri bünyelerine almayarak sadece bulundukları ortamda yaşamaya uyum sağlamıştır. Bazı türler ise tam olarak aydınlatılamayan bir mekanizma ile yüksek konsantrasyonlarda ağır metalleri bünyelerine almakta ve kökten diğer toprak üstü organlarına bu metalleri taşıyabilmektedir (Chaney, 1983; Baker ve Brooks, 1989). “Akümülatör” ya da “Hiperakümülatör” adı verilen bu bitkilerin belirlenmesi ile ağır

metal gibi kirleticilerin bitkiler aracılığıyla ortadan kaldırılmasını sağlayan fitoremediyasyon teknolojisinin gelişmesi sağlanmıştır. Kirlenmiş alanların fitoremediyasyonu için uygun bitkilerin geliştirilmesi ancak bir bitkinin herhangi bir ağır metale olan tolerans mekanizmasının anlaşılması ile mümkün olabilir. Bu nedenle, bitkilerde ağır metal toleransı ile ilişkili fizyolojik ve moleküler mekanizmaların detaylı aydınlatılması, fitoremediyasyon teknolojisinin gelişimi için son derece önemlidir.

Hiperakümülatör bitkilerin bulunması, kirlenmiş alanların temizlenmesinde bu bitkilerin genetik bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Hiperakümülatör bitkilerin ağır metal gibi kirleticileri başarılı bir şekilde ortadan kaldırabilmek için geniş bir kök sistemine ve yüksek bir biyokütleyle sahip olmaları remediyaşyonun başarısı açısından çok önemlidir. Bu bitkilerin küçük boyutlara ve düşük büyüme oranlarına sahip olmaları ise fitoremediyasyon potansiyelini olumsuz etkilemektedir (Tong ve diğ., 2004). Bu dezavantajları ortadan kaldırmak için klasik ıslah yöntemleri kullanılarak yavaş büyüyen ve düşük biyokütleli bitkilerden yüksek biyokütleli çeşitlerin geliştirilmesi temel alınmıştır (Li ve diğ., 2004). Günümüzde ise klasik ıslah yöntemleri veya transgenik teknolojiler kullanılarak bitkilerin fitoremediyasyon için kapasitelerinin arttırılması hedeflenmiştir. Özellikle, Arabidopsis genom projesinin tamamlanmasından sonra diğer birçok bitkinin genom taraması yapılabilmiş ve ağır metal homeostazisi ve birikimi ile ilişkili birçok gen tespit edilmiştir (Dhankher ve diğ., 2002). Bununla birlikte, mikroçip teknolojisi kullanılarak aynı anda binlerce farklı genin anlatım seviyelerinin saptanmasını mümkün kılan cDNA mikroarray tekniğı ile metal birikiminden sorumlu çok sayıda gen belirlenebilmiştir (Weber ve diğ., 2004; Hu ve diğ., 2005; Chiang ve diğ., 2006). Elde edilen bu veriler doğrultusunda metal alınımlı, taşınımı ve birikiminin anlaşılması sağlanarak fitoremediyasyon kapasitesi yüksek transgenik bitkilerin geliştirilmesi mümkün olabilir (Baker ve diğ., 2000; Salt ve Kramer, 2000). Ayrıca, doğal metal hiperakümülatör bitkilerde yapılan metal alınımlı, taşınım, birikim ve tolerans mekanizmalarının kritik analizleri, metal bağlayıcı protein veya peptitlerin sentezinden sorumlu genlerin teşhisine önemli katkılar sağlayacaktır.

Bu tez kapsamında *Brassica nigra*'ya (*B. nigra*) ait 3 farklı ekotipte bakır stresiyle ilişkili bazı genlerin anlatımsal profillemesi çalışılmıştır. Çalışmalarda bitki materyali olarak, bakır madeni yataklarında yaşamını sürdürebilen ve gelişmiş kök sistemine

sahip bir kara bitkisi olması nedeniyle *Brassica nigra* (kara hardal) kullanılmıştır. Diyarbakır Ergani maden yataklarından toplanan Türkiye kökenli ekotiple, yurtdışından getirilen ve Etiyopya kökenli olan CGN06625 ve CGN06626 ekotipleri Cu toleransı bakımından birbiriyle karşılaştırılmıştır. Bitkilerde eser miktarda bulunmasıyla birçok fizyolojik olayda önemli rol oynayan fakat fazlası bitkiye toksik etki eden Cu elementi, *B. nigra* ekotiplerine farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 μM CuSO_4), hidroponik ortamda uygulanmıştır. 72 saat sonunda hasat edilen her üç ekotipe ait kök, gövde ve yaprak dokularının içerdiği Cu miktarı, hassas bir ölçüm yapılmasını sağlayan ICP-OES ile tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan istatistiksel analizlerle elde edilen sonuçların kendi içerisinde anlamlı olup olmadığı karşılaştırılmıştır.

Fizyolojik çalışmalar sonrasında, bakır iyonu ile ilişkili genlerin belirlenebilmesi için düşük konsantrasyonda Cu uygulaması yapılan *B. nigra* kök dokusuna ait mikroarray analiz sonuçları değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda kök dokusunda farklı anlatım yapan genler temel alınarak detaylı gen anlatım çalışmalarına başlanmıştır. Mikroarray analizinde ticari olarak *Brassica nigra*'ya ait gen çipleri bulunmadığı için aynı familyadan *Arabidopsis* bitkisine ait gen çipleri kullanılmıştır. Analiz sonucunda ağır metal metabolizması ile ilişkili olduğu düşünülen genlerin metal metabolizmasındaki rollerinin daha iyi anlaşılabilmesi için daha güvenilir ve güçlü ifade düzeyi nedeniyle kantitatif RT-PZR yöntemi tercih edilmiştir. Bu yöntem kullanılarak, farklı konsantrasyonlarda Cu uygulaması yapılan *B. nigra*'ya ait 3 ekotipin kök, gövde ve yapraklarında ağır metal stresiyle ilişkili olduğu düşünülen 8 genin mRNA seviyesindeki anlatım değişiklikleri detaylı olarak incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, ağır metallerin topraktan köklere alınımı veya dışarıya atılması, taşınması, depolanması veya detoksifikasyon mekanizmalarının fizyolojik ve moleküler seviyelerde irdelenerek aydınlatılmasına yönelik çalışmalara önemli bir kaynak oluşturacaktır. Böylece, bu çalışmanın fitoteknolojik yaklaşımların geliştirilmesine de katkıda bulunması beklenmektedir. Bu yaklaşımlar uzun vadede, kirlenmiş suların ve tarımsal alanların iyileştirilmesinde etkili ve çevre sağlığına dost çözümler sunacaktır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. TOPRAKTA AĞIR METAL KİRLİLİĞİ VE BİTKİLER

Yirminci yüzyılın başından itibaren modern tarım yöntemlerinin kullanılması ve sanayileşmenin giderek yaygınlaşması ile birlikte hızla artan dünya nüfusu gibi etkiler ekosistemler ve doğal kaynakların büyük ölçüde tahrip edilerek kirlenmesine neden olmuştur. Bunun sonucu olarak da günümüzde toprak ve su kirliliği büyük bir çevre sorunu haline gelmiştir. Ülkemizde ise, özellikle işlenebilir ve tarıma açılabilir toprak kaynaklarının azalması nedeniyle toprak ve su kirliliği en önemli çevre sorunlarının başında gelmektedir (Türkoğlu, 2006). Ancak, kirlenmiş alanların iyileştirilmesi konusunda ülkemizde yapılan çalışmalar, bu konuda daha bilinçli ülkelere göre oldukça geri kalmıştır.

Toprağın kirlenmesine neden olan kirleticiler genellikle makro ve mikro kirleticiler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Asit depoları, fosfor ve azot gübreleri gibi makro kirleticiler toprağa bırakılmış ya da toprakta kendiliğinden mevcut olabilir. Mikro kirleticiler ise toprakta genellikle eser miktarda bulunan kirleticilerdir. Pestisitler ve pestisit olmayanlar şeklinde organik kirleticiler ve radyoaktif maddeler, ağır metaller ve tuzları şeklinde inorganik kirleticiler mikro kirleticilere örnek olarak verilebilir (Tarradellas ve Bitten, 1997). Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA)'nın hazırladığı 129 tane öncelikli çevre kirleticileri arasında yer alan ağır metaller, toprak kirliliğinde yoğun kirletici kaynaklar arasında yer almaktadır (Özay ve Mammadov, 2013). Topraklardaki ağır metaller çeşitli kaynaklardan çevreye yayılmakta ve ağır metal kirliliğinin giderek artmasıyla dünya çapında önemli bir problem halini almaktadır (Goyer, 1991).

“Ağır metal” deyimini atom yoğunluğu 5 g/cm^3 ün üzerinde ve atom numarası 40'dan büyük olan elementler için tanımlanmaktadır (Duffus, 2002). Yeryüzünde doğal olarak varolan 90 tane elementten 53'ü ağır metal olmasına rağmen bunların hepsi biyolojik öneme sahip değildir. Bazı elementlerin bitkilerin gelişmesi için iz miktarlarda mutlaka gerekli olduğu belirlenmiştir. Bakır (Cu), demir (Fe), nikel (Ni), çinko (Zn), mangan

(Mn) ve molibden (Mo) bitkilerin iz miktarda ihtiyaç duyduğu ağır metaller arasındadır. Bunun yanında alüminyum (Al), vanadyum (V), arsenik (As), civa (Hg), kurşun (Pb), kadmiyum (Cd) ve selenyum (Se) gibi bazı ağır metaller ise toksik etkili olmasına rağmen bitkiler tarafından alınmaktadır. Bitki için mutlak gerekli olmayan bu ağır metallerin biyolojik işlevleri tam olarak bilinmemektedir. İz miktarda bitki tarafından alınan ağır metaller ise özellikle enzimatik yollarla yer almaktadır. Bitki gelişimi için mutlak gerekli element olsun veya olmasın ağır metallerin topraktaki aşırı konsantrasyonları bitkiler üzerine toksik etki yapabilir (Fernandes ve Henriques, 1991; Athar ve Ahmad, 2002; Inoue, 2013). Ağır metallerin özellikle doku ve organlardaki aşırı birikimi bitkilerin vejetatif ve generatif organlarının gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir. En önemli inorganik mikro kirletici olan ağır metallerin çevreye yayınımları doğal süreçlerden ya da endüstriyel faaliyetler gibi daha çok insanın neden olduğu etkilerden (antropojen etki) kaynaklanmaktadır. Ağır metal iyonları maden yatakları ve işletmeleri, enerji ve yakıt üretimi, tarımda kullanılan aşırı pestisit ve gübre kullanımı, motorlu taşıtların egzozları gibi endüstriyel aktiviteler sonucu, volkanik faaliyetler ve seller gibi doğal kaynaklı veya kentsel atıklar gibi insan kaynaklı etkilerle çevreye hızlı bir şekilde yayılmaktadır. Bu yollarla ekosistemlerin toprak, su ve hava gibi ortamlarında yaygın bir şekilde birikmeye başlayan ağır metaller, besin zinciri nedeniyle bitkilerden hayvanlara ve sonrasında insanlara geçerek dünya yüzeyindeki tüm organizmaların yaşamını tehdit eden önemli bir çevre sorunu haline almıştır.

Son yıllarda topraktaki ağır metal kirliliği üzerine yapılan başlıca çalışmalar; ağır metallerin kaynakları, yayılış şekilleri, çevre üzerine etkileri, kirlenmiş bölgelerin araştırılması ve bu bölgelerin temizlenmesi için kullanılan iyileştirme teknikleri, risk değerlendirmesi gibi konulardır (Köseoglu, 2007). Dünya genelinde yapılan çalışmalara bakıldığında ise araştırmalar özellikle ağır metallerin bitkiler ile olan etkileşimleri üzerine yoğunlaşmıştır. Bu metallerin doğrudan ya da dolaylı olarak bitkiye olan toksik etkileri ise üzerinde çalışılan en önemli konudur (Athar ve Ahmad, 2002).

Toprakta belli bir konsantrasyonun üzerinde bulunan ağır metaller, bitki gelişimi ve özellikle metabolizması üzerinde çeşitli toksik etkiler göstermektedir (Dietz, 1999; Hagemeyer, 1999; Cuypers ve diğ., 2009). Bu etkiler, mineral beslenme, fotosentez, terleme, enzim aktivitesi, nükleik asit ve klorofil biyosentezi ile çimlenme gibi bitkide

bazı canlılık olaylarının değişmesine sebep olan çeşitli büyüme süreçlerinde kendini gösterir (Assche ve Clijsters, 1990; Saradhi, 1991; Vajpayee ve diğ., 2000; Küpper ve diğ., 2002). Ayrıca, hormon dengesinin bozulması, su ilişkisinin değişmesi ve membranlarda hasar gibi fizyolojik olaylarda da etkilidir (Kennedy ve Gonsalves, 1987). Ağır metallerin bitkiye alındıktan sonra metabolizma üzerindeki toksik etkileri çok farklı şekillerde olabilir. Örneğin; lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi biyomoleküller üzerinde çeşitli oksidatif hasara neden olabilirler. Özellikle Pb, Hg ve Fe gibi bazı zehirli metaller enzimlerle kompleks oluşturup, bu enzimlerin biyokimyasal aktivitelerini inhibe edebilir ve böylece protein sentezi veya yapısında farklı oluşumlara neden olabilirler. Cu ve Fe gibi metallerin aşırı birikimi ise, hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikalleri ($OH^\cdot$) vb. süperoksit radikallerin ($O_2^\cdot$) oluşumuna neden olabilir. Ayrıca, temel elementlerin yerini alarak toksik etki gösterebilir (Dietz ve diğ., 1999; Michalak, 2006; Yadav, 2010).

2.1.1. Ağır metallere karşı bitki türlerinin değişen toleransı

Günümüzde ağır metallerle ilgili yapılan birçok araştırmadan elde edilen bulgulara göre, toprakta aşırı miktarda birikmiş olan ağır metallerin çevreye verdiği zararın ne kadar olduğunu kesin olarak belirlemek çok zordur. Özellikle bazı ağır metallerin bitkiler için gerekli besin olduğu düşünüldüğünde bu maddelerin bitkiler için zararlı olabilecek sınır değerleri bitki türüne göre değişiklik göstermektedir. Ayrıca, toprağın pH'ı, içeriği, toprakta bulunan diğer elementlerin bileşik yapıda bulunup bulunmadığı, ağır metalin tipi, konsantrasyonu, çözünürlüğü, hücre içine taşınması gibi birçok etmen ağır metallerin toksik hale dönüşmelerinde rol oynamaktadır. Toksik etkiler yalnızca toprağın özelliğine veya elementin tipine bağlı olmayıp bitki türünün genetik kaynaklı fizyolojik özelliklerine göre de farklılık gösterebilir. Dolayısıyla bitki türlerinin ağır metallere karşı toleransı bu nedenlerden dolayı değişiklik göstermektedir. Bazı bitki türleri, çok az yoğunluktaki ağır metallerden zarar gördükleri halde, bazıları hiç zarar görmeden bünyelerinde bol miktarda ağır metal biriktirebilir (Baker, 1981).

Metalli topraklar farklı bitki türleri üzerinde değişik etkiler göstermektedir. Metal konsantrasyonu yüksek olan topraklarda bitkiler metal alımıyla ilgili çeşitli tolerans mekanizmaları geliştirmişlerdir. Baker ve Walker (1990) bu mekanizmalara göre

bitkileri, metal toleranslı, metal indikatör ve metal akümülatör bitkiler olmak üzere 3 ana gruba ayırmıştır;

1) Metale toleranslı bitkiler: Bu bitkilerde topraktaki metallerin alınımı ve/veya köklerden toprak üstü organlara metal taşınımı sınırlıdır. Bu nedenle toprak üstü organlarında bulunan metal konsantrasyonu topraktakine göre düşüktür. Boularbah ve diğ. (2006) toleranslı bitkileri, köklerindeki ağır metal miktarı yüksek, gövde/kök oranı ise 1'den düşük olan bitkiler şeklinde tanımlamıştır. Köklerinde büyük miktarlarda metali kontrol altında tutan bu gruba ait birçok bitki türü rapor edilmiştir (Baker ve Walker, 1990). *Oenothera biennis*, *Commelina communis*, *Silene maritima*, *Agrostis stolonifera* L. ve *Silene vulgaris* bu türlere örnek olarak verilebilir. Ayrıca *Salix*, *Populus* ve *Pinus radiata* gibi türler de metale toleranslı odunsu bitkilerdendir (Wei ve diğ., 2005; Maestri ve diğ., 2010; Mehes-Smith ve diğ., 2013).

2) Metal indikatör bitkiler: İndikatör bitkiler, akümülatör bitkilere benzer bir şekilde gövde, yaprak gibi toprak üstü organlarında metali biriktirebilirler. Fakat farklı olarak bitkinin toprak üstü organlarındaki metal konsantrasyonu topraktaki metal konsantrasyonundan daha düşüktür (Baker ve Walker, 1990). İndikatör bitkilerin, toprak üstü organlarında biriktirdikleri metallerin miktarı toprakta bulunan metal miktarının yansıması şeklindedir (Mehes-Smith ve diğ., 2013). Ancak, topraktaki ağır metal alımının devam etmesi bir süre sonra bitki türünün ölmesine neden olur. Biyolojik ve ekolojik önemi olan bu bitkilerden *Populus alba*, en iyi bilinen Cd ve Zn indikatörüdür (Madejon ve diğ., 2004).

3) Metal akümülatör bitkiler (Hiperakümülatörler): Bazı bitkiler ağır metal detoksifikasyonu ile ilişkili potansiyel mekanizmalara sahip olup, metal stresi altında canlılıklarını sürdürebilmektedir. Bu gruba giren bitkiler ağır metalleri, herhangi bir toksisite belirtisi göstermeksizin toprakta bulunan metal miktarına göre daha fazla miktarda metali toprak üstü organlarında biriktirebilmektedir (Maestri, 2012). “Hiperakümülatörler” olarak adlandırılan bu bitkiler, çok yüksek seviyelerdeki kirleticileri, diğer bitki türlerine göre 100-1000 kat daha fazla miktarda kök, gövde ve/veya yapraklarında absorbe edebilmektedir (Salt ve diğ., 1998). Bazı bitkiler sadece bir metale özgünken bazıları birden fazla metali akümüle etme yeteneğine sahiptir (Almas ve diğ., 2009; Mganga ve diğ., 2011).

Akümülatör bitkilerle ilgili çeşitli tanımlamalar yapılmış olup, bir bitkinin hiperakümülatör olarak adlandırılabilmesi için aşağıda belirtilen özelliklere sahip olması gerekmektedir;

- a) Gövdedeki ağır metal miktarının kökteki ağır metal miktarına bölümü 1'den büyükse (gövde/kök > 1),
- b) Gövdedeki ağır metal miktarının topraktaki toplam ağır metal miktarına bölümü 1'den büyükse (ekstraksiyon katsayısı > 1) (Harrison ve Chirgawi, 1989; Rotkittikhun ve diğ., 2006; Mehes-Smith ve diğ., 2013),
- c) Eğer bitki normal bitkilere göre (kontamine olmayan bitkiler-kontrol bitkileri) 10-500 kez daha fazla ağır metal akümüle ediyorsa (Allen, 1989; Fifield ve Haines, 2000),
- d) 100 mg/kg'dan fazla Cd, 1000 mg/kg Cu, Pb, Ni, Cr; veya 10000 mg/kg'dan fazla Zn akümüle ediyorsa (Brooks, 1998; Ernst, 2006; Mganga ve diğ., 2012) hiperakümülatör bitki olarak tanımlanabilir.

Günümüzde kök, gövde ve/veya yaprak gibi dokularında metali akümüle edebilen 45 familyaya ait yaklaşık 450 hiperakümülatör tür tanımlanmış olup bunların çoğunluğu Brassicaceae familyasına aittir (Reeves ve Baker, 2000; Pal ve Rai, 2010). Bu hiperakümülatör bitkilerin büyük çoğunluğunu, en az 317 türle Ni hiperakümülatörleri oluşturmaktadır. Bu türler toprak üstü organlarında % 0,1-1 oranı arasında Ni içerirler ve esas olarak serpantin topraklarda bulunurlar. Zn hiperakümülatörleri, bilinen sadece 15 tür olmasına rağmen, hiperakümülatörlerin ikinci büyük grubunu oluşturur (Brooks, 1994). Bu akümülatörler esas olarak Pb, Zn ve Cd ile kirlenmiş kireçli topraklarda bulunmaktadır. Bununla beraber kirlenmiş başka alanlarda da bazı Zn akümülatörlerine rastlanmıştır (Schat ve diğ., 2000; Bert ve diğ., 2002).

Brassicaceae familyasında en iyi bilinen iki cins *Alyssum* ve *Thlaspi*'dir. *Thlaspi* türleri gövdelerinde %3'ten fazla Zn, %0,5'ten fazla Pb ve %0,1'den fazla Cd biriktirebilirler. Ayrıca, *Arabidopsis halleri* biyokütlesinin üstünde, %1'den fazla Cd ve Zn biriktirebilir. Yine *Alyssum* türleri hasat edilebilir organlarında %1 üzerinde Ni biriktirebilir (Di Baccio ve diğ., 2011). Bunların dışında Euphorbiaceae, Asteraceae, Lamiaceae ve Scrophulariaceae familyalarına ait hiperakümülatör türler de vardır.

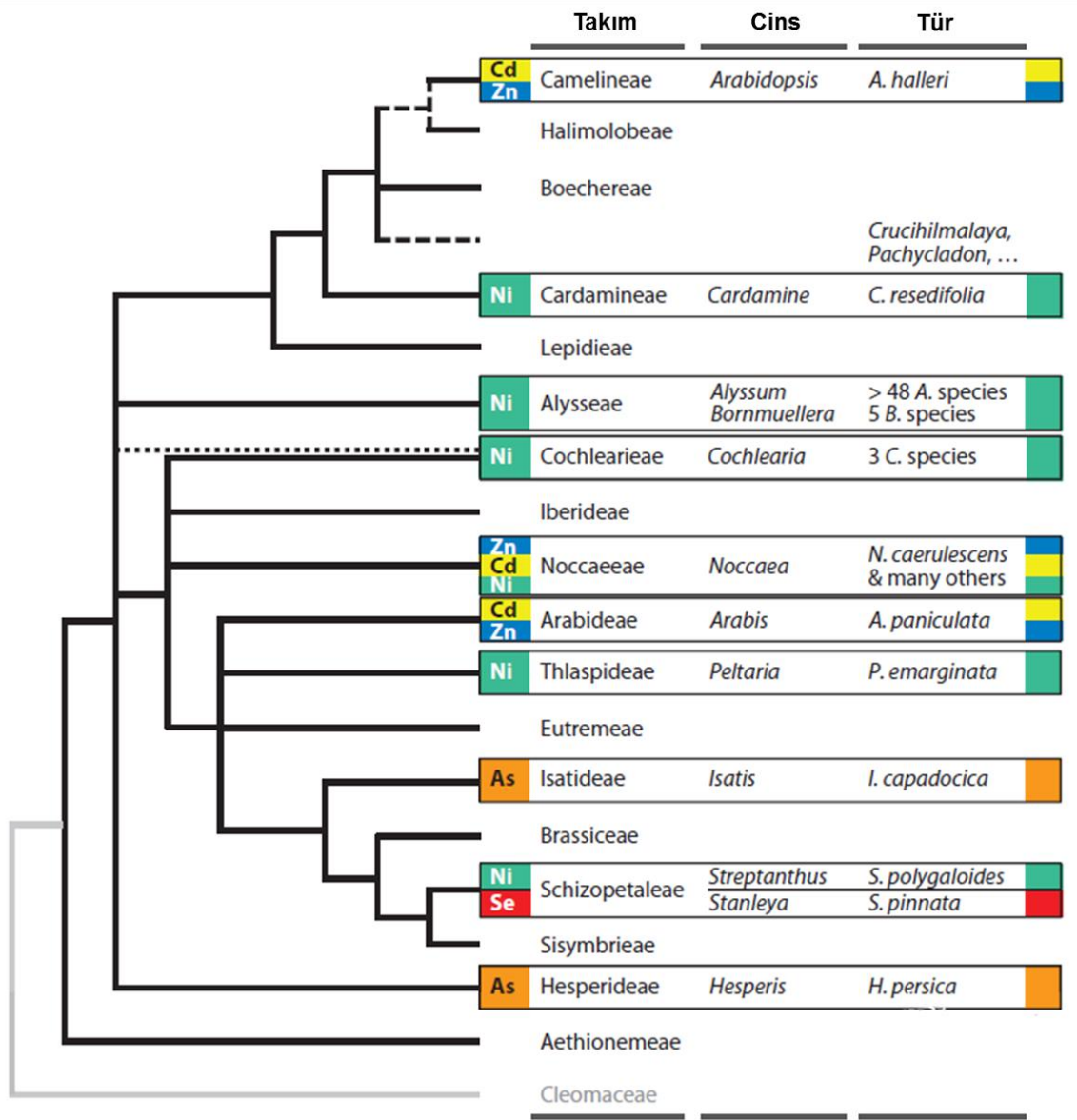
Metalleri akümüle etme yeteneği familyalar, türler ve populasyonlar arasında farklılık gösterir. Örneğin; *Arabidopsis halleri* Cd ve Zn akümülatörü iken *Arabidopsis thaliana* metale karşı toleranslıdır ve metallerin alınımı sadece köklerle sınırlıdır (Ernst, 2006).

Yüksek konsantrasyonlarda metal akümüle etme yeteneği bakır (Cu), demir (Fe), çinko (Zn) ve selenyum (Se) gibi esansiyel metaller ile kadmiyum (Cd), civa (Hg), kurşun (Pb), alüminyum (Al) ve arsenik (As) gibi esansiyel olmayan metallerle çalışılmıştır (Salt ve diğ., 1998; Meagher, 2000; Clemens, 2001; Guerinot ve Salt, 2001; Clemens ve diğ., 2002; Hall, 2002; McGrath ve Zhao, 2003).

2.1.2. Brassicaceae’de Hiperakümülatör Bitkiler

Hardalgiller olarak bilinen Brassicaceae, birçok ağır metali akümüle edebilen türlere sahip olduğu için “Metalofit Familyası” olarak da tanımlanır. Bu familya, özellikle çinko ve kadmiyum, aynı zamanda nikel, talyum, krom ve selenyum gibi ağır metalleri akümüle edebilen çeşitli türler içermektedir. Farklı ağır metalleri akümüle edebilme yeteneği, Brassicaceae’de metal hiperakümülasyonu özelliğinin ne kadar geniş çapta olduğunu göstermektedir (Şekil 2.1) (Francesconi ve diğ., 2002; Koller ve diğ., 2007; Karimi ve diğ., 2009).

Bitkilerde, metal hiperakümülasyonu birçok kez evrim geçirmiştir. Evrimsel süreçteki farklılıkların Brassicaceae familyasında tekrarlanma sıklığı diğer familyalara oranla daha yüksektir (Şekil 2.1). Yakın gelecekte, farklı Brassicaceae türlerinde gözlenen ve birbirinden bağımsız oluşan metal hiperakümülasyonunun evrim süreci bulgularını ve bunların sonucu oluşan genomik değişiklikleri karşılaştırmak mümkün olacaktır. Bu nedenle, metal hiperakümülatörleri adaptasyonunun karşılaştırmalı genomik analizlerinde bu familyaya ait hiperakümülatör türler önemli model oluşturmaktadır. Özellikle *Thlaspi* ve *Brassica* cinslerinin fitoremediyasyon teknolojisinde model olarak kullanılması, ağır metal birikiminin moleküler mekanizmasının aydınlatılmasında oldukça etkili olmuştur (Krämer, 2010).



Şekil 2.1: Brassicaceae familyasında takım düzeyinde metal birikimi yapan türlerin mevcut hipotez üzerine filogenetik ilişkileri (Kramer 2010'dan alınmıştır).

Koch (2009) tarafından çizilen ağaç, Kramer (2010) tarafından yeniden daha basit bir şekilde düzenlenerek Brassicaceae familyasındaki filogenetik ilişkiler ayrıntılarıyla incelenmiştir (Şekil 2.1). Odontarrhena (Brassicaceae) familyası, yüksek oranda ağır metal akümüle edebilmesi nedeniyle çevre açısından son derece önemlidir. Örneğin, her biri Ni hiperakümülatörü olduğu bilinen türlerin yaklaşık %25'ini içeren Euphorbiaceae ve Brassicaceae familyaları Ni hiperakümülatörlerinin büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. Brassicaceae'de *Alyssum* türlerinin neredeyse tamamı Ni hiperakümülatörüdür (Mengoni ve diğ., 2012). *N. caerulescens* ve *N. praecox* ise hem

Zn hem de Cd hiperakümülatörü *Noccaea* türleridir (Reeves, 2000; Vogel-Mikus, 2005).

Noccaea türlerine ek olarak en az 4 Zn hiperakümülatörü tür bulunmaktadır. *N. caerulescens*, *N. goesingense* ve en az 21 ek *Noccaea* taksonu ile birlikte Ni hiperakümülatörleri kabul edilir. Şekil 2.1' deki filogenetik ilişkiye bakıldığında Ni hiperakümülatörünün Brassicaceae'de, birbirinden bağımsız bir şekilde en az 6 kere evrimleştiği görülmektedir (Krämer, 2010).

Ayrıca, bilinen 15 adet Zn akümülatörünün büyük çoğunluğu Brassicaceae familyasına aittir. Zn hiperakümülatör türler genellikle antropojenik olarak kirletilmiş tarihi ve günümüzde hala kullanılmakta olan maden bölgelerinde saptanmıştır. Bu türlerin bazıları aynı zamanda, kimyasal yapısı Zn ile benzerlik gösteren Cd ve/veya Pb hiperakümülatörü olarak da rapor edilmiştir. Bu metaller, minerallerde çoğunlukla birlikte oluşmakta ve Zn ile Cd hiperakümülatör ve hipertolerans mekanizmalarında ortak lokus setler bulunmaktadır (Courbot ve diğ., 2007). Yine, Arsenik (As) hiperakümülatörü, birkaç eğreltiotu türü dışında Brassicaceae türlerinden sadece iki tanesinde gözlenmiştir (Karimi ve diğ., 2009).

2.1.3. Metal Birikiminde Model Bitkiler

2.1.4.1. *Arabidopsis halleri*

Arabidopsis halleri, ağır metal toleransı ve birikimi çalışmaları için kullanılan model bir bitki olup en iyi bilinen Zn/Cd hiperakümülatörüdür. Kirletilmemiş ve metal içeren topraklarda bulunan tüm *A.halleri* alt türleri ve populasyonlarının yapısal olarak Zn ve Cd hiperakümülatörü özelliğini barındırdıkları kabul edilmektedir. Doğal populasyonların %16 - 40'ı yaprak kuru biyokütlesinde, 10 000 $\mu\text{g/g}^{-1}$ 'dan yüksek Zn konsantrasyonuna sahiptir (Bert ve diğ., 2002). Aynı türde gözlenen farklılıklar incelendiğinde, Cd konsantrasyonunun Zn konsantrasyonuna oranla daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu populasyonun, kirletilmemiş topraklarda yetişen ve Cd konsantrasyonu 1 $\mu\text{g/g}^{-1}$ kuru toprak kütlesi limitinden düşük olan birkaç temsilcisi dahil, %10-33 arası değişen kısmı 100 $\mu\text{g/g}^{-1}$ 'dan yüksek seviyede hiperakümülatör özelliği taşımaktadır (Bert ve diğ., 2002; Krämer, 2010). Yapılan kök hücre uzaması tolerans testlerine göre, *A. halleri* bitkilerinin *A. thaliana* ve *A. lyrata* ile

karşılaştırıldığında, hidroponik ortamlarda en az 76 kat daha fazla Zn ve 8 kat daha fazla Cd tolere edebildikleri belirlenmiştir (Bert, 2003; Willems, 2007).

2.1.4.2. *Thlaspi caerulescens* (*Nocca caerulescens*)

Arabidopsis thaliana ile yakın ilişkili olan *Thlaspi caerulescens*, Brassicaceae ailesinin bir üyesi olup ağır metal birikimi çalışmaları için çok iyi bir model bitkidir. Toksikite belirtisi göstermeden yüksek seviyede çinko, nikel ve bazen kadmiyum biriktirebilme yeteneği nedeniyle birçok inceleme ve çalışmaya konu olmuştur (Küpper ve diğ., 2001; Milner ve Kochian 2008). Daha çok Zn akümülatörü olarak bilinen *Thlaspi caerulescens* ile yapılan çalışmalar sonucunda, kirli topraklarda ya da metal içeriği yüksek besin çözeltilerinde yetişen sağlıklı bitkilerde, 30 000 $\mu\text{g/g}^{-1}$ (KA) Zn, 14 000 $\mu\text{g/g}^{-1}$ (KA) Cd ve 4 700 $\mu\text{g/g}^{-1}$ (KA) Ni birikimi rapor edilmiştir (Assunção ve diğ., 2001; Klein, 2007). Yılda iki kere kendi döllen bu tür, $2n=14$ kromozomlu diploit olup, kodlama bölgesinde yaklaşık %88 ortak nükleotit dizilimi bulunan *A. thaliana*'ya oranla yaklaşık iki kat daha büyük genom boyutuna (2C) sahiptir (Rigola ve diğ., 2006). Bütün hiperakümülatörlerde olduğu gibi, *Thlaspi caerulescens*'in gövdesinde içerdiği Zn, Cd ve Ni konsantrasyonu kök dokusuna oranla genellikle daha yüksektir (Van de Mortel, 2007).

2.1.4.3. *Brassica juncea*

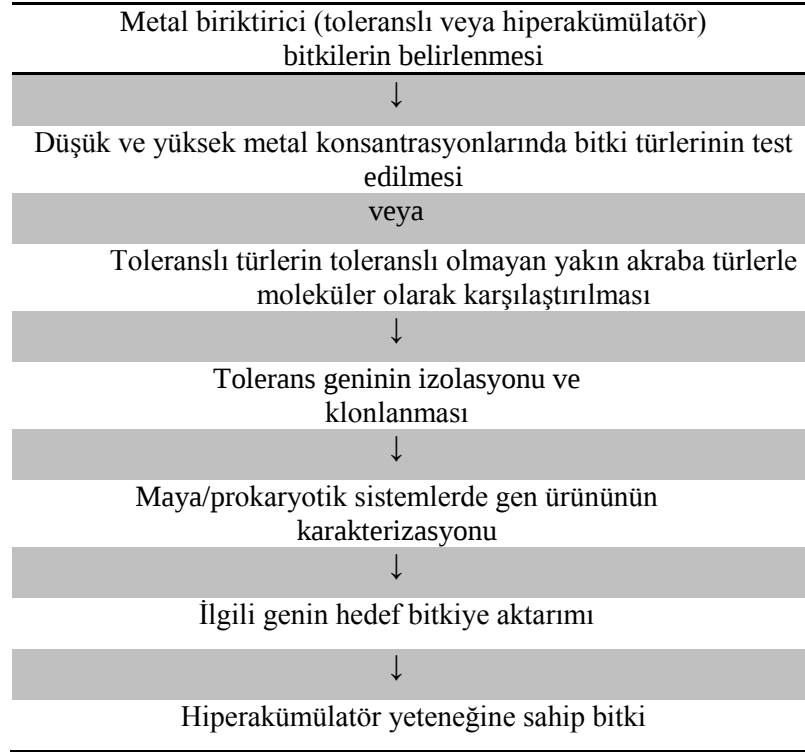
Brassicaceae familyasında metal akümüle eden türlerden biri de “kahverengi hardal” olarak bilinen *Brassica juncea*'dır. *Brassica juncea* L. sahip olduğu yüksek biyokütle nedeniyle (diğer hiperakümülatörlere göre en azından 10 kat daha fazla), ağır metalle kirlenmiş topraklarda bile hızla büyüeyebilen bir bitkidir. Gelişmiş bir kök sistemine sahip olan bu bitki özellikle Pb, Cd ve Zn gibi ağır metalleri akümüle etme yeteneğine sahiptir (Minglin ve diğ., 2005; Anjum ve diğ., 2008; John ve diğ., 2009). Ayrıca, As ağır metaline karşı da akümülatör özellik gösterdiği rapor edilmiştir (Gupta ve diğ., 2009). Bu metalleri topraktan kökler yardımıyla aldıktan sonra toprak üstü organlarına taşımaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda, *B. juncea*'nın gövdesinde 400 $\mu\text{g/g}^{-1}$ (KA) Cd birikimi belirlenmiştir (Haag-Kerwer ve diğ., 1999). *B. juncea*'nın, Cd elementinin 100 ppm gibi alt ve 250 ppm'den fazla uç düzeylerinde bile gelişimine devam ettiği belirlenmiştir (Singh ve Tewari, 2003).

2.2. FİTOREMEDİYASYON

Toprakta çeşitli nedenlerle oluşan kirliliğin en uygun şekilde temizlenmesi, kontrol altına alınması zaman ve maliyet açısından büyük önem taşımaktadır. Bunun için kirlilik oranının, buna neden olan makro ya da mikro kirleticilerin ve bunların oluşturduğu risklerin belirlenmesi gerekmektedir. Özellikle sanayileşmenin etkisiyle giderek artan ağır metaller gibi kirleticiler günümüzün önemli bir çevre problemi haline gelmiştir (Sovljanski ve diğ., 1989; EPA, 2000). Bu kirleticilerin besin zinciri yoluyla hayvanlar ve özellikle insan sağlığı açısından oluşturduğu tehlikelerin önlenmesi için birçok yöntem geliştirilmiştir. Ancak, maliyetin yüksek olması, arıtma sonucunda ortaya çıkan diğer kirletici formların gideriminin tamamen sağlanamamasından dolayı biyoremediyasyon gibi alternatif teknolojiler ortaya çıkmıştır. “Biyoremediyasyon (Biyolojik İyileştirme)” son yıllarda çevre kirliliğinin ortadan kaldırılması çalışmalarında çok önem kazanan bir yöntem olmuştur. Gerek karasal ya da sucul habitatların kirlenmesini önlemek amacıyla kullanılmakta olan arıtım teknolojileri ve gerekse kirlenmiş habitatların temizlenmesini sağlayan biyolojik iyileştirme teknolojileri olarak tanımlanan biyoremediyasyon, temelde fiziksel, kimyasal ve ağırlıklı olarak biyolojik süreçlerin kullanımıyla geliştirilmiş teknolojilerdir (Utsunomyia, 1980; Chaney, 1983; Baker ve ark., 1990; Wenzel, 2009). Bu fizikokimyasal ve mühendislik yaklaşımlarına göre çevreye uygun ve daha ucuz metotlardan biri de bitkilerin kullanılmasıdır. Günümüzde bitkiler, çevre kirliliğini ortadan kaldırmak için yüksek maliyetli teknolojilerin yerine ekonomik, birçok toprak türünde uygulanabilir, tahrip edici özelliği olmayan ve çevre dostu doğal bir yöntem olarak biyoremediyasyon çalışmalarında kullanılmaya başlanmış ve bu yöntemler “Fitoremediyasyon Teknolojisi (Bitkisel Arıtım)” veya “Fitoteknolojiler” olarak adlandırılmıştır (EPA, 2000; Karenlampi ve diğ., 2000; Mulligan ve diğ., 2001; McIntyre, 2003; Erakhrumen ve Agbontalor, 2007). “Yeşil Islah” olarak da adlandırılan bu arıtım şekli 1991 yılında hayatımıza girmiş olup hızla gelişmekte olan bir teknolojidir (Vanlı, 2007). İlk uygulamaları yapay sulak alanlar ve petrol döküntü alanlarında yapılan bu teknolojinin, günümüzde kullanımı daha geniş bir alana yayılmıştır (EPA, 2000).

Bazı bitkiler ağır metal detoksifikasyonu ile ilişkili potansiyel mekanizmalara sahip olup, metal stresi altında canlılıklarını sürdürebilmektedir. Bu nedenle fitoremediyasyon tekniğinde çevresel kirleticileri absorbe edebilen, dokularında yüksek seviyelerde biriktirebilen (hiperakümülatör) ve fiziksel, kimyasal ve biyolojik süreçler aracılığıyla detoksifiye edebilen bitkilerin kullanımı tercih edilmektedir. Ancak, teşhis edilen hiperakümülatör bitkilerin çoğunun hem düşük biyokütleyle sahip olması hem de olumsuz çevre koşullarına adapte olamamasından dolayı bu teknolojinin kullanılmasında bazı sınırlamalar ortaya çıkmıştır (Tong ve diğ., 2004). Bu sınırlamaların ortadan kaldırılması ve bu teknolojinin daha verimli kullanılabilmesi için bitkilerdeki metal hiperakümülasyonu ile ilişkili mekanizmaların iyi bir şekilde anlaşılması gerekmektedir. Bu amaçla yüksek biyokütleli çeşitlerin geliştirilmesi için klasik ıslah yöntemleri kullanılmaktadır (Li ve diğ., 2004). Günümüzde ise Arabidopsis genom projesinin tamamlanması ve birçok bitkinin genom taraması sonucu ağır metal homeostazisi ve birikimi ile ilişkili olan bir dizi gen belirlenmiştir (Dhankher ve diğ., 2002). Bütün bu bilgiler ışığında istenilen özelliklere sahip fakat akümülatör olmayan bitkilerin, genetik mühendisliği aracılığıyla akümülatör bitkilerin bazı özelliklerini taşımaları sağlanabilir (Bennett, 2003). Bu nedenle, metal alınımı, taşınımı ve birikiminin genetik ve biyokimyasının anlaşılması fitoremediyasyon kapasitesi yüksek transgenik bitkilerin geliştirilmesine katkıda bulunacaktır (Baker ve diğ., 2000; Salt ve Kramer, 2000).

Tablo 2.1’de fitoremediyasyon yeteneğine sahip hiperakümülatör bitkilerin elde edilmesi için izlenmesi gereken strateji verilmiştir. Temeli bu stratejiye dayanan transgenik teknolojiler kullanılarak metal şelatlayan maddelerin aşırı üretiminin sağlanmasıyla, sitoplazmada metallerin daha fazla detoksifiye edilmesi ve toksik iyonların daha az toksik formlara dönüştürülmesi hedeflenmektedir. Ayrıca, ilgili metal taşıyıcı proteinlerin aşırı anlatımı sağlanarak bitkilerin metal birikim kapasitelerinin arttırılmasına yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Evans ve diğ., 1992; Lee ve diğ., 2003; Pilon, 2003; Van Huysen ve diğ., 2004).

Tablo 2.1: Fitoremediyasyon yeteneğine sahip bitkilerin elde edilme stratejisi

Toprakta bulunan birçok organik ve inorganik kirleticinin giderimi fitoremediyasyon yöntemi ile yapılmaktadır. Bitkiler tarafından akümüle edilebilen bu kirleticilere örnek olarak; bazı ağır metaller (Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn), radyonükleidler (90Sr, 137Cs, 239Pu, 238U, 234U), As, Se gibi metaloidler ve pestisit gibi diğer organik bileşikler verilebilir. Ancak, bir kirleticinin bitkiler tarafından topraktan alınabilmesi için öncelikle toprak şartlarıyla ilgili birçok parametrenin uygun olması gerekir. Özellikle toprağın pH'ı en önemli parametrelerden biridir. Bununla birlikte, bölgesel özellikler, fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörler, toprağın yapısı, tuzluluk ve kirleticilerin türü de önemli etkenler arasındadır (Özay ve Mammadov, 2013).

Fitoremediyasyonun, diğer metotlarla karşılaştırıldığında en büyük dezavantajı sürecin çok daha uzun olmasıdır. Ancak, hem ekonomik hem de ekolojik bir yöntem olması, uygulama esnasında özel bir donanım gerektirmemesi ve uygulanan bölgenin yeniden kullanılabilmesine imkan vermesi gibi avantajlara sahip olması nedeniyle günümüzde tercih edilen bir toprak ıslah yöntemidir. Özellikle de proteomik ve genomik teknolojiler kullanılarak fitoremediyasyon için aday gen veya proteinlerin bulunması, bitkilerdeki metal metabolizması ve metallerle kirlenmiş alanların remediasyonu için

yeni bitkilerin geliştirilmesi, fitoremediyasyon teknolojisine gösterilen talebi giderek arttırmaktadır (Cherian ve Oliveira, 2005) .

Fitoremediyasyon kapsamında kirleticilere ve temizleme için seçilecek bitki türüne göre farklı yöntemler bulunmaktadır. Fitoremediyasyon teknolojisi temel süreç ve uygulanabilirlik bakımından fitoekstraksiyon, fitodegradasyon, fitostabilizasyon, fitovolatilizasyon ve rizofiltrasyon gibi alt başlıklar altında incelenebilir (Pilon-Smits ve Pilon, 2000; Raskin ve Ensley, 2002; Rawat ve diğ., 2012).

2.2.1. Fitoekstraksiyon (Bitkisel Özümleme)

Fitoekstraksiyon, topraktaki metallerin hiperakümülatör bitkilerin kökleri tarafından alınması ve hasat edilebilen (gövde, yaprak vb.) toprak üstü organlarına taşınarak biriktirilmesidir (Lasat, 2002). Bu bitkiler bünyelerinde diğer bitkilere oranla 100-1000 kat daha fazla kirlilik etmeni biriktirme yeteneğine sahiptir. Bitki bünyesine alınan bu kirleticiler, bitkinin hasat edilmesi, budanması ya da sökülmesi ile uzaklaştırılabilmektedir. Hasat edilen kısımlar gübre olarak kullanılabileceği gibi, kirleticinin cinsine bağlı olarak bitkiler; yakılarak, kurutularak veya çürütülerek yok edilebilir. Ayrıca, daha çok ağır metallerle kirlenmiş topraklarda uygulanan bu teknoloji ile ağır metaller yeniden elde edilebilir. Özellikle işlenerek çıkarılması çok ekonomik olmayan maden cevherlerinin elde edilmesinde ABD gibi ülkelerde bu yöntemden yararlanılmaktadır. Altın ve nikel gibi elementler bu yolla geri kazanılmaktadır (EPA, 2000). Brassicacea, Euphorbiacea, Asteraceae, Lamiaceae ve Scrophulariaceae familyalarından yaklaşık 450 kadar tür bünyesinde ağır metal biriktirebilmektedir (Reeves ve Baker, 2000; Milner ve Kochian, 2008). Bu yöntemle topraktan alınan kirleticiler; Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, vb. bazı elementler, ⁹⁰Sr, ¹³⁷Cs, ²³⁹Pu gibi radyonükleidler, metal olmayanlar ve bazı organik kirleticilerdir (Tangahu ve diğ., 2011). Fitoekstraksiyon daha çok, ağır metallerle kirlenmiş toprakların iyileştirilmesinde uygulanmaktadır (EPA, 2000).

2.2.2. Fitodegradasyon (Köklerle Bozunum)

Fitotransformasyon olarak da bilinen bu yöntemde bitkiler tarafından alınan organik kirleticiler çeşitli metabolik yollardan geçerek, bitki tarafından üretilen enzim ve kofaktörlerin etkisiyle bozunur (Ji ve diğ., 2004; Newman ve Reynolds, 2004). Bu

uygulamanın başarısı kirleticilerin alımı için seçilen bitki türünün birikim yeteneğine bağlıdır. Daha sonra, alınan maddeler bitkinin metabolik döngüsündeki enzim kompleksleri ile CO₂ ve H₂O'ya ayrıştırılır. Bitki hücrelerinde organik bileşiklerin total yıkımı nadiren meydana gelir. Ancak biyotransformasyon ürünleri, aminoasitlerin sentezi veya doğal bitki bileşenlerine dahil edilmek gibi başka yollarda da kullanılabilir (Spaczyński ve diğ., 2012). Organik kirleticilerin biriktirilmesi veya alım, taşınım ve yıkım süreci bu yöntemin başarısında önem taşımaktadır. Bunların fitodegradasyonu bitki içerisinde veya rizosferde gerçekleşmektedir. Özellikle pestisitler (Li ve diğ., 2002; Wang ve diğ., 2003), topraktaki petrol ve aromatik bileşikler (Chen ve diğ. 2003; Godsy ve diğ., 2003) gibi birçok farklı organik kirleticiler bu yöntemle uzaklaştırılmaktadır. Örneğin, *Sorghum bicolor* bitkilerinin polisiklik aromatik hidrokarbonlarla (PAH) kirlenmiş alanların arıtımında oldukça etkin olduğu gösterilmiştir (Banks ve diğ., 2003). Fitodegradasyon, genellikle kök bölgesi ile hatta en uç kök kısımları (rizosfer) ile sınırlıdır. Dehalojenaz, nitroredüktaz, peroksidaz, lakkaz ve nitrilaz gibi bitki enzimleri kirleticileri metabolize ederek, kirleticilerin biçim değiştirmesinde aktif rol oynadıkları rizosfere salgılanırlar (Newman ve Reynolds, 2004).

2.2.3. Fitostabilizasyon (Köklerle sabitleme)

Köklerle sabitleme olarak da adlandırılan bu yöntem ağır metal kirliliğinin çok yoğun olduğu maden yatakları gibi bölgelerin kirleticilerden arındırılmasında tercih edilen bir uygulamadır (Wong, 2003). Yüksek metali tolere edebilen fitostabilizasyon bitkileri topraktaki kirleticileri gövdelerine taşımayıp bunun yerine köklere veya rizosfere bağlarlar. Böylece bitkiler, topraktaki kirleticileri hareketsizleştirerek, köklerde biriktirerek veya kök ve/veya rizosferde çöktürerek fiziksel ve kimyasal olarak sabitlemektedir (Kocaer ve Başkaya, 2003; Neuman ve Ford, 2006). Ayrıca, gövdelerinde düşük seviyede birikim yaptıkları için hasat edildikten sonra kalıntıların tehlikeli atık haline gelmesi önlenmiş olur. Fitostabilizasyon, toprakta bulunan metalleri sabitlemekle birlikte, toprak yüzeyi bitkilerle örtülerek toprak erozyonu önlenmekte, kirleticilerin yeraltı sularına sızması azaltılmakta ve toprakla doğrudan teması engellenmektedir (Bert ve diğ., 2005; Terzi ve Yıldız, 2011). Fitostabilizasyon için kullanılacak bitkilerde kök derinliği sistemin etkinliği bakımından çok önemlidir. Bu bitkiler seçilirken geniş bir kök sistemine sahip olanlar tercih edilir. Özellikle yüksek

konsantrasyonlardaki ağır metallerin varlığında yüksek oranda biyokütle üretebilen ve ağır metalleri gövdeye en az seviyede taşıyan türler kullanılır (Rizzi ve diğ., 2004). Örneğin kavak, kökleri 150-300 cm derinliklere kadar ulaşabildiğinden fitostabilizasyon çalışmalarında kullanılan bir türdür (Pivetz, 2001).

2.2.4. Fitovolatilizasyon (Bitkisel Buharlaştırma)

Doğada As, Hg ve Se gibi metaller gaz formunda bulunabilmektedir. Fitovolatilizasyon, bu ve benzeri uçucu metallerin bitkiler tarafından topraktan absorbe edilip daha az zehirli uçucu formlara dönüştürülmesini ve buharlaşma (transpirasyon) ile yapraklardan atmosfere verilmesini kapsamaktadır (Doucette ve diğ., 2003). Ayrıca, klorlu çözücüler gibi organik kirleticiler de bu yöntemle topraktan uzaklaştırılabilir (Sakakibara ve diğ., 2007). Bu uygulama, her ne kadar zararı ve etkisi azaltılsa da oluşan yeni toksik formların atmosfere verilmesi nedeniyle en tartışmalı fitoremediyasyon yöntemidir. Birçok bitki ve ağaç türü fitovolatilizasyonda aktif olarak kullanılmaktadır. Örneğin, *Brassica juncea* ve *Arabidopsis thaliana* etkin fitoremediyasyon özelliklerinden dolayı sıklıkla bu teknikte tercih edilmektedir (Ghosh ve Singh, 2005; Terzi ve Yıldız, 2011). Özellikle dünya genelinde ciddi bir problem olan Se bakımından zengin toprakların temizlenmesinde fitovolatilizasyondan yararlanılmaktadır (Brooks, 1998; Sakakibara ve diğ., 2007). *Arabidopsis thaliana* ve *Brassica juncea* bitkilerinin Se içeren besi ortamında yetiştirildiğinde dimetilselenit ve dimetildiselenit formunda uçucu Se üretebildikleri gösterilmiştir (Banuelos, 2000). Yine *Arabidopsis thaliana* çok zehirli olan organik ve inorganik civa tuzlarını uçucu elemental bir forma dönüştürmektedir (Watanabe, 1997). *Populus* ve *Salix* gibi ağaç türlerinin de ağır metalleri absorbe ettikleri ve gaz formuna dönüştürerek atmosfere verebildikleri bildirilmiştir (Pulford ve Watson, 2003). Son zamanlarda fitoremediyasyon uygulamaları için bitkilerin geliştirilmesinde ve yeni özellikler kazandırılmasında transgenik teknolojilerden yararlanılmaktadır. Örneğin, *Nicotiana tabacum* ve *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin genetiği modifiye edilerek civa redüktaz geni ile iyonik formdaki civayı (Hg^{+2}) daha az toksik olan forma (Hg^0) dönüştürmeleri sağlanmıştır (Bizily, 1999; Meagher ve diğ., 2000).

2.2.5. Rizofiltrasyon (Köklerle süzme)

Rizofiltrasyon mekanizması atık su arıtımında kullanılan bitkilerin köklerinin fiziksel ve biyokimyasal etkilerine dayanır. Kirleticiler, özellikle sulak alanlarda kökler tarafından alınıp biyotik ve abiyotik işlemlere bağlı olarak gövdeye taşınır ve/veya köklerde çökmesi sağlanır (Terzi ve Yıldız, 2011; Rawat ve diğ., 2012). Bu uygulamanın amacı kirleticilerin bitki üzerinde ya da içinde hareketsizliğinin sağlanmasıdır. Daha sonra köklerin veya bitkinin hasat edilmesi gibi çeşitli yollarla kirleticiler ortamdaki uzaklaştırılır. Hem kara hem de su bitkilerinin kullanılması sistemin büyük bir avantajıdır. Ayrıca, yöntem kirleticilerin doğal kaynağında yapılabileceği gibi havuz ve gölet gibi yapay alanlarda da uygulanabilir. Böylece, kirlilik amaca göre kaynağında ya da uzakta bertaraf edilebilmektedir. Özellikle atık suların, yeraltı ve yüzey sularının arıtılmasında rizofiltrasyondan yararlanılmaktadır. Rizofiltrasyon için kullanılacak bitkiler büyük miktarda kök biyokütlesi ve yüzey alanı oluşturabilmelidir. *Brassica juncea*, *Helianthus annuus* ve bazı çim türleri gibi hidroponik ortamda yetiştirilebilen birçok kara bitkisi yaygın olarak rizofiltrasyonda kullanılmaktadır (Dushenkov ve diğ., 1995; Lin ve diğ., 2003). Ayrıca, *Lemna minor*, *Pistia stratiotes* ve *Spirodela intermedia* gibi su bitkilerinden de sulak ortamlardaki ağır metalleri uzaklaştırmak için yararlanılmaktadır. Ancak, bu bitkilerin yüzey alanlarının dar olması ve çok yavaş büyüyen kökleri nedeniyle kirleticilerin ortamdaki uzaklaştırılması düşük miktarlarda olmaktadır (Hou ve diğ., 2007; Sachdeva ve Sharma, 2012). Bu bitkiler Cu, Cd, Cr, Ni, Pb, Zn ve U gibi toksik metallerin sulak ortamlardan uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır (EPA, 2000).

2.3. BİTKİLERDE METAL BİRİKİMİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMASI

2.3.1. Ağır Metal Stresi Yanıtında Sinyal İletimi

Bitkiler, ağır metal stresine karşı karmaşık bir sinyal iletimi mekanizması içerir (Yeh ve diğ., 2007). Ağır metalin algılanmasıyla aktive olan bu sistem, stresle ilişkili proteinler ve sinyal moleküllerinin sentezlenmesi ile karakterize edilir. Son olarak da, stresi ortadan kaldırmak için metale duyarlı özel genlerin transkripsiyonel aktivasyonu gerçekleşir.

İlgili sinyal iletim yolları; Ca-kalmodulin sistemi, hormonlar, ROS sinyali ve stresle ilişkili genler tarafından aktive edilerek birleşen, Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinaz (MAPK) fosforilasyon aşamalarını içerir. Farklı sinyal yolları farklı ağır metallere yanıt için kullanılabilir.

2.3.1.1. Ca-Kalmodulin Sistem

Bitki hücrelerinde Ca^{+2} , aşırı sıcaklık, ozmotik stres, oksidatif stres, anoksi (oksijen yetersizliği) ve mekanik stres gibi abiyotik stres faktörlerine bitkinin verdiği yanıtta sinyalizasyon özelliği gösterir (Knight, 1999). Hücrede ağır metal miktarının fazla olması Ca kanallarının stabilitesini değiştirir ve böylece hücreye Ca akışı artar. Hücre içi Ca, sinyalleri yaymak için kalmodulin ile etkileşen bir sekonder habercidir ve sonuç olarak ağır metal taşınımı, metabolizması ve toleransına katılan genleri düzenler (Yang ve Poovaiah, 2003). Daha yüksek Ca seviyeleri ise, ağır metallerin toksik etkilerini hafifletmek için adaptasyon mekanizmalarına neden olan Cd elementine maruz kalan bitkilerde gözlenmektedir (DalCorso ve diğ., 2010). Ca-Kalmodulin sistemi aynı zamanda Ni ve Pb gibi diğer ağır metallerin toksisitesine yanıtta da görev almaktadır. Transgenik bütün bitkilerinde, plazma membranında lokalize olmuş *NtCBP4* (kalmodulin bağlayıcı protein) taşıyıcısının aşırı anlatımının Pb^{+2} alınımını ve gövde dokularına taşınımını arttırdığı bildirilmiştir (Arazi ve diğ., 1999).

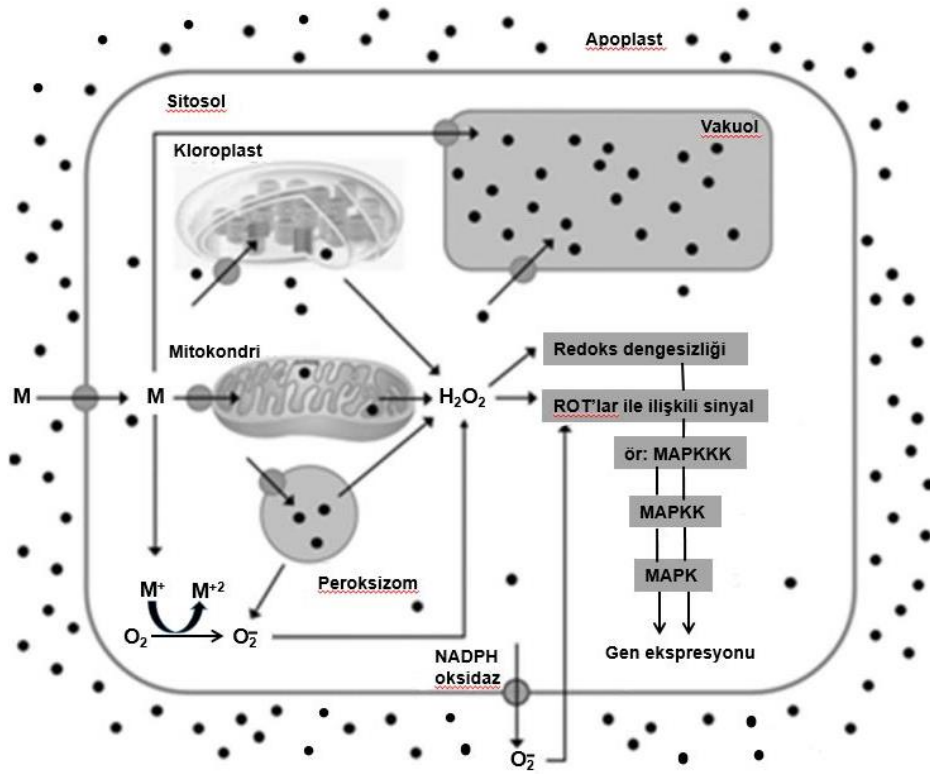
2.3.1.2. Ağır Metal Stresi Yanıtında Hormonlar

Bitki hormonları, birçok fizyolojik ve metabolik süreçte, ayrıca ağır metal varlığında hormon sentezinin düzenlenmesi gibi abiyotik strese karşı adaptasyonda önemli rol oynamaktadırlar (Alscher ve Cumming, 1990). Ağır metallerin hormonlar üzerine etkisi farklı olmaktadır. Örneğin, Cd, Cu, Fe ve Zn elementlerine toksik düzeylerde maruz kalan bitkiler, daha yüksek seviyelerde etilen üretir. Buna rağmen Co aynı etkiye sahip değildir. Cd ve Cu, ACC sentaz ekspresyonu ve aktivitesinin regülasyonu ile etilen sentezini uyarır. Ayrıca, Cu ve Cd elementlerinin *Phaseolus coccineus*'da jasmonik asitin (JA) hızlı birikimini teşvik ettiği bulunmuştur. Cu stresinin, aynı zamanda pirinç ve *Arabidopsis thaliana*'da bu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Maksymiec ve diğ., 2005). Ağır metal stresine karşı cevapta görev alan bitki hormonlarından biri de salisilik asittir (SA). Cd varlığında arpa köklerinde SA miktarının arttığı görülmüştür. Ayrıca,

dış kaynaklı SA'nın, Cd toksisitesinden kaynaklanan lipid peroksidasyonuna karşı arpa köklerini koruduğu bildirilmiştir (Hayat ve diğ., 2010).

2.3.1.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Rolü

Ağır metaller, bitkilerde stres cevabı olarak “Reaktif Oksijen Türleri” (ROT'lar) nin oluşumunu teşvik etmektedir (Gill ve Tuteja, 2010). “Serbest oksijen radikalleri” olarak da adlandırılan ROT'lar, serbest radikallerin en yaygın formudur. Cd gibi ağır metaller hücrede yükseltgenmiş metal iyonları formunda bulunur ve O₂ varlığında indirgenerek Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile doğrudan ROT üretir (Vranova, 2002). Bu reaksiyonlar dolaylı olarak antioksidan enzimleri inhibe ederek gerçekleşir. Özellikle, H₂O₂, ağır metaller ve diğer streslere karşı cevap olarak bir sinyal molekülü gibi davranış gösterir. *A. thaliana*, bakla, domates, arpa, bezelye ve fasulye gibi çeşitli bitkilerde yapılan birçok çalışmada farklı metallerin etkisiyle H₂O₂ miktarında artış olduğu gözlenmiştir. Maksymiec ve Krupa (2006), *A. thaliana*'da yaptıkları bir çalışmada Cu ve Cd stresine yanıt olarak H₂O₂'in miktarının arttığını belirlemişlerdir. Yine, Cho ve Park (2000) domateste, bitki Hg stresine maruz kaldığında ve arpada Mn toksisitesine yanıtta H₂O₂'nin miktarında artış olduğunu ispatlamışlardır. Stres sonucu meydana gelen H₂O₂ birikimindeki bu artış hücrenin redoks durumunu değiştirerek antioksidan üretimini ve antioksidan mekanizmalarının aktivasyonunu uyarır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Ağır metal varlığında reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretim yolları. Ağır metal (M) siyah noktalarla gösterilmiştir (Yıldız ve diğ., 2011'den alınmıştır).

2.3.1.4. MAP kinaz Kaskadı

MAP kinazlar (Mitogen-activated protein kinases), hücre dışı sinyallerin hücre içi hedeflere iletiminde yer alan düzenleyiciler olarak görev yapmaktadır. Tüm ökaryotlarda bulunan MAP kaskatları, serin/treonin protein kinazların oldukça geniş bir ailesi tarafından kodlanırlar. Bitkilerde MAPK'lar, patojenler, aşırı sıcak, ağır metal stresi, kuraklık ve yaralanma gibi biyotik ve abiyotik streslere karşı bir yanıttır. Bu yolak ayrıca, hormon sinyal iletiminde ve gelişmeye yönelik uyarılara karşı cevapta da kullanılır. Bir MAPK aktivasyonu komplekste yer alan 3 protein kinazın sırasıyla fosforilasyonu ve aktivasyonu ile sonuçlanır: MAPK kinaz kinaz (MAPKKK), MAPK kinaz (MAPKK), ve MAPK. Bu kademeli fosforilasyon sonunda MAPK, sitoplazmik substratlarını (hücre iskeleti elemanları, diğer protein kinazlar) ve/veya nükleusta transkripsiyon faktörlerini fosforilasyon yoluyla aktive eder ve böylece bitki hücresinin strese karşı biyolojik cevabı oluşur. MAPK kaskatlarının yüksek yapılı bitkilerde stres sinyal iletim yollarında önemli rolleri bulunmaktadır. Örneğin, Cu ve Cd stresine maruz kalan Alfalfa (*Medicago sativa*) bitkisinde MAPK'nın dört izoformunun aktif olduğu gösterilmiştir (Schoenbeck ve diğ., 1999). Yine, pirinçte yapılan bir çalışmada Cd

metaline maruz kalan bitkilerde MAPK geninin aktive olduğu belirlenmiştir (Cheong ve diğ., 2003).

Son olarak tüm bu sinyal yolları, stres adaptasyonu için gerekli genlerin aktive olmasında etkili transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesinde görev alır. Bu görev, özellikle ağır metal stresinde metal taşıyıcıların aktivasyonu ve şelatlayıcı bileşiklerin biyosentezi için gerekli genler anlamına gelmektedir.

2.3.2. Toprakdan Metal İyonu Alınımı

Bitkiler tarafından metal iyonlarının alınımı; metal iyonlarının kök yüzeyine tutunması, kök içine alınımı ile kütle akışı ve difüzyon aracılığıyla gövdeye taşınmasını kapsamaktadır. Metal iyonlarının topraktan alınımında rizosferde bulunan kök salgıları ve mikroorganizmalar etkilidir. Toprak parçacıklarına bağılı halde bulunan metallerin alınımı köklerden rizosfere salgılanan metal şelatlayıcı moleküller, plazma membranına bağılı metal redüktaz ve proton salınımıyla sağlanmaktadır. Yüksek yapılı bitkiler topraktan, metal iyonları ve diğeri inorganik besinlerin alınımı için son derece etkili sistemlere sahiptir (Dalvi ve Bhalerao, 2013). Az sayıdaki taşıma mekanizması, farklı ağır metal katyonlarının köklerdeki plazma zarından birlikte taşınmakta olduğunu düşündürmektedir. Kadmiyum ve kurşun gibi toksik ağır metallerin biyolojik işlevleri tam olarak bilinmemekle beraber bu ağır metallere özgü taşıyıcılar da bulunamamıştır. Özgün taşıyıcılar yerine, bu toksik metaller geniş substrat özgünlüğüne sahip katyon taşıyıcıları yoluyla hücre içine girer.

Bitkilerde inorganik iyonların kökleri tarafından alımın mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır ancak, simplast (hücreler arası) ya da apoplast (hücre dışı) yolla iyonların alındığı bilinmektedir (White ve diğ., 2002). Fizyolojik çalışmalar, apoplast yolla ilgili olmasına rağmen, hiperakümülyasyonda simplast yolu içeren 3 ana adım tanımlamışlardır: (i) köklerde plazma membran boyunca metallerin aktif taşınımı; (ii) kökten gövdeye taşınım sırasında simplasta metal girişi; (iii) yapraklardaki özel hücre bölümlerinde metal şelasyonu ve senkronasyonu.

Bu süreçlerin genetik ve moleküler yönlerinin aydınlatılması büyük önem taşımaktadır. Hiperakümülyasyon fenotipinin şekillenmesinde yer alan genlerin ve görevlerinin belirlenmesi için farklı yaklaşımlar kullanılmıştır: (i) doğal genetik varyasyonun analizi;

(ii) zıt fenotipli bitkiler arasında yapılan melezleme sonucu elde edilen melez bireylerde genetik ayrışmanın analizi; (iii) major genlerin veya kantitatif özellikteki lokusların (QTLs) haritalanması; (iv) mutantların izolasyonu; (v) hiperakümüülasyon ile ilişkili proteinlerin ve bileşiklerin izolasyonu ve karakterizasyonu; (vi) *A. halleri*/*T. caerulea* ve *A. thaliana*'da bulunan belirli genlerin düzenlenmesinin karşılaştırmalı analizi; (vii) metallere duyarlı maya mutantlarının tamamlama deneyleri ile işlevsel analizi; (viii) transgenik bitkilerin yapımı; (ix) mikroarray teknolojisi kullanarak *T. caerulea* ve *A. halleri*'de transkriptom çalışmaları.

2.3.2.1. Metal İyonlarının Ekstraselüler Salgılara ve Hücre Çeperine Bağlanması

Ağır metallere karşı bitkinin ilk tepkisi olan salgılar, bitki kökleri tarafından toprak matriksinin içine doğru salgılanır. Kök salgılarının en önemli görevlerinden biri, metallerin şelatlanması ve hücrelerin içine alınmasını önlemektir (Bais ve diğ., 2006). Örneğin, Ni-şelatlarından olan histidin ve sitrat, kök salgılarında bulunur ve topraktan Ni alımını azaltır. Cu ve Zn gibi metal iyonlarının apoplasta bağlanması, aynı zamanda kök hücrelerinin metal içeriğini kontrol etmek için yardımcı olur.

2.3.2.2. Metal İyonlarının Köklerde Plazma Membran Boyunca Aktif Taşınımı

Bitkilerde, metal alımını ve homeostazide görevli olan birkaç protein ailesinin, plazma membranında taşıyıcı olarak işlev gösterdiği belirlenmiştir. Hücresel düzeyde, plazma zarı ve tonoplastta bulunan metal taşıyıcıları, ağır metallerin fizyolojik konsantrasyonlarını korumak için gerekli olmakla birlikte, aynı zamanda ağır metal stresine yanıtta da katkıda bulunabilir. Bu taşıyıcılar, ağır metal (veya CPx-tip) ATPaz'ları (Solioz ve Vulpe, 1996), doğal dirençle ilişkili makrofaj protein (Nramp) ailesi (Clemens, 2001), katyon-difüzyon hızlandırıcı (CDF) protein ailesi ve çinko-demir permeaz (ZIP) gen ailesi (Guerinot, 2000) gibi protein sınıflarıdır. Bu ağır metal taşıyıcılarının çoğunun biyolojik işlevleri, hücredeki yerleşimleri ve metal özgünlükleri hala tam olarak bilinmemektedir. Bitkilerde, *Saccharomyces cerevisiae* mutantlarında yapılan çalışmalarla metal taşıyıcıların işlevsel özellikleri hakkında daha fazla bilgi elde edilmiştir (Clemens, 2001).

ZIP Protein Ailesi

ZIP gen ailesi üyeleri metallerin taşınmasında görev alan temel protein ailesidir. ZIP ailesi, içerdği ZRT1 ve ZRT2 (zinc-regulated transporter, çinko-düzenlenmiş taşıyıcı) ve IRT1 (iron-regulated transporter, demir-düzenlenmiş taşıyıcı) proteinlerinin tanımlanmasından sonra “ZRT, IRT benzeri Protein=ZIP” şeklinde isimlendirilmiştir (Guerinot, 2000). Bu aileye ait taşıyıcılar birçok bitki türünde tespit edilmekle birlikte bakteri, mantar ve hayvanda da bulunur. ZIP ailesi üyeleri, Cd, Mn, Zn ve Fe gibi katyon çeşitlerini zarlar boyunca taşıma yeteneğine sahiptir. Bazı ZIP proteinleri *A. thaliana*'da Fe ve Zn alınımına cevap sırasında kök ve gövdede uyarılır ve bitkide stres yanıtının bir parçası gibi görünür. ZIP ailesine ait birçok genin anlatımı Fe ve Zn yokluğunda artmakta fakat bunların kök ve nodüllerde anlatımı çoğu zaman sınırlanmaktadır.

İlk olarak tanımlanan ZIP proteini, *A. thaliana*'dan izole edilen IRT1 (*AtIRT1*) genidir (Eide ve diğ., 1996; Vert ve diğ., 2002). Bu gen topraktan Fe alınımında önemli bir göreve sahiptir. *AtIRT1*, Fe eksikliğinde Zn^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} ve Cd^{+2} gibi iki değerli ağır metallerin birikiminde aracı olarak geniş bir özgünlüğe sahiptir (Vert ve diğ., 2009; Nishida ve diğ., 2011). Örneğin, Schaaf ve diğ. (2006) mayada yaptıkları bir çalışmada Ni metaline duyarlı suşta, kontrol suşuna göre *AtIRT1* gen ifadesinin daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Bunun sonucunda da Ni^{+2} iyonunun hücre içine alınmasında *AtIRT1* geninin etkili olabileceği düşünülmüştür (Schaaf ve diğ., 2006; Morrissey ve diğ., 2009).

Ayrıca, bitkilerde ZIP gen ailesi üyeleri, Cd metalinin topraktan kök hücrelerine alınması ve köklerden gövdeye taşınmasına katılmaktadır (Kramer ve diğ., 2007). Hiperakümülatör türlerde bu taşıyıcı proteinler, metal iyonlarının birikiminde ve ZIP anlatımı ile bağlantılı metal birikim kapasitesinin artmasında gereklidir ancak yeterli değildir.

ZIP gen ailesinin metal hiperakümülasyonuna kesin olarak katkı sağladıkları ve aynı zamanda kendilerine özgü olan işlevleri de sürdürmeye devam ettikleri kabul edilmektedir.

Nramp Protein Ailesi

Metal iyonlarının membran boyunca taşınmasında görevli diğer bir taşıyıcı grup ise doğal dirençle ilişkili makrofaj protein (Nramp) ailesidir. Bu genler, Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} ve Co^{2+} gibi birçok iki değerlikli metal iyonlarını taşıma kapasitesine sahiptir. Nramp gen ailesi, evrimsel süreçte büyük ölçüde korunmuş ve homologları bakteriler, mayalar, böcekler, memeliler ve ayrıca yüksek yapılı bitkiler dahil olmak üzere canlı organizmaların geniş bir yelpazesinde tanımlanmıştır (Cellier ve diğ., 1995; Canonne-Hergaux ve diğ., 1999; Thomine ve diğ., 2000). *NRAMP1* bu ailenin memelilerde tespit edilen ilk genidir (Williams ve diğ., 2000). Bu makrofaj, endozomal/lizozom bölgesi üzerinde bulunan entegre bir membran proteinini kodlar.

Yüksek yapılı bitkilerde ise *Nramp* gen ailesine ait taşıyıcılar, kök ve gövdede sentezlenmekte ve plazma membranı ile tonoplast boyunca metal iyonlarının taşınmasında görev almaktadır (Williams ve diğ., 2000). Bitkilerde, Nramp gen ailesi ile yapılan çalışmalar büyük ölçüde ilk olarak pirinçte (*Oryza sativa*) yapılmış ve 3 tane Nramp geni (*OsNramp 1-3*) tespit edilmiştir (Cellier ve diğ., 1995; Belouchi ve diğ., 1997; Thomine ve diğ., 2000). Bu üç genin klonlanması için memelilerde bulunan *NRAMP1* geniyle büyük ölçüde benzerlik gösteren, pirinçten elde edilen EST dizileri kullanılmıştır (Belouchi, 1995). Daha sonra Alonso ve diğ.'nin (1999) yaptıkları bir çalışmada *Arabidopsis*'te Nramp genleriyle benzerlik gösteren 2 gen belirlenmiştir. Bu genlerden biri olan *AtNramp2*, memelilerde ve pirinçte bulunan *Nramp* genleriyle yüksek oranda benzerlik göstermektedir. *EIN2* (ethylene-insensitive 2, etilen-duyarsız 2) olarak adlandırılan ve etilen sinyalizasyon yolunun bir parçası olan ikinci gen ise, *Nramp* genleri ile oldukça az benzerlik gösterirken, *EIN2* ve Nramp proteinlerinin hidrofobik bölgeleri büyük ölçüde benzerlik göstermektedir (Alonso ve diğ., 1999). Yapılan birçok çalışmada, *Arabidopsis thaliana*'nın metal taşınımında farklı rollere sahip toplam 6 adet Nramp geni içerdiği rapor edilmiştir (Curie ve diğ., 2000; Vert ve diğ., 2002; Puig ve diğ., 2007; Cailliatte ve diğ., 2010). Bu genlerin öncelikli olarak Fe taşınımında görev aldıkları fakat daha düşük affiniteyle başka metallerin taşınımında da rol oynadıkları gösterilmiştir (Thomine ve diğ., 2000). *AtNramp3*, *AtNramp4* ve *AtNramp6* genlerinin anlatımının çok yüksek olduğu *Arabidopsis* bitkilerinde aşırı Cd hassasiyetinin görüldüğü belirlenmiştir. Buna bağlı olarakta, bitki için gerekli olmayan

bu toksik metalin taşınımında bu genlerin görev alabilecekleri düşünülmüştür (Lanquar ve diğ., 2004). Yine, yapılan başka bir çalışmayla *AtNramp1*, 3 ve 4'ün Mn alınımlarında rol aldıkları ortaya konmuştur (Cailliatte ve diğ., 2010).

Son yıllarda DNA mikroarray teknolojisinin gelişmesi sonucu hiperakümülatör bitkilerde yapılan karşılaştırmalı transkriptom analizleriyle aynı familyaya ait farklı türlerde Nramp'ların karşılaştırılması mümkün olmuştur. Örneğin, Zn ve Cd hiperakümülatörü olan *Arabidopsis halleri* ile hiperakümülatör olmayan *Arabidopsis thaliana* karşılaştırıldığında *NRAMP3* geninin *A. halleri*'de *A. thaliana*'ya kıyasla arttığı bulunmuştur (Lanquar ve diğ., 2004; Weber ve diğ., 2004). Bu da, *NRAMP* genlerinin Cd veya Zn hiperakümülatör süreçlerinde rol aldıklarını düşündürmektedir.

Bakır Taşıyıcı Protein Ailesi

Bakır taşıyıcı proteinler (The Copper Transporters-CTR) ilk önce mayalarda ve memelilerde daha sonra bitkilerde tespit edilmiştir. Sancenon ve diğ. (2003) *Arabidopsis*'te potansiyel Cu taşıyıcısı 5 üye (*COPT1-5*) tanımlamıştır. *COPT1*, 2, 3 ve 5 genleri Cu taşıma mekanizması baskılanmış maya mutantlarında anlatım yaptırıldığı zaman işlevsel olarak tamamlanmakta ve organizma Cu taşıma aktivitesini geri kazanmaktadır (Kampfenkel ve diğ., 1995a). Kantitatif RT-PZR ile yapılan dokuya özgü sentezleme çalışmalarında, *COPT4* hariç diğer taşıyıcıların kökle karşılaştırıldığında yaprak ve gövdede daha fazla anlatım yaptığı gösterilmiştir (Sancenon ve diğ., 2003; Andrés-Colásve diğ., 2010). *COPT1* *Arabidopsis*'te Cu elementinin taşınımında yer almakta ayrıca bitkinin büyümesinde ve polen gelişiminde de rol oynamaktadır (Sancenón ve diğ., 2004).

2.3.2.3. Plazma membranında metal alış-verişi

Plazma membranı, bitkinin ağır metallere yanıtında önemli bir rol oynar. Ağır metallerin hücre içine alınımının azaltılması veya önlenmesi, ya da hücre dışına aktif pompalama yöntemiyle dışa akışının sağlanması gibi görevleri vardır. Bitkilerde, iyonların plazmadan dışa akışı ya da alınımının azaltılmasının koruyucu bir mekanizma olduğunu gösteren birkaç örnek vardır. Örneğin, As toleranslı genotip olan *Holcus lanatus* ile toleranslı olmayan genotipi karşılaştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada, yüksek afiniteli As taşıma sistemi toleranslı genotipte baskılanmıştır. Bunun sonucunda, PC'lerin temel yapı sentezinin kombinasyonu nedeniyle toleranslı türün daha az

miktarda arsenatı absorbe ettiği görülmüştür (Meharg ve Macnair, 1992; Hartley-Whitaker ve diğ., 2001).

Bitkilerde aktif akış sistemleri oldukça yaygın olup hücre içinde ağır metal birikiminin kontrolü için kullanılmaktadır. Bu mekanizma, bakteriler ve hayvan hücrelerinde yapılan çalışmalarda ayrıntısıyla ortaya konmuştur (Palmiter ve Findley, 1995; Silver, 1996). Bitki hücrelerinde ise diğer organizmalardan farklı olarak, ağır metal stresine yanıtta görev alan plazma membranı dışı akış taşıyıcılarının sadece birkaç belirgin kanıtı vardır. Bakteri ve memelilerden elde edilen veriler karşılaştırıldığında, (mikrobiyal ve hayvansal protein dizisi benzerliği temel alınarak) bitkilerde ağır metal akış pompalarına en olası aday taşıyıcıların P1B-ATPazlar ve CDF aileleri olduğu görülmüştür. P1B-tipi ATPazlar, P-tipi ATPaz protein üst ailesine üye olup biyolojik membranlarda farklı metal katyonlarının yer değiştirmesinde ATP hidrolizindeki enerjiyi kullanırlar (Axelsen ve Palmgren, 2001; Palmgren ve Nissen, 2011). P1B-ATPazlar, metal iyonlarını elektrokimyasal gradiyentlerine karşı stoplazmadan dışarı, apoplast ya da vakuolün içine pompalar. *A. thaliana* ve pirinçte sekiz adet P1B-tipi ATPaz, ağır metal ATPazlar olarak (HMA5) yeniden adlandırılmıştır (Baxter ve diğ., 2003). HMA'lar, tek değerlikli katyonları (Cu/Ag) taşıyanlar ve çift değerlikli katyonları (Zn/Co/Cd/Pb) taşıyanlar olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Bu ATPaz'lar metal alınımında görev alan diğer taşıyıcılardan daha seçicidir. Örneğin, HMA2, HMA3 ve HMA4 sadece Zn ve Cd'nin translokasyonunda görevlidir (Krämer ve diğ., 2007). Bu nedenle, *hma2hma4* çift mutantları ve daha az bir oranda *hma4* tekli mutantı gövdede düşük seviyede Zn içermektedir. Dolayısıyla, bitki Zn eksikliği belirtileri gösterebilir ancak diğer mikro besinlerden etkilenmez. Buna ek olarak, Cd duyarlılığında artış ve Cd'nin kökten gövdeye geçişinde ise azalma gösterirler (Mills ve diğ., 2004; Wong ve Cobbett, 2009). *AtHMA2* ve *AtHMA4*'ün her ikisi de plazma membranı üzerinde bulunmaktadır. Mayalarda, *AtHMA4*'ün heterolog anlatımının Zn ve Cd toksisitesine toleransı tetiklediği gösterilmiştir (Mills ve diğ., 2005). Bundan dolayı, *AtHMA4*'ün bir akış pompası olarak da davranış gösterdiği söylenebilir.

Ayrıca, ABC taşıyıcıları da metal iyonlarının plazma membranından dışı akışına katılmaktadır. Örneğin, *A. thaliana*'nın kök tüyleri ve epidermal hücrelerin plazma zarında bulunan *AtPDR8*, bitkiye metal toleransı ve patojen direnci kazandırır (Kobae

ve diğ., 2006; Kim ve diğ., 2007). Yapılan bir çalışmada, Cd ve Pb varlığında tetiklenen *AtPDR8*'in aşırı anlatımına maruz kalan transgenik bitkilerde, kök ve gövdede Cd birikiminin olmadığı görülmüştür. Bunun tersine, mutantlar yüksek düzeyde Cd elementini biriktirirler ve her iki metale de duyarlıdırlar. Muhtemelen, *AtPDR8* plazma membranında bu metallerin bir dışa akış pompası olarak hareket etmektedir (Kim ve diğ., 2007).

2.3.3. Metal İyonlarının Kökten Gövdeye Taşınımı

Hiperakümülatör bitkilerin köklerinde metal bağlayıcı ligandlar olarak işlev görebilen birçok küçük organik molekül bulunmaktadır (Rascio ve Navari-Izzo, 2011). Metal iyonları, kökler tarafından alındıktan sonra ksileme yüklenir ve çeşitli şelatör kompleksleriyle gövdeye taşınır. Kökler, toprakta çözünmez formda bulunan metallere bağlanan organik asitler içermektedir. Özellikle de sitrat, ksilemde Fe ve Ni için önemli bir şelatördür (Tiffin, 1970; Hall, 2002). Buna ek olarak aminoasitler de metaller için potansiyel ligandlar olup, detoksifikasyon ve toleransta önemli görevlerde yer alabilmektedirler (Rauser, 1999; Clemens, 2001). Serbest histidinin (His) Ni hiperakümüülasyonunda işlev gören önemli bir ligand olduğu bildirilmiştir (Callahan ve diğ., 2006). Ayrıca, bir metiyonin türevi olan nikotinaminin (NA) Cu taşımada görev aldığı belirlenmiştir (Pich ve Scholz, 1996). Taşıyıcı proteinler çok sayıda çeşitli metalin kökten gövdeye taşınmasında görev almaktadır. Metal iyonları ayrıca floem yoluyla ana dokudan genç dokulara doğru taşınabilir. Bu nedenle, floem özsuyu ana dokudan kaynaklanan Fe, Cu, Zn, ve Mn gibi metalleri içerir (Greger, 1999). Floem içinde NA sadece Fe, Cu, Zn ve Mn şelatörü olarak tanımlanmıştır (Stephan ve Scholz, 1993). NA, ksilem ve floem içerisindeki metallerin uzun mesafe taşınmasında görev alırken diğer şelatörler yalnızca metallerin yüklenmesi için gereklidir. Yapılan bir çalışmada, Ni, Co ve Fe şelatı gibi yüksek moleküler ağırlıklı bileşiklerin *Ricinus communis* (hint fasulyesi) bitkisinin floeminde bulunduğu rapor edilmiştir (Schmidke ve Stephan, 1995; Kruger ve diğ., 2001). Ayrıca, Zn-şelatlayıcı peptitler *Citrus* spp.'de bulunmuş fakat detaylı olarak tanımlanamamıştır (Taylor ve diğ., 1988).

2.3.3.1. Ağır Metal ATPaz (HMA) Taşıyıcı Ailesi

ATP hidrolizi, metal iyonlarının elektrokimyasal gradiente karşı taşınmasında son derece önemlidir. Arabidopsis ve *Oryza sativa* da yapılan çalışmalarda bu bitkilerde 8

adet HMA geni bulunmuştur (Baxter ve diğ., 2003). ATPaz4 olarak da adlandırılan HMA4 geni, P1B-tipi ATPaz genleri içerisinde kodlanan ve Arabidopsis'te karakterize edilen ilk gendir. *AtHMA4*, bir plazma membran taşıyıcısı olup Zn homeostazisi ve Cd detoksifikasyonu gibi iki değerlikli iyonların kökten gövdeye translokasyonunda görev almaktadır (Mills ve diğ., 2003, 2010; Verret ve diğ., 2004). Özellikle Arabidopsis bitkilerinde yapılan genom analizleri ile, HMA1-4'ün Zn, Co, Cd ve Pb taşınımı ve diğer grubu olan HMA5-8'in ise Cu ve Ag taşınımından sorumlu olduğu gösterilmiştir (Baxter ve diğ., 2003).

2.3.3.2. MATE Protein Ailesi

Hiperakümülatör bitkilerde ağır metallerin translokasyonunda aktif olarak görev alan diğer bir protein ailesi de MATE (Multidrug and Toxin Efflux) membran proteindir (Brown ve diğ., 1999). Bu proteinler, toksik bileşikler ve sekonder metabolitlerin sitosoldan hücre dışına çıkartılması veya vakuollerde depolanmasında görev alırlar (DalCorso ve diğ., 2013). NorM, *Vibrio parahaemolyticus*'ten izole edilen ilk MATE proteini olup Na⁺/ilaç antiportörü olarak görev yapar (Morita ve diğ., 1998, 2000). FDR3 ise bu ailenin en önemli üyesi olup kök dokularında sitratın vasküler dokulara salınmasında rol oynar. Yapılan araştırmalarda perisikl hücrelerin plazma membranına yerleşmiş FDR3 geninin, hiperakümülatör bitkilerde fazla anlatım yaptığı bildirilmiştir. Örneğin, *Thlaspi caerulescens* ve *Arabidopsis halleri*'nin köklerinde yapısal olarak aşırı derecede FDR3 geninin anlatım yaptığı bulunmuştur (Talke ve diğ., 2006; van de Mortel, 2006; Rascio ve Navari-Izzo, 2011). FDR3 proteinin, bitkilerde klorofil II biyosentezi, solunum ve fotosentetik elektron aktarımı gibi çeşitli metabolik süreçlerde yer alan temel element Fe taşınımı için, mutlak gerekli bir ligand olan sitratın ksileme salgılanmasında rol aldığı bilinmektedir (Durreet ve diğ., 2007). Ayrıca, bu genin hiperakümülatör bitkilerde fazla anlatım yapması Zn ve Mn gibi metallerin taşınımında rol alabileceğini göstermektedir. Yapılan başka bir çalışmada pirinç genomunda *FRDL3*-benzeri genler bulunmuş ve bunlardan 3 tanesi (*OsFRDL1*, *OsFRDL2* ve *OsFRDL3*) izole edilmiştir (Inoue ve diğ., 2004). Yapılan promotor-GUS analizi, *OsFRDLJ* geni promotorunun uzun mesafeli taşınımın yapıldığı hücrelerde aktif olduğunu göstermiştir.

2.3.3.3. Oligopeptit Taşıyıcı Ailesi

Bazı otsu bitkilerin kökleri demir eksikliğine tepki olarak fitosideroforlar (phytosiderophores) salgılar ve taşıyıcı YS1 proteini ile demir- fitosiderofor kompleksi şeklinde Fe elementini alır (Ueno ve diğ., 2009). YS1, oligopeptit taşıyıcı protein üst ailesi (OPT) içinde yer alan bir taşıyıcı proteindir (Yen ve diğ., 2001). YSL familyası bitkiler için özel olmakla beraber ilk defa mısırdan tanımlandığı için adını mısır Sarı Şerit 1 Proteininden (Yellow stripe 1 Protein) (*ZmYS1*) almaktadır (Curie ve diğ., 2001; Ueno ve diğ., 2009). *ZmYS1* taşıyıcısı Fe, Zn, Cu, Ni iyonlarının ve daha az bir kapsamda da Mn ve Cd elementlerinin taşınmasında görev almaktadır. Bu iyonlar fitosideroforlar veya NA tarafından şelatlanabilir. YS1 geninin Arabidopsis genomunda 8 tane, pirinç genomunda ise 19 tane homoloğu (YSL, Yellow Stripe-like proteins) bulunmuştur (Curie ve diğ., 2001; Jean ve diğ., 2005). Ayrıca, bazı homologları arpada (Murata ve diğ., 2006) ve dikotil bir tür olan *Thlaspi caerulescens*'de (Gendre ve diğ., 2007) tanımlanmıştır. Arabidopsis'te bulunan *AtYSL1* geni, yaprak ksilem parankimasında, polende ve genç silikalarda anlatım yapmaktadır. Düşük Fe-NA kompleksine sahip mutantlarda normal çimlenmenin olmaması bu proteinin şelatlanmış Fe elementinin taşınmasında rol aldığı bir işarettir (Le Jean ve diğ., 2005). *AtYSL2* homoloğu ise, kök ve gövde vaskular dokularında anlatım yapar ve esas olarak lateral bir şekilde plazma membranında yer aldığı için metallerin damar içine lateral hareketinde görev alır (Schaaf ve diğ., 2005).

2.3.4. Şelasyon

Ağır metaller bitki hücresine alındıktan sonra metabolik olarak toksik seviyeye gelinceye kadar gerekli değildir. Bitkiler ağır metallerin birikmesiyle istenmeyen toksik reaksiyonlara katılımlarını önlemek ve daha fazla metal depolayabilmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Hücre içinde, toksik metal konsantrasyonu belirli bir eşik değerini aşarsa, aktif bir metabolik süreç şelatlayıcı bileşiklerin üretimine katkıda bulunur. Metallerle şelasyon yapan bileşikler genellikle "metallotiyonin" ve "fitokelatin"ler olup, metallerin detoksifikasyonunda önemli rolleri vardır. Kök hücreleri ağır metallerle maruz kaldığında bu bileşiklerin sentezi için hücre uyarılır (Rauser, 1999; Rea ve diğ., 2004). Bitkilerde birçok metal şelatörü vardır. Küçük moleküllerin büyük bir kısmı, aynı zamanda organik asitler, amino asitler, fosfat ve

türevleri dahil olmak üzere birçok molekül hücrelerin içindeki metal şelasyonuna katılmaktadır (Rauser, 1999; Rascio ve Izzo, 2011).

2.3.4.1. Fitokelatinler

Ağır metal detoksifikasyonunda önemli rolleri olan fitokelatinler (PC), birçok metali metal-tiyolat kompleksleri şeklinde alıkoyabilme özelliğine sahiptir. PC'ler özellikle Cd toleransı bakımından bitkilerde en iyi karakterize edilmiş metal şelatlarıdır (Cobbett, 2000; Benavides ve diğ., 2005). Bu moleküller sisteyince zengin küçük polipeptitler olup, genel yapısı (γ -Glu-Cys) $_n$ -Gly ($n = 2-11$) şeklindedir (Cobbett ve Goldsbrough, 2002; Dalvi ve Bhalerao, 2013). Birçok bitki türünde ve bazı mikroorganizmalarda tanımlanmış olan fitokelatinler, sitozol içinde sentezlenir ve daha sonra da kompleksler şeklinde vakuole taşınır. Bitkilerde Cd, Cu, Zn, Ag, Au, Hg, ve Pb gibi ağır metallerin birikimi PC'lerin üretimini teşvik etmektedir (Mendoza-Cozatl ve diğ., 2008). *Brassica napus*'ta, Hg ile ilgili yapılan bir çalışmada, Hg birikiminin PC2 konsantrasyonu ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir (Iglesia-Turino ve diğ., 2006; Terzi ve Yıldız, 2011).

PC'ler, glutatyondan (GSH; γ -GluCysGly) enzimatik bir reaksiyonla, fitokelatin sentaz (phytochelatin synthase) tarafından ağır metal iyonlarının bulunduğu ortamlarda üretilir. Yapılan birçok fizyolojik, biyokimyasal ve genetik çalışmalar, GSH'nin (veya bazı durumlarda ilişkili bileşiklerin) PC biyosentezi için substrat olduğunu doğrulamıştır (Rauser, 1995; Pal ve Rai, 2010). Özellikle, *Arabidopsis*'in yanı sıra GSH içermeyen *Schizosaccharomyces pombe* maya mutantlarında yapılan genetik çalışmalar, GSH eksikliğinde, PC eksikliğini ve Cd elementine aşırı duyarlılığı onaylamıştır (Cobbett, 2000). Bitkilerde glutasyon, sisteyinden iki basamaklı bir reaksiyonla sentezlenmektedir: İlk aşamada γ -glutamil-cis sentaz (γ -ECS) reaksiyonda katalizör görevindeyken ikinci aşamada glutasyon sentaz (GS) tarafından reaksiyon kataliz edilir. γ -glutamil-cis sentaz aktivitesi sisteyinin kullanılabilirliğine bağlıdır ve glutasyon tarafından geri-bildirim regülasyonu ile kontrol edilmektedir (May ve Leaver, 1995; Mejare ve Bullow, 2001). GSH senteziyle ilgili enzimlerle birçok çalışmalar yapılmış ve *Arabidopsis thaliana* (Howden ve diğ., 1995; Clemens ve diğ., 1999; Cobbett, 2000), *Triticum aestivum* (Keltjens ve Van Beusichem, 1998; Stolt ve diğ., 2003), *Brassica juncea* (Speiser, 1992) ve *Schizosaccharomyces pombe* (Vatamaniuk ve diğ., 1999; Clemens ve diğ., 1999)'de bu enzimi kodlayan genler bulunmuştur. Ayrıca,

fitokelatinlerin sentezinde metal türünün etkili olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Örneğin, Vestergaard ve diğ. (2008), Mg^{+2} , Mn^{+2} , Ca^{+2} ve Na^{+2} uygulamalarının PC sentezini etkilemediğini, buna karşın Cd^{+2} ve Zn^{+2} uygulamalarının PC üretimine neden olduğunu bildirmişlerdir. Yine benzer bir çalışmada, Zhang ve diğ. (2008), *Sedum alfredii* bitkilerinde Cd ve Pb stresinin PC üretimini arttırdığını, buna karşın Zn stresinin etki göstermediğini tespit etmişlerdir (Terzi ve Yıldız, 2011).

2.3.4.2. Metalloproteinler ve Ferritinler

PC'ler gibi metalloproteinler de (MT) sistein bakımından zengin, düşük molekül ağırlıklı metal bağlayıcı peptitlerin büyük bir ailesidir (Hamer, 1986; Kagi, 1991). Metal şelasyonu için tiyol gruplarına sahip olan bu grup, PC'lerden farklı olarak mRNA translasyonu sonucu oluşan gen ürünleridir. Bu protein ailesi hayvanlar, prokaryotlar ve bitkiler gibi birçok organizmada tespit edilmiştir. Bitkilerde bulunan MT'ler diğer organizmalarda bulunanlardan farklı yapıda olup 9-16 sistein içeriğine sahip, sülfürce zengin 60-80 aminoasitlik proteinlerdir (Rauser, 1999). MT'lerin metal bağlama özelliklerinden dolayı metal homeostazisi ve detoksifikasyonunda rol oynadığı düşünülmektedir. Bitkilerde MT'ler Cu ve Zn gibi mikro besin elementlerinin homeostazisinin sürdürülmesinde görev almaktadır. Ayrıca, Cd ve As gibi toksik metallerin detoksifikasyonunda da yer aldıkları bildirilmiştir (Lee ve diğ., 2004; Merrifield ve diğ., 2004).

Bitkilerde tanımlanan ilk MT 1987 yılında buğdayda bulunan *EcMT* proteindir (Lane ve diğ., 1987) ve o zamandan beri 140'tan fazla MT dizisi çeşitli türlerde tanımlanmıştır. (Zhou ve diğ., 2006). Bitkilerde MT'ler çeşitli abiyotik streslerle tetiklenirken, aynı zamanda bitkinin gelişimi sırasında da anlatım göstermektedirler (Rauser 1999). Buğday ve pirinçte MT'lerin Cu ve Cd gibi metal iyonları ve aşırı sıcaklık ile besin eksikliği gibi abiyotik stresler tarafından uyarıldığı rapor edilmiştir (Cobbett ve Goldsbrough, 2002). Sistein yapısına ve içeriğine göre MT'ler, bitkilerde 4 alt gruba ayrılmaktadır. MT1, MT2, MT3 ve MT4 olarak adlandırılan bu grupların bitki dokularındaki anlatımları ve işlevleri farklıdır (Yang ve Chu, 2011). Örneğin, tip 1 MT genel olarak köklerde anlatım gösterirken (Hudspeth ve diğ., 1996) tip 2 MT çoğunlukla yapraklarda anlatım göstermektedir (Zhou ve Goldsbrough, 1995). MT1, ortada sisteinin olmadığı bir ara bölge ile parçalara ayrılmış iki sisteince zengin domaini ile

karakterize edilir. Bu proteinlerde, memelilerle benzer sistein düzenlemesine sahip yapılar bulunur ancak farklı olarak çok daha uzun bir aralık bölgesi yer alır (Vallee, 1991; Zhou ve diğ., 2006). MT2, buğdayda bulunan *EcMT* proteini ile temsil edilmektedir ve 3 tane sisteince zengin domain içerir (Lane ve diğ., 1987). Monokotilerlerde ve dikotillerde bulunan MT'lerden elde edilen ürünlerin çoğu Tip 1'e aittir. Bu nedenle Tip 1 MT'ler sisteinlerin yerleşimine göre MT1a ve MT1b gibi çeşitli izoformlara ayrılmıştır. Fitokelatinlerden oluşan Tip 3 MT daha çok olgunlaşmış meyvelerde anlatım gösterir. MT3, bitkilerde enzimatik olarak bir poli (g-Glu-Cys)-glisin yapısı içeren peptitlerden sentezlenir (Cobbett ve Goldsbrough, 2002). Tip 4 MT'nin anlatımı ise sadece gelişmekte olan tohumlarda belirlenmiştir. Örneğin, buğdayda (*EcMT*) ve *A. thaliana* tohumlarında oldukça fazla MT4 anlatımının olduğu tespit edilmiştir.

Hayvanlarda ve mantarlarda bulunan metallothioneinler, ağır metal detoksifikasyonunda açık bir şekilde görev almasına rağmen, bitkilerde MT'ler ve ağır metaller arasındaki ilişki kesin olarak bilinmemektedir (Zenk, 1996; Giritch ve diğ., 1998). MT'lerin *A. thaliana*'da Cu homeostazisine katıldığı bilinirken (Cobbett ve Goldsbrough 2002), *S. cerevisiae*'de yapılan çalışmalar MT1 ve MT2 proteinlerinin Cd toleransı ile ilişkili olduğunu işaret etmektedir (Zhou ve Goldsbrough, 1994).

Transgenik bitkilerle yapılan çalışmalarda, MT genlerinin bu bitkilere aktarılmasıyla ağır metalleri biriktirme yeteneklerinin arttığı görülmüştür (Daghan, 2004; Pavlikova ve diğ., 2004; Cherian ve Oliveira, 2005). Özellikle maden yatakları gibi kirlenmiş alanların ağır metallerden temizlenmesi için transgenik bitkilerin geliştirilmesi ve tarla denemeleri, fitoremediyasyon teknolojilerini daha etkili ve uygulanabilir hale getirmektedir. Örneğin, Ellis ve diğ. (2004) yaptıkları bir çalışmada, selenyum hiperakümülatörü *Astragalus bisulcatus* bitkisinden izole edilen selenosistein metiltransferaz (SMT) genini *A. thaliana*'ya aktarmışlardır. SMT'nin aşırı anlatımının sağlandığı transgenik *A. thaliana* bitkilerinin, selenit (SeO^{-3}) ile kirlenmiş topraklarda yetiştirildiklerinde biriktirdikleri Se miktarı yabani tiplerine göre 8 kat artmıştır. Yine tütünde yapılan bir çalışmada, tütün bitkilerine *AtMT2b* ve *AtHMA4* genleri aktarılmış ve bu genlerin birlikte anlatımının Cd toleransını ve gövde dokusuna Cd ve Zn taşınımını arttırdığı bildirilmiştir (Grispen ve diğ., 2011).

Ferritinler ise multimerik demir bağlayıcı proteinlerdir ve kendi merkezi boşluğunda 4 500 demir atomuna kadar saklayabilir (Harrison ve Arosio, 1996; DalCorso ve diğ., 2013). Hayvanlarda ferritinlerin Cu, Zn, Cd ve Al dahil olmak üzere farklı birçok metali depolama yeteneğine sahip olduğu bulunmasına rağmen, bitkilerde sadece Fe elementini depoladığı gösterilmiştir (Price ve Joshi, 1982). Bitki ferritinleri, fotoinhibisyon ve demirin aşırı yüklenmesi gibi çeşitli çevresel streslere yanıt olarak sentezlenir (Murgia ve diğ., 2001, 2002). Ferritinin bitkilerdeki gen anlatımı ABA ve antioksidanlar ayrıca, serin/treonin fosfataz inhibitörleri tarafından düzenlenir. Bu nedenle, ferritinin serbest demirin yol açtığı oksidatif strese karşı bir savunma mekanizması vardır. Bitkilerde ferritinin başlıca görevi demiri depolamak ya da serbest bırakmak değil, hücrelerde oksidatif stresten oluşabilecek hasarı önlemektir (Ravet ve diğ., 2009).

2.3.4.3. Organik Asitler, Amino Asitler ve Fosfat Türevleri

Malat, sitrat, oksalat gibi küçük ligandlar ve aminoasitler ağır metal toleransında ve detoksifikasyonunda rol oynamaktadır (Rauser 1999; Mleczek ve diğ., 2013). Özellikle ağır metallerin ksilemden taşınmasında etkili olan bu ligandlar, hücrede birden fazla role sahiptirler. Bitkide, metale maruz kalma ile asit üretim miktarı arasındaki ilişki incelendiğinde bu karboksilik asitlerin ağır metal taşınımına katıldıkları çok açıktır. Örneğin, sitrat gibi organik asitlere göre iki değerlikli katyonlarla daha kararlı kompleksler oluşturan histidin (His) ve nikotiamin (NA) 'in konsantrasyonu Ni ve Zn hiperakümüasyonu için çok önemlidir. Ni elementine maruz kalan nikel hiperakümülatörü *Alyssum lesbiacum*'da His konsantrasyonunun arttığı tespit edilmiştir (Kerkeb ve Krämer, 2003; Ingle ve diğ., 2005). Yine farklı Ni hiperakümülatörü *Thlaspi* türlerinin köklerinde yüksek seviyelerde histidin bulunmuştur (Assunção ve diğ., 2003; Terzi ve Yıldız, 2011).

Bitkilerde sitrat sentaz enzimi tarafından sentezlenen sitratın, hücredeki ana görevi Fe^{+2} iyonunun şelatlanmasıdır. Bununla birlikte, malat ve oksalat gibi organik asitlerle karşılaştırıldığında daha yüksek metal iyonu kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Özellikle, Ni^{+2} ve Cd^{+2} gibi metaller için kuvvetli bir çekime sahiptir (Kramer ve diğ., 2000). Bitkilerde PC'lerin keşfinden önce, Ni hiperakümülatörü ile yapılan araştırmalar Ni elementinin ağırlıklı olarak sitrata bağlı olduğunu göstermiştir ve üretilen sitrat miktarı ile akümüle edilen Ni arasında güçlü bir ilişkinin olduğu ortaya konmuştur (Lee,

1977; 1978; Hossain ve diğ., 2012). O zamandan beri yapılan birçok çalışmada, karboksilik asitlerin ağır metallerle ilişkili olduğu bulunmuştur. Miyasaka ve diğ.'nin (1991) yaptığı başka bir çalışmada, *Phaseolus vulgaris* L.'de sitrik asit ile Al toleransı arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Malat ise çinko toleranslı bitkilerde sitozolik bir Zn şelatörüdür (Mathys, 1977).

Hiperakümülatör bitkilerde amino asitler ve türevleri, metal iyonlarının toksik düzeylerde etkisini azaltmak için bitki direncini arttıran metal şelatlarını oluştururlar. (Rascio ve Navari-Izzo, 2011). Histidin ağır metal metabolizmasında en önemli serbest amino asit olarak kabul edilir. Ni hiperakümülatör bitki olan *Alyssum lesbiacum*'da Ni elementinin alınımı, ksilemde bulunan His konsantrasyonu ile orantılıdır (Callahan ve diğ., 2006; Haydon ve Cobbett, 2007). Bitki Ni elementine maruz kalınca, ATP fosforibosiltransferaz geni (ATP-PRT) His biyosentezindeki ilk basamağı katalizler. ATP-fosforibosiltransferazın anlatımı hiperakümülatör olan *Alyssum lesbiacum*'da akümülatör olmayan *Alyssum montanum*'a göre daha fazladır (Kramer ve diğ., 1996; Mleczek ve diğ., 2013). Transgenik *A. thaliana* bitkisinde yapılan bir çalışmada, ATP-PRT geninin aşırı anlatımının Ni toleransını ve gövdedeki serbest His havuzunu arttırdığı ama ksilem özsuyunda ve gövdede Ni birikimini etkilemediği bulunmuştur. Bu durum, bitkide Ni hiperakümülatasyonu için başka ek faktörlere ihtiyaç olduğunu göstermektedir (Ingle ve diğ., 2005).

Nikotinamin (NA), NA sentaz (NAS) tarafından katalizlenen bir reaksiyonla 3 tane S-adenosil-L-metiyonin molekülünün yoğunlaştırılarak sentezlenmesinden oluşan bir aminokarboksilat grubudur (Shojima ve diğ., 1990). Bu amino asit türevi, Fe, Zn ve Cu elementlerini şelatlayarak vakuollerde depolanmasını sağlar (Stephan ve diğ., 1996; Mleczek ve diğ., 2013). NA'nın, köklerden salgılanmayıp bu elementlerin uzun mesafede taşınmasında rol oynadığı belirlenmiştir. Ni elementine maruz kalmış hiperakümülatör *Thlaspi caerulescens*'de Ni'nin köklerde NA birikmesini tetiklediği gösterilmiştir. Ancak, köklerde *TcNAS* anlatımı ve/veya NAS aktivitesi tespit edilememiştir. Bu da büyük olasılıkla, NA'nın ksilem özsuyunda sabit bir Ni-NA kompleksi oluşturarak gövdeden taşındığını düşündürmektedir. Akümülatör olmayan *Thlaspi arvense*'de ise NA ve Ni-NA şelatları bulunmaz. *A. thaliana*'daki NAS anlatım seviyeleri Fe, Zn ve Cu yetersizliğinde artmaktadır. Zn eksikliği, *A.thaliana* ve *A.*

halleri'nin (Zn ve Cd hiperakümülatörü) her ikisinde de gövdede NAS transkriptinin artmasını tetikler (Talke ve diğ., 2006). Normal büyüme şartları altında, *A. halleri* köklerde yüksek oranda NAS anlatımı gösterir ve daha fazla NA akümüle eder. NA'nın genellikle sitoplazma ve floemde faaliyet göstermesi beklenirken, transgenik bitkilerin vakuollerindeki NA bölümlenmesinin gelişmiş olması, vakuoldeki Zn birikimini yönetmektedir (Haydon ve diğ., 2012).

2.3.5. Ağır Metallerin Taşınmasında Rol Oynayan Taşıyıcı Proteinler

Metal iyonları sitozolde aşırı derecede biriktiğinde, bitkideki toksik etkilerini en aza indirmek için sitozolden uzaklaştırılmaları gerekir. Bitkiler bu işlemi dışa akış ya da bölümlendirme yoluyla yaparlar. Bu süreçte yer alan çeşitli hücre içi taşıyıcı gen aileleri bitki ve mayada tespit edilmiştir. Bu gen aileleri, ATP bağlayıcı kaset, ağır metal ATPazlar, katyon difüzyon kolaylaştırıcı proteinleri içermektedir.

2.3.5.1. ABC-Tipi Aile

ABC (ATP-bağlayıcı kaset) taşıyıcıları tüm canlı organizmalarda bulunan, geniş bir membran protein ailesini oluşturmaktadır (Ortiz ve diğ., 1992; Ortiz ve diğ., 1995; Hall ve Williams, 2003; Crouzet ve diğ., 2006). ATP hidrolizi ile çalışan bu pompalar birçok maddenin taşınmasında görev almaktadır. Ağır metal iyonları, ksenobiyotikler, şekerler, lipidler, peptitler ve pigmentler ABC proteinlerinin taşıdıkları maddeler arasında sıralanabilir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda bitkilerde bu ailenin iki büyük alt sınıfı tanımlanmıştır. Çoklu ilaç direnciyle ilişkili proteinler (MRP) ve çoklu ilaç direnç proteinleri (MDR) olarak tanımlanan bu alt sınıflar, özellikle şelatlanmış ağır metallerin sekestrasyonunda (alınmasında) etkindir. Arabidopsis'te klonlanan ilk ABC taşıyıcı bir MDR-benzeri gen olmasına rağmen bitkilerde sadece belirli MRP'ler bugüne kadar işlevsel olarak karakterize edilmiştir (Rea ve diğ., 1998; Hall ve Williams, 2003). Özellikle, vakuolde glutatyon S-konjugat pompası (GS-konjugatları) taşınmasında oynadıkları rol tam olarak tanımlanmış ve ABC taşıyıcıların glutatyon S-konjugat pompası oldukları tespit edilmiştir. ABCC1 ve ABCC2 taşıyıcıları glutatyon-konjugat komplekslerini vakuole taşıyan "ABC taşıyıcıları" olarak tanımlanmıştır (Liu ve diğ., 2001; Rea, 2007).

Bitki hücrelerinde vakuoller, PC-Cd komplekslerinin birikimi ve depolanması için ana organel olarak işlev görür (Salt ve diğ., 1995). ABC taşıyıcılarının da vakuollere madde

taşınmasında görev aldıkları düşünülmektedir. *Arabidopsis*'te çoklu ilaç-direnci ile ilişkili ABC taşıyıcılarının homologu olan *AtMRP*'nin, Cd elementinin şelatlar şeklinde vakuole taşınmasında rolünün olduğuna dair kanıtlar mevcuttur. Yulaf ve *Arabidopsis*'te yapılan çalışmalarla Cd toleransı ve sekestrasyonunda *AtMRP*'lerin rolü detaylı olarak araştırılmıştır. *Arabidopsis*'te Cd uygulamasından sonra belirgin bir şekilde *AtMRP3* miktarının artmasıyla, yüksek oranda düzenlenen 4 MRP taşıyıcısının, kökte anlatım seviyelerinin arttığı bildirilmiştir. Bu nedenle, Bovet ve diğ. (2003) ABC taşıyıcıları arasında sadece *AtMRP3*'ün, Kim ve diğ. (2006) ise sadece *AtATM3*'ün Cd taşınımında işlev gördüğünü ileri sürmüştür. Ama ilginç bir şekilde bu homolog taşıyıcı genin, Cu uygulamasıyla da tetiklendiği belirlenmiştir (Hall ve Williams, 2003).

2.3.5.2. CDF- Tipi Aile

Kasyon difüzyon kolaylaştırıcı (CDF) protein ailesi üyeleri, sitoplazmadan vakuole, apoplasta ve endoplazmik retikulumda metal iyonlarının taşınmasına katılmaktadır (Krämer ve diğ., 2007; Peiter ve diğ., 2007). Bu protein ailesi aynı zamanda bitkilerde "Metal Taşıyıcı Proteinler (MTP)" olarak da adlandırılır. Metal homeostazisi ve toleransında önemli rollere sahip CDF taşıyıcıları, ilk olarak prokaryotlarda karakterize edilmiştir (Nies, 1992; Paulsen ve Saier, 1997; Eide, 1998; van der Zaal ve diğ., 1999; Hall ve Williams, 2003). Daha sonra birçok ökaryotta bulunmuş ve Zn^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2} , Ni^{+2} ve Mn^{+2} gibi iki değerlikli metal kasyonlarının dışa akış şeklinde taşınımında görev aldığı belirlenmiştir (Krämer ve diğ., 2007; Montanini ve diğ., 2007; DalCorso ve diğ., 2013). CDF ailesi, filogenetik olarak 4 gruba ayrılmaktadır fakat bunlardan grup I ve III'ün üzerinde, bitkilerde metal toleransı ve birikimi ile ilgili olduğu için daha fazla çalışma yapılmıştır (Mäser ve diğ., 2001; Krämer ve diğ., 2007).

Bitkilerde ilk teşhis edilen *MTP* geni, *ZAT1* olarak bulunmuş daha sonra ismi *AtMTP1* geni olarak değiştirilmiştir. *Arabidopsis thaliana* bitkilerinden izole edilen bu genin, hayvanlarda bulunan ZnT Zn taşıyıcı geniyle görevi bakımından oldukça benzerlik gösterdiği bulunmuştur (van der Zaal ve diğ., 1999). *AtMTP1* geni tüm bitki organlarında yapısal olarak anlatım yapmakta fakat Zn tarafından bu genin anlatımı tetiklenmemektedir. Ancak, *AtMTP1* geni aktarılmış transgenik bitkilerle yapılan çalışmalarda, bitkilerin köklerinde Zn konsantrasyonunun ve toleransının arttığı rapor edilmiştir. Bunun yanında, bu genin susturulmuş olduğu bitkilerin ise aşırı Zn hassasiyeti gösterdiği bildirilmiştir (Desbrosses-Fonrouge ve diğ., 2005). *A. thaliana*'da

belirlenen diğ er bir tonoplast taşıyıcı olan *AtMTP3*, Zn elementinin vakuole taşınmasında yer almaktadır (Kramer ve diğ ., 2007). Zn hiperakümülatörü olan *Arabidopsis halleri* bitkisinde de *AtMTP1* homologu olan *AhMTP1* geni bulunmuştur (Drager ve diğ ., 2004). Koful membranı Zn/H⁺ antiportu olan *AhMTP1* geninin anlatım seviyelerinin, *A. halleri*'nin yapraklarında *A. thaliana*'nın yapraklarına oranla 20 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (Becher ve diğ ., 2004; Drager ve diğ ., 2004; Kramer, 2010).

Metal hiperakümülatörü *Thlaspi goesingense* bitkilerinde bir MTP geni olan *TgMTP1* tanımlanmıştır (Persans ve diğ ., 2001). Yapılan bir çalışmada, *T. goesingense*' de, *TgMTP1* geninin yüksek seviyedeki anlatımının gövde vakuollerinde Ni iyonlarının birikimini arttırdığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, *Thlaspi goesingense* membran MTP proteininin mayada aşırı anlatımının sağlanmasıyla, Cd, Co, Ni ve Zn iyonlarına toleransın arttığı rapor edilmiştir (Terzi ve Yıldız, 2011). Ayrıca, hiperakümülatör bitki *Thlaspi caerulescens*' da da bir ZAT geni olan ZTP1 karakterize edilmiştir (Assunçao ve diğ ., 2001). Büyük oranda yapraklarda anlatım yapan bu genin köklerde de az miktarda bulunduğu saptanmıştır. Bu bitkilerin çoğu Zn elementine karşı toleranslı olduğu için Zn'nin hücre içi taşınımında ZTP1/ZAT-benzeri taşıyıcılar gibi rol aldıkları düşünülmektedir (van der Zaai ve diğ ., 1999; Assunçao ve diğ ., 2001).

Tropikal bir bitki olan *Stylosanthes hamata*' da bir başka CDF taşıyıcısı *ShMTP1* tespit edilmiştir. Baklagiller familyasından olan bu bitki, Mn²⁺ miktarının yüksek olduğu topraklarda büyüebilmektedir. *ShMTP1* geni, maya ve *Arabidopsis*'te sentezletirildiğinde Mn²⁺'ye karşı tolerans sağladığı görülmüştür. Ayrıca, *ShMTP1*'in proton/ Mn²⁺ antiportu olarak olası bir göreve sahip olduğu düşünülmektedir (Delhaize ve diğ ., 2003; Pittman, 2005; Hanikenne, 2009). Mn toleransında etkili diğ er bir dışa akış proteinlerinden biri de *ShMTP8*'dir. Delhaize ve diğ ., (2003) tarafından *ShMTP8*'in *Stylosanthes hamata*'da anlatım yaptığı belirlenmiştir. Yapılan ek çalışmalarla bu genin tonoplastta lokalize olduğu bulunmuş ve Mn²⁺ iyonlarının sitoplazmadan uzaklaştırılmasında aktif rol oynadıkları bildirilmiştir.

CDF taşıyıcıları içerisinde (*AtMTP1* dahil) Grup III ile yakından ilişkili diğ er bir gen olan *PtdMTP1* hibrit kavakta (*Populus trichocarpa* x *Populus deltoid*) tanımlanmıştır (Gaither ve Eide 2001; Blaudez ve diğ ., 2003). *PtdMTP1*, düşük seviyelerde anlatımı

olan yapısal bir taşıyıcı protein olup, bitkinin genelinde yaygın bir şekilde bulunur. Blaudez ve diğ., (2003) bitkide en yüksek *PtdMTP1* anlatımının olgun yapraklarda ve köklerde olduğunu tespit etmişlerdir. *PtdMTP*'in mayada anlatımının sağlanmasıyla, Zn elementine aşırı duyarlı mutant soylarını tamamlamayı başardığı görülmüştür. Ancak, Cd, Co, Mn ve Ni gibi diğer metallere karşı aynı sonucu göstermemiştir (Blaudez ve diğ., 2003).

2.3.5.3. Ağır metal ATPazlar

P-tip ağır metal ATPaz, aralarında bitkilerin de olduğu birçok organizmada gerekli ve olası zehirli metalleri hücre zarı içinde taşıma göreviyle ilişkilendirilmiştir. Bunlar; ATP'yi yüklü parçacıkların biyolojik zarlar içerisinde basınçla taşınmasında kullanan ve reaksiyon döngüsü içerisinde oluşan fosforile edilmiş aracı molekül ile tanınan P-tip ATPaz protein üst ailesinin bir alt grubudur. Metal iyonlarının elektrokimyasal gradiyente karşı ATP hidrolizi ile taşınması, bitkilerde ve mantarlarda ağır metal ATPaz'lar (HMA) tarafından yapılmaktadır. HMA'lar birçok farklı gruba ayrılmakta ve çoğu organizmada bulunmaktadır. Na^+/K^+ -ATPaz hayvanlarda, Ca^{2+} -ATPaz ise çeşitli organizmalarda bulunan HMA'lara örnek olarak verilebilir (Axelsen ve Palmgren, 2001; Hall ve Williams, 2003). Bütün ATPaz'lar, reaksiyon döngülerinde ara bir fosforlanma oluşumunu içeren ortak bir enzimatik mekanizma paylaşır ve bu nedenle de P-tipi ATPaz'lar olarak adlandırılır (Serrano, 1989; Axelsen ve Palmgren, 2001; Hall ve Williams, 2003).

P-tipi ATPaz'lar, kendi içinde taşıyıcılık özelliklerine göre iki veya daha fazla alt gruba ayrılabilen, temelde 5 ana aile ($\text{I}\pm\text{V}$) olarak sınıflandırılır. Ağır metal taşıyıcı ATPaz4 (*HMA4*) olarak da adlandırılan P1B-tip ATPaz'ların metal taşınımında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Palmgren ve Axelsen, 1998; Axelsen ve Palmgren, 2001). 1B ağır metal taşıyıcı ATPaz'ların substratları, membran vezikülleri üzerinde yapılan biyokimyasal çalışmaların sonucunda, Cu (II) yerine Cu (I) olarak belirlenmiştir (Yruela, 2005). Aynı zamanda bu grup korunmuş bir membran içinde sistein-prolinesisteine/histidin/serin dizisini içerdiği için CPx-ATPaz olarak da adlandırılır (Solioz ve Vulpe, 1996).

Arabidopsis ve *Oryza sativa* bitkilerinin sekiz *HMA* genine sahip olduğu belirlenmiştir (Baxter ve diğ., 2003). *Arabidopsis* bitkilerinde yapılan genom analizleri, *HMA*'ların

işlevsel olarak bu bitkilerde iki farklı gruba ayrıldığını göstermiştir; birinci grup *HMA1-4*'ün Zn, Co, Cd ve Pb taşınımından, diğer grup *HMA5-8*'in ise Cu ve Ag taşınımından sorumlu olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, Arabidopsis bitkilerinde *HMA4* taşıyıcılarının Zn homeostazisi ve Cd detoksifikasyonunda görev aldıkları bildirilmiştir. Bu metallerin kökten gövdeye geçişinde de *HMA4*'lerin rol aldığı belirlenmiştir (Mills ve diğ., 2005; Courbot ve diğ., 2007; Terzi ve Yıldız, 2011). Arabidopsis bitkilerinde günümüze kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde, *A. halleri*' de bulunan *AhHMA4* ile *A. thaliana*' da bulunan homoloğu *AtHMA4*'ün protein işlevleri arasında raporlanan bir farklılığa rastlanmamıştır. *AtHMA4*, *A. thaliana* kök ksilemlerinde Zn ve Cd yüklemesini sağlamaktadır. *A. thaliana* çift mutanti *hma4* ve homoloğu *hma2*'de gövdedeki Zn konsantrasyonları yaklaşık %50 azaltılmış, kökteki Zn konsantrasyonları artmış olup, normal büyüme ortamında gövdede Zn eksikliği semptomları gözlenmiştir. *AhHMA4* ve *AtHMA4* arasındaki en büyük farklılık, *A. halleri*'de *AhHMA4*'de 6 ile 53 kat daha fazla transkript miktarı olması ve transkriptlerin konumlarında çok minör değişiklikler olmasıdır. *A. halleri* ile benzer olarak, *N. caerulea*'de bulunan *NcHMA4*'ün hem kök hem de gövdedeki anlatım seviyeleri *A. thaliana AtHMA4*'e oranla çok daha yüksektir (Bernard ve diğ., 2004). Varolan bulgulara göre *HMA4*, *N. caerulea* ve *A. halleri*'de metal hiperakümüasyonu ve hipertoleransında son derece etkindir (Papoyan ve Kochian, 2004).

Bitki hücrelerinde Cu birikimi ve taşıma mekanizmaları hakkında detaylı bilgi bulunmamaktadır. Ancak yakın zamanda yapılan çalışmalarla özellikle mayadan diğer ökaryotlara kadar birçok organizmada çeşitli Cu ağır metal taşıyıcı ailesi belirlenmiştir.

2.3.5.4. Katyon/H⁺ antiportörler

CaCA protein üst ailesi olarak da adlandırılan katyon/H⁺ antiportörleri, yüksek kapasite ve düşük affiniteye sahip taşıyıcılardır. Fizyolojik olarak çeşitli bitkilerden karakterize edilen bu antiportörlerin bitkide bulundukları yerler ağırlıklı olarak vakuol membranları yani tonoplastlardır. Bunun yanında, plazma membranı ve kloroplast tilakoid membranı da antiportörleri içermektedir (Blumwald ve Poole, 1986; Ettinger ve diğ., 1999; Luo ve diğ., 2005; Mei ve diğ., 2007). Bu taşıyıcılar, sitozolik Ca⁺² ve Na⁺ iyonlarını vakuole taşıyarak konsantrasyonlarının düzenlenmesinde görev almaktadır (Hirschi, 2001). Metal homeostazında görevli olan MHX ve CAX, CaCA aile üyelerine örnek olarak

verilebilir. MHX, ksilemle ilgili hücrelerde anlatım yapan, vakuolar bir Mg^{+2} ve Zn^{+2}/H^{+} antiportudur. Bu antiportun bütün bitkisinde aşırı anlatımı Mg ve Zn elementlerine karşı duyarlılığı arttırmasına rağmen bu metallerin gövdedeki konsantrasyonunu değiştirmmez (Shaul ve diğ., 1999). CAX ailesi, Ca^{+2}/H^{+} antiportu olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca vakuolde Cd^{+2} sekestrasyonu için bu antiportun önemli bir yol olduğu düşünölmektedir (Salt ve Wagner 1993). *A. thaliana*' da, yalnızca *AtCAX2* ve *AtCAX4* gibi CAX proteinlerinin Cd elementinin vakuolde birikimi ile ilgili olduğu rapor edilmiştir (Korenkov ve diğ., 2007). *AtCAX2* ve *AtCAX4*'ün Arabidopsis'te aşırı anlatımı Cd'nin vakuollere daha fazla birikimiyle sonuçlanır. *AtCAX4* esas olarak kök ucunda anlatım yapar ve Ni ve Mn ile bu genin anlatımı tetiklenir (Mei ve diğ., 2009).

2.4. BİTKİLERDE AĞIR METAL METABOLİZMASI İLE İLİşKİLİ GENLERİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Büyümeyi ve farklılaşmayı içeren birçok yaşamsal faaliyet değişen gen ifadeleri ile oluşmaktadır. Bu spesifik genlerin anlatım seviyelerini belirlemek ise, genlerin işlevinin belirlenmesi için yapılan çalışmaların temelini oluşturur. Geçmiş yıllardan günümüze kadar gen anlatımının mRNA seviyesinde analizi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Anlatım seviyesinin belirlenmesi için kullanılan teknikler aşağıdaki gibi sıralanabilir;

- RNA hibridizasyonu (Northern blotting) (Alwine ve diğ., 1977),
- Nokta hibridizasyonu (Dotblot Analysis) (Lennon ve Lehrach, 1991),
- Karşılařtırılmalđ ayırım metodu (Differential Display, DD) (Liang ve Pardee, 1992),
- Ters anlatım polimeraz zincir reaksiyonu (kantitatif RT-PZR) (Freeman ve diğ., 1999),
- Serisel gen anlatım analizi (Serial Analysis of Gene Expression, SAGE) (Velculescu ve diğ., 1995),
- *In situ* hibridizasyon,
- Mikroarray (Heller, 2002),
- RNA dizileme (RNAseq) (Chu ve Corey, 2012).

Bu teknikler kullanılarak bir örnekte bulunan RNA miktarına bağlı olarak, seçilmiş hedef genlerin veya tamamının anlatım düzeyinin ölçülmesi amaçlanmaktadır. Bazı yöntemler sadece tek bir genin anlatımını incelemektedir. Örneğin, northern blot analizinde aynı anda birden fazla mRNA'nın analizi mümkün değildir. Karşılaştırmalı ayırım metodunda, farklılık sadece mRNA boyutuyla sınırlı olduğundan ve yine analiz edilebilecek örnek sayısı çok fazla olmadığından kullanımı sınırlıdır. Dotblot analiz yönteminin ise en büyük dezavantajı kullanılması gereken örnek miktarının fazlalığı olarak görülmektedir. Bütün bu kısıtlamalardan dolayı birçok genin aynı anda farklı koşullarda anlatımlarını inceleyebilmek amacıyla; çıkarımlı hibridizasyon, farklılık gösterimi (Differential Display), serisel gen anlatım analizi (Serial Analysis Gene Expression) ve anlatım yapan gen parçalarının DNA dizilerinin belirlenmesi gibi teknikler geliştirilmiştir. Ayrıca, bu teknolojilere ek olarak günümüzde kullanılan mikroarray teknolojisi aynı anda binlerce genin anlatım seviyelerinin çalışılmasını sağlayan yeni ve güçlü bir teknolojidir. Bu teknoloji sayesinde ileri derecede genotip ve gen anlatım analizleri yapılabilmektedir. Birçok geni aynı anda inceleyebilmek amacıyla kullanılan diğer yöntemler mikroarray teknolojisi ile karşılaştırıldığında çeşitli dezavantajlara sahiptir. Gen anlatım çalışmalarında kullanılan yöntemlerden bazıları aşağıda ayrıntılarıyla açıklanmıştır;

2.4.1. Northern blot

Total RNA veya mRNA kullanılarak belli bir genin anlatımını göstermek amacıyla kullanılır. 1977'de geliştirilmiş olan Northern Blot tekniği, RNA örneklerinin elektroforetik ortamda ayrıştırılarak kapiller yöntemlerle membrana aktarılması ve hedef dizinin tamamı ya da bir kısmına komplementer olacak proba hibridizasyonu sonrası görüntülenmesine dayanmaktadır. Görüntüleme, kullanılan tekniğe bağlı olarak radyoaktif veya radyoaktif olmayan DIG metoduyla gerçekleştirilir (Alwine ve diğ., 1977). Oldukça fazla miktarda RNA'ya gereksinim olması, ayrıca görüntülemeye ve örnekler arası farklılıkların tanımlanmasında hassasiyetin düşük olması bu tekniğin en önemli dezavantajlarındandır.

2.4.2. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

Miktar belirleme ve farklı hücre popülasyonlarındaki mRNA düzeylerini karşılaştırma açısından oldukça hassas olan kantitatif RT-PZR, RNA'nın belli dizilerinin enzimatik

olarak çoğaltılmasına dayanan *in vitro* bir metottur (Heid ve diğ., 1996). Bu yöntemde, geleneksel PZR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. Yöntem, floresan ışıma tekniklerinin moleküler genetik yöntemlerde kullanılması esasına dayanır. PZR çoğaltımını görünür hale getiren diziye özgün floresan işaretli prob veya diziye özgün olmayan floresan boyaların kullanıldığı, oluşan DNA ile floresan ışımının doğrusal olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir (Günel, 2007). Bu teknoloji ile çeşitli biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısının ve mRNA düzeyinin sayısal olarak belirlenebilmesi nedeniyle gen anlatım çalışmalarına daha hızlı bir ivme kazandırılmıştır (Klein, 2002).

Genler etkilerini mRNA düzeyinde ortaya çıkarırlar fakat RNaz enzimlerinin aktivitesi ile çok çabuk parçalandıklarından mRNA ile çalışmak oldukça zordur. Bu nedenle, RNA kalıp olarak PZR'da görev alamadığından kantitatif RT-PZR'ın ilk aşaması mRNA'nın tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) ters transkripsiyonudur. Bu aşamada bir ters transkriptaz enzimi ve DNA primeri kullanılır. Ters transkriptaz reaksiyonunda, Avian Myeloblastosis Virus-Reverse Transcriptase (AMV-RT) ve Moloney Murine Leukemia Virus- Reverse Transcriptase (MMLV-RT) olmak üzere iki farklı ters transkriptaz enzimi kullanılmaktadır. AMV-RT, MMLV-RT'den daha dayanıklı bir enzimdir. 55°C'ye kadar polimerizasyon aktivitesini koruyabilmesi nedeniyle RNA ikincil yapısıyla ilgili problemlerin ortadan kalkmasına yardım eder. Buna karşın, MMLV-RT ise önemli derecede düşük RNaz H aktivitesine sahiptir. Uzun PZR ürünlerinin sentezini düşük RNaz H aktivitesinden dolayı engelleyebileceğinden, MMLV-RT genellikle tam uzunluktaki cDNA moleküllerinin sentezi çalışmalarında tercih edilmektedir (Peters ve diğ., 2004).

Reaksiyonun ilk basamağı olan ters transkripsiyon aşamasında üç farklı tipte primer kullanılabilir; spesifik primer, random primer ve oligo dT primer. mRNA spesifik primerlerinin kullanımı özgünlüğü arttırarak spesifik olmayan eşleşmeyi ortadan kaldırır. Diğer primerlerin kullanımı da çok az miktardaki RNA'dan analiz edilebilecek mRNA moleküllerini arttırır. Bu primerler poliadenillenmiş bölgeye bağlanabilir ve böylece 3'- poly (A) kuyruğuna sahip mRNA'ların kantitatif RT-PZR ile çoğaltma işlemleri yapılabilir (Tefferi, 2002).

Ters transkripsiyondan sonra ikinci olarak, cDNA'nın standart PZR yoluyla çoğaltılması aşaması gelir. Yapılacak olan deneyin amacına göre DNA polimeraz seçilir. Piyasada, termostabil (sıcaklığa dayanıklı), doğru sentez ve kalıp DNA'daki değişmiş trifosfatları okuma özelliğine sahip birçok enzim bulunmaktadır. Termostabil DNA polimerazlardan PZR'da en yaygın olarak kullanılanı *Thermus aquaticus*'dan elde edilen Taq DNA polimerazdır (Chien ve diğ., 1976). PZR'ın özgünlüğü, primerlere bağlı olduğundan reaksiyon koşulları mutlaka her yeni enzimle yeniden optimize edilmelidir.

Kantitatif RT-PZR, özellikle mRNA düzeyinde gen ekspresyonunda daha hassas, verimli, hızlı ve daha üretken bir yöntem olması nedeniyle gen ifadenmesi analizlerinde sıkça tercih edilen bir yöntemdir. mRNA'nın kantitasyonunda özgünlük, hassasiyet ve tekrarlanabilirliğe gereksinim duyulan çalışmalarda bu yöntemden yararlanılmaktadır (Remans ve diğ., 2008; Qi ve diğ., 2010; Chandna ve diğ., 2012). Böylece, mRNA miktar tayini yapılabilir ve uygun standart eğrilerle tam kopya sayısı kolaylıkla belirlenebilir.

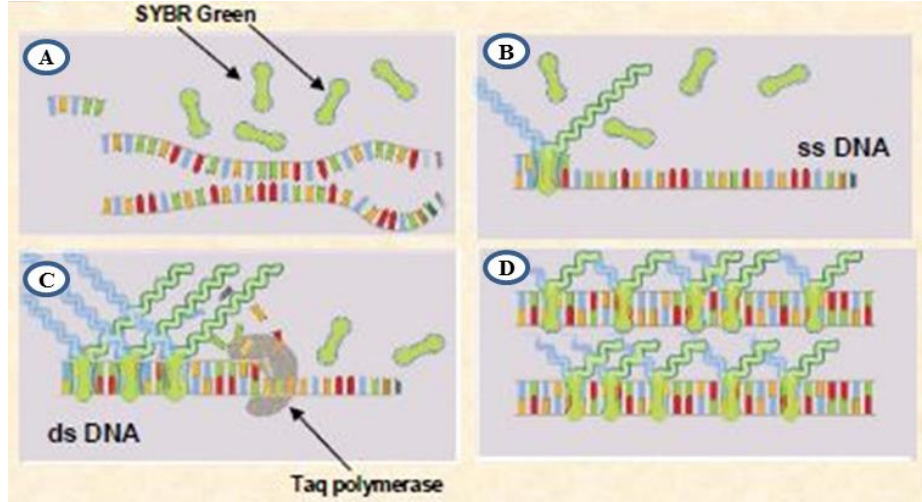
Kantitatif RT-PZR'da oluşan PZR ürününü saptamak için çeşitli floresans temelli sistemler kullanılmaktadır. Bu sistemlerin temeli PZR sırasında oluşan floresans ışımanın ölçülmesine dayanır. Yayılan floresans ışınım miktarı, PZR ürün miktarı ile orantılı olup reaksiyonu gözlemlemeye olanak sağlar (Klein, 2002). Floresans kaynağı olarak primerlere bağlı ya da onlardan bağımsız floresans işaretleyiciler kullanılır. Bu sistemler aşağıdaki gibi iki ana başlık altında incelenebilir (Bustin, 2005);

2.4.2.1. Diziye Özgü Olmayan Saptama Metodu

SYBR-Green Tekniği

Spesifik olmayan çift zincirli DNA'nın çoğaltımında genellikle DNA'ya bağlanan ve diziye özgü olmayan floresan boyalar kullanılır. "SYBR Green I" bu yöntemde en fazla kullanılan boyadır. Bu metot, floresans boyanın sadece çift zincirli DNA'ya bağlanması temeline dayanır. Böylece, çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak RT- PZR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar. SYBR Green I'in yükseltgenme dalga boyu 497 nm ve indirgenme dalga boyu ise 520 nm'dir.

Aktivitesini uzun amplikasyon döngüleri sonrası bile çok az kaybeden bu boya, çift sarmal DNA'nın küçük oluşuna bağlanır (Şekil 2.3) (Kubista ve diğ., 2006).



Şekil 2.3: SYBR Green Tekniği.¹

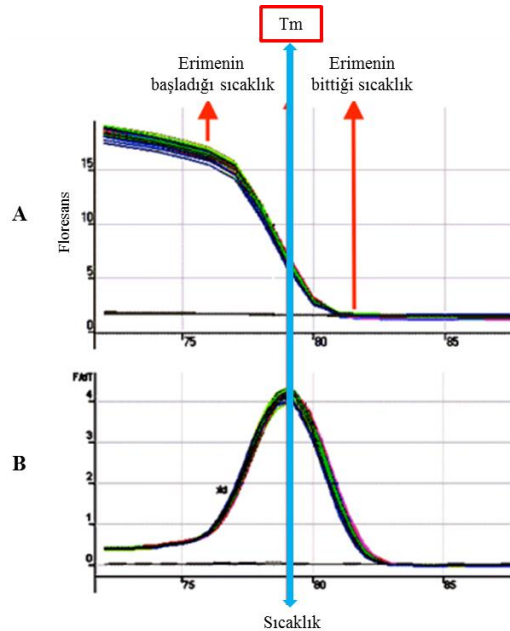
(A) Başlangıç aşaması; amplikasyonun başlangıcında ortamda SYBR Green, primerler ve denatüre edilmiş DNA ayrı ayrı bulunmaktadır, bu nedenle de floresans ışımaya çok azdır. **(B)** Primerin hedef moleküle bağlanması; primerlerin hedef moleküle bağlanmasıyla az miktardaki SYBR Green çift sarmal yapıya katılmaktadır. Bu nedenle yayılan floresans miktarı da az olmaktadır. **(C)** Polimerizasyon aşaması; yeni sentezlenmekte olan DNA molekülüne daha fazla SYBR Green bağlanarak zamanla floresans miktarında artışa neden olur. Bu artışı aynı anda ekrandan izlemek mümkündür. **(D)** Son aşama; Polimerizasyon tamamlandığında “SYBR Green” boya çift iplikli DNA’ya bağlanır ve floresans ışımaya yapar.

SYBR-Green I yöntemiyle çok fazla sayıda hedef genin çoğaltılması sağlanabilir. Ancak, bunun için PZR şartlarının optimize edilmesi ve kullanılacak primerlerin iyi tasarlanması gerekmektedir. Bu yöntemde uygun primer seçimi en önemli aşamadır. Yöntemin başarıyla uygulanabilmesi için seçilen PZR primerlerinin sadece spesifik cDNA’ya bağlanması gerekmektedir. Oluşabilecek istenmeyen primer-dimer veya spesifik olmayan amplifikasyon ürünleri yine floresan ışımaya açığa çıkaracağından yanlış pozitif sonuca neden olabilir (Bustin ve Mueller, 2005). SYBR-Green tekniğinin başarısını engelleyen önemli sorunlardan biri de RNA izolasyonu sırasında oluşan genomik DNA kontaminasyonudur. Bu sorunları en aza indirmek ve özgül amplifikasyon ürünü elde etmek için primerlerin seçiminde bazı noktalara dikkat etmek gerekir. cDNA amplifikasyon primerleri farklı ekzonlardan seçilmeli ve ampikon

¹ <http://www.gene-quantification.de/chemistry.html>

uzunlukları kısa tutulmalıdır (120-250 baz). Primerlerin bağlandığı ekzonların uzak seçilmesi de dikkat edilmesi gereken diğer bir noktadır (Balcı, 2009).

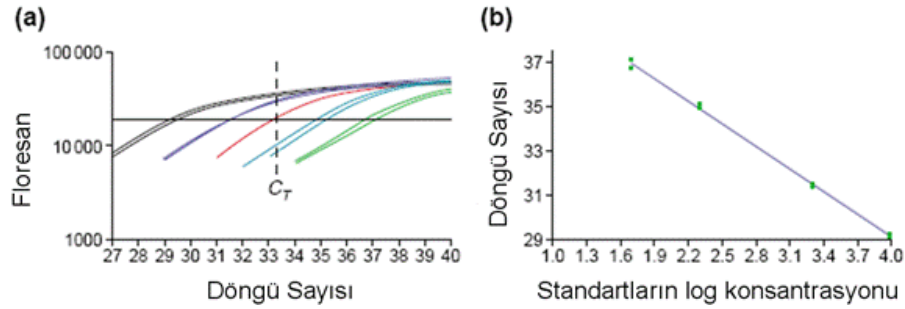
Hedeflenen ampliconun çoğalıp çoğalmadığını, kantifikasyona primer dimerlerinin ve nonspesifik ürünlerin karışmadığını gösterebilmek için her deney sonrası reaksiyon ürünleri agaroz jelde görüntülenebilir ya da reaksiyondan sonra erime eğrisi (melting curve) analizi basamağı eklenebilir (Ponchel, 2006). Her bir DNA, kendine özgü erime sıcaklığı (melting temperature, T_m) değerine sahiptir. T_m değeri, çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal hale gelmesi için gerekli sıcaklık olarak tanımlanabilir. Erime eğrisi analizi yapılmak istendiğinde, amplifikasyonun ardından sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek belirli aralıklarla tüpteki floresans ışım miktarı kaydedilir. Çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında yani denatürasyon sırasında boya serbest kalır. Birbirleri üzerindeki enerji aktarımı ortadan kalktığı için floresans ışım miktarı aniden düşmeye başlar. Bu şekilde elde edilen erime eğrisinden yararlanılarak ampliconun T_m derecesi saptanabilir. Tam olarak T_m değerinin tespit edilebilmesi için türev analizinden yararlanılır ve erime eğrisinin zamana karşı türevi çizilir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Erime eğrisi analizi. **(A)** Ham veri; DNA denatüre oldukça floresan azalır. **(B)** İkincil (türev) veri; eğrinin tepe noktası T_m (erime sıcaklığı) değerini gösterir.²

² <http://www.fatih.edu.tr/~abasiyanik/mfarg.htm>

Kantitatif RT-PZR uygulamalarında en önemli parametrelerden biri de “Eşik döngü değeri”dir (threshold cycle = C_t). C_t değeri, amplifikasyon sırasında saptanan floresans ışınım eşik değerinin aşıldığı döngü sayısıdır. Ayrıca, bu değer üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir. Kalıp DNA kopya sayısı ne kadar fazla ise C_t değeri o kadar küçüktür. C_t değerleri karşılaştırılarak farklı PZR reaksiyonlarında yer alan kalıp örneklerin miktarı tahmin edilebilir. Kantitatif RT-PZR, kalıp DNA miktarı bilinen standart örneklerle ait C_t değerleri ile incelenen örneğin C_t değeri karşılaştırılarak yapılmaktadır (Şekil 2.5). Kantitatif yöntemler, kompetitif RT-PZR teknikleridir. Bu nedenle, kantitatif PZR analizlerinde standart olarak tanımlanan kontrol örneklerine ihtiyaç vardır. Standart örnek olarak, içinde bulunan kalıp DNA miktarı bilinen örneklerle yapılan çalışmalara “mutlak kantitasyon” adı verilir.



Şekil 2.5: Kantitatif RT-PZR sonucu³.

(a) Konsantrasyonu farklı olan standartların C_t değerleri farklılık göstermektedir. (b) C_t değerlerinin, standartların konsantrasyonlarının logaritmasına karşı oluşturulduğu standart eğri.

Kantitatif RT-PZR çalışmalarında, başlangıç materyalindeki küçük farklılıkların katlanarak amplifikasyon ürününe yansması sonucu mRNA kantifikasyonunda bazı sorunlar oluşabilir. Özellikle farklı bireylerden alınan örneklerle başlatılan reaksiyonlarda bu durum sıkça gözlenmektedir. Bu nedenle, bir iç kontrol kullanarak başlangıç farklılıklarını ortadan kaldırmak ve belli bir standarda getirmek için “normalizasyon” yapılması gerekir. Normalizasyon sadece farklı bireylerde değil aynı bireyden farklı dönemlerde alınan başlangıç örnekleri için de yapılmalıdır. Bunun için çeşitli koşullarda ifade düzeyi değişmediği bilinen veya çok az etkilenen “housekeeping genler” kullanılmaktadır (Thellin ve diğ., 1999; Bustin 2002). Normalizasyon sırasında, hedef genin anlatım düzeyi, referans gen olarak kullanılan housekeeping genin anlatım düzeyine oranlanır. Böylece, izole edilen RNA miktarı ve sentezlenen cDNA miktarının

³ <http://www.fatih.edu.tr/~abasiyanik/mfarg.htm>

getirdiği başlangıç farklılıklarından dolayı oluşan deneysel hatalar normalize edilmiş olur. Gen anlatımı çalışmalarında öncelikle dikkat edilecek en önemli nokta referans gen olarak kullanılacak housekeeping genin doğru seçimidir. Bu referans genin anlatım düzeyinin az değişkenlik gösterip sabit kalması, hedef genin anlatım düzeyinin belirlenmesinde de güvenilir bir referans olmaktadır.

En yaygın kullanılan housekeeping genler gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) (Petersen ve diğ., 1990), β -aktin (Choi ve diğ., 1991) ve rRNA'dır (Finnegan ve diğ., 1993). GAPDH referans gen olarak en çok tercih edilen housekeeping genlerden biridir. Ancak, Ohl ve diğ.,'nin 2005 yılında yapmış olduğu bir çalışmada GAPDH'nin kararlı bir davranış göstermeyip anlatımında değişiklik olabildiği ortaya konmuştur (Yüzbaşıoğlu, 2008). Daha sonra yapılan çalışmalarla da bu görüş desteklenerek GAPDH geninin normalizasyon amacıyla kullanılamayacağı ifade edilmiştir (Jung ve diğ., 2007). Gen ekspresyonu çalışmalarında tercih edilen diğer bir referans gen de β -aktin'dir. β -aktin, monomer haldeki aktin moleküllerinin sıkıca yan yana dizilmesiyle oluşan sarmal bir yapıdadır. Ökaryotlarda bir gen ailesi tarafından kodlandığı için aktin moleküller yüksek birçok izoforma sahiptir (Bustin ve diğ.,2005).

2.4.2.2. Diziye Özgü Saptama Metodu

DNA parçasının özel bir bölgesi çoğaltılmak isteniyorsa bu bölgenin saptanmasında floresans işaretli hidrolizasyon ve hibridizasyon problemleri kullanılır. Hidrolizasyon problemlerinin başlıcaları TaqMan prob (Heid, 1996), Molecular beacon (Mhlanga, 2001; Tan, 2004; Vet ve Marras, 2005) ve Scorpion primeridir (Whitcombe, 1999; Giglio ve diğ., 2003). Bu problemler, cDNA örneklerinde hedef dizilerin miktarını ölçmek için, Taq polimeraz flüorojenik 5' eksonükleaz aktivitesini kullanırlar. Hibridizasyon problemlerinde ise Light-Cycler prob (FRET) en çok kullanılan tekniktir (Lee ve diğ., 1993). Her bir PZR döngüsünde oluşan floresans ışınım miktarı, hibridizasyon ve hidroliz problemleri kullanıldığı zaman ikisinde de artmasına rağmen, floresans sinyali oluşumu farklılık göstermektedir. Hibridizasyon problemlerinde hedef DNA'ya bağlanma sonucunda sinyal oluşurken, hidroliz problemlerinde hedef DNA'dan ayrılma sonucunda sinyal oluşur. Hibridizasyon problemleri özellikle mutasyonların saptanmasına yönelik erime eğrisi analizi için kullanılır.

Diziye özgü saptama metotları, kantitatif analizlerde en hassas RT-PZR yöntemlerinden birisi olduğu için özellikle tanı amaçlı olarak tıpta geniş kullanım alanlarına sahiptir. Ancak, yaşanan optimizasyon zorlukları, kullanılan sarf malzemelerin pahalı olması ve nitelikli yüksek iş gücüne ihtiyaç duymaları bu tekniklerin kullanımını kısıtlamaktadır. Özellikle, gıdaların ana bileşik ve katkı içindeki hayvan ve bitki türlerinin nitel ve nicel tahmininde, bitkilerde yapılan gen anlatımı çalışmalarında hidroliz ve hibridizasyon problemlerine nazaran SYBR-Green tekniğinin kullanılması daha uygundur (Harald, 2009).

TaqMan® Prob Yöntemi

TaqMan Probları, iki farklı floresans boya ile boyanmış, diziye özgü oligonükleotitlerdir. Bu problemler, primerlerden daha uzun olup 20-30 baz uzunluğuna sahiptir ve Tm değerleri 10° daha yüksektir. TaqMan sisteminde floresans boyalar, 5' ve 3' uçlarına veya iç bölgelerine eklenir. Bu nedenle yöntem, "5' nuclease assay" olarak da adlandırılmaktadır (Wong ve Medrano, 2005). Yöntemde kullanılan prob, tek zincirli olup çoğaltılmak istenilen DNA'ya tamamlayıcıdır. Ayrıca, 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretlenmiştir. Probun 5' ucunda raportör florokrom (6-carboxyfluorescein = 6-FAM), 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine = TAMRA) bulunur. Prob, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik aside bağlanmasıyla yeni zincir oluşmaya başlar. Probun bağlandığı noktaya gelindiğinde sentezin devam edebilmesi için taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar (Holland ve diğ., 1991). Böylece, raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. DNA zincir sentezi uzamaya devam eder. Her döngüde üretilen ampikon miktarına paralel olarak floresans sinyal şiddeti de artar (Cacherill ve Uhl, 2001).

Moleküler Boncuk Yöntemi

Moleküler boncuk yöntemi, TaqMan Prob ve SYBR Green I yöntemleri ile yapısı ve çalışma prensibi bakımından karşılaştırıldığında oldukça farklıdır (Bustin, 2000). Moleküler boncuklar oligonükleotit problemler olup hedef DNA/RNA'ya hibridize olduklarında yapılarında değişiklik gösterebilecek özelliğe sahiptirler. Bu nedenle

ortamdaki ısı değişimleri sırasında molekülün yuvarlak yapısı düz hale geçebilmektedir. Halka formundaki yapının yuvarlak uç kısmı çoğaltılacak DNA ile komplementer tek zincirli DNA dizisini içerir. Kullanılan proplar hedef nükleik asit dizilerine hibridize olmadan önce iki boya birbirine en yakın pozisyonda bulunmaktadır. Bu sırada baskılayıcı florofor, floresansın yayılmasını engellediği için moleküler boncuk probu solüsyon içerisinde serbest haldeyken ışımaya yapmaz. Hedef DNA bölgesi PZR ile çoğalmaya başladığı andan itibaren prob, tamamlayıcısı olduğu DNA ile karşılaşır ve yapısal değişikliğe uğrayarak düz, çift zincirli hale geçer. Böylece, iki florokrom birbirinden uzaklaşır ve baskılayıcı etki ortadan kalktığı için ışımaya oluşur. Ortamdaki floresans miktarı artar (Tyagi ve Kramer, 1996). Primer uzama basamağında sıcaklık arttığında, moleküler boncuk propları hedeflerinden ayrılırlar ve floresans yeniden ortadan kalkar. Her döngünün bağlanma basamağında yeni bir hibridizasyon oluşur ve sonlanan floresansın yoğunluğu, bir önceki döngünün sonunda biriken ürünün miktarını gösterir.

Bu yöntemde dikkat edilmesi gereken en önemli nokta prob tasarımıdır. Optimal şartlar sağlanamazsa, özellikle uygun sıcaklık bulunamamışsa probun halka şeklindeki yapısı değişikliğe uğramaz. Bu nedenle, ortamda hedef DNA dizisi bulunsa bile floresans ışımaya gerçekleşmeyebilir (Bustin, 2000). Moleküler boncuk yöntemi, genetik tarama, SNP çalışmaları ve farmakogenetik çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. (Shi, 2002; Marras ve diğ., 2003).

Scorpion (akrep) primerler

Bu yöntemde firkete yapısında olan iki PZR probu kullanılır. Proba, primer ve sentez esnasında primerin halka yapısını korumasını sağlayan PZR reaksiyonu durdurucu eklenmiştir. Bu proplardan bir tanesi 5' ucunda florofor, diğeri ise 3' ucunda baskılayıcı görevindedir. Scorpion primerler, hedef dizinin iç kısmına tamamlayıcı olan bir sekansı içermektedir. İlk amplifikasyon döngüsü sırasında, primer bağlandıktan sonra uzar ve aynı DNA zincirindeki komplementer bölgeye bağlanır. Bu bağlanma ile baskılayıcı molekülün etkisinden kurtulan florofor, floresans ışık salar (Sharkey ve diğ., 2004). Elde edilen floresans sinyali amplikasyon ürününün miktarı ile orantılıdır. Yöntemin en önemli avantajı, mutasyon saptamada hızlı ve daha iyi sonuç vermesidir.

Hibridizasyon Prob Yöntemi (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer)

Hedefe özgü problemler kullanılarak Real-Time PZR ile amplifikasyonun saptanması yöntemidir. Bu yöntem Roche tarafından “LightCycler®” PZR cihazında kullanılmak üzere geliştirilmiştir (Chaplin ve diğ., 1999). Özgünlüğü arttırmak için diziye özgü farklı boya ile işaretli iki farklı hibridizasyon probu tasarlanmıştır. Özgül problemlerden biri 3’ ucundan floresans verici boya ile işaretlidir (donör boya) ve LightCycler® ışık kaynağı ile uyarıldığında yeşil renkte floresans yayar. İkinci prob ise, 5’ ucundan alıcı boya (acceptor dye) ile işaretlidir. “Dual hibridizasyon problemleri” adı verilen bu tür problemlerin uzunlukları 30 nükleotide kadar olabilir. 5’ ucuna tutunmuş olan alıcı floroforun uyarılma spektrumu diğer probun yayılım spektrumu ile çakışır. İkinci probun bağlanma sonrasında 5’ ucundan sentez olmayıp, kendi uzamasını engellemesi için bu uca bir fosfat bağlanmıştır. PZR reaksiyonu sırasında, bu iki prob hedef nükleik asit dizisine bağlanıp birbirine yaklaştığında (1-5 nükleotid uzaklıkta) işaretli uçlar yanyana gelmiş olur. İki boyanın yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek kırmızı renkte floresans oluşumuna yol açar. Bu iki boya arasındaki enerji yayılımına “Floresans Rezonans Enerji Transferi” adı verilir (Fluorescence resonance energy transfer-FRET) (Bernard ve Wittwer, 2000). Böylece enerji, verici boyadan alıcı boyaya transfer olur. Oluşan floresans miktarı, PZR sonucu oluşan ürün miktarına bağlı olarak ortamdaki hibridizasyon derecesiyle doğru orantılı olarak artar. Her PZR döngüsünün düşük sıcaklık basamaklarında prob hedef DNA’ya bağlanarak ışımaya sağlar, yüksek sıcaklık basamaklarında hedeften ayrılır. Her döngüde, problemlerin bağlanabileceği hedef DNA miktarı arttığı için, sinyal miktarı da artar (Wong ve Medrano, 2005).

2.4.3. Mikroarray Teknolojisi

Mikroçiplerle küçük örnek hacimleri kullanılarak tek deneyde binlerce genin farklı koşullardaki anlatımları aynı anda incelenebilmektedir (Heller, 2002; Başaran ve diğ., 2010). Hücre içinde fonksiyonu bilinmeyen birçok genin anlatım düzeyinin ve düzey farklılıklarının belirlenmesi için mikroarray teknolojisinin kullanılması çok yaygındır. Özellikle tıp alanında önemli katkılar sağlayan bu teknoloji den bitki biyoteknolojisinde de yararlanılmaktadır. Bitkilerde mikroarray teknolojisi ilk defa Arabidopsis’te yaprak ve kökteki gen anlatım profillerini belirlemek için 48 cDNA parçacığını içeren çip

kullanılarak yapılmıştır (Schene ve diğ., 1995). Daha sonra 1443 Arabidopsis geni içeren cDNA mikroçiple farklı organ ve gelişme evresinde olan bitkilerde gen anlatım profilleri belirlenmiştir (Ruan ve diğ., 1998) .

Son yıllarda mikroçip teknolojisi model bitki olan Arabidopsis'in yanında tarımsal açıdan önemli olan birçok bitkide (pirinç, mısır, çilek, fasulye gibi) farklı koşullardaki gen anlatım profillerini belirlemek için kullanılmaktadır. Ayrıca mikroçiplerden bitkilerde abiyotik (tuz, kuraklık, sıcaklık, ağır metal alımı vb.) ve biyotik (patojenler, mikroorganizmalar, hayvanlar vb.) stresler sırasında aktif olan veya aktivitelerini azaltan genlerin bulunmasında yararlanılmaktadır. Buna benzer çalışmalar tüm genom DNA baz dizisi belli olan Arabidopsis ve pirinçte kullanılabileceği gibi kısmi genom DNA dizileri belirlenmiş ya da belirlenmekte olan birçok diğer bitkide de uygulanabilmektedir. Fakat bitkide ağır metal metabolizmasında görevli genlerin bulunup ilgili moleküler mekanizmaların aydınlatılması için kullanılan *Brassica juncea* ve *Brassica nigra* gibi pek çok bitki türünün mikroarray çipleri ticari olarak bulunmamaktadır. Bu bitkilerde tüm veya kısmi genom DNA baz dizileri belli olmadığı için çalışılmak istenen diziler hakkında yeterli genomik veri yoktur. Bu nedenle tür içindeki hibridizasyon (TİH) deneyleri mümkün olmamakta ve türler arası hibridizasyon (TAH) ile çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BİTKİSEL MATERİYAL

Bu çalışmada Brassicaceae familyasına ait *Brassica nigra* (Kara Hardal) bitkisi kullanılmıştır. Bitkinin sistematik tanımlaması aşağıda belirtildiği gibidir;

Alem	: Plantae	Bitkiler
Altalem	: Tracheobionta	Vasküler bitkiler
Üstbölüm	: Spermatophyta	Tohumlu Bitkiler
Bölüm	: Magnoliophyta	Angiospermliler, çiçekli bitkiler
Sınıf	: Magnoliopsida	Çiftçenekliler
Altsınıf	: Dilleniidae	-
Takım	: Brassicales (Capparales)	-
Familya	: Cruciferae (Brassicaceae)	Hardalgiller
Cins	: Brassica (L.)	Hardal
Tür	: <i>Brassica nigra</i>	Kara Hardal

B. nigra, yüksek oranda biyokütle üretimi, hızlı büyüme oranı, toprak üstü ve hasat edilebilen kısımlarında ağır metalleri tolere edebilme yeteneği göstermesi ve yapılacak moleküler çalışmaların uygulanabilirliği açısından elverişli olması nedeniyle tercih edilmiştir. Bu çeşitler TÜBİTAK, MAM, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü bitki odalarında yetiştirilmiştir.

3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN HARDAL EKOTİPLERİ VE ÖZELLİKLERİ

COST 859 projesi kapsamında yüksek bakır içeren topraklarda endemik akümülatör bitki tespit etmek için çalışmalar başlatılmıştır. Bu amaçla, Diyarbakır yöresinde Ergani civarındaki maden yataklarından farklı türde birçok bitki toplanmıştır. Yapılan fizyolojik taramalar ile *Brassica nigra* olduğu belirlenen kara hardal bitkisinin ağır metale karşı toleransının yüksek olabileceği tespit edilmiştir. Projenin alt bölümünü oluşturan bu tez çalışmasında ise bu ekotip ile yurtdışından getirtilen Etiyopya kökenli CGN06625 ve CGN06626 ekotipleri, Cu ağır metaline karşı toleranslarının

karşılaştırılması için kullanılmıştır. Aşağıda yurtdışından getirtilen CGN06625 ve CGN06626 ekotiplerinin tohum bankasındaki bilgileri yer almaktadır;

Svalbard Küresel Tohum Deposu (Svalbard Global Seed Vault) CGN06625

Sgsv id	: 237291
WIEWS Enstitü kodu	: NLD037
Kasa numarası	: 2
Koleksiyon adı	: Crucifer
Kabul numarası	: CGN06625
Tam bilimsel adı	: <i>Brassica L. nigra</i> (L.) Koch
Kaynak veya toplandığı ülke	: ETH (Etiyopya)
Tohum sayısı	: 400
Rejenerasyon ay ve yılı	: 1993
Temin eden enstitü kodu	: NLD037
Ülke Kodu	: ETH (Etiyopya)
Kabul edilme tarihi	: 2008-02-07
Depolama tarihi	: 2008-02-26

Svalbard Küresel Tohum Deposu (Svalbard Global Seed Vault) CGN06626

Sgsv id	: 237292
WIEWS Enstitü kodu	: NLD037
Kasa numarası	: 2
Koleksiyon adı	: Crucifer
Kabul numarası	: CGN06626
Tam bilimsel adı	: <i>Brassica L. nigra</i> (L.) Koch
Kaynak veya toplandığı ülke	: ETH (Etiyopya)
Tohum sayısı	: 400
Rejenerasyon ay ve yılı	: 1984
Temin eden enstitü kodu	: NLD037
Ülke Kodu	: ETH (Etiyopya)
Kabul edilme tarihi	: 2008-02-07
Depolama tarihi	: 2008-02-26

3.3. BİTKİLERİN YETİŞTİRİLMESİ

B. nigra CGN06625, CGN06626 ve Diyarbakır ekotiplerine ait tohumlar yüzey gerilimini arttırmak için Tween-20 içeren % 5'lik sodyum hipoklorit çözeltisi ile 15 dk boyunca yüzey sterilizasyonuna tabi tutulduktan sonra, deiyonize su altında yıkanmıştır. İmbibisyonu sağlamak amacıyla 1 saat boyunca deiyonize suda bekletilen tohumlar, çimlenme ve fide gelişimi için 20 cm çapındaki plastik saksılardaki (saksı başına 10 tohum olacak şekilde) nemli perlit ortamına ekilmiştir. Dördüncü günde çimlenen tohumlar, ½ oranında seyreltilen Hoagland besi çözeltisi (Hoagland ve Arnon, 1938) (Tablo 3.1) ile haftada 3 gün sulanmıştır. Çimlenme gününden itibaren 3 hafta süre boyunca perlit ortamında büyütülen *B. nigra* fideleri daha sonra, ½ Hoagland besi çözeltisi içeren ve akvaryum motoru ile havalandırılan 6 ve 12 lt'lik polipropilen su kültürü kaplarına (kap başına sırasıyla 5 ve 10 adet bitki) aktarılmıştır. Hidroponik ortamda 1 hafta süreyle büyütülen bitkilerden, eşit büyüme evresinde olanlar uygulama yapılmak üzere seçilmiştir. Bitkiler, %60 nem ve 16 sa ışık (25 ± 2 °C) / 8 sa karanlık (20 ± 2 °C) fotoperiyodunda, $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ışık şiddeti altında bitki büyüme odasında yetiştirilerek uygulamaya alınmıştır.

Tablo 3.1: Hoagland Solüsyonu İçeriği (%100 1 litre).

Adı	Stok Derişim	Kullanılan Miktar
Potasyum nitrat (KNO_3) (Sigma P8291)	1 M	5 ml
Kalsiyum nitrat 4 hidrat $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma C4955)	1 M	5 ml
Potasyum fosfat (K_2SO_4) (Sigma P5379)	1 M	1 ml
Magnezyum sülfat (MgSO_4) (Sigma M7506)	1 M	2 ml
Mikroelement stok solüsyonu *	%100	1 ml
Fe-EDTA	100 mg/l	1 ml

Tabloda belirtilen tuzlar deiyonize su ile hazırlanan stok çözeltilerinden belirtilen miktarlarda alınarak, konsantrasyonu 5 M olacak şekilde son hacim deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır (Hoagland ve Arnon, 1938).

* Mikroelementleri içeren stok çözeltinin 1 litresinde bulunan mineral tuzlarının miktarları

Adı	Miktar
Borik Asit (H_3BO_3) (Sigma B6768)	2,86 g
Manganez (II) klorür-4 Hidrat ($Cl_2Mn.4H_2O$) (Sigma M 3634)	1,81 g
Çinko sülfat-7 Hidrat ($ZnSO_4.7H_2O$) (Sigma Z 4750)	0,22 g
Bakır sülfat-5 Hidrat ($CuSO_4.5H_2O$) (Sigma C 1297)	0,08 g
Molibdik asit ($MoO_3.H_2O$) (Sigma %85)	0,02 g

3.4. BİTKİLERE AĞIR METAL UYGULAMASI

Bu çalışmada *Brassica nigra* türüne ait CGN06625, CGN06626 ve Diyarbakır ekotiplerine Cu ağır metali uygulanmıştır. Cu elementi, Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA)'nın hazırladığı 129 tane öncelikli çevre kirleticileri arasında yer aldığından, uygulamalar için seçilmiştir (ATSDR, 2013). Bununla birlikte, Türkiye'de çok sayıda bakır madeninin işletilmesi ve bu bölgelerde meydana gelen yoğun Cu kirliliği de bu elementin seçilmesinde etkili olmuştur. Cu, bitkilere bakır sülfat çözeltisi ($CuSO_4$) şeklinde uygulanmıştır. Literatür taramaları ve optimizasyon çalışmaları için yapılan ön denemeler sonucunda uygulanacak konsantrasyonlara karar verilmiştir. Özellikle uygulama süresince düşük konsantrasyonlar tercih edilerek bitkide gözle görülür herhangi bir morfolojik değişikliğe sebep olmaması amaçlanmıştır.

B. nigra CGN06625, CGN06626 ve Diyarbakır ekotiplerine ait 31 günlük bitkilere ağır metal uygulaması, her 1 lt' lik polipropilen kaba bir bitki olacak şekilde yapılmıştır (Şekil 3.1). Her deney kabı için toplam hacmi 1 lt olacak şekilde hazırlanan ½ Hoagland besi çözeltisine stok metal çözeltisinden (0,5 M) hesaplanan miktarlarda metal ilavesi yapılarak farklı konsantrasyonlarda Cu içeren (25 ve 50 μM) uygulama ortamı hazırlanmıştır. Ağır metal uygulanmayan kontrol bitkiler için ½ Hoagland besi çözeltisi uygulama ortamı olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.1: 72 saat süreyle hidroponik ortamda Cu uygulaması yapılan CGN06625 ekotipinin genel görünümü (1. Gün).

3.4.1. Bitkilerin Hasat Edilmesi

Uygulama süresi sonunda kontrol (metal uygulanmayan) ve deney (metal uygulanan) bitkileri, kök, gövde ve yaprak kısımları gibi bitkinin farklı organlarında biriken ağır metal miktarının tayini amacıyla ve moleküler genetik çalışmalarda kullanılmak üzere hasat edilmiştir. Ağır metal miktar tayini yapılacak örneklerin kökleri hasat sırasında 3'er dk deiyonize su ile yıkanmış ve tüm örnekler 75 °C' ye ayarlanmış etüvde 72 saat kurumaya bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda örneklerin kuru ağırlıkları alınmıştır. Moleküler analizlerin yapılacağı örnekler ise sıvı azota alınarak -80 °C' de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Her deney seti kendi içinde kontrol ve deney gruplarına ait 3'er adet biyolojik tekrar içermektedir. Her bir biyolojik tekrarda ise 3 farklı bitki bulunmaktadır. Bitkilerin hasat işlemi, her biyolojik tekrara ait 3 farklı bitkiden kök, gövde ve yaprak örnekleri alınarak, kendi grubuyla biraraya getirilip harmanlanarak yapılmıştır.

dokularda biriken Cu miktarının belirlenmesi için yaş yakma yöntemi uygulanan bitki örneklerinin analizleri, İndüktif Eşlenmiş Plazma-Optik Emisyon Spektrometre-Optima 7000 DV (ICP-OES) (Perkin Elmer)'de yapılmıştır. ICP-OES cihazı %1'lik HNO₃ ile standart ana çözeltiden (1000 ppm) seyreltilerek hazırlanan standartlarla (0,1 ppm, 0,2 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 5 ppm) kalibre edildikten sonra numunelerin içerdiği Cu miktarı 327,393 nm dalga boyunda, 3 tekrarlı olacak şekilde ölçülmüştür. ICP-OES cihazının çalışma koşulları Tablo 3.2'de verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre, *B. nigra*, Diyarbakır, CGN06625 ve CGN06626 ekotiplerinin kök, gövde ve yaprak kısımlarında akümüle edilen ağır metal miktarı mg/kg KA (kilogram kuru ağırlık başına miligram) olacak şekilde hesaplanmıştır.

Tablo 3.2: ICP-OES Çalışma Koşulları.

Cihaz	Perkin Elmer Optima 7000 DV
Dalga boyu	Nm
Replikasyon	3
RF Gücü	1450 W
Plazma Gaz Akışı	16.0 L/min
Numune Pompalama Oranı	25 rpm

3.6. METAL AKÜMÜLASYONU İLE İLİŞKİLİ GENLERİN TANIMLANMASI VE İFADELERİNİN BELİRLENMESİ İÇİN KULLANILAN MOLEKÜLER YÖNTEMLER

3.6.1. Total RNA İzolasyonu

Farklı konsantrasyonlarda Cu uygulaması yapılmış olan bitkilerin kök, gövde ve yaprak dokularında gen anlatım çalışmaları yapılmak üzere total RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Total RNA'ları elde etmek için, içerisinde homojenizasyon kolonu ve RNA izolasyon kolonu olmak üzere iki farklı kolon bulunan RNA izolasyon kiti (RNeasy Mini Kit, Qiagen) kullanılmıştır. İzlenen yöntem aşağıdaki gibidir;

1. -80 °C’de saklanan bitki örneklerinin sıvı azotla dondurularak çözünmesi önlenmiş ve minimum 0,3 g olacak şekilde tartımı yapılmıştır.
2. İzolasyona başlamadan önce guanidin hidroklorit (GuHCl) içeren, örnek başına 600 µl RLC tamponuna %10 oranında (ml başına 10 µl olacak şekilde) β-merkaptoetanol ilave edilmiş ve tampon homojenize edilip vortekslenmiştir.
3. Bitki materyali toz hale gelinceye kadar, sıvı azot yardımıyla steril havan içerisinde ezilmiş ve steril santrifüj tüpüne (15 ml) aktarılmıştır.
4. Örnek üzerine 100 mg bitki materyaline 600 µl olacak şekilde RLC tamponu ilave edilerek vorteks yapılmıştır.
5. Vortekslenen örnek 2 ml’lik homojenizasyon (QIAshredder) kolonuna aktarılarak 2 dk 13.000 rpm’de santrifüj edilmiş ve filtreden geçirilmesi sağlanmıştır.
6. Kolondan geçen lizat steril tüpe aktararak, lizatın hacminin yarısı kadar %96’lık etanol ilave edilmiş ve pipetle karıştırılmıştır.
7. Karışım RNA izolasyon (RNeasy Spin) kolonuna aktarılıp 10.000 rpm’de 15 sn santrifüj edilmiştir. Bu aşamadan sonra kolonun yıkanması işlemlerine geçilmiştir.
8. Kolondan geçen sıvı atılarak birinci yıkama olarak, kolona 700 µl *RW1 Tamponu ilave edilmiş ve 10.000 rpm’de 15 sn santrifüj edilmiştir.
9. Kolondan geçen sıvı tekrar atılarak, kolonu yıkamak için 500 µl *RPE tamponu ilave edilmiş ve 10.000 rpm’de 15 sn santrifüj edilmiştir.
10. Kolondan geçen sıvı tekrar atılmış, ikinci kez 500 µl RPE kolona ilave edilmiş ve 10.000 rpm’de 2 dk santrifüj edilmiştir. Böylece yıkama aşaması tamamlanmıştır.
11. Kolon steril, RNaz içermeyen 1,5 ml ependorf tüpe yerleştirilerek kapakları kesilmiş ve üzerine 40 µl dietilpirokarbonat (DEPC)’lı saf su ilave edilerek 10.000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir. Membranda kalabilecek RNA’ları toplamak amacıyla tekrar 20 µl DEPC ddH₂O ilave edilerek santrifüj işlemi tekrarlanmış ve elde edilen RNA örnekleri -80 °C ’ye kaldırılmıştır.

3.6.2. Total RNA Miktar Tayini

Brassica nigra ekotiplerinden (CGN06625, CGN06626 ve Diyarbakır) elde edilen RNA’ların miktarı ve saflığı Nanodrop spektrofotometresinde (Thermo) 260 nm ve 280

nm dalga boyundaki okumalarla belirlenmiştir. DEPC'li su ile 1/10 oranında seyreltilen örneklerden 1 µl alınarak cihazda okutulan total RNA örneklerinin konsantrasyonları ng/µl cinsinden belirlenmiştir. Saflık oranları (OD 260/ OD 280) 1,60-2,00 arasında olan örneklerin %1'lik formaldehitli agaroz jelde elektroforezleri yapılarak RNA'ların konsantrasyon miktarları ve sağlamlıkları kontrol edilmiştir.

3.6.3. Total RNA'ların Formaldehitli Agaroz Jelde Ayırıştırılması

Elde edilen total RNA'lar %1'lik formaldehitli agaroz jelde ayırıştırılmıştır. Jelin hazırlanması ve elektroforez işlemleri Sambrook ve diğ. (1989)' nde verildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Jelin içeriği aşağıda yer almaktadır:

Agaroz 1 g

5XMOPS (morfolino-propan sülfonik asit) 10 ml

DEPC'li ddH₂O 83 ml

Formaldehit 7 ml

Agaroz ve DEPC'li ddH₂O mikrodalga fırında eritildikten sonra 5XMOPS ve formaldehit belirtilen miktarlarda ilave edilmiştir. Karıştırılarak homojen hale getirilen karışım, çeker ocak içerisinde mini jel elektroforez kasetine dökülmüştür. Polimerize olan jel 1XMOPS ve formaldehit içeren yürütme tamponunun bulunduğu tanka alınarak örnekler yüklenmeden önce 15 dk ön yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu esnada RNA örneklerinin 3 µl'si kullanılarak üzerine 1:1 oranında etidyumbromür (EtBr) içeren yükleme tamponundan (3 µl) ilave edilerek 65 °C'de 10 dk denatüre edilmiştir. Denatürasyon sonrası buza alınan örneklerin tamamı kuyulara yüklenmiştir. Yüklenen örneklerin 80 V'da 30 dk ayrışması sağlanmıştır.

3.6.4. Total RNA'dan Genomik DNA'nın Uzaklaştırılması

Total RNA'da genomik DNA'nın bulunması ileride yapılacak olan kantitatif RT-PZR deneylerinde yanlış sonuçlara yol açacağından, genomik DNA'nın RNA'dan uzaklaştırılması büyük önem taşımaktadır. Formaldehitli jel üzerinde RNA'nın saflığı görülsün bile DNazI uygulamasının yapılması gerekmektedir. Genomik DNA'nın uzaklaştırılması, elde edilmiş olan total RNA'nın DNazI enzimi etkisinde bırakıldıktan sonra RNA'nın tekrar çöktürülmesi ve sulandırılması basamaklarından oluşmaktadır. Bu işlem için RNaz içermeyen DNazI enzimi (Roche) kullanılmıştır. Total RNA'dan

DNA'nın uzaklaştırılması metodu, kitte belirtilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir (Cevher-Keskin, 2006).

DNazI- 10X reaksiyon tamponu: 100 mM Tris-HCl, pH 8.4
 500 mM KCl
 15mM MgCl₂
 %0.01 jelatin

1. Steril ve RNaz içermeyen 1,5 ml'lik ependorf tüp içerisine Tablo 3.3'de verilen miktarlarda 10X inkübasyon tamponu ve DNazI (10U/μl) enzimi ilave edilmiştir.

Tablo 3.3: DNazI uygulamasında kullanılan bileşenler ve reaksiyon miktarları

Bileşenler	Son Konsantrasyon
Total RNA	50 μl (10-50 μg)
10X Reaksiyon Tamponu	5 μl
DNaz I (10 U/μl)	1 μl
Toplam	50 μl

- Örneklerin homojen olarak karışması sağlanarak 37 °C'de 15 dk bekletilmiştir.
- Mevcut protein ve DNazI kontaminasyonunu uzaklaştırmak için fenol /kloroform (3:1) uygulaması gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası reaksiyon hacmi kadar (50 μl) fenol/kloroform ilave edilerek, örnekler 30 sn vorteks yardımıyla karıştırılmıştır.
- Buz üzerinde 10 dk bekletilmiştir.
- Maksimum hızda (13 000 rpm) 10 dk +4 °C'de santrifüj edilmiştir.
- Üst faz alınarak steril bir tüpe aktarılmıştır.
- Etanolle çöktürme aşaması için alınan üst faz üzerine 5 μl 3 M sodyum asetat (NaOAc) (pH:5.2) ve 200 μl saf etanol ilave edilmiştir.
- En az 1 saat olacak şekilde –80 °C'de bekletilmiştir.
- Soğutmalı santrifüjde 30 dk 13 000 rpm'de santrifüj edilerek RNA'lar çöktürülmüştür.
- Etanol uzaklaştırılarak RNA çöktürmesi üzerine DEPC'li saf su ile hazırlanmış olan %70'lik etanol ilave edilmiş ve 5 dk 13 000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

11. Steril kabin içerisinde tüp kapakları açık şekilde tutularak etanolün uçması sağlanmıştır.
12. 20 µl DEPC'li saf su ile RNA çökeltisi çözülerek, daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

3.6.5. DNazI Sonrası Bioanalyzer (Agilent) RNA Miktar Okumaları

Kantitatif RT-PZR için cDNA çalışmalarına geçmeden önce DNazI ile muamele edilerek temizlenmiş olan RNA'ların kalite ve miktarlarının kontrolü Bioanalyzer 2100 (Agilent)'de gerçekleştirilmiştir. Kök, gövde ve yaprak örneklerinden elde edilen ve genomik DNA içermeyen total RNA'ların kontrolü, cihazda 260 ve 280 nm dalga boylarında yapılmıştır. Bioanalyzer, daha az örnek kullanmayı sağladığı ve hassasiyeti oldukça yüksek olduğu için RNA'ların kalitesini belirlemek amacıyla tercih edilmiştir. Bu çalışmada, total RNA miktar okumaları için RNA Nano 6000 çipleri kullanılmıştır.

3.6.6. Ters Transkripsiyon-Komplementer (Tamamlayıcı) DNA (cDNA) Sentezi ve Kontrolü

Saf hale getirilmiş, kalite ve miktarları Bioanalyzer Agilent 2100 cihazında kontrol edilmiş total RNA'ların ters transkripsiyonları, RNA'ya yönelik bir DNA polimeraz olan Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV)-ters transkriptaz enzimi ile sağlanmıştır. Farklı dokulardan elde edilen total RNA'lardan cDNA sentezi için "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit" (Roche) içerisinde yer alan tampon ve enzimler kullanılmıştır. Kitte açıklanan yönteme göre aşağıda belirtildiği şekilde birbirini takip eden 2 aşamalı reaksiyonla cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir:

I. Reaksiyon:

	<u>Hacim</u>	<u>Son Konsantrasyon</u>
Total RNA		1 µg/µl
Oligo dT Primer	1 µl	2,5 µM

olacak şekilde DEPC'li saf su ile 13 µl'ye tamamlanmıştır. RNA ve primer karışımı 65 °C'de 10 dk inkübe edildikten sonra 2. aşamada kullanılan karışımdan toplam hacim 20 µl olacak şekilde her bir tüpe dağıtılmıştır.

II. Reaksiyon:

	Hacim	Son Konsantrasyon
5X reaksiyon Tamponu	4 µl	1X
RNaz inhibitörü 40U/µl	0,5 µl	20 U
dNTP mix	2.0 µl	1mM (herbiri için)
Ters Transkriptaz 20U/ul	0.5 µl	10 U

olacak şekilde hazırlanan karışım ilk aşamadan sonra birinci karışımın üzerine eklenmiştir. Toplam hacmi 20 µl olan örnekler 50 °C’de 30 dk inkübe edildikten sonra enzim inhibisyonu için 85 °C’de 5 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyon +4 °C’de sonlandırılmıştır.

cDNA’ların sentezinin kontrolü konvansiyonel Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) (Applied Biosystems) ile β-aktin primer çifti kullanılarak yapılmıştır. PZR cihazında kurulan döngü programı Tablo 3.4’de detaylı olarak verilmiştir.

Tablo 3.4: cDNA kontrolü için PZR cihazında kurulan döngü programı.

Basamak	İşlem	Süre	Sıcaklık	Döngü
I.	Denatürasyon	5 dk	95 °C	1
II.	Denatürasyon	30 sn	95 °C	} 35
	Bağlanma	30 sn	55 °C	
	Uzama	30 sn	72 °C	
III.	Son uzama	10 dk	72 °C	1

Tüm cDNA’lardan pozitif sonuç elde edildikten sonra örnekler, bir sonraki aşama olan kantitatif RT-PZR’da kullanılmak üzere -20 °C’ye kaldırılmıştır.

3.6.7. Primer Tasarımı

Mikroarray analizi sonucunda elde edilen, metal alınımı ve taşınmasında rol aldığı düşünülen genlerin anlatımlarının doğrulanması, bu genlere ait primerler kullanılarak kantitatif ters yazılım polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle yapılır. Mikroarray analizinde *Brassica nigra*’nın ticari çipleri bulunmadığı için Arabidopsis’e ait prop dizileri kullanıldığından, primerler doğrudan bu problardan tasarlanamamıştır. Tasarlanan primerlerin *Brassica nigra* (BB) bitkisine uygun olması ve etkin bir şekilde çalışması için, Arabidopsis bitkisine ait gen dizilerinin tümü ile fitoremediasyon

çalışmalarında tercih edilen *Brassica juncea* (AABB) ve bu türe yakınlık gösteren *Brassica rapa* (AA) bitkisinin EST (Expressed Sequence Tag) dizileri karşılaştırılmıştır. Arabidopsis bitkisine ait gen dizileri TAIR (The Arabidopsis Information Resource) (www.arabidopsis.org) ve Biology WorkBench (<http://workbench.sdsc.edu/>) veri tabanlarından alınmıştır. *B. nigra*, *B. juncea* ve *B. rapa*'nın EST dizileri ise NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) veri tabanından alınmıştır. Elde edilen EST dizileri karşılaştırılarak *Brassica* türleri arasında en korunaklı bölgeler bulunmuştur. Böylece, daha düzgün primerler tasarlamak amacıyla yapılan karşılaştırmalar sonucunda her gen için en çok benzerlik gösteren diziler seçilmiştir. Bu bölgelerden tasarlanan 10 adet primer çiftinin (ileri=forward=F ve geri=reverse=R) baz uzunluğu 19-21 arasında değişmektedir (Tablo 3.5). Primerler tasarlanırken ampikon uzunluğunun 95-160 baz içermesine ve GC içeriğinin %40-50 arasında olmasına dikkat edilmiştir. Ayrıca erime sıcaklığının (55 °C) primer çiftleri arasında mümkün olduğu kadar farklılık göstermemesine özen gösterilmiştir. Tasarlanan primerlerin uygunluğu Biology WorkBench (<http://workbench.sdsc.edu/>) ve Primer1 programları kullanılarak kontrol edilmiştir. Mikroarray analizi sonucunda metal alınımı ve taşınmasında rol aldığı düşünülen ve sentezi yaptırılan primerler Tablo 3.5'de verilmiştir.

Tablo 3.5: Tasarlanan primerlere ait diziler, Tm değerleri, GC oranı (%) ve ampikon uzunlukları.

Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')	Primer uzunluğu	Tm	%GC	Ampikon uzunluğu
BnPIP2-5F1	5'-GTTCTGTATTGGCTCCATT -3'	20	56.59	45	99 bp
BnPIP2-5R1	5'-ACTTCTTGACAGGGTTGATAC-3'	20	54.34	45	
BnGSKB6F1	5'-ACCAGTGAAGTATCCATCAA -3'	20	56.33	45	
BnGSKB6R1	5'-TGCCTGAGGGTATAGAATGAC-3'	21	56.76	47.6	103 bp
BnCAT3F1	5'-CACCAGAGAGGGAACTTTG-3'	20	57.36	50	141 bp
BnCAT3R1	5'-TCCAGAATCCTCCAGTACTC-3'	20	54.18	50	
BnCSD1F1	5'-GAGTTGCAGTTTGAACAGC-3'	20	56.12	45	
BnCSD1R1	5'-CCATGAAGACCAGGCTTAAG-3'	20	57.42	50	118 bp
BnFSD1F1	5'-CAACCTCAAGAAACAGGTTC -3'	20	54.81	45	149 bp
BnFSD1R1	5'-TCATTGACTCCCAGAAGAAC-3'	20	55.15	45	
BnLOS2F1	5'-AGCCACAGAAGTGGTGAAAC -3'	20	57.76	50	
BnLOS2R1	5'-TACGCAAAAGCTGGTTGTAC -3'	20	56.58	45	130 bp
BnPDC3F1	5'-GAGCTTAGGTGTTTCCAAAC-3'	20	54.09	45	122 bp
BnPDC3R1	5'-ATGTACACAGGCTTGCTCTC-3'	20	55.47	50	
BnRBOF1	5'-GGTGACTAGGGAACAAGGAT-3'	20	55.57	50	
BnRBOR1	5'-CTTCCTCGTACACACTCGTG-3'	20	56.87	55	119 bp
BnMT1aF1	5'-ATGGCAGGTTCTAACTGTGG -3'	20	57.67	50	98 bp
BnMT1aR1	5'-CAGCTACAGTTGTGCGCACTC-3'	20	57.20	55	
BnGAPC1F1	5'-AAGGCTATCAAGGAGGAATC-3'	20	55.04	45	
BnGAPC1R1	5'-ACAACTTGTCGCTCAATG-3'	19	54.71	42.1	146 bp

3.6.8. Yarı-Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

In vitro koşullarda oligonükleotid primerler kullanılarak DNA polimeraz enzimi tarafından DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen özgün bir bölgenin çoğaltılması için yarı-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu kullanılır (Dieffenbach ve diğ., 1993). Çalışmalarda PZR uygulamasında kullanılan bileşenler ve reaksiyonlar ayrıntılarıyla Tablo 3.6'da verilmiştir. Bu çalışmada farklı dokulardan elde edilen cDNA'lar ve tasarlanan primerlerin kontrolü, PZR uygulamasıyla gerçekleştirilmiştir. PZR şartlarının optimizasyonu için herhangi bir yöntem denenmemiş olup laboratuvarında daha önceden optimize edilmiş olan program kullanılmıştır (Tablo 3.4). PZR uygulamalarında, *Arabidopsis thaliana*'ya ait aktin mRNA dizisinden tasarlanan ve 55 °C'de iyi çalışan β -aktin primer çifti (referans gen, house keeping gen) (Tablo 3.7) iç kontrol olarak kullanılmıştır. Referans gen β -aktine ait primer çifti PZR ile kontrol edildikten sonra, tasarlanan primerlerin kontrolü de aynı program ile yapılmıştır (Tablo 3.4).

Tablo 3.6: PZR uygulamasında kullanılan bileşenler ve reaksiyon miktarları (μ l).

Bileşenler	Hacim (μ l)/Reaksiyon
10X Taq polimeraz tamponu	2,5
dNTP Karışımı (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (10 mM)	0,5
MgCl ₂ (25 mM)	1,5
Primer-F (10 pmol)	0,5
Primer-R (10 pmol)	0,5
Taq DNA polimeraz (5 u/ μ l)	0,125
cDNA (100 ng/ μ l)	2
Steril Saf Su	17,375
Toplam Reaksiyon Hacmi	25

Tablo 3.7: β -aktin genine ait primer dizileri ve ampikon uzunluğu.

Primer Adı	Primer Dizisi	Ampikon Uzunluğu
β -aktin-F	5'-TGTTCCACCACCACAGCAGAGCG-3'	150
β -aktin-R	5'-CACCTGTCCGTCGGGTAACCTCG-3'	

Ayırıcı bir matriks olan agaroz jel içerisinde elektriksel alana maruz bırakılan, DNA veya RNA parçalarının büyüklüklerine göre ayrıştırılması sağlayan yöntem agaroz jel

elektroforezidir. Bu nedenle, PZR sonucunda elde edilen ürünler, EtBr içeren %2'lik agaroz jelde ayrıştırılarak kontrol edilmiştir. Agaroz jel, 2 g agaroz ve 100 ml 1X TAE (Tris-Acetate-EDTA) tamponu içermektedir. Karışım mikrodalga fırında agaroz tamamen eriyene kadar kaynatılmıştır. Agaroz, elle dokunulabilir sıcaklığa gelinceye kadar (yaklaşık 50 °C) soğutulduktan sonra 5 µl EtBr (stok konsantrasyon: 10 µg/ µl) eklenmiş ve hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek mini jel elektroforez kasetine dökülmüştür. Yaklaşık 30 dk sonra polimerize olan jel, içerisinde 1X TBA yürütme tamponu bulunan elektroforez tankına alınmıştır. 3 µl 6X DNA yükleme boyası ile karıştırılan örneklerin kuyulara yüklendikten sonra 80 V'da 30 dk ayrışması sağlanmıştır.

3.6.9. Karşılaştırmalı Transkriptom Profillemeye Yöntemiyle Metal Metabolizmasında Yer Alan Genlerin İrdelenmesi

Hücre içinde fonksiyonu bilinmeyen birçok genin ekspresyon düzeyinin ve düzey farklılıklarının belirlenmesi için mikroarray teknolojisinin kullanılması çok yaygındır. Bu nedenle bu tez çalışmasında da metal metabolizmasında yer alan genlerin belirlenmesi için karşılaştırmalı transkriptom profillemeye yöntemiyle mikroarray analizleri yapılmıştır. Mikroarray tekniği, aynı anda binlerce genin anlatım seviyelerinin yüksek verimlilikte çalışılabilmesine olanak sağladığından ağır metal stresine ilişkili genlerin belirlenmesinde öncelikli olarak tercih edilmiştir.

B. nigra'nın farklı ekotiplerinde Cu stresine karşı mRNA düzeyindeki gen ekspresyon farklılıklarını incelemek üzere "Affymetrix GeneChip Arabidopsis ATH1 Genome Array" kullanılmıştır. Bu çalışmada yapılan mikroarray hibridizasyon deneyleri, gerekli laboratuvar alt yapısı sağlanamadığı için, TÜBİTAK-COST 859 proje kapsamında, Affymetrix firmasının Türkiye temsilcisi olan AYKA Ltd. Şti'ye yaptırılmıştır.

Mikroarray çalışmalarında kullanılan GeneChip® Arabidopsis ATH1 Genome Array'de yer alan oligonükleotid prob lar 25 baz uzunlukta olup 22 850 prob seti 24 000 geni tanımlamaya yönelik olarak hazırlanmıştır. GAPDH, Ubiquitin ve Aktin olmak üzere 3 farklı housekeeping gen prob olarak kullanılmıştır. Bu çiplerin Arabidopsis bitkisi için hazırlanmış olması nedeniyle bazı örneklerde hibridizasyon problemleri yaşanmıştır. Farklı anlatım yapan genlerin tanımlanabilmesi için elde edilen sonuçlara ANOVA

analizi yapılarak, “teşvik edilen” ve “baskılanan” genler şeklinde gen listeleri oluşturulmuştur.

Cu ağır metale karşı toleransı düşük olarak belirlenen, *B.nigra* CGN06619 ekotipinin düşük ve yüksek konsantrasyon Cu uygulamalarına ait bitki örnekleri, kontrolleriyle birlikte analiz için gönderilmiştir. Bu çalışmada, mikroarray analizi sonucunda *B.nigra* CGN06619 ekotipinin düşük konsantrasyondaki Cu uygulamasına ait kök dokusundan elde edilen veriler kullanılmıştır.

3.6.10. Kantitatif Ters Yazılım Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

Kantitatif RT-PZR, floresan tekniklerle çoğaltım, saptama ve miktar tayini yapmayı sağlayan bir yöntem olup, diğer tekniklerle karşılaştırıldığında hassas ve tekrarlanabilirliği daha yüksek olması nedeniyle tercih edilmiştir (Cevher-Keskin, 2006). Kullanılan diğer yöntemlerin temeli, kalıptaki başlangıç miktarının ve reaksiyonun bitiminde çoğaltılmış son ürünlerin miktarının ölçülmesine dayanmaktadır. Ancak, kantitatif RT-PZR diğer yöntemlerden farklı olarak reaksiyon gerçekleşirken çoğaltım ürünlerinin yaydığı floresanın eş zamanlı görüntülenmesini sağlar (Higuchi, 1993; Kubista, 2006; 2008).

Reaksiyonun tüm kimyasal ve fiziksel bileşenleri kendi aralarında bağımlı olduğu için kantitatif RT-PZR oldukça kompleks bir yöntemdir. Bu yöntemin ilk aşamasını, RNA kalıp olarak PZR’da kullanılamadığından, RNA’nın cDNA’ya ters transkripsiyonu oluşturur. Bu aşamadan sonra ise PZR ile çoğaltım gelir. Kullanılan RNA veya DNA-bağımlı DNA polimerazlar farklı özellikteki enzimleri içerebilir. Çoğunlukla ayrı şekilde (iki enzim/iki tüp reaksiyon) ya da tek (iki enzim/tek reaksiyon tüpü) olarak farklı enzimler kullanılmaktadır. Özellikle, tek enzim/tek reaksiyon tüpü şeklindeki, hem RNA hem DNA-bağımlı DNA polimerazın kullanılması zaman açısından kolaylık sağlamaktadır. Ayrıca, reaksiyon sırasında oluşabilecek kontaminasyon riskini de azaltmaktadır (Cevher-Keskin, 2006).

Kantitatif RT-PZR’ da farklı amaçlar için floresan işaretli problemler veya boyalar kullanılmaktadır. “SYBR Green I” floresan boyası bu çalışmalarda sıklıkla kullanılan metotlardan biridir. Bu metotun temelini floresan boyanın sadece çift zincirli DNA’ya bağlanması oluşturur. Böylece, çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel RT- PZR

cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar. SYBR Green I'nin yükseltgenme dalga boyu 497 nm ve indirgenme dalga boyu ise 520 nm'dir. Çift sarmal DNA'nın küçük oluşuna bağlanan bu boya, aktivitesini uzun amplikasyon döngüleri sonrası bile çok az kaybeder (Kubista ve diğ., 2006).

Farklı konsantrasyonlarda Cu verilerek yetiştirilmiş olan *B. nigra* bitkisinde kök, gövde ve yaprak dokularında Tablo 3.5'de belirtilen 10 adet genin ekspresyon farklılıklarını belirlemek için kantitatif bir metot olarak RT-PZR kullanılmıştır. Kontrol, 25 ve 50 μ M Cu uygulamasına ait bitkilerin kök, gövde ve yapraklarının total RNA'larından hazırlanmış olan cDNA örneklerinin, farklı dilüsyonları (1/100, 1/250, 1/500, 1/1000) hazırlanmıştır. Bu dilüsyonlarla PZR kurularak optimizasyon çalışmaları yapılmış ve bu çalışma için BioRad CFX96 ve IQ5 Sistemi kullanılmıştır. Reaksiyonlar 96 kuyuluk plateler (BioRad) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonların hazırlanışı Tablo 3.8'de verilmiştir.

Tablo 3.8: Kantitatif Real-Time PZR karışımının hazırlanması.

ddH ₂ O	8,5 μ l
*SYBRGreenKarışımı	12,5 μ l
Primer F(5pmol/ μ l)	1 μ l
PrimerR(5pmol/ μ l)	1 μ l
cDNA	2 μ l
Toplam	25 μ l

*SYBR Green Karışımı (BioRad 170-8880): 2XKarışım: 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH:8.4, 0.4 mM her bir nükleotid (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 50 U/ml iTaq DNA polimeraz, 6mM MgCl₂, SYBR Green I, 20 nM floresanboya.

Tablo 3.9'da ise kullanılan kantitatif RT-PZR programı görülmektedir. Referans gen olarak β -aktin kullanılmış, BioRad CFX96 Manager 3.1 ve IQ5 2.1 yazılımı kullanılarak normalizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek için 3'lü replikasyon şeklinde çalışılmıştır. Program beş basamaktan oluşmakta ve son olarak erime eğrisi analizi (melting curve) içermektedir. II. basamakta belirtilen döngü sayısına yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu karar verilmiştir.

Tablo 3.9: Kantitatif RT-PZR’da kurulan PZR programı

Basamaklar	İşlem	Sıcaklık	Süre	Döngü
I	Denatürasyon	94 °C	3 dk	1
II	Denatürasyon	94 °C	30 sn	50
	Bağlanma	55 °C	30 sn	
	Uzama	72 °C	30 sn	
III	Son Uzama	94 °C	10 sn	1
IV	Melting Curve Analiz	55 °C-94 °C (0,5 °C artışla)	0,5 sn	81
V	Soğuma	4 °C	10 sn	∞

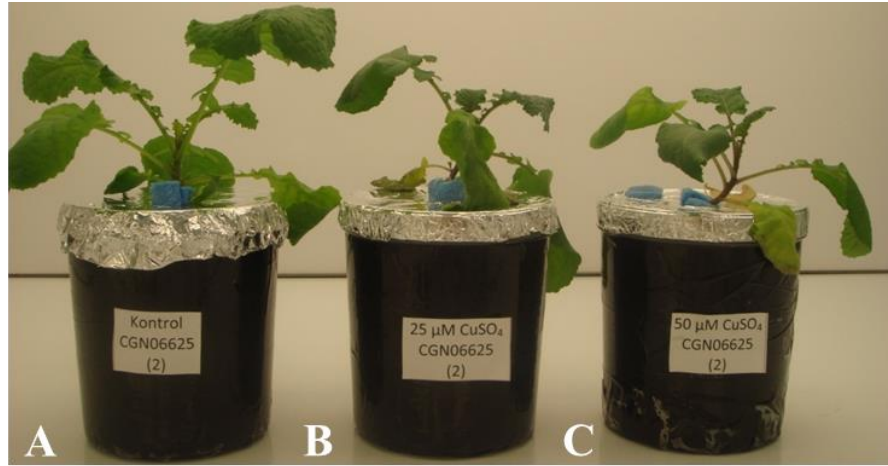
3.6.11. İstatistiksel Analizler

Bu çalışmada yapılan tüm denemelerde, her bir örnek için kendi içinde 3 tekrarı olan 3 farklı deney seti kurulmuştur. Elde edilen tüm ölçümlerin istatistiksel değerlendirmesi SPSS 17. versiyon istatistiksel programında yapılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, tek yönlü varyans analizine (One-Way ANOVA) göre değerlendirilmiştir. Ağır metal miktarlarının karşılaştırılmasında Tukey testi uygulanmıştır (Daniel, 1991). $p < 0,05$ ve $p < 0,01$ düzeyindeki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

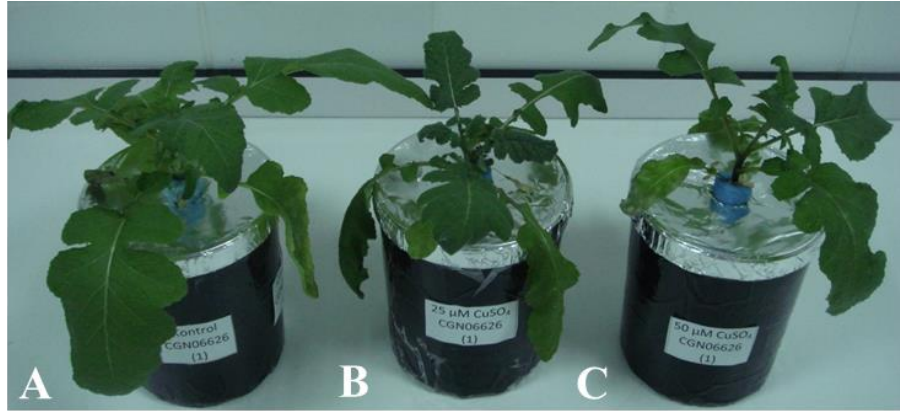
4. BULGULAR

4.1. BİTKİDE BİRİKEN AĞIR METAL MİKTARI

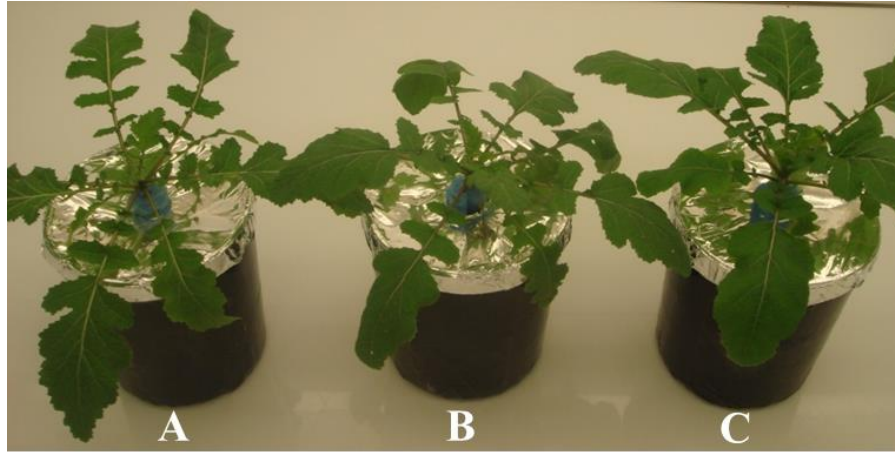
B. nigra, Diyarbakır, CGN06625 ve CGN06626 ekotiplerine hidroponik ortamda 25 μ M ve 50 μ M CuSO_4 çözeltisi 72 saat boyunca uygulanmıştır (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3). Bu süre sonunda Etiyopya kökenli CGN06625 ve CGN06626 ekotiplerinde bakırdan dolayı özellikle alt yapraklarda sararma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4A,B). Ayrıca, CGN06626'nın alt yapraklarında koyu renk oluşumlar gözlenmiştir (Şekil 4.4C). Diyarbakır ekotipinde ise morfolojik olarak olumsuz herhangi bir semptomu rastlanmamıştır. Kontrol bitkileriyle farklı konsantrasyonlarda Cu uygulanan bitkiler arasında bir fark görülmemiştir (Şekil 4.3).



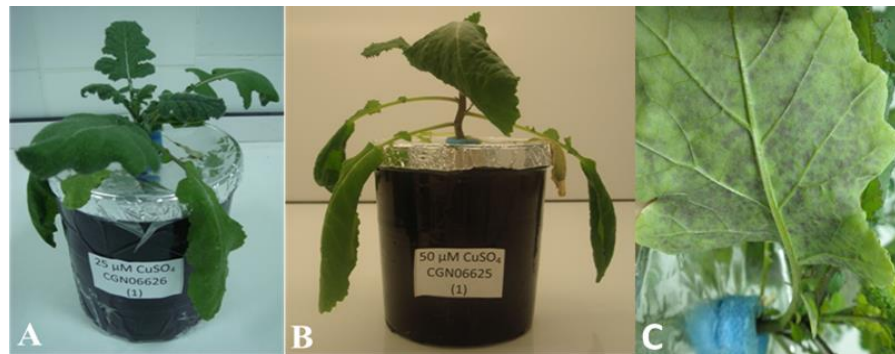
Şekil 4.1: Farklı konsantrasyonlarda 72 saat süreyle Cu uygulanmış 25 μ M (B), 50 μ M (C) ve uygulanmamış (kontrol) (A) *Brassica nigra*, CGN06625 ekotipine ait bitkilerin genel görünümü.



Şekil 4.2: Farklı konsantrasyonlarda 72 saat süreyle Cu uygulanmış 25 µM (B), 50µM (C) ve uygulanmamış (kontrol) (A) *Brassica nigra*, CGN06626 ekotipine ait bitkilerin genel görünümü.



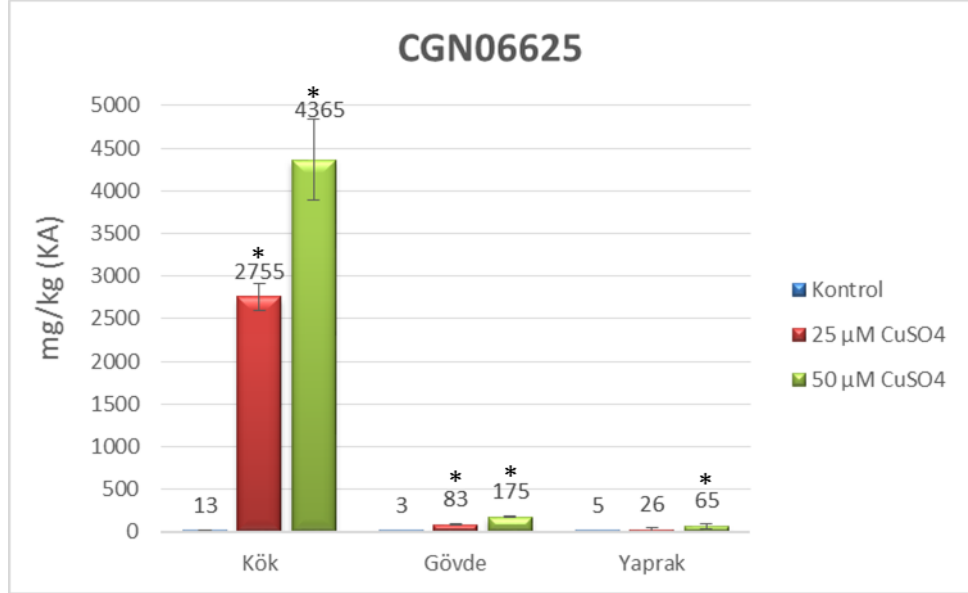
Şekil 4.3: Farklı konsantrasyonlarda 72 saat süreyle Cu uygulanmış 25 µM (B), 50 µM (C) ve uygulanmamış (kontrol) (A) *Brassica nigra* Diyarbakır ekotipine ait bitkilerin genel görünümü.



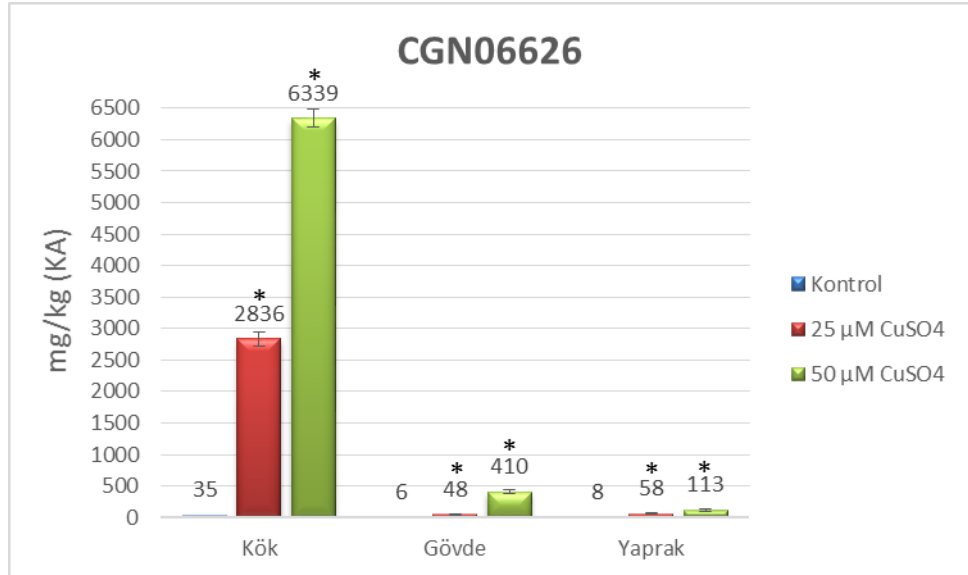
Şekil 4.4: Hidroponik ortamda 25 µM ve 50 µM Cu uygulaması yapılan ve bakırdan morfolojik olarak negatif etkilenmiş CGN06626 (A, C) ve CGN06625 (B) ekotipine ait bitkilerin görünümü.

72 saat boyunca Cu uygulamasına tabi tutulan *B. nigra*, CGN06625, CGN06626 ve Diyarbakır ekotiplerine ait bitkilerin kontrol ve ağır metal uygulanan deney gruplarına

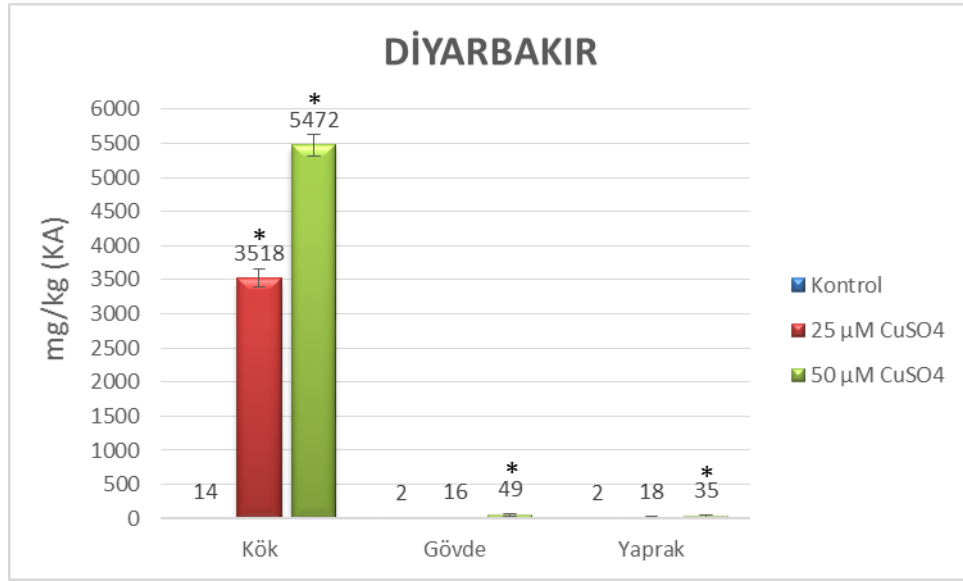
ait kök, gövde ve yaprak kısımlarında akümüle edilen ağır metal miktarları (mg/kgKA) Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de verilmiştir. Ayrıca, elde edilen sonuçların ekotipler arasında karşılaştırılmasının SPSS analiz değerlendirmesi Tablo 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.5: Farklı konsantrasyonlarda bakır uygulaması yapılan CGN06625 ekotipinin kök, gövde ve yaprak kısımlarında biriken metal miktarlarının grafikte gösterimi, (mg/kgKA) (Hata çubukları, standart sapmayı göstermektedir), *: $p < 0,05$ değeri, kontrol gruplarına göre anlamlı farklılık gösteren deney gruplarını ifade etmektedir.



Şekil 4.6: Farklı konsantrasyonlarda bakır uygulaması yapılan CGN06626 ekotipinin kök, gövde ve yaprak kısımlarında biriken metal miktarlarının grafikte gösterimi (mg/kgKA). (Hata çubukları, standart sapmayı göstermektedir), *: $p < 0,05$ değeri, kontrol gruplarına göre anlamlı farklılık gösteren deney gruplarını ifade etmektedir.



Şekil 4.7: Farklı konsantrasyonlarda bakır uygulaması yapılan Diyarbakır ekotipinin kök, gövde ve yaprak kısımlarında biriken metal miktarlarının grafikte gösterimi (mg/kgKA). (Hata çubukları, standart sapmayı göstermektedir), *: $p < 0,05$ değeri, kontrol gruplarına göre anlamlı farklılık gösteren deney gruplarını ifade etmektedir.

Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de görüldüğü üzere, 72 saat süreyle yapılan ağır metal uygulamasında, her bir ekotipe ait kontrol bitkilerinin kök, gövde ve yapraklarında iz miktarda Cu saptanmıştır. 25 µM ve 50 µM CuSO₄ uygulamalarından elde edilen ICP-OES sonuçlarına göre, bitkinin farklı kısımlarında akümüle edilen Cu miktarlarına bakıldığında, en fazla miktarın kökte saptandığı, bunu sırayla gövde ve yaprakların takip ettiği görülmektedir. Ayrıca bütün uygulamalarda kök, gövde ve yapraklarda biriken metal miktarları kontrol bitkilerinin kök, gövde ve yapraklarına göre önemli derecede artış göstermiştir.

Tablo 4.1: 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda CuSO₄ çözeltisi uygulanan *B. nigras* CGN06625 (A), CGN06626 (B) ve Diyarbakır (C) ekotiplerinin kök, gövde ve yapraklarında akümüle edilen ağır metal miktarları (mg/kgKA) ($\pm$ değerler standart sapmayı göstermektedir).

	KÖK			GÖVDE			YAPRAK		
	Kontrol	25 µM CuSO ₄	50 µM CuSO ₄	Kontrol	25 µM CuSO ₄	50 µM CuSO ₄	Kontrol	25 µM CuSO ₄	50 µM CuSO ₄
A	12,64±5,46 ^a	2754,67±153,02 ^b	3926,00±481,00 ^{a,b}	3,33±0,58 ^a	83,41±10,58 ^a	175,47±6,75 ^a	5,48±1,69 ^a	25,25±11,06 ^{a,b}	64,79±25,56 ^b
B	34,58±24,68 ^a	2835,50±107,50 ^b	6338,50±138,50 ^a	5,86±2,83 ^a	48,33±11,50 ^{a,b}	410,07±23,96 ^b	8,15±0,66 ^a	58,21±8,61 ^a	112,90±16,29 ^a
C	14,30±6,43 ^a	3518,00±131,00 ^a	5472,00±162,00 ^b	2,07±0,96 ^a	16,02±5,69 ^b	49,01±24,37 ^c	1,77±0,82 ^a	17,55±10,66 ^b	35,01±13,79 ^b

Not: Her sütun kendi arasında değerlendirilmiştir. a, b, c: $p < 0,05$

B. nigra, CGN06625, CGN06626 ve Diyarbakır ekotiplerine ait CuSO_4 uygulanmamış kontrol bitkileri karşılaştırıldığında, köklerinde saptanan Cu miktarları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4.1). 25 ve 50 μM CuSO_4 uygulanmış kök örneklerinde ise belirgin bir fark göze çarpmaktadır. 25 μM CuSO_4 uygulanmış kök örneklerinin içerdiği Cu miktarı karşılaştırıldığında, Diyarbakır ekotipinin (3518,00 mg/kgKA) ekotipinin hem CGN06625 (2754,67 mg/kgKA) hem de CGN06626 (2835,50 mg/kgKA) ekotipleri ile anlamlı bir fark gösterdiği belirlenmiştir ($p<0,05$). CGN06625 ve CGN06626 ekotipleri arasında ise belirgin bir fark bulunamamıştır. 50 μM CuSO_4 çözeltisi uygulanan bitkilerin kökleri karşılaştırıldığında, Diyarbakır (5472,00 mg/kgKA) ekotipi ile CGN06626 (6338,50 mg/kgKA) ekotipi arasında tespit edilen fark anlamlıdır ($p<0,05$). CGN06625 ekotipi ile diğer ekotipler arasında ise bir fark bulunamamıştır.

CuSO_4 uygulaması yapılan ekotiplerin gövdelerinde bulunan Cu miktarı karşılaştırıldığında kontrol grupları arasında anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$) (Tablo 4.1). 25 μM CuSO_4 grupları incelendiğinde ise CGN06625 (83,41 mg/kgKA) ve Diyarbakır (16,02 mg/kgKA) ekotipleri arasında fark vardır ($p<0,05$). Fakat CGN06626 ekotipi ile diğer ekotipler arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir. Ayrıca, 50 μM CuSO_4 gruplarında her üç ekotipin de (CGN06625; 175,47 mg/kgKA, CGN06626; 410,07 mg/kgKA, Diyarbakır 49,01 mg/kgKA) arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0,05$).

Yapraklarda biriken Cu miktarı incelendiğinde kontrol gurupları arasında belirgin bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). 25 μM CuSO_4 gruplarında Diyarbakır (17,55 mg/kgKA) ekotipi ile CGN06626 (58,21 mg/kgKA) arasında fark vardır ($p<0,05$). CGN06625 ekotipi ile diğer ekotipler arasında ise fark bulunamamıştır. 50 μM CuSO_4 uygulanmış grupların yaprakları karşılaştırıldığında CGN06625 ile Diyarbakır arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. CGN06626 (112,90 mg/kgKA) ekotipi ise hem CGN06625 (64,79 mg/kgKA) ile hem de Diyarbakır (35,01 mg/kgKA) ekotipi ile belirgin bir farklılık göstermiştir.

Sonuç olarak, tüm ekotiplerin kontrol grupları 25 μM CuSO_4 ve 50 μM CuSO_4 grupları ile karşılaştırıldığında ayrıca konsantrasyonlar kendi aralarında karşılaştırıldığında

$p < 0,05$ 'e göre anlamlı farklılıkların olması deneysel çalışmanın güvenilirliğini göstermektedir (Tablo 4.1).

4.2. AĞIR METAL UYGULAMASI YAPILAN BİTKİLERDE FARKLILIK GÖSTEREN GENLERİN TANIMLANMASI VE BELİRLENMESİ

4.2.1. Total RNA İzolasyonu

Cu uygulaması yapılan *B. nigra*, CGN06625, CGN06626 ve Diyarbakır ekotiplerinin kök, gövde ve yaprak dokularından, RNA izolasyon kiti kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen total RNA'ların saflık dereceleri (OD260/OD280) NanoDrop spektrofotometresinde yapılan ölçümlerle kontrol edilmiş ve saflıkları 1,80 ile 2,10 arasında saptanmıştır (Tablo 4.2, Tablo 4.3, Tablo 4.4). Ayrıca, total RNA'ların konsantrasyon miktarları ve saflıklarının kontrolü için formaldehitli agaroz jelde ayrışmaları sağlandıktan sonra jel görüntüsü iyi olmayanların veya miktarları yetersiz görünenlerin izolasyonları tekrar edilmiştir (Şekil 4.8-4.13)

Tablo 4.2: *B.nigra* CGN06625 (A) ekotipinin farklı konsantrasyonlarda kök, gövde ve yaprak dokularına ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri.

No	İsim (CGN06625)	Konsantrasyon (ng/μl)	260/280
A1	Kontrol, Kök, Tekrar1	1078	2,08
A2	Kontrol, Gövde, Tekrar1	285	2,10
A3	Kontrol, Yaprak, Tekrar1	620	2,00
A4	25 μM, Kök, Tekrar1	507	2,07
A5	25 μM, Gövde, Tekrar1	1292	2,10
A6	25 μM, Yaprak, Tekrar1	644	2,08
A7	50 μM, Kök, Tekrar1	700	2,04
A8	50 μM, Gövde, Tekrar1	2816	2,03
A9	50 μM, Yaprak, Tekrar1	668	2,03
A10	Kontrol, Kök, Tekrar2	1495	2,09
A11	Kontrol, Gövde, Tekrar2	692	2,06
A12	Kontrol, Yaprak, Tekrar2	1045	2,08
A13	25 μM, Kök, Tekrar2	368	2,06
A14	25 μM, Gövde, Tekrar2	2067	2,07
A15	25 μM, Yaprak, Tekrar2	578	1,95

Tablo 4.2: Devamı.

No	İsim (CGN06625)	Konsantrasyon (ng/μl)	260/280
A16	50 μM, Kök, Tekrar2	594	2,09
A17	50 μM, Gövde, Tekrar2	1533	2,00
A18	50 μM, Yaprak, Tekrar2	953	2,10
A19	Kontrol, Kök, Tekrar3	212	2,02
A20	Kontrol, Gövde, Tekrar3	1180	2,04
A21	Kontrol, Yaprak, Tekrar3	942	2,09
A22	25 μM, Kök, Tekrar3	853	1,99
A23	25 μM, Gövde, Tekrar3	1294	2,05
A24	25 μM, Yaprak, Tekrar3	622	2,10
A25	50 μM, Kök, Tekrar3	219	2,04
A26	50 μM, Gövde, Tekrar3	990	2,10
A27	50 μM, Yaprak, Tekrar3	411	2,06

Tablo 4.3: *B.nigra* CGN06626 (B) ekotipinin farklı konsantrasyonlarda kök, gövde ve yaprak dokularına ait spektrofotometrik değerleri.

No	İsim (CGN06626)	Konsantrasyon (ng/μl)	260/280
B1	Kontrol, Kök, Tekrar1	1741	1,99
B2	Kontrol, Gövde, Tekrar1	1341	1,98
B3	Kontrol, Yaprak, Tekrar1	980	1,92
B4	25 μM, Kök, Tekrar1	776	1,96
B5	25 μM, Gövde, Tekrar1	244	1,96
B6	25 μM, Yaprak, Tekrar1	480	1,86
B7	50 μM, Kök, Tekrar1	714	1,98
B8	50 μM, Gövde, Tekrar1	712	2,05
B9	50 μM, Yaprak, Tekrar1	564	2,00
B10	Kontrol, Kök, Tekrar2	1717	2,03
B11	Kontrol, Gövde, Tekrar2	1456	2,02
B12	Kontrol, Yaprak, Tekrar2	912	2,10
B13	25 μM, Kök, Tekrar2	356	1,96
B14	25 μM, Gövde, Tekrar2	1541	1,94
B15	25 μM, Yaprak, Tekrar2	1066	2,01
B16	50 μM, Kök, Tekrar2	865	1,88
B17	50 μM, Gövde, Tekrar2	1946	1,96

Tablo 4.3: Devamı.

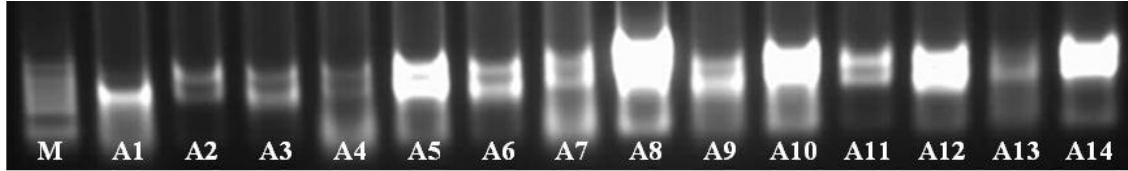
No	İsim (CGN06626)	Konsantrasyon (ng/μl)	260/280
B18	50 μM, Yaprak, Tekrar2	1493	1,88
B19	Kontrol, Kök, Tekrar3	1375	2,03
B20	Kontrol, Gövde, Tekrar3	1386	2,03
B21	Kontrol, Yaprak, Tekrar3	1040	2,00
B22	25 μM, Kök, Tekrar3	220	1,87
B23	25 μM, Gövde, Tekrar3	2084	2,05
B24	25 μM, Yaprak, Tekrar3	505	2,10
B25	50 μM, Kök, Tekrar3	339	1,85
B26	50 μM, Gövde, Tekrar3	1025	1,91
B27	50 μM, Yaprak, Tekrar3	1163	2,02

Tablo 4.4: *B.nigra* Diyarbakır (C) ekotipinin farklı konsantrasyonlarda kök, gövde ve yaprak dokularına ait RNA'ların spektrofotometrik değerleri.

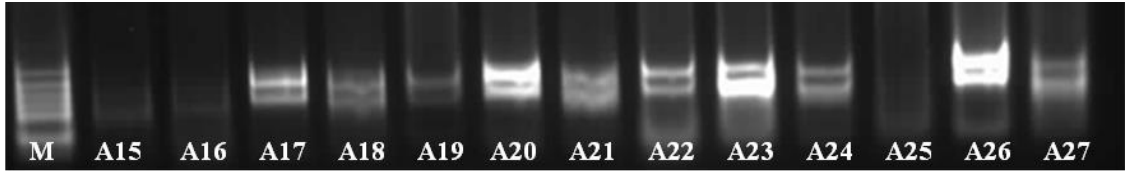
No	İsim (Diyarbakır)	Konsantrasyon (ng/μl)	260/280
C1	Kontrol, Kök, Tekrar1	379	1,96
C2	Kontrol, Gövde, Tekrar1	1316	2,03
C3	Kontrol, Yaprak, Tekrar1	2140	2,06
C4	25 μM, Kök, Tekrar1	563	1,98
C5	25 μM, Gövde, Tekrar1	1411	2,02
C6	25 μM, Yaprak, Tekrar1	2411	2,01
C7	50 μM, Kök, Tekrar1	3752	2,02
C8	50 μM, Gövde, Tekrar1	4320	1,97
C9	50 μM, Yaprak, Tekrar1	1912	2,04
C10	Kontrol, Kök, Tekrar2	209	1,97
C11	Kontrol, Gövde, Tekrar2	3117	1,97
C12	Kontrol, Yaprak, Tekrar2	1853	2,10
C13	25 μM, Kök, Tekrar2	608	1,99
C14	25 μM, Gövde, Tekrar2	4566	1,95
C15	25 μM, Yaprak, Tekrar2	1137	1,95
C16	50 μM, Kök, Tekrar2	704,5	2,00
C17	50 μM, Gövde, Tekrar2	3757	1,98
C18	50 μM, Yaprak, Tekrar2	1115	1,96
C19	Kontrol, Kök, Tekrar3	1296	1,98

Tablo 4.4: Devamı.

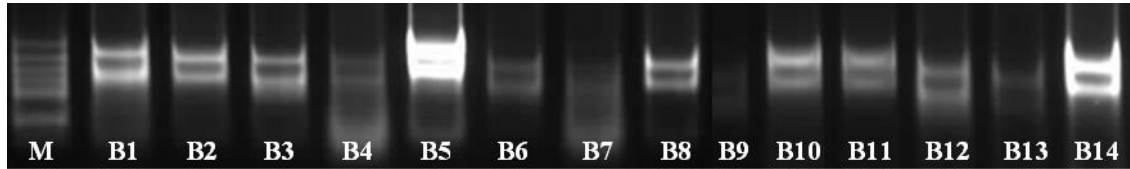
No	İsim (Diyarbakır)	Konsantrasyon (ng/μl)	260/280
C20	Kontrol, Gövde,Tekrar3	2504	2,02
C21	Kontrol,Yaprak,Tekrar3	1096	2,05
C22	25 μM, Kök, Tekrar3	261	2,00
C23	25 μM,Gövde,Tekrar3	1799	2,00
C24	25 μM,Yaprak,Tekrar3	1170	2,10
C25	50 μM,Kök,Tekrar3	834	2,05
C26	50 μM,Gövde,Tekrar3	1084	2,02
C27	50 μM,Yaprak,Tekrar3	749	2,09



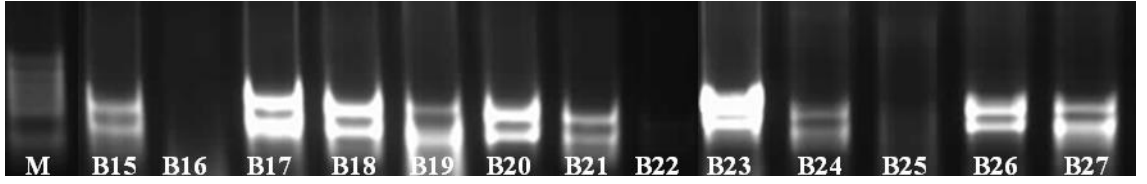
Şekil 4.8: *B.nigra* CGN06625 ekotipinin farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 μM) CuSO₄ çözeltisi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) bitkilerin, kök, gövde ve yaprak dokularından izole edilmiş olan total RNA'ların denatüran % 1'lik formaldehitli agaroz jel görüntüsü,A1-A14 (M=Marker: RiboRuler-High Range RNA Ladder, 200-6000 baz).



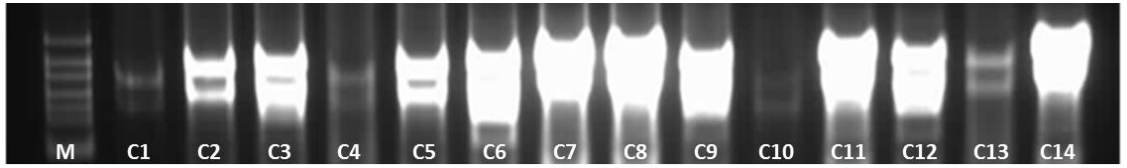
Şekil 4.9: *B.nigra* CGN06625 ekotipinin farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 μM) CuSO₄ çözeltisi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) bitkilerin, kök, gövde ve yaprak dokularından izole edilmiş olan total RNA'ların denatüran % 1'lik formaldehitli agaroz jel görüntüsü,A15-A27 (M=Marker: RiboRuler-High Range RNA Ladder, 200-6000 baz).



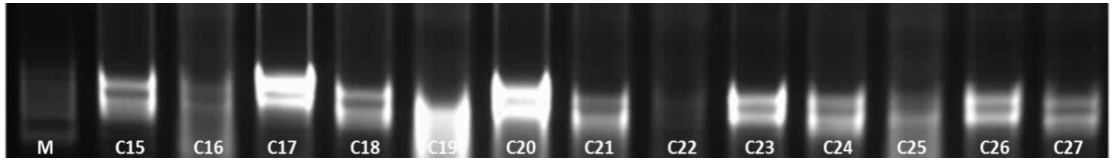
Şekil 4.10: *B.nigra* CGN06626 ekotipinin farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 μM) CuSO₄ çözeltisi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) bitkilerin, kök, gövde ve yaprak dokularından izole edilmiş olan total RNA'ların denatüran % 1'lik formaldehitli agaroz jel görüntüsü, B1-B14 (M=Marker: RiboRuler-High Range RNA Ladder, 200-6000 baz).



Şekil 4.11: *B.nigra* CGN06626 ekotipinin farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 μ M) CuSO₄ çözeltisi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) bitkilerin, kök, gövde ve yaprak dokularından izole edilmiş olan total RNA'ların denatüran % 1'lik formaldehitli agaroz jel görüntüsü, B14-B27 (M=Marker: RiboRuler-High Range RNA Ladder, 200-6000 baz).



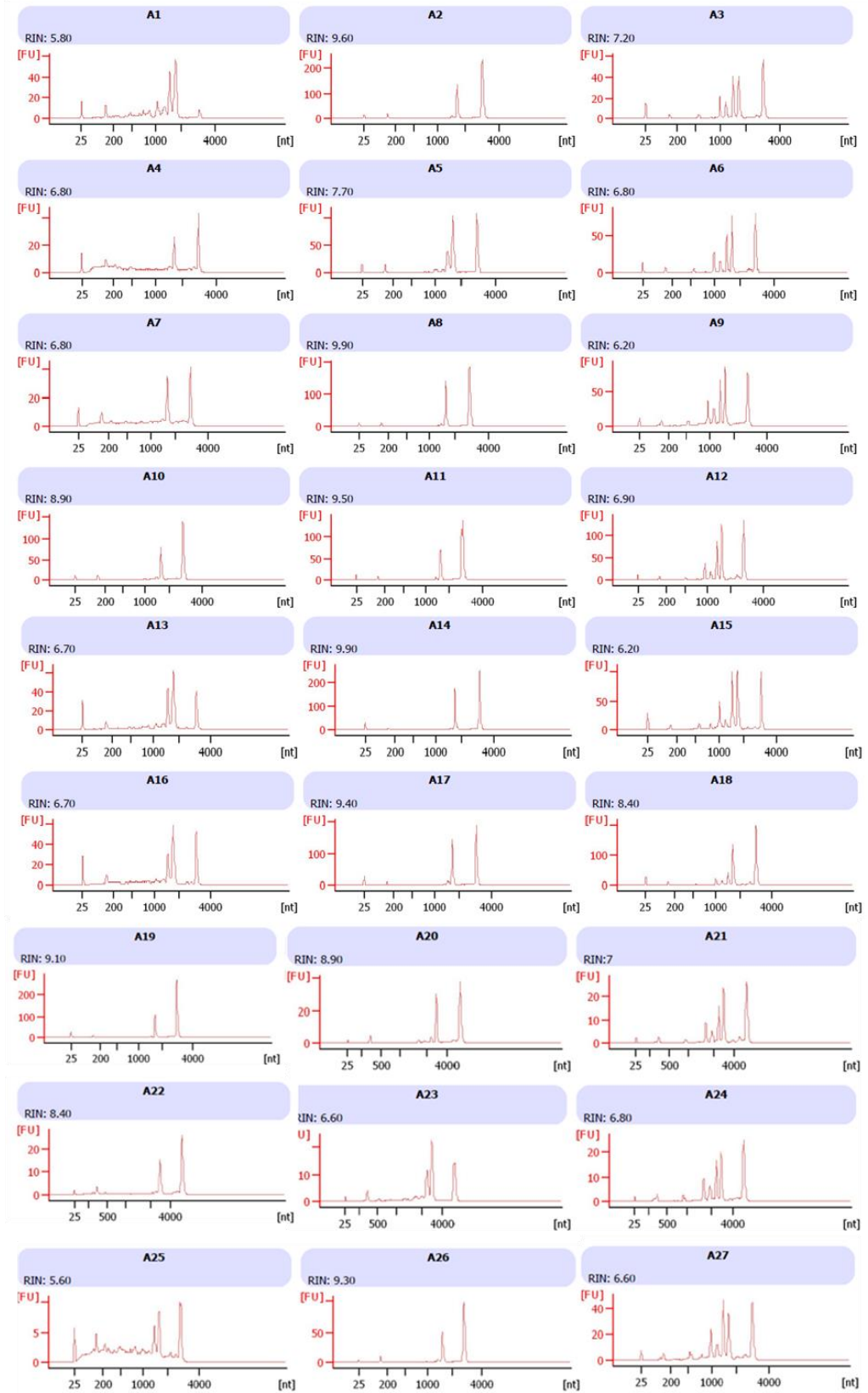
Şekil 4.12: *B.nigra* Diyarbakır ekotipinin farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 μ M) CuSO₄ çözeltisi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) bitkilerin, kök, gövde ve yaprak dokularından izole edilmiş olan total RNA'ların denatüran % 1'lik formaldehitli agaroz jel görüntüsü, C1-C14 (M=Marker: RiboRuler-High Range RNA Ladder, 200-6000 baz).



Şekil 4.13: *B.nigra* Diyarbakır ekotipinin farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 μ M) CuSO₄ çözeltisi uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) bitkilerin, kök, gövde ve yaprak dokularından izole edilmiş olan total RNA'ların denatüran % 1'lik formaldehitli agaroz jel görüntüsü, C15-C27 (M=Marker: RiboRuler-High Range RNA Ladder, 200-6000 baz).

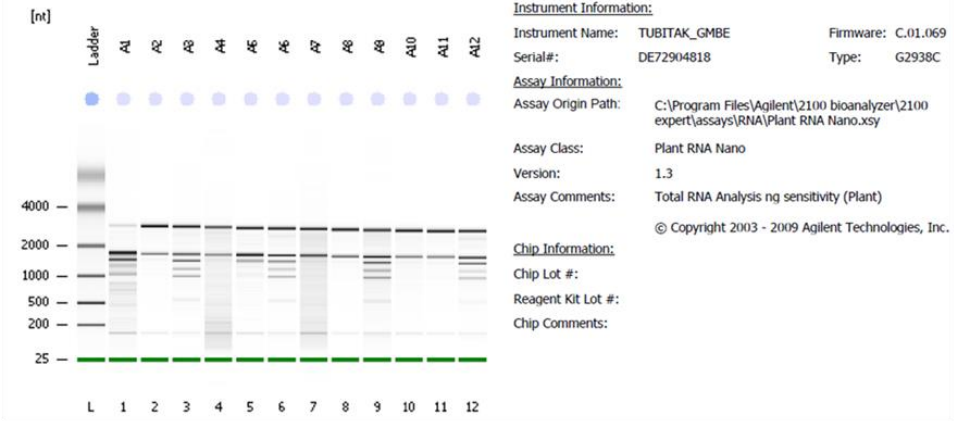
4.2.2. Total RNA'ların Saflaştırılması

72 saat süreyle Cu uygulaması yapılan *B. nigra*, CGN06625, CGN06626 ve Diyarbakır ekotiplerinin kök, gövde ve yaprak dokularından elde edilen total RNA'lara DNaz I enzimi uygulanarak, genomik DNA'nın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Saf hale getirilen total RNA'ların konsantrasyon miktarları, sağlamlıkları (Şekil 4.14, Şekil 4.16, Şekil 4.18) ve genel jel görüntüsü (Şekil 4.15, Şekil 4.17, Şekil 4.19.) Bioanalyzer 2100 (Agilent) kullanılarak kontrol edilmiştir.

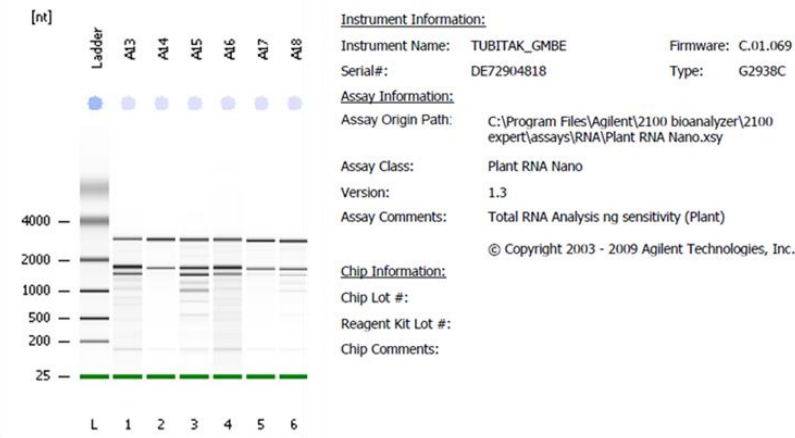


Şekil 4.14: 72 saat boyunca 25 ve 50 μM CuSO_4 çözeltisi uygulanan *B.nigra* CGN06625 (A) ekotipinin kök, gövde ve yaprak dokusundan elde edilen total RNA'ların DNazI uygulaması sonucu Bioanalyzer Agilent 2100 cihazında okuma sonrası her bir biyolojik tekrarına ait kromatogram görüntüleri (A1-A27).

Electrophoresis File Run Summary (A)



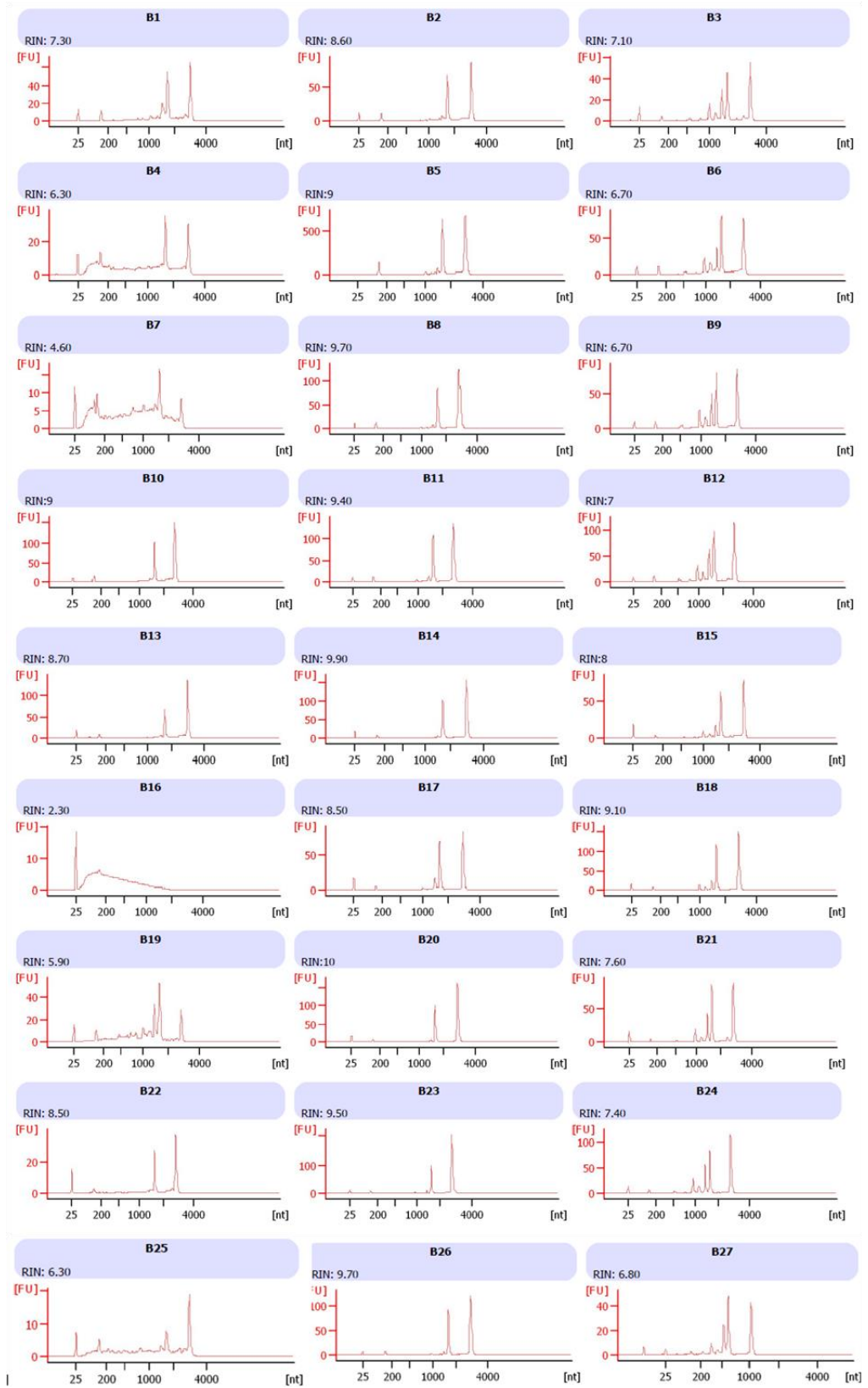
Electrophoresis File Run Summary (B)



Electrophoresis File Run Summary (C)

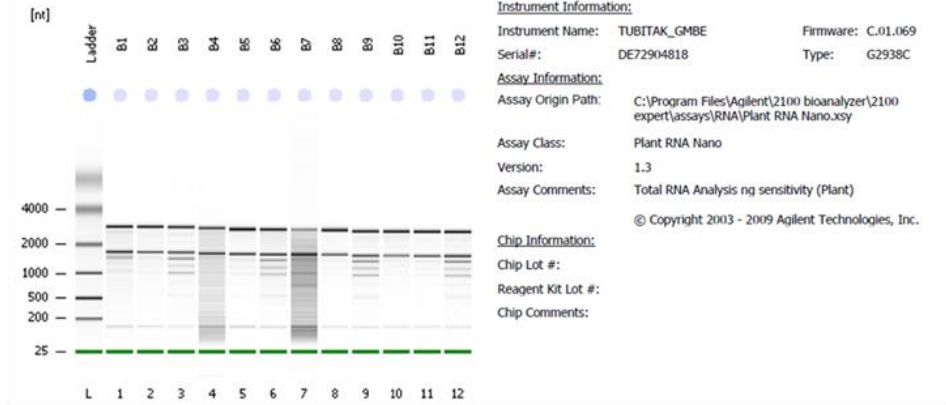


Şekil 4.15: 72 saat boyunca 25 ve 50 μM CuSO_4 çözeltisi uygulanan *B.nigra* CGN06625 ekotipinin kök, gövde ve yaprak dokusundan elde edilen total RNA'ların DNaz I uygulamasını takiben Bioanalyzer Agilent 2100 cihazında okuma sonrası her bir biyolojik tekrarına ait genel jel profili; (A) A1-A12, (B) A13-A18, (C) A19-A27.



Şekil 4.16: 72 saat boyunca 25 ve 50 μM CuSO_4 çözeltisi uygulanan *B.nigra* CGN06626 (B) ekotipinin kök, gövde ve yaprak dokusundan elde edilen total RNA'ların DNaz I uygulaması sonucu Bioanalyzer Agilent 2100 cihazında okuma sonrası her bir biyolojik tekrarına ait kromatogram görüntüleri (B1-B27).

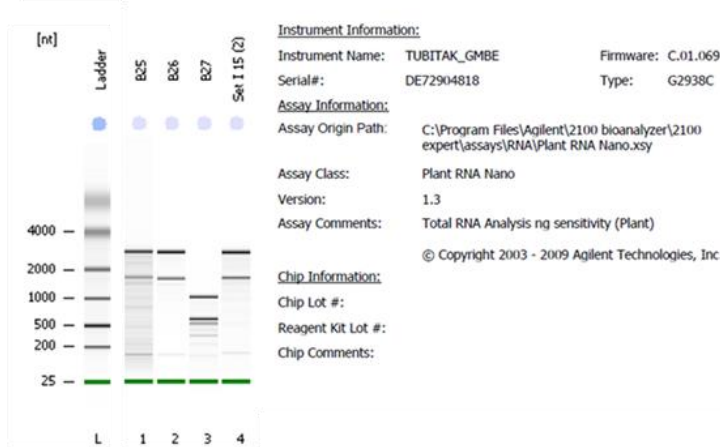
Electrophoresis File Run Summary (A)



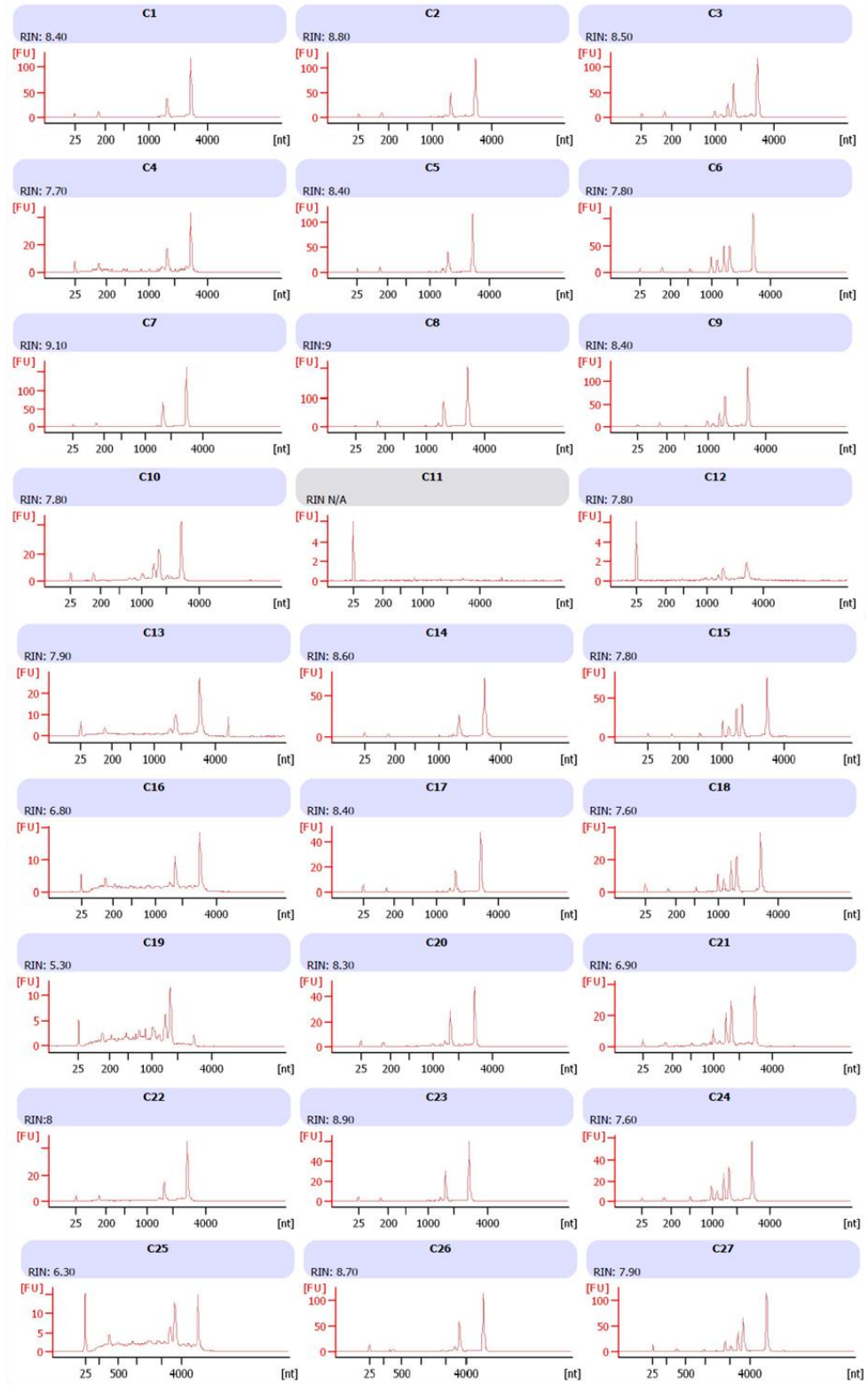
Electrophoresis File Run Summary (B)



Electrophoresis File Run Summary (C)

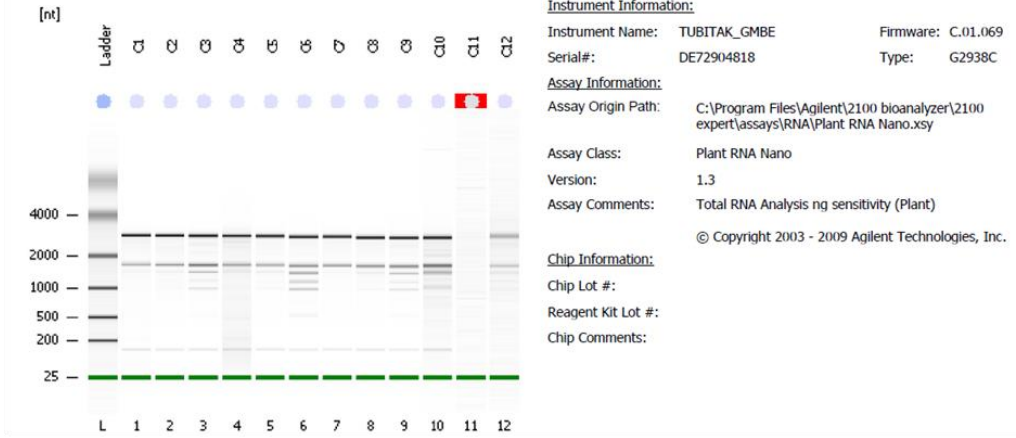


Şekil 4.17: 72 saat boyunca 25 ve 50 μM CuSO_4 çözeltisi uygulanan *B.nigra* CGN06626 ekotipinin kök, gövde ve yaprak dokusundan elde edilen total RNA'ların DNaz I uygulamasını takiben Bioanalyzer Agilent 2100 cihazında okuma sonrası her bir biyolojik tekrarına ait genel jel profili; **(A)** B1-B12, **(B)** B13-B24, **(C)** B25-B27.

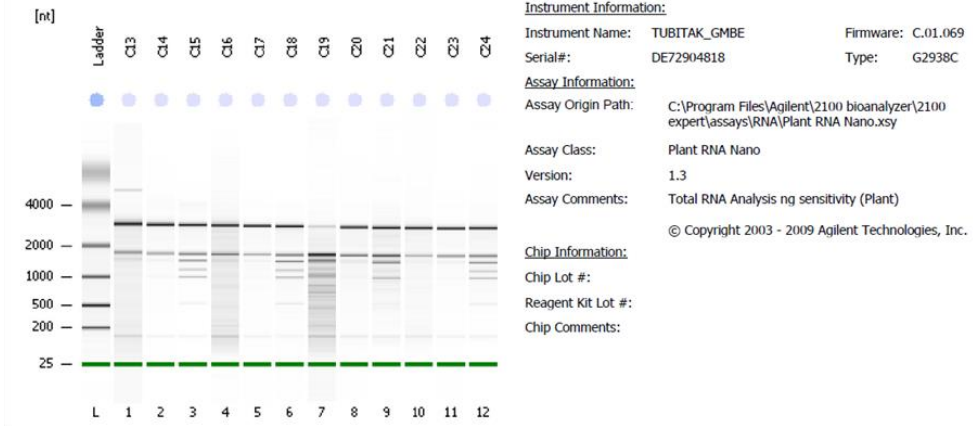


Şekil 4.18: 72 saat boyunca 25 ve 50 μM CuSO_4 çözeltisi uygulanan *B. nigra* Diyarbakır (C) ekotipinin kök, gövde ve yaprak dokusundan elde edilen total RNA'ların DNaz I uygulaması sonucu Bioanalyzer Agilent 2100 cihazında okuma sonrası her bir biyolojik tekrarına ait kromatogram görüntüleri (C1-C27).

Electrophoresis File Run Summary (A)



Electrophoresis File Run Summary (B)



Electrophoresis File Run Summary (C)

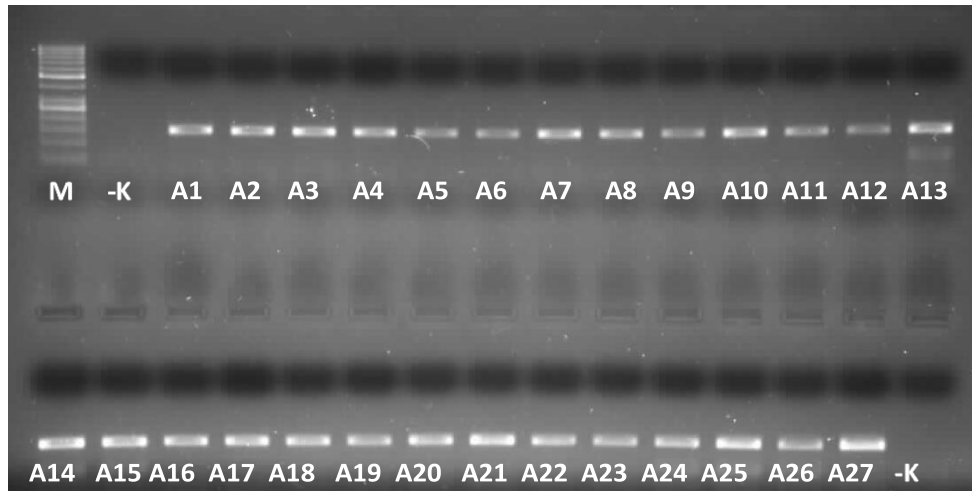


Şekil 4.19: 72 saat boyunca 25 ve 50 μM CuSO_4 çözeltisi uygulanan *B.nigra* Diyarbakır ekotipinin kök, gövde ve yaprak dokusundan elde edilen total RNA'ların DNaz I uygulamasını takiben Bioanalyzer Agilent 2100 cihazında okuma sonrası her bir biyolojik tekrarına ait genel jel görüntüsü; **(A)** C1-C12, **(B)** C13-C24, **(C)** C25-C27.

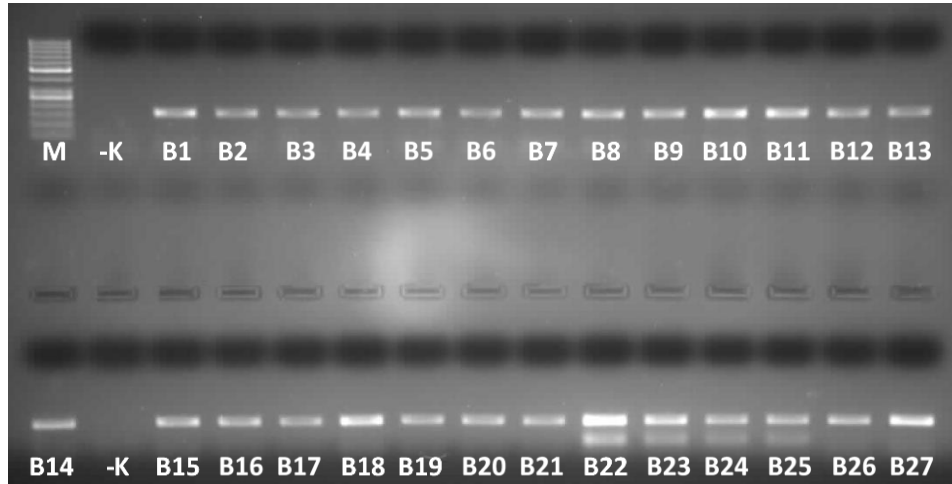
Şekil 4.14, Şekil 4.16 ve Şekil 4.18’de görüldüğü gibi 25 ve 50 μM CuSO_4 çözeltisi uygulanan ve 3’er adet biyolojik tekrarı bulunan kontrol ve ağır metal uygulanan deney bitkilerinin kök, gövde ve yaprak örneklerine ait total RNA’larının bütünlük numaraları (RIN) 7-10 arasındadır. RIN değerinin bu aralıklarda olması RNA’ların sağlam olduklarını göstermektedir. Ayrıca RIN değerleri 6’dan düşük olan ve bant görüntüsü iyi olmayan RNA örneklerinin DNazI uygulaması tekrarlanmış ve Bioanalyzer cihazında konsantrasyon miktarları ve sağlamlıkları yeniden kontrol edilmiştir.

4.2.3. Yarı-Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

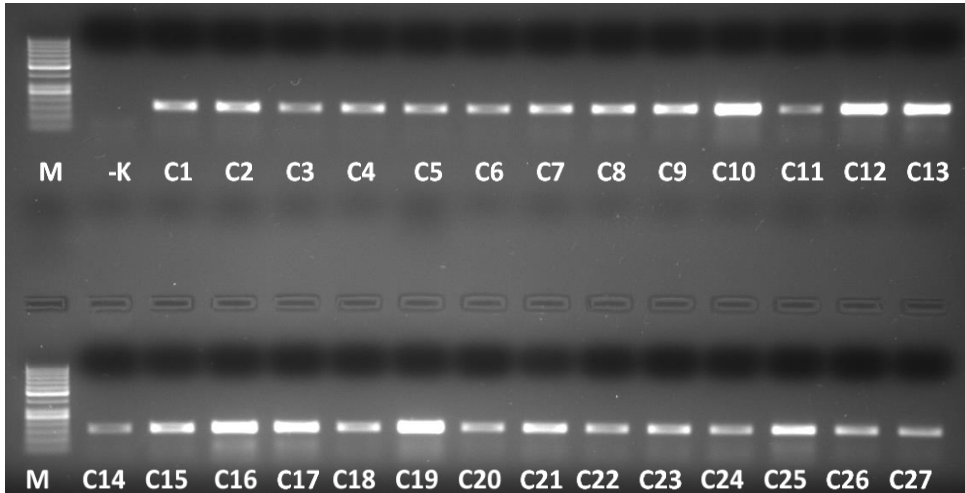
Bu çalışmada elde edilen cDNA’ların kontrolü, house keeping gen olarak kullanılan β -aktin primer çiftiyle PZR yapılarak sentezlerinin olup olmadığı kontrol edilmiştir. Ayrıca, tasarlanan primerlerin kontrolü de PCR uygulaması ile gerçekleştirilmiştir. β -aktin genine ait primer çifti kontrol edildikten sonra, farklı konsantrasyonlarda Cu uygulaması yapılan *Brassica nigra* ekotiplerinden elde edilen cDNA’ların kontrolü PZR’la gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22).



Şekil 4.20: *B.nigra* CGN06625 ekotipinin farklı konsantrasyonlarda (Kontrol, 25 ve 50 μM) CuSO_4 stresi uygulanmış bitkilerin kök, gövde ve yapraklarından elde edilen cDNA’ların β -aktin primer çiftleriyle yapılan PZR’nın % 2’lik agaroz jel görüntüsü (A= CGN06625 Ekotipi, A1-A9=Tekrar 1, A10-A18=Tekrar 2, A19-A27=Tekrar 3, M=Marker, -K= Negatif Kontrol).



Şekil 4.21: *B.nigra* CGN06626 ekotipinin farklı konsantrasyonlarda (Kontrol, 25 ve 50 μ M) CuSO_4 stresi uygulanmış bitkilerin kök, gövde ve yapraklarından elde edilen cDNA'ların β -aktin primer çiftleriyle yapılan PCR'nın % 2'lik agaroz jel görüntüsü (B=CGN06626 Ekotipi, B1-B9=Tekrar 1, B10-B18=Tekrar 2, B19-B27=Tekrar 3, M=Marker, -K= Negatif Kontrol).



Şekil 4.22: *B.nigra* Diyarbakır ekotipinin farklı konsantrasyonlarda (Kontrol, 25 ve 50 μ M) CuSO_4 stresi uygulanmış bitkilerin kök, gövde ve yapraklarından elde edilen cDNA'ların β -aktin primer çiftleriyle yapılan PZR'nın % 2'lik agaroz jel görüntüsü (C=Diyarbakır Ekotipi, C1-C9=Tekrar 1, C10-C18=Tekrar 2, C19-C27=Tekrar 3, M=Marker, -K= Negatif Kontrol).

4.2.4. Karşılaştırmalı Transkriptom Profilleme Yöntemiyle Metal Metabolizmasında Yer Alan Genlerin İrdelenmesi

Bu çalışmada metal metabolizmasında yer alan Cu ile ilişkili genlerin belirlenmesi için Cu taramaları sonucunda, bu ağır metale karşı toleransı düşük olarak belirlenen *B.nigra* CGN06619 bitkisinin 72 saat boyunca 25 μ M Cu uygulaması sonrası kök dokusunda farklı anlatım yapan genlere ait mikroarray sonuçlarından yararlanılmıştır. Bulunan genlerin listesi Tablo 4.5'te verilmiştir. Listede yer alan gen farklılıkları minimum 2 kat

artış veya azalma bazında ele alınmıştır. Mikroarray analiz sonucunda ağır metal alımı ve taşınmasında rol aldığı düşünülen genler gri renk ile belirtilmiştir.

Tablo 4.5: CGN06619 kök dokusunda, 25 μ M bakır uygulanan bitkiyle kontrol bitkiler arasında farklılık (2 kat artmış veya 2 kat azalmış) gösteren genler (t testi uygulanmıştır).

	Gen Adı	p-değeri	Ortalama (0 μ M)	Ortalama (25 μ M)	Kat farkı (0 μ M /25 μ M)
1	PDC3 (pyruvate decarboxylase-3); carboxy-lyase/ catalytic/ magnesium ion binding	0.04069	2.16459	7.02793	29.1079
2	LSH10 (LIGHT SENSITIVE HYPOCOTYLS 10)	0.10658	2.57729	6.40965	14.2448
3	MT3 (METALLOTHIONEIN 3); copper ion binding	0.11659	4.8685	8.19364	10.0223
4	PFK6 (PHOSPHOFRUCTOKINASE 6); 6-phosphofructokinase	0.00768	3.32556	5.9936	6.35566
5	ASP2 (ASPARTATE AMINOTRANSFERASE 2); L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase	0.03304	3.45247	6.04048	6.01269
6	LHCA2; chlorophyll binding	0.14569	2.61361	5.12327	5.69489
7	AlaAT1 (ALANINE AMINOTRANSFERASE); ATP binding / L-alanine:2-oxoglutarate aminotr	0.04893	1.57901	3.95006	5.17319
8	AtAGAL1 (<i>Arabidopsis thaliana</i> ALPHA-GALACTOSIDASE 1); alpha-galactosidase/ çatal	0.033276	2.36441	4.43037	4.18712
9	AILP1	0.071299	7.4332	9.47764	4.12512
10	SUS1 (SUCROSE SYNTHASE 1); UDP-glycosyltransferase/ sucrose synthase	0.031914	6.27673	8.29316	4.0458

Tablo 4.5: Devamı.

	Gen Adı	p-değeri	Ortalama (0 µM)	Ortalama (25 µM)	Kat farkı (0 µM /25 µM)
11	HXK3 (HEXOKINASE 3); ATP binding / fructokinase/ glucokinase/ hexokinase	0.010165	4.78039	6.79502	4.04077
12	ADH1 (ALCOHOL DEHYDROGENASE 1); alcohol dehydrogenase	0.003431	3.13304	5.03919	3.74808
13	LHCB3 (LIGHT- HARVESTING CHLOROPHYLL B- BINDING PROTEIN 3); structural molecule	0.265629	1.65417	3.55226	3.72721
14	PIP2;5 (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2;5); water channel	0.042183	2.62508	4.48409	3.62758
15	RBOHD (RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGUE D); NAD(P)H oxidase	0.000438	1.99324	3.83457	3.58342
16	CAT3 (CATALASE 3); catalase	0.048485	6.08061	7.83927	3.38384
17	SSI2; acyl-[acyl- carrier-protein] desaturase/ stearoyl- CoA 9-desaturase	0.050463	1.00784	2.74376	3.33091
18	CAB3 (CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 3); chlorophyll binding	0.345759	0.9019726	2.62578	3.26267
19	LHCA1; chlorophyll binding	0.383059	1.51606	3.17384	3.1553
20	ATC (ARABIDOPSIS THALIANA CENTRORADIALIS) ;phosphatidylethanol amine binding	0.158403	2.14377	3.75487	3.05485
21	ATGSKB6; Glutamine synthase clone KB6) / glutamate-ammonia ligase	0.058075	3.70664	5.1711	2.7596

Tablo 4.5: Devamı.

	Gen Adı	p-değeri	Ortalama (0 µM)	Ortalama (25 µM)	Kat farkı (0 µM /25 µM)
22	PDF1.2b (plant defensin 1.2b)	0.155797	2.17808	3.63255	2.74056
23	PFK3 (PHOSPHOFRUCTO KINASE 3); 6-phosphofructokinase	0.23307	2.92054	4.31209	2.6236
24	RAN-1; GTP binding / GTPase/ protein binding	0.16993	2.21968	3.60673	2.61543
25	LTP5 (Lipid transfer protein 5); lipid transporter	0.171547	1.26984	2.6399	2.58481
26	ASP5 (ASPARTATE AMINOTRANSFER ASE 5); L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase	0.061591	2.99522	4.30976	2.48723
27	LTP4 (LIPID TRANSFER PROTEIN 4); lipid binding	0.031735	0.99438	2.26055	2.40521
28	GAPCP-2; NAD or NADH binding / binding / catalytic/ glyceraldehyde-3-phosphate d	0.218901	3.84382	5.10551	2.39777
29	RBCS1A (RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE SMALL CHAIN 1A); copper ion binding /	0.30257	1.23053	2.48388	2.38394
30	LHCB5 (LIGHT HARVESTING COMPLEX OF PHOTOSYSTEM II 5); chlorophyll binding	0.457194	1.72058	2.94235	2.33233
31	AtMC3 (metacaspase 3); cysteine-type endopeptidase	0.304718	3.18419	4.39894	2.32101
32	PRXCB (PEROXIDASE CB); peroxidase	0.083871	5.8552	7.06	2.30506

Tablo 4.5: Devamı.

	Gen Adı	p-değeri	Ortalama (0 µM)	Ortalama (25 µM)	Kat farkı (0 µM /25 µM)
33	RNS3 (RIBONUCLEASE 3); RNA binding / endoribonuclease/ ribonuclease T2	0.151207	1.62573	2.82107	2.28998
34	MT2B (METALLOTHIONEIN 2B); copper ion binding	0.078415	7.77753	8.97271	2.28973
35	PSBR (photosystem II subunit R)	0.344396	4.52427	5.71552	2.28351
36	WRKY75; transcription factor	0.054459	1.17387	2.365	2.28332
37	PCK1 (PHOSPHOENOLPY RUVATE CARBOXYKINASE 1); ATP binding / phosphoenolpyruvate ca	0.273445	5.25726	6.44245	2.27394
38	GRP5 (GLYCINE- RICH PROTEIN 5); structural constituent of cell Wall	0.106404	2.68062	3.85426	2.2558
39	GAPC (GLYCERALDEHYD E-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C SUBUNIT); glyceraldehyde-3-phos	0.232765	5.39986	6.56318	2.23972
40	GAPC (GLYCERALDEHYD E-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C SUBUNIT); glyceraldehyde-3-phos	0.287455	2.88406	4.02355	2.20304
41	AHP1 (HISTIDINE- CONTAINING PHOSPHOTRANSMI TTER 1); histidine phosphotransfer kina	0.109988	3.51386	4.64539	2.19091
42	FPP1 (FLOWERING PROMOTING FACTOR 1)	0.260042	1.10743	2.218	2.1593

Tablo 4.5: Devamı.

	Gen Adı	p-değeri	Ortalama (0 µM)	Ortalama (25 µM)	Kat farkı (0 µM /25 µM)
43	ALDH12A1; 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase/ 3-chloroallyl aldehyde dehydr	0.202698	3.83864	4.9464	2.15511
44	RGP1 (REVERSIBLY GLYCOSYLATED POLYPEPTIDE 1); cellulose synthase (UDP-forming)	0.389832	8.59662	9.69528	2.14154
45	PIP1;5 (PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1;5); water channel	0.132708	4.49983	5.58798	2.12602
46	AHB1 (ARABIDOPSIS HEMOGLOBIN 1); oxygen binding / oxygen transporter	0.179397	2.06467	3.15239	2.12538
47	ATGSTU11 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 11); glutathione transferase	0.138074	2.53316	3.58756	2.07685
48	CLA1 (CLOROPLASTOS ALTERADOS 1); 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	0.059655	1.61858	2.66234	2.06159
49	APT2 (ADENINE PHOSPHORIBOSYL TRANSFERASE 2); adenine phosphoribosyltransfe rase/	0.1691	5.65665	6.68632	2.04155
50	LP1; calmodulin binding	0.035467	3.13078	4.14835	2.0245
51	LOS2; LOW EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 2/ phosphopyruvate hydratase	0.0556	7.06303	8.05456	1.98829

Tablo 4.5: Devamı.

	Gen Adı	p-değeri	Ortalama (0 µM)	Ortalama (25 µM)	Kat farkı (0 µM /25 µM)
52	ADK1 (adenosine kinase 1); adenosine kinase/ copper ion binding	0.098793	3.00933	3.99488	1.98007
53	ATGSTF3 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE F3); glutathione transferase	0.30228	8.71293	9.67018	1.94161
54	LHB1B1; chlorophyll binding	0.059595	1.54858	2.50123	1.93542
55	ATPK3; ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase	0.361334	4.90396	5.84283	1.91703
56	CAT1 (CATALASE 1); catalase	0.07638	2.30818	3.24668	1.91653
57	NIP5;1; arsenite transmembrane transporter/ boron transporter/ water channel	0.583617	3.42612	4.35435	1.90295
58	PSBP-1 (PHOTOSYSTEM II SUBUNIT P-1); poly(U) binding	0.188193	1.57447	2.47667	1.86891
59	GAPC1 (GLYCERALDEHYD E-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C SUBUNIT 1); glyceraldehyde-3-p	0.163642	8.40779	9.2885	1.84128
60	AALP (Arabidopsis aleurain-like protease); cysteine-type peptidase	0.097358	7.41678	8.27398	1.81152
61	CSD1 (COPPER/ZINC SUPEROXIDE DISMUTASE 1); superoxide dismutase	0.254562	8.17262	7.32206	-1.8032
62	TIP2;2 (TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN 2;2); water channel	0.491506	4.72429	3.87172	-1.80571

Tablo 4.5: Devamı.

	Gen Adı	p-değeri	Ortalama (0 µM)	Ortalama (25 µM)	Kat farkı (0 µM /25 µM)
63	ATHRGP1 (HYDROXYPROLIN E-RICH GLYCOPROTEIN); structural constituent of cell Wall	0.031789	2.12921	1.27532	-1.80737
64	BGLU16 (BETA GLUCOSIDASE 16); catalytic/ cation binding / hydrolase, hydrolyzing	0.00418	2.16232	1.30018	-1.81773
65	GLP5 (GERMIN- LIKE PROTEIN 5); manganese ion binding / nutrient reservoir	0.218669	5.11418	4.24662	-1.82457
66	APS4; sulfate adenylyltransferase (ATP)	0.03449	6.2811	5.39648	-1.84628
67	NIR1 (NITRITE REDUCTASE 1); ferredoxin-nitrate reductase/ nitrite reductase (NO-	0.36531	3.52178	2.62108	-1.86698
68	FLA13 (FASCICLIN- LIKE ARABINOGALACT AN PROTEIN 13 PRECURSOR)	0.252645	2.49547	1.578	-1.8888
69	MYB59 (MYB DOMAIN PROTEIN 59); DNA binding / transcription factor	0.286815	3.53674	2.52164	-2.02104
70	ATNUDX25 (<i>Arabidopsis thaliana</i> NUDIX HYDROLASE HOMOLOG 25); bis(5'-nucleosyl)-te	0.050313	2.51208	1.49291	-2.02675
71	ATMHX (<i>Arabidopsis thaliana</i> MAGNESIUM/PROT ON EXCHANGER); calcium:sodium antiport	0.080972	2.43064	1.41133	-2.02695

Tablo 4.5: Devamı.

	Gen Adı	p-değeri	Ortalama (0 µM)	Ortalama (25 µM)	Kat farkı (0 µM /25 µM)
72	CYP78A8;cytochrome P450, family 78, subfamily A, polypeptide 8	0.021523	2.78332	1.73839	-2.06326
73	AtGLDP1 (<i>Arabidopsis thaliana</i> glycine decarboxylase P-protein 1); catalytic/ gly	0.110702	6.40722	5.36174	-2.06405
74	TIF3H1; translation initiation factor	0.075002	5.12636	4.05302	-2.10431
75	PGI1 (PHOSPHOGLUCOSE ISOMERASE 1); glucose-6-phosphate isomerase	0.084415	6.18019	5.10269	-2.11037
76	SULTR1;2 (SULFATE TRANSPORTER 1;2); sulfate transmembrane transporter	0.287466	2.43452	1.31693	-2.16983
77	XTH21 (XYLOGLUCAN ENDOTRANSGLUCOSYLASE/HYDROLASE 21); hydrolase, acting on glycol	0.202592	2.39859	1.26938	-2.18738
78	AtTIP2;3; ammonia transporter/ methylammonium transmembrane transporter/ water c	0.357022	3.64138	2.47111	-2.25053
79	pal1 (Phe ammonia lyase 1); phenylalanine ammonia-lyase	0.19755	4.02007	2.81408	-2.30695
80	MT1C; (METALLOTHIONEIN 1C), copper ion binding,	0.037249	7.03	5.70526	-2.50488
81	CBL2 (CALCINEURIN B-LIKE 2); calcium ion binding	0.040989	5.92248	4.56026	-2.5708

Tablo 4.5: Devamı.

	Gen Adı	p-değeri	Ortalama (0 μ M)	Ortalama (25 μ M)	Kat farkı (0 μ M /25 μ M)
82	G6PD2 (GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE 2); glucose-6-phosphate dehydrogenase	0.088057	5.04517	3.43002	-3.06345
83	ATRFNR2 (ROOT FNR 2); FAD binding / NADP or NADPH binding / electron carrier/ fe	0.055376	3.49648	1.82123	-3.19375
84	carbonic anhydrase, putative / carbonate dehydratase, putative	0.170342	5.27313	3.36359	-3.75688
85	CINV1 (cytosolic invertase 1); beta-fructofuranosidase	0.032505	4.77051	2.72142	-4.13845
86	NRT1.5 (NITRATE TRANSPORTER 1.5); nitrate transmembrane transporter/ transporter	0.007546	6.13129	3.74782	-5.2179
87	CPuORF32 (Conserved peptide upstream open Dreading frame 32)	0.025907	5.07281	1.51975	-11.7376
88	RCI3 (RARE COLD INDUCIBLE GENE 3); peroxidase	0.054223	6.36165	2.60183	-13.5462

Tablo 4.5'te görüldüğü gibi 25 μ M Cu uygulaması yapılan *B. nigra*, CGN06619 ekotipinin kök dokusunda, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında deney grubunda farklılık gösteren 88 adet gen tespit edilmiştir. Bu genlerden 60 tanesinin kontrol grubuna kıyasla teşvik edildiği 28 tanesinin ise baskılandığı görülmüştür. Mikroarray analizi sonucunda kök dokusunda ağır metal alınımı ve taşınmasında rol aldığı düşünülen 23 adet gen belirlenmiştir.

Analiz sonuçları değerlendirildiğinde, kök dokusundan Cu stresi ile ilişkili olarak belirlenen toplam 23 adet gen mRNA seviyesinde yapılacak olan daha ayrıntılı çalışmalar için seçilmiştir. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda bunlar arasından 10 genin kantitatif RT-PZR çalışmaları için uygun olduğuna karar verilmiştir. Ağır metal

alınımı ve taşınımında görevli olabileceği düşünülen bu genlerin yer aldığı yollar ve moleküler fonksiyonları Tablo 4.6’da detaylı olarak verilmiştir (Yüksel ve diğ., 2010).

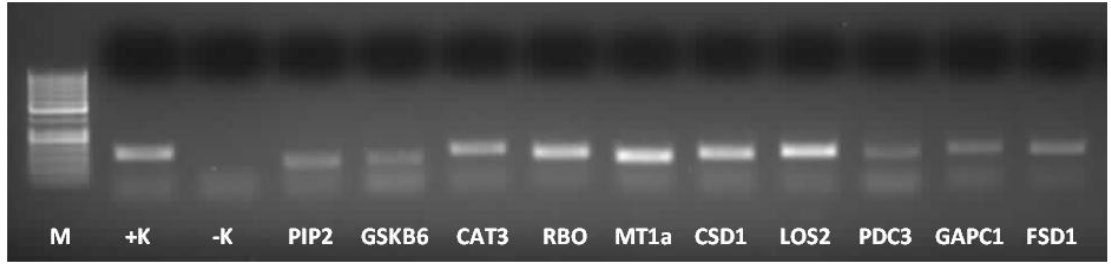
Tablo 4.6: Mikroarray analizi sonucunda ağır metal alınımı ve taşınmasında rol aldığı düşünülen genlerin yer aldığı yollar ve moleküler fonksiyonları.

Gen Adı	Gen Kodu	Yer Aldığı Yolk	Moleküler Fonksiyon
ADH1	AT1G77120	Glikolizis / Glukoneogenezis	Alkol dehidrogenas aktivitesi Oksidoredüktaz aktivitesi
CAT3	AT1G20620	Triptofan Metabolizması Metan Metabolizması	Katalaz aktivitesi Demir iyonu bağlama
CYP706A2	AT4G22710	Elektron taşınımı	Oksijen bağlama Elektron taşıma Demir iyonu bağlama
CYP78A8	AT1G01190	Askorbat ve aldarat Metabolizması	Oksijen bağlama Elektron taşıma Demir iyonu bağlama
CSD1	AT1G08830	Süperoksit metabolizması	Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi Bakır, çinko süperoksit dismutaz enzim aktivitesi Metal iyonu bağlama
FSD1	AT4G25100	Süperoksit metabolizması	Süperoksit dismutaz enzim aktivitesi Metal iyonu bağlama
GAPC1	AT3G04120	Glikolizis / Glukoneogenezis	Oksidatif strese yanıt Glikolizis
G6PD2	AT5G13110	Pentoz fosfat yolağı Glutasyon Metabolizması	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz Aktivitesi
GSKB6	AT3G17820	Glutamat metabolizması Peptidoglikan biyosentezi Azot metabolizması	Nitrat asimilasyonu Glutamin biyosentezi Azot bileşiğı metabolizması
GSTF3	AT2G02930	Glutasyon Metabolizması	Katabolik toksin süreci
LOS2	AT2G36530	Glikolizis / Glukoneogenezis	Fosfopiruvat hidrataz aktivitesi Glikolizis
MT1a	AT1G07590	Ağır metal metabolizması	Bakır bağlama Metal bağlama
MT1C	AT1G07610	Ağır metal metabolizması	Bakır bağlama Elektron taşıma Oksidoredüktaz aktivitesi
NAXT1	AT3G45640	Nitrat taşıma Metabolizması	Protein kinaz aktivitesi Ozmatik ve oksidatif strese yanıt
NRT1.5	AT1G12110	Nitrat taşıma metabolizması	Oligopeptit taşıma

Tablo 4.6: Devamı.

Gen Adı	Gen Kodu	Yer Aldığı Yolak	Moleküler Fonksiyon
Pal1	AT2G37040	Alkoloid biyosentezi II Tirozin metabolizması Nitrojen metabolizması	Savunma Oksidatif strese yanıt Yaralanmalara yanıt
PDC3	AT5G01330	Glikolizis / Glukoneogenezis	Katalitik aktivite Magnezyum iyon bağlama Tiamin pirofosfat bağlama
PIP2;5	AT3G54820	Taşıma metabolizması	Taşıma
RBO1	AT5G47910	Oksijen ve reaktif oksijen türlerinin metabolik süreci	Elektron taşıma NAD (P) H oksidaz aktivitesi Demir iyonu bağlama FAD bağlama
RCI3	AT1G05260	Fenil alanin metabolizması Metan metabolizması	Peroksidaz aktivitesi Hem bağlama Oksidatif strese yanıt
RFNR2	AT1G30510	Elektron taşınımı	Elektron taşıma aktivitesi Oksidoredüktaz aktivitesi
SUS1	AT5G20830	Nişasta ve sükroz Metabolizması	Sükroz sentezi aktivitesi Ozmatik ve strese yanıt
TIP2;2	AT3G26520	Taşıma metabolizması	Su kanal aktivitesi Su homeostasisi

Tablo 4.6’da yer alan genler incelendiğinde, genlerin daha çok taşıma sürecine katılarak taşıyıcı aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Ağır metal alınımı ve taşınması ile ilişkili olduğu düşünülen bu genlerin elektron ve nitrat taşınımı, ağır metal metabolizması, glikolizis ve glutatyon metabolizması gibi yolaklarda yer aldığı belirlenmiştir. Ayrıca, bu yolaklarda yer alan birçok genin oksidatif strese yanıtta görev aldığı bilinmektedir. Bu genlere ait primer çiftleri Biology WorkBench (<http://workbench.sdsc.edu/>) programı kullanılarak tasarlanmış ve IDT (Integrated DNA Technologies) firmasından hizmet alımı yapılarak sentezletilmiştir. Sentezletilen 23 primer çiftinin kontrolleri konvansiyonel PZR ile yapılmış ve 10 primer çifti kantitatif RT-PZR çalışmaları için seçilmiştir (Şekil 4.23).



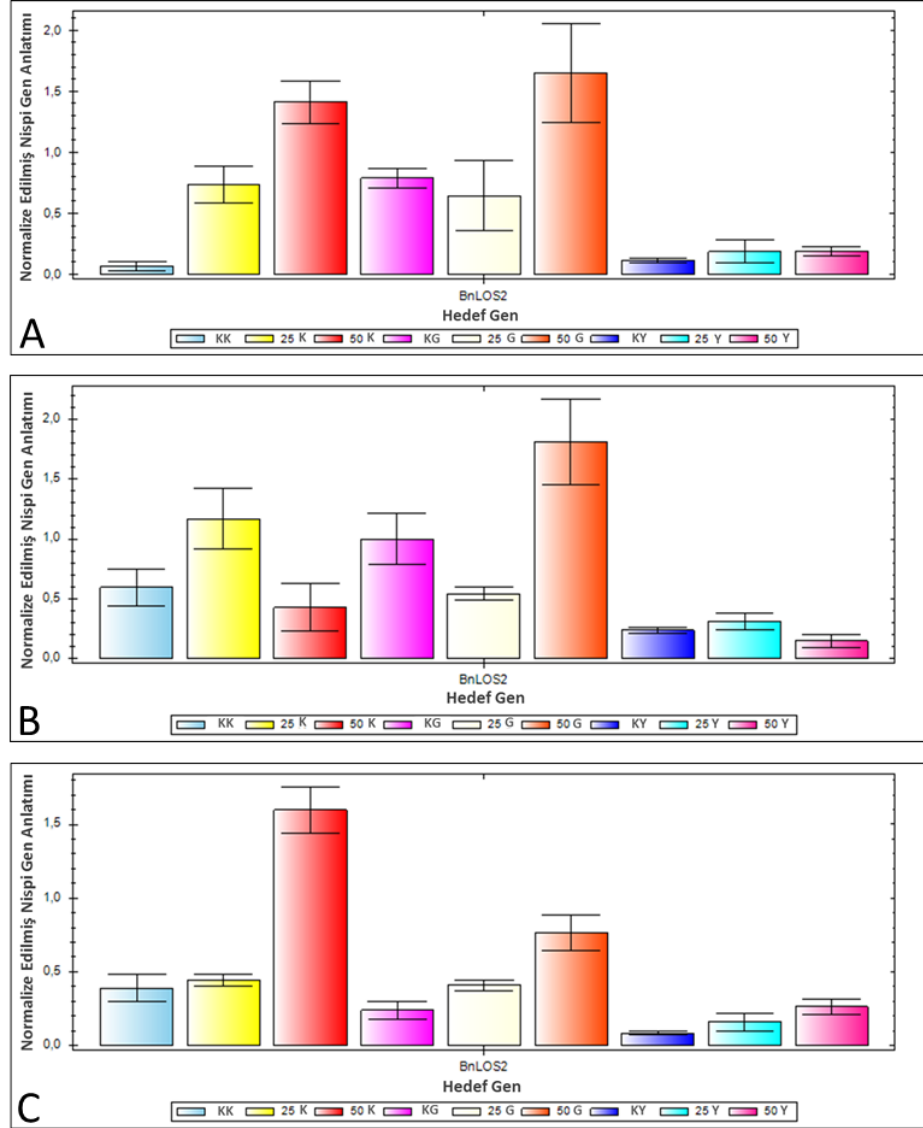
Şekil 4.23: Çalışan primer çiftlerinin, 72 saat boyunca Cu uygulaması yapılan *B.nigra* GN06626 ekotipinin 50 μ M CuSO₄ uygulama grubuna ait kök örneklerinden elde edilen cDNA'lar kullanılarak PZR'la kontrolünün %2'lik agaroz jel görüntüsü (M=Marker, +K= Pozitif kontrol; β -aktin primeri, -K= Negatif Kontrol).

4.2.5. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR)

Farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 μ M) bakır uygulaması sonucu, metal akümülyasyon ve toleransı bakımından farklılık gösteren *Brassica nigra* ekotiplerinin kök dokusunda meydana gelen transkriptomal değişimleri belirlemek için mikroarray analizi yapılmıştır. Ağır metal metabolizmasıyla ilişkili olabilecek genler belirlendikten sonra, mikroarray analizi sonuçlarını doğrulamak ve seçilen genlerle detaylı çalışmalar yapmak amacıyla, daha güvenilir bir yöntem olan kantitatif RT-PZR yöntemi kullanılmıştır. Aynı zamanda, seçilmiş olan genlerin farklı dokular ve ekotipler için detaylı mRNA anlatım profilleri belirlenmiştir. Böylece, Cu uygulaması yapılan *B. nigra* bitkisine ait 3 farklı ekotipin kök, gövde ve yapraklarından elde edilen mRNA'lar kullanılarak cDNA eldesi sonrası, metal akümülyasyon mekanizmasında fonksiyonel olduğu düşünülen 10 adet genden tasarlanan primerlerin her biri ile kantitatif RT-PZR yapılmıştır. Bu örneklerin β -aktin primer çiftiyle (referans gen, housekeeping gen) yapılan amplifikasyonları normalizasyon için kullanılmıştır. Hedef genlerin referans gene göre nispi gen anlatımları, “delta-delta metodu” yoluyla kat farkı olarak belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda PZR’da çalıştığı gösterilen 10 adet genden, 8 tanesi kantitatif RT-PZR’da olumlu sonuç vermiştir.

72 saat boyunca 25 ve 50 μ M CuSO₄ çözeltisi uygulanan *B. nigra*, CGN06625, CGN06626 ve Diyarbakır ekotiplerinin kök, gövde ve yaprak dokularında, deney grubunda kontrol grubuna oranla farklı anlatım yapan her bir hedef gene ait normalize edilmiş nispi gen anlatımları Şekil 4.24- Şekil 4.32’de verilmiştir.

***BnLOS2* (Low Expression Of Osmotically Responsive Genes 2)**

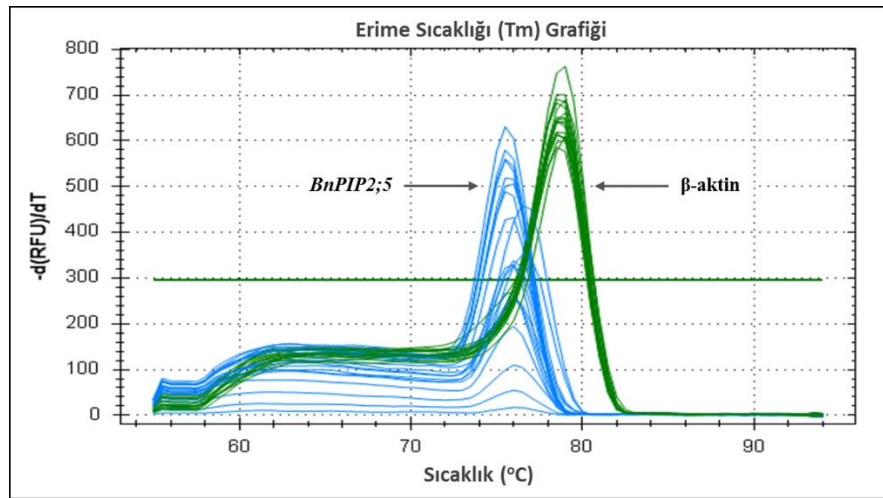


Şekil 4.24: 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 μ M) Cu uygulaması yapılan *B. nigra* CGN06625 (**A**), CGN06626 (**B**) ve Diyarbakır (**C**) ekotiplerine ait kök, gövde ve yaprak dokularında, deney grubunun kontrol grubuna oranla farklı anlatım yapan *BnLOS2* genine ait normalize edilmiş nispi gen anlatımı oranı ($2^{\Delta\Delta Cq}$). (KK=Kontrol kök, 25K=25 Kök, 50K=50 Kök, KG=Kontrol gövde, 25G= 25 Gövde, 50G= 50 Gövde, KY= Kontrol yaprak, 25Y= 25 Yaprak, 50Y=50 Yaprak).

BnLOS2 genine ait kantitatif RT-PZR analiz sonuçları değerlendirildiğinde, genin her üç ekotipte de farklı anlatım yaptığı görülmüştür. Toleranslı olan ve olmayan ekotiplerde kök ve gövde dokularında *BnLOS2* geni yüksek anlatım yaparken, yaprakta genin anlatım düzeyinde farklılığa rastlanmamıştır (Şekil 4.24). CGN06625 ekotipinde kontrol örneğiyle karşılaştırıldığında en yüksek gen anlatımı 50 μ M kök örneğinde tespit edilmiştir (yaklaşık 7 kat). Gövde dokusunda da benzer şekilde 50 μ M

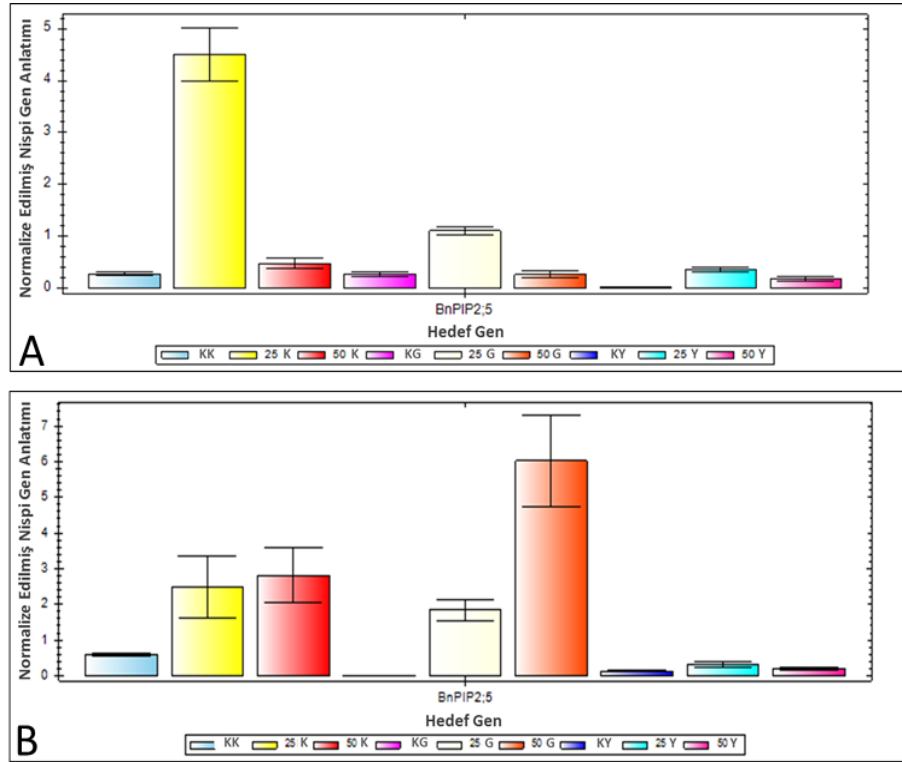
uygulamasında kontrole göre 2 kat gen anlatımı artmıştır. CGN06626'da kontrol örneğiyle karşılaştırıldığında en yüksek gen anlatımı kökte 25 μM 'da (2 kat), gövdede 50 μM 'da (2 kat) belirlenmiştir. Diyarbakır ekotipinde ise, kök dokusunda 50 μM uygulamasında kontrole göre gen anlatımında 4 kat artış saptanmıştır. Gövde dokusundaki gen anlatımı kökle karşılaştırıldığında daha düşük olup, kontrolle arasındaki en büyük fark 50 μM Cu uygulamasında gözlenmiştir (yaklaşık 2 kat).

***BnPIP2;5* (Plasma Membrane Intrinsic Protein 2;5)**



Şekil 4.25: 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 μM) Cu uygulaması yapılan *B. nigra* CGN06625 ekotipine ait kök, gövde ve yaprak dokularında, deney grubunun kontrol grubuna oranla farklı anlatım yapan *BnPIP2;5* genine ait erime sıcaklığı grafiği.

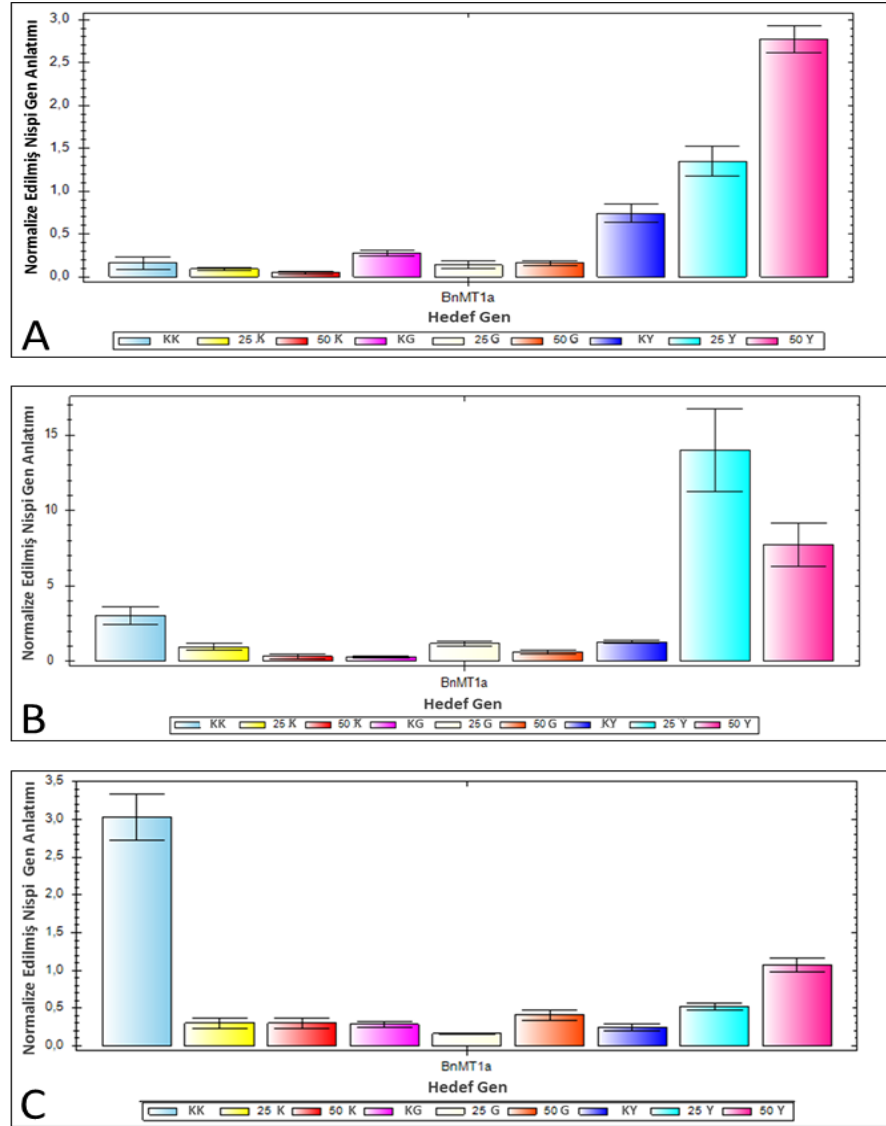
BnPIP2;5 geninin, toleranslı olmayan ekotipler arasında farklı anlatım gösterdiği tespit edilmiştir. CGN06625 ekotipinde kantitatif RT-PZR analizi sonucu elde edilen Ct değerlerinin tutarsız olduğu görülmüştür. Aynı ekotipin 3 tekrarında da analizler yapılmış ancak gen anlatımında olumlu cevap alınamamıştır. Ayrıca, reaksiyon sırasında referans gen olarak kullanılan β -aktin geninin Ct değerlerinin tutarlı olması deneysel şüpheyi ortadan kaldırmaktadır (Şekil 4.25).



Şekil 4.26: 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 μ M) Cu uygulaması yapılan *B. nigra* CGN06626 (**A**) ve Diyarbakır (**B**) ekotiplerine ait kök, gövde ve yaprak dokularında, deney grubunun kontrol grubuna oranla farklı anlatım yapan *BnPIP2;5* genine ait normalize edilmiş nispi gen anlatımı oranı ($2^{\Delta\Delta Cq}$). (KK=Kontrol kök, 25K=25 Kök, 50K=50 Kök, KG= Kontrol gövde, 25G= 25 Gövde, 50G= 50 Gövde, KY= Kontrol yaprak, 25Y= 25 Yaprak, 50Y=50 Yaprak).

Toleranslı olmayan diğer bir ekotip CGN06626 kök dokusunda en yüksek *BnPIP2;5* anlatımı 25 μ M uygulamasında belirlenmiştir. Kontrol kök örneğiyle karşılaştırıldığında gen anlatımının yaklaşık 16 kat arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.26A). Gövde dokusuna ait elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde ise, 25 μ M’da kontrole göre genin anlatımında her ne kadar bir artış gözlenirse de, referans genle karşılaştırıldığında bu artışın çok düşük oranda olduğu saptanmıştır. Ayrıca, 50 μ M uygulamasında *BnPIP2;5* baskılanmış ve gen anlatımının kontrol örneğiyle aynı seviyede olduğu gözlenmiştir. Diyarbakır ekotipinde, CGN06626’dan farklı olarak hem kökte hem de gövdede *BnPIP2;5* teşvik edilmiştir. Kökte, 25 ve 50 μ M uygulamalarında kontrol örneğine göre gen anlatımı 4 kat artmıştır. Buna ek olarak, en yüksek *BnPIP2;5* anlatımı ise gövdede 50 μ M uygulamasında belirlenmiştir; kontrol örneğinin normalize edilmiş nispi gen anlatımı 0,01 iken 50 μ M gövde örneğinin 6,02 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.26B). Her iki ekotipte de yaprak dokusunda gen anlatımında bir farklılığa rastlanmamıştır.

BnMT1a (Metallothionein 1a)

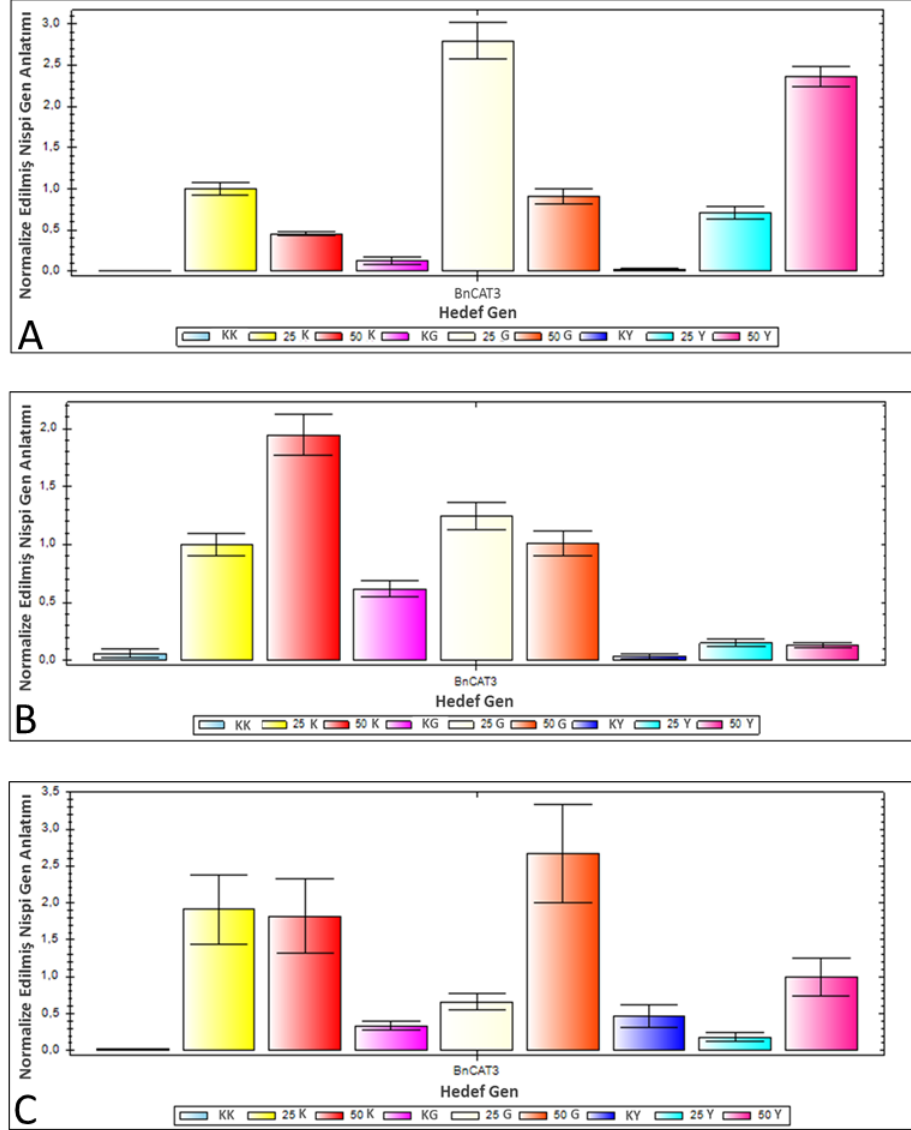


Şekil 4.27: 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 µM) Cu uygulaması yapılan *B. nigra* CGN06625 (**A**), CGN06626 (**B**) ve Diyarbakır (**C**) ekotiplerine ait kök, gövde ve yaprak dokularında, deney grubunun kontrol grubuna oranla farklı anlatım yapan *BnMT1a* genine ait normalize edilmiş nispi gen anlatımı oranı ($2^{\Delta\Delta Cq}$). (KK=Kontrol kök, 25K=25 Kök, 50K=50 Kök, KG=Kontrol gövde, 25G= 25 Gövde, 50G= 50 Gövde, KY= Kontrol yaprak, 25Y= 25 Yaprak, 50Y=50 Yaprak).

BnMT1a genine ait grafik değerlendirildiğinde toleranslı olan ve olmayan ekotipler arasında farklı dokularda gen anlatımında değişiklikler tespit edilmiştir. CGN06625 ve CGN06626 ekotiplerinin her ikisinde de benzer bir şekilde en yüksek gen anlatımı yaprak dokusunda belirlenmiştir. Her iki ekotipte de gövdede anlamlı bir fark gözlenmezken, kök dokusunda CGN06626 ekotipinde *BnMT1a*'nın anlatımı kontrole göre 25 ve 50 µM uygulamalarda baskılanmıştır (yaklaşık 3 kat). Diyarbakır ekotipinde

de *BnMT1a*'nın anlatımı sadece kök dokusunda baskılanmış (yaklaşık 10 kat), gövde ve yaprakta ise gen anlatımında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

BnCAT3 (Catalase 3)

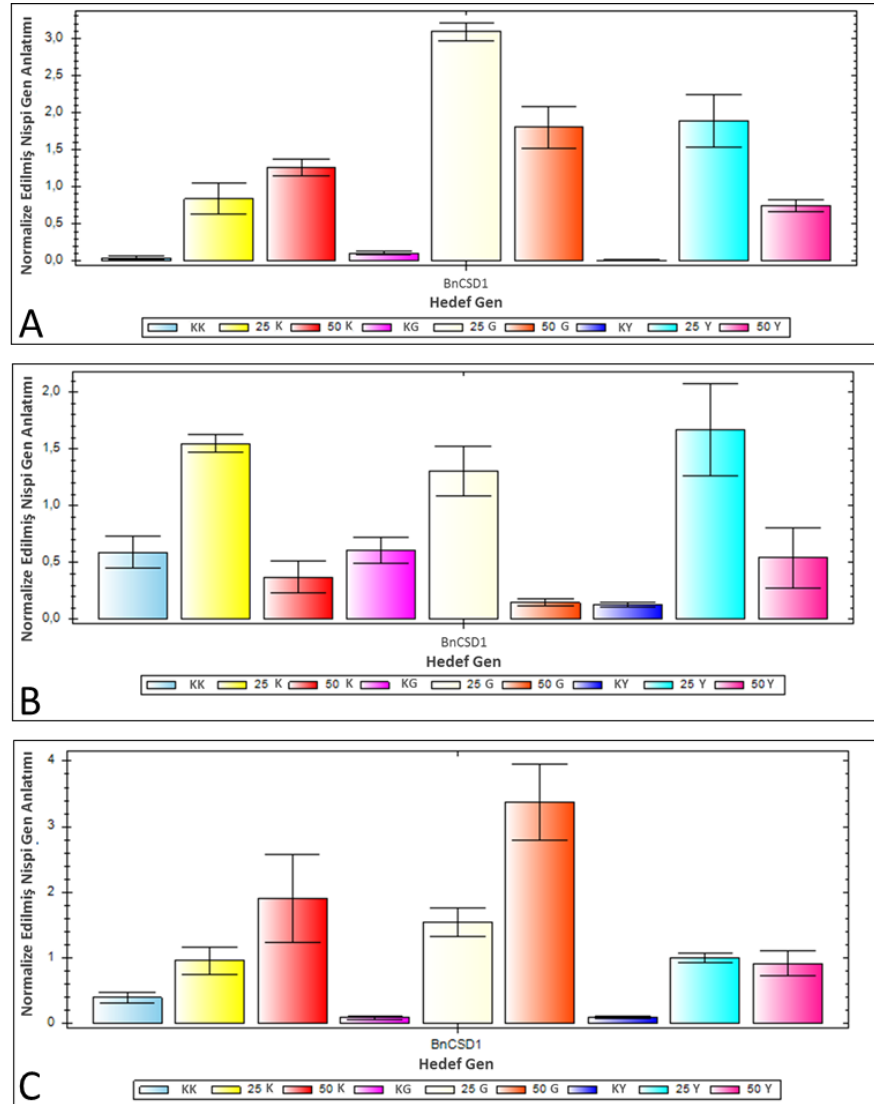


Şekil 4.28: 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 μ M) Cu uygulaması yapılan *B. nigra* CGN06625 (A), CGN06626 (B) ve Diyarbakır (C) ekotiplerine ait kök, gövde ve yaprak dokularında, deney grubunun kontrol grubuna oranla farklı anlatım yapan *BnCAT3* genine ait normalize edilmiş nispi gen anlatımı oranı ($2^{\Delta\Delta Cq}$). (KK=Kontrol kök, 25K=25 Kök, 50K=50 Kök, KG=Kontrol gövde, 25G= 25 Gövde, 50G= 50 Gövde, KY= Kontrol yaprak, 25Y= 25 Yaprak, 50Y=50 Yaprak).

CGN06625 ekotipinde *BnCAT3* geninin kök, gövde ve yaprak dokularında kontrol örneğiyle karşılaştırıldığında farklı anlatım yaptığı belirlenmiştir. En yüksek gen anlatımı gövde dokusunda 25 μ M Cu uygulamasında görülürken (kontrole göre yaklaşık 20 kat), bunu sırasıyla yaprak ve kök dokuları izlemiştir. CGN06626 ekotipinde de

benzer sonuçlar elde edilmiş ancak yaprak dokusunda gen anlatımında anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır. *BnCAT3* geni kontrolle karşılaştırıldığında kökte yüksek oranda teşvik edilmesine rağmen (yaklaşık 30 kat) gövdede anlatım oranı düşmüştür (yaklaşık 2 kat). Diyarbakır ekotipinde ise en yüksek gen anlatımı gövdede 50 μ M Cu uygulamasında belirlenmiştir (kontrole göre yaklaşık 7 kat). Kök ve yaprakta tespit edilen anlatım seviyesi gövdeyle karşılaştırıldığında daha düşüktür.

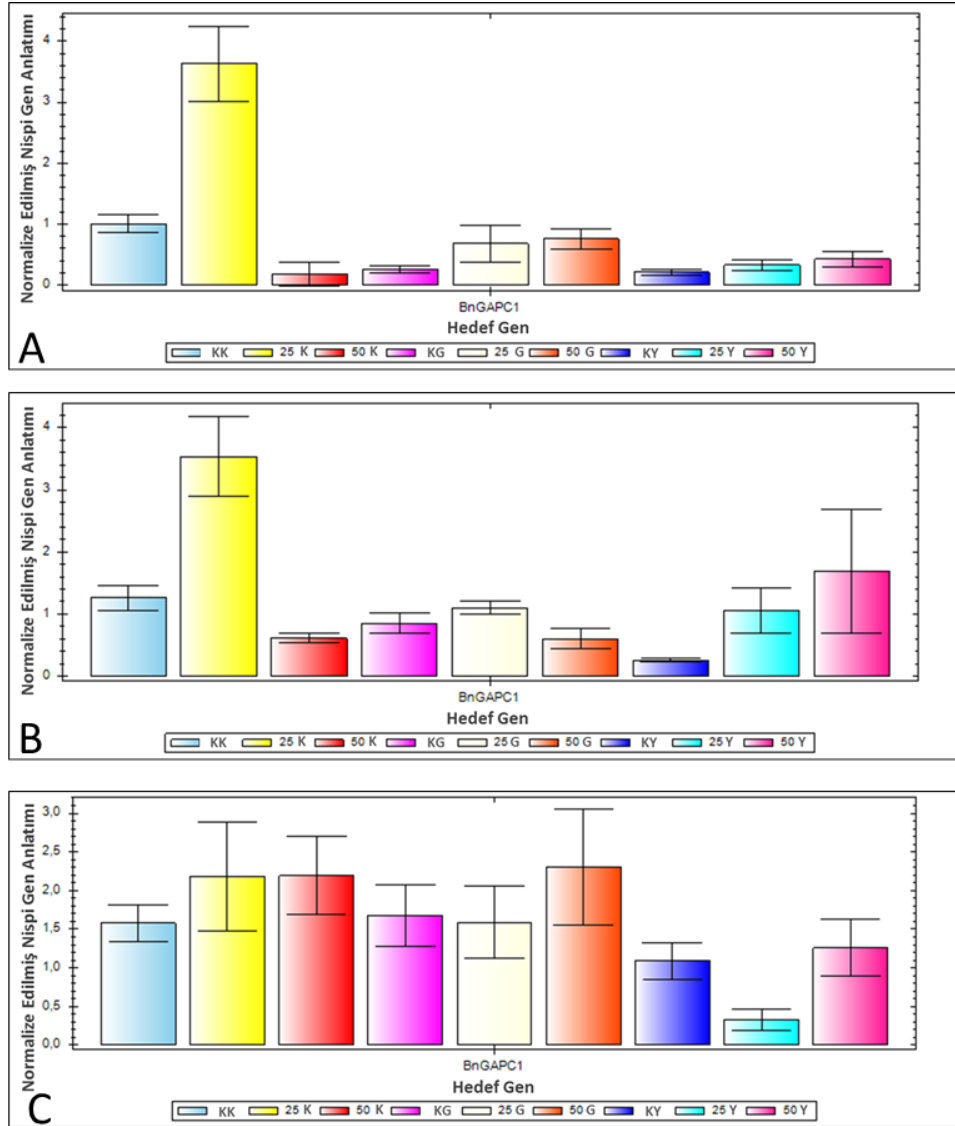
***BnCSD1* (Copper/Zinc Superoxide Dismutase 1)**



Şekil 4.29: 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 μ M) Cu uygulaması yapılan *B. nigra* CGN06625 (**A**), CGN06626 (**B**) ve Diyarbakır (**C**) ekotiplerine ait kök, gövde ve yaprak dokularında, deney grubunun kontrol grubuna oranla farklı anlatım yapan *BnCSD1* genine ait normalize edilmiş nispi gen anlatımı oranı ($2^{\Delta\Delta Cq}$). (KK=Kontrol kök, 25K=25 Kök, 50K=50 Kök, KG=Kontrol gövde, 25G= 25 Gövde, 50G= 50 Gövde, KY= Kontrol yaprak, 25Y= 25 Yaprak, 50Y=50 Yaprak).

BnCSD1 geninin kantitatif RT-PZR analiz sonucuna ait grafik incelendiğinde tüm ekotiplerde kök, gövde ve yaprakta farklı seviyelerde gen anlatımı olduğu görülmüştür (Şekil 4.29). Toleranslı olmayan CGN06625 ve CGN06626 ekotipleri *BnCSD1* geni bakımından karşılaştırıldığında her iki ekotipte de benzer sonuçlar alınmış ancak gen anlatımının CGN06625 ekotipinde, özellikle gövde dokusunda daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu ekotipte kontrol örneğiyle karşılaştırıldığında en yüksek gen anlatımı gövdede 25 μ M uygulamasında tespit edilmiştir (yaklaşık 30 kat). Yaprakta gen anlatımının gövdeye nazaran daha düşük olduğu belirlenmiş, en az anlatımın ise kök dokusunda meydana geldiği görülmüştür. Kökte tespit edilen gen anlatımının referans genle karşılaştırıldığında oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Ancak, kontrol örneğiyle kıyaslandığında, uygulanan Cu konsantrasyonuna paralel olarak genin anlatımında artış sözkonusudur. CGN06626'da bütün dokularda 25 μ M uygulamasında *BnCSD1* geni teşvik edilirken 50 μ M uygulamada ise baskılanmıştır. Elde edilen sonuçlar kontrol örneğiyle karşılaştırıldığında, kökte yaklaşık 3 kat, gövdede 2 kat, yaprakta 13 kat gen anlatım seviyesi artmıştır. Diyarbakır ekotipinde de kontrolle karşılaştırıldığında *BnCSD1*'in anlatımı diğer ekotiplerle benzer bir şekilde farklı konsantrasyonlardaki Cu uygulamalarında artış göstermiştir. Ancak, gen anlatımı konsantrasyona bağlı olarak kök ve gövdede artış gösterirken yaprakta her iki Cu uygulamasında da eşit miktarda olmuştur (Şekil 4.29).

***BnGAPC1* (Phosphorylating Glyceraldehyde-3-P Dehydrogenase C Subunit 1)**

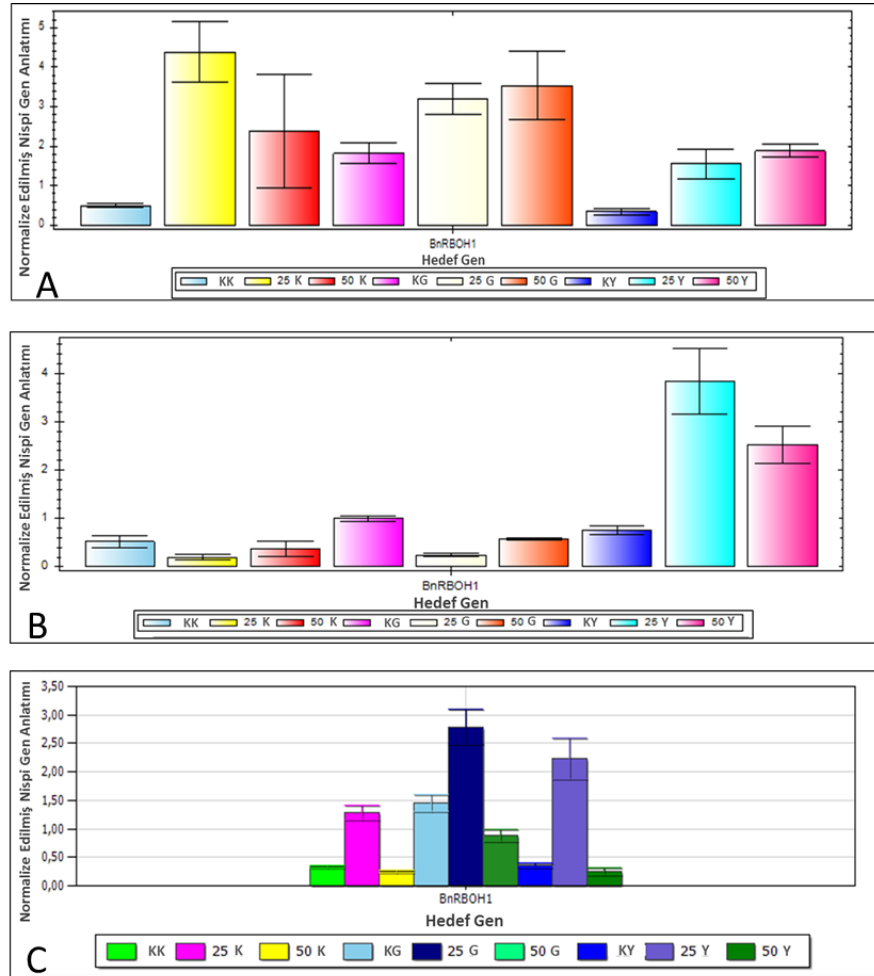


Şekil 4.30: 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 µM) Cu uygulaması yapılan *B. nigra* CGN06625 (A), CGN06626 (B) ve Diyarbakır (C) ekotiplerine ait kök, gövde ve yaprak dokularında, deney grubunun kontrol grubuna oranla farklı anlatım yapan *BnGAPC1* genine ait normalize edilmiş nispi gen anlatımı oranı ($2^{\Delta\Delta Cq}$). (KK=Kontrol kök, 25K=25 Kök, 50K=50 Kök, KG=Kontrol gövde, 25G= 25 Gövde, 50G= 50 Gövde, KY= Kontrol yaprak, 25Y= 25 Yaprak, 50Y=50 Yaprak).

BnGAPC1 genine ait kantitatif RT-PZR sonuçları değerlendirildiğinde toleranslı olan ve olmayan ekotipler arasında gen anlatımının farklı olduğu görülmüştür. Toleranslı olmayan CGN06625 ve CGN06626 ekotiplerinde *BnGAPC1* geni kökte teşvik edilmiş diğer dokularda ise genin anlatım seviyesinde çok büyük bir farklılık gözlenmemiştir. Her iki ekotipte 25 µM Cu uygulanan kökte, kontrolle karşılaştırıldığında gen anlatımı yaklaşık 3 kat artmıştır. 50 µM uygulamada ise gen anlatımının 25 µM'a göre

yaklaşık 6 kat azaldığı tespit edilmiştir. Toleranslı ekotip olan Diyarbakır'da kontrol örneğine göre *BnGAPC1*'in kök, gövde ve yapraktaki anlatım seviyesinde önemli bir farklılık belirlenmemiştir. Toleranslı olan ve olmayan ekotipler gen anlatımı bakımından birbiriyle karşılaştırıldığında, toleranslı olmayan CGN06625 ve CGN06626 ekotipleri kök dokusundaki *BnGAPC1* gen anlatımının Diyarbakır ekotipine göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

***BnRBOH1* (Respiratory Burst Oxidase Homologue D)**

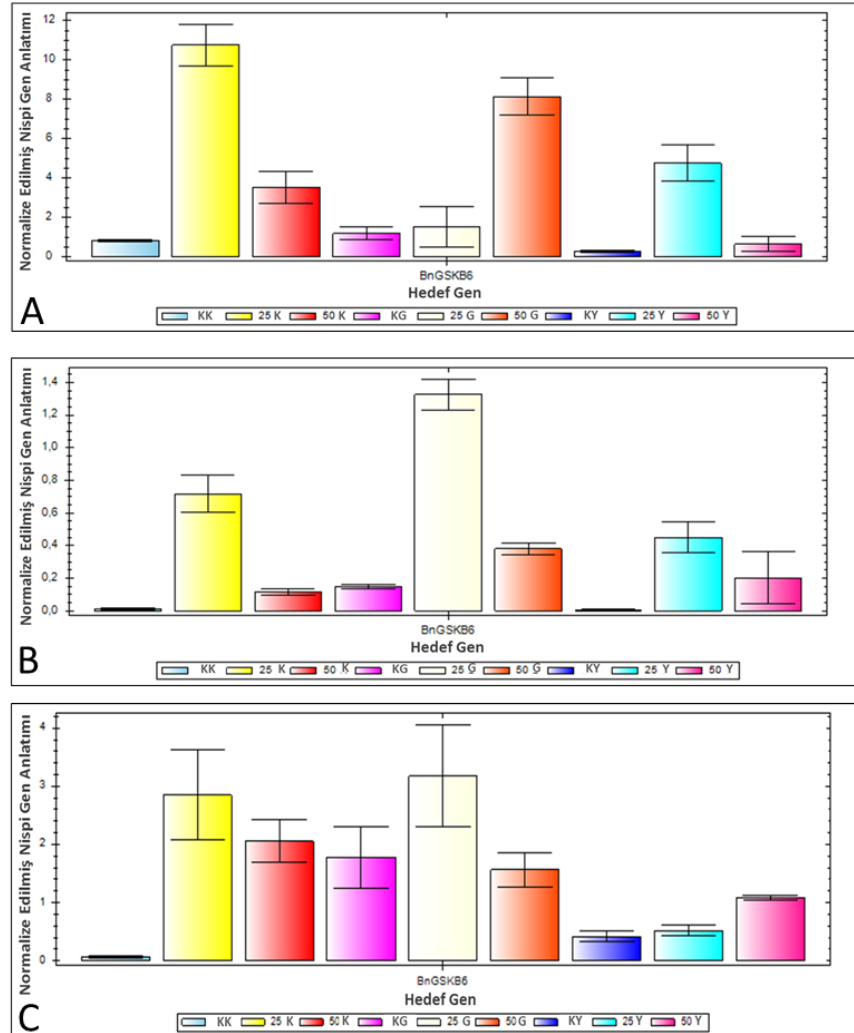


Şekil 4.31: 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 µM) Cu uygulaması yapılan *B. nigra* CGN06625 (**A**), CGN06626 (**B**) ve Diyarbakır (**C**) ekotiplerine ait kök, gövde ve yaprak dokularında, deney grubunun kontrol grubuna oranla farklı anlatım yapan *BnRBOH1* genine ait normalize edilmiş nispi gen anlatımı oranı ($2^{\Delta\Delta Cq}$). (KK=Kontrol kök, 25K=25 Kök, 50K=50 Kök, KG=Kontrol gövde, 25G= 25 Gövde, 50G= 50 Gövde, KY= Kontrol yaprak, 25Y= 25 Yaprak, 50Y=50 Yaprak).

BnRBOH1 geninin toleranslı olmayan ekotipler arasında farklı anlatım yaptığı saptanmıştır. CGN06625 ekotipinde her üç dokudada gen anlatımında farklılık gözlenirken CGN06626 ekotipinde sadece yaprak dokusunda farklılık tespit edilmiştir.

CGN06625’de, kontrol örneğiyle karşılaştırıldığında 25 μ M Cu uygulamasında kökte yaklaşık 9 kat, gövdede 2 kat yaprakta 5 kat; 50 μ M uygulamasında ise kökte 5 kat, gövdede 2 kat, yaprakta 5 kat gen anlatımının arttığı belirlenmiştir. Ancak, CGN06626 ekotipinde sadece yaprak dokusunda kontrole göre 25 μ M’da yaklaşık 5 kat, 50 μ M’da 3 kat gen anlatımı artmıştır. Diyarbakır ekotipine ait tüm dokularda gen anlatımında farklılıklar bulunmuş ve en yüksek *BnRBOH1* anlatımının gövdede olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, üç dokudada 25 μ M Cu uygulamasında gen anlatımı teşvik edilirken 50 μ M’da baskılanmıştır. Kontrol örneğiyle karşılaştırıldığında kökte yaklaşık 4 kat, gövdede 2 kat, yaprakta ise 7 kat gen anlatımının arttığı görülmüştür.

***BnGSKB6* (Glutamine Synthase Clone KB6)**



Şekil 4.32: 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (25 ve 50 μ M) Cu uygulaması yapılan *B. nigra* CGN06625 (A), CGN06626 (B) ve Diyarbakır (C) ekotiplerine ait kök, gövde ve yaprak dokularında, deney grubunun kontrol grubuna oranla farklı anlatım yapan *BnGSKB6* genine ait normalize edilmiş nispi gen anlatımı oranı ($2^{\Delta\Delta C_q}$). (KK=Kontrol kök, 25K=25 Kök, 50K=50 Kök, KG= Kontrol gövde, 25G= 25 Gövde, 50G= 50 Gövde, KY= Kontrol yaprak, 25Y= 25 Yaprak, 50Y=50 Yaprak).

BnGSKB6 genine ait kantitatif RT-PZR sonuçları incelendiğinde toleranslı olmayan ekotipler arasında gen anlatımında önemli farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Referans genle karşılaştırıldığında, CGN06625 ekotipinde normalize edilmiş nispi gen anlatımının çok yüksek, CGN06626'da ise daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Örneğin, 25 μ M Cu uygulanan kök dokusunun normalize edilmiş nispi gen anlatımı CGN06625 ekotipinde 10,76 iken CGN06626'da 0,72'dir. *BnGSKB6* geni CGN06625'te diğer ekotipe göre yaklaşık 15 kat daha fazla teşvik edilmiştir. Kontrol örneğiyle karşılaştırıldığında ise gen anlatımının CGN06625 ekotipinde kökte yaklaşık 13 kat (25 μ M'da), gövdede 7 kat (50 μ M'da) arttığı tespit edilmiştir. Yaprakta belirlenen gen anlatım seviyesinin kök ve gövdeye göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Toleranslı ekotip olan Diyarbakır'da, *BnGSKB6* geninin en yüksek anlatımı gövde dokusunda tespit edilmiştir. Ancak, kontrol örneğiyle karşılaştırıldığında en yüksek gen anlatımının kökte olduğu görülmüştür.

Toleranslı olan ve olmayan *B. nigra* ekotiplerine ait (CGN06625, CGN06626 ve Diyarbakır) kantitatif RT-PZR analiz sonuçları ile hassas ekotip *B. nigra* CGN06619'da yapılmış olan mikroarray sonuçlarının karşılaştırmaları Tablo 4.7'de ayrıca özetlenmiştir.

Tablo 4.7: 72 saat boyunca Cu uygulaması yapılan CGN06619, CGN06625, CGN06626 ve Diyarbakır ekotiplerinin kök dokusunda deney gruplarının kontrol grubuna oranla, farklı anlatım gösteren hedef genlerin mRNA seviyesindeki değişikliklerin, kantitatif RT-PZR ve mikroarray analiz sonucunda kat değişimi olarak ifadesi.

Mikroarray Analizi			RT-PZR ($2^{\Delta\Delta Cq}$)					
	CGN06619		CGN06625		CGN06626		Diyarbakır	
Hedef Genler	Kat değişimi	p-değeri	Kat değişimi	p-değeri	Kat değişimi	p-değeri	Kat değişimi	p-değeri
<i>BnCAT3</i>	1,92	0,08	0,99	0,00 ^a	0,94	0,00 ^a	1,90	0,00 ^a
<i>BnCSD1</i>	-1,80	0,25	0,80	0,01 ^b	0,96	0,00 ^a	0,57	0,02 ^b
<i>BnGAPC1</i>	1,84	0,16	2,63	0,01 ^b	2,27	0,01 ^b	0,80	0,23
<i>BnGSKB6</i>	2,76	0,06	9,93	0,00 ^a	0,71	0,00 ^a	2,78	0,01 ^b
<i>BnMT1a</i>	-2,50	0,04 ^b	-0,07	0,07	-2,08	0,00 ^a	-2,96	0,00 ^a
<i>BnLOS2</i>	1,99	0,06	0,66	0,00 ^a	0,58	0,01 ^b	0,05	0,48
<i>BnPIP2;5</i>	3,63	0,04	-	-	4,24	0,00 ^a	1,89	0,05
<i>BnRBOH1</i>	3,58	0,00 ^a	3,89	0,00 ^a	-0,32	0,06	0,95	0,13

Not: a: $p < 0,01$ ve b: $p < 0,05$ değerleri, kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gösteren hedef genleri ifade etmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Topraktaki ağır metal kirliliği günümüzdeki önemli çevresel problemlerden birisidir. Özellikle antropojenik etkilerle doğada miktarı giderek artan ağır metaller, tarım alanlarında toprak kullanımını kısıtlamakta ve ekosisteme zarar vermektedir. Ağır metallerin toprakta birikmesinin sadece toprak verimliliği ve ekosistem fonksiyonları üzerinde değil aynı zamanda besin zinciri yoluyla havyan ve insan sağlığı üzerinde de önemli etkileri vardır. Bu nedenle, son yıllarda ağır metallerle ilgili yapılan çalışmalarda özellikle ağır metallerin bitkilerle etkileşimi üzerinde durulmuş ve ağır metal kirliliğini ortadan kaldırmak için akümülatör ya da toleranslı bitki türleri kullanılmıştır (Padmavathiamma ve Li, 2007; Sarma, 2011). Bu bitkilerin belirlenmesiyle kirlenmiş suların ve tarımsal alanların iyileştirilmesinde etkili ve çevre sağlığına dost çözümler sunan fitoremediyasyon teknolojilerinin gelişimi sağlanmıştır. Dolayısıyla, sürdürülebilir toprak kullanımı ve gıda güvenliğinin teminat altına alınabilmesi ancak fitoteknolojik yöntemlerin daha iyi anlaşılmasıyla mümkündür.

Özellikle ağır metallerin bitkilerde akümülyasyonu ve toleransıyla ilgili moleküler mekanizmaların detaylı olarak aydınlatılması son derece önemlidir (Yang ve diğ., 2005; Hossain ve diğ., 2012). Brassicaceae familyasına ait *Arabidopsis halleri*, *Thlaspi caerulescens*, *Brassica juncea* ve *Brassica napus* gibi akümülatör bitkiler bu mekanizmaların aydınlatılmasında model bitki olarak kullanılmakta ve birçok çalışmada yer almaktadır (Bert ve diğ., 2003; Bernard ve diğ., 2004; Iglesia-Turino ve diğ., 2006; Gupta ve diğ., 2009; Cailliatte ve diğ., 2010; Chandna ve diğ., 2012; Haydon ve diğ., 2012). Ancak önemli bir yağ bitkisi olan ve ağır metallere karşı tolerans gösteren *B. nigra* ile ilgili detaylı moleküler çalışmalara literatürde rastlanmamıştır. Ülkemizde Doğu Anadolu bakır maden yataklarında yaşamaya adapte olmuş *B. nigra*'nın, ağır metal toleransı yeteneğiyle ilgili az sayıda fizyolojik çalışma bulunmaktadır (Bharagava ve diğ., 2008). Ayrıca, ağır metallerin alınımı veya taşınması sırasında yer alan mekanizmalar ve hücrede görevli taşıyıcılar hakkında bu türle yapılan literatürde detaylı bir çalışma olmamakla beraber eldeki mevcut bilgiler de çok azdır. Cu, ağır metal olmasına rağmen canlı dokuda birden fazla oksidasyon seviyesinde bulunabildiğinden,

bitkilerdeki birçok fizyolojik işlemlerde gerekli bir redoks-aktif geçiş metalidir. Bitkilerde, önemli fizyolojik mekanizmaların ve bitki büyüme ve gelişmesi üzerine Cu elementinin etkisi birçok çalışmada gösterilmiştir (Andrés-Colás ve diğ., 2010). Ancak bitki hücrelerinde Cu homeostazı, detoksifikasyonu ve taşıma mekanizmaları hakkında detaylı bilgi bulunmamaktadır (Yruela, 2005). Bununla birlikte, yakın zamanda bu alanda hızlı ilerlemeler olmuş ve özellikle mayadan diğer ökaryotlara Cu taşınımı hakkında bazı sonuçlar rapor edilmiştir (Nevitt ve diğ., 2012). Aynı zamanda birçok ağır metal taşıyıcı ailesi belirlenmiştir. Yine de özellikle ağır metallerin akümülyasyonunda rol oynayan moleküler mekanizmalar ile ilgili birçok temel soru cevapsız kalmıştır. Bu soruların cevaplanması, hücresel seviyede Cu taşınımında görevli gen ailesi ve proteinlerin belirlenmesi, bakırın bitkilerde birikiminin ve taşınımının anlaşılmasını sağlayacaktır. Ayrıca elde edilen bilgilerle hücrede Cu alımı ve homeostazıyla ilgili çeşitli mekanizmaların tanımlanması fitoremediyasyon sistemlerinin geliştirilmesi bakımından son derece önemli olacaktır. Özellikle metal şaperonlarının taşıyıcılarla etkileşiminin araştırılması, ağır metallerin hücreler arası trafiği ile ilgili bilginin açığa çıkmasını sağlayacaktır.

Bu çalışmada, *B. nigra* 'ya ait Etiyopya kökenli CGN06625 ve CGN06626 ekotiplerinin ve Türkiye kökenli Diyarbakır ekotipinin farklı konsantrasyonlarda uygulanan Cu elementine karşı gösterdiği tolerans ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir. Uygulamalar sonucu her ekotipe ait kök, gövde ve yaprak dokularının içerdiği Cu miktarı son derece hassas bir yöntem olan ICP-OES analizleriyle belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde anlamlı sonuçlar elde edilmiş ve deney güvenilirliği doğrulanmıştır (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Tablo 4.1). Ayrıca, metal birikimi ile ilgili olarak bitki metabolizmasında teşvik edilen veya baskılanan bazı genler tanımlanmış ve bu genlerle ilgili detaylı çalışmalar yapılmıştır. Yapılan moleküler çalışmalar sonucunda metal alınımında ve taşınmasında yer alabilecek, doğrudan bakır iyonuna bağlanabilecek proteinleri kodlayan bazı genler belirlenmiştir. Bu genlerin, metal metabolizmasındaki rollerinin daha iyi anlaşılabilmesi için mRNA düzeyindeki anlatım seviyeleri, daha güvenilir ve güçlü ifade düzeyi nedeniyle kantitatif RT-PZR yöntemiyle doğrulanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda Cu uygulanan bitkilerin kök, gövde ve yaprak dokularında bu genlerin anlatım farklılıkları analiz edilmiştir.

Yapılan bu çalışmada, ağır metal gibi toksik minerallerin topraktan köklere alınımı/ dışarıya atılması, taşınması, depolanması/ detoksifikasyon mekanizmalarının fizyolojik ve moleküler seviyelerde irdelenerek aydınlatılması ile fitoteknolojik yaklaşımların geliştirilmesine katkıda bulunması amaçlanmıştır. Bu yaklaşımlar, kirlenmiş suların ve tarımsal alanların iyileştirilmesinde etkili ve çevre sağlığına dost çözümler sunmaktadır. Dolayısıyla, bu çalışmayla sürdürülebilir toprak kullanımı ve gıda güvenliğinin teminat altına alınabilmesi için fitoteknolojik yöntemlerin daha iyi anlaşılması hedeflenmiştir.

B. nigra ağır metallere karşı toleranslı bir tür olup ağır metalleri özellikle kökte depolama yeteneğine sahiptir (Memon ve Zahiroviç, 2014). Aynı familyaya ait *B. juncea* ve *A. thaliana* gibi hiperakümülatör türlerin ağır metal metabolizmasıyla ilişkili birçok çalışma olmasına rağmen, *B. nigra*'nın bu yeteneğini araştırmak için yapılmış olan çalışmalar çok kısıtlıdır. Bu çalışmada, *B. nigra* CGN06625, CGN06626 ve Diyarbakır ekotiplerine 72 saat süreyle 25 ve 50 μM CuSO_4 çözeltisi uygulanmış ve her üç ekotipte de en fazla Cu birikiminin kök dokusunda olduğu ICP-OES analizleriyle tespit edilmiştir (Tablo 4.1). Bunu sırayla gövde ve yaprak dokuları takip etmiştir. Her bir ekotipe ait kontrol bitkilerinin toprak altı ve üstü organlarında iz miktarda Cu belirlenmiştir (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7). Ayrıca, bütün uygulamalarda kök, gövde ve yapraklarda biriken metal miktarları kontrol bitkilerinin kök, gövde ve yapraklarına göre önemli derecede artış göstermiştir. Toprakta 100 mg/kg, bitki kuru maddesinde ise 15-30 mg/kg'dan fazla bakırın toksik etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Sauve ve diğ., 1997). Quartacci ve arkadaşlarının (2003) yaptığı bir çalışmada, dört farklı Brassica türünde Cu alınımı ve taşınımı araştırılmış ve bazı türler üzerine düşük konsantrasyonda uygulanan 5 mM Cu elementinin bile toksik etkiye neden olduğu saptanmıştır. Bakır toksisitesi genellikle, ilk önce bitkinin kök sistemlerinde açığa çıkmakta ve bitki bünyesinde protein sentezi, fotosentez, solunum, iyon alınımı ve hücre membran stabilitesi gibi bazı fizyolojik olayların bozulmasına neden olmaktadır (Sossé ve ark., 2004). Bu nedenle, Cu toksisitesi sonucunda bitkide genel bir klorosiz oluşmaktadır (Alva ve diğ., 1999; McBride, 2001) (Şekil 4.4). Yapılan bu tez çalışmasında, farklı konsantrasyonlarda Cu uygulaması sonucunda elde edilen veriler, Diyarbakır ekotipinin diğer ekotiplere nazaran Cu elementine karşı toleransının yüksek olduğunu göstermiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3).

B. nigra bitkisine ait 3 farklı ekotipin kök, gövde ve yapraklarında biriken Cu miktarı belirlendikten sonra metal birikimi ve toleransı ile ilgili metabolizmanın aydınlatılmasına yönelik moleküler düzeyde çalışmalara geçilmiştir. Düşük konsantrasyonda Cu uygulaması yapılan kök ve yaprak örneklerinde mikroarray tekniği kullanılarak *B. nigra* bitkisinde Cu etkisi altında anlatımı değişen genler araştırılmıştır. Gen bankası taramaları sonucunda, farklı anlatım yapan cDNA'ların ağır metal alınımı ve taşınımında görevli olduğu düşünülen genler tespit edilmiştir (Yüksel ve diğ., 2010). Cu etkisiyle hücre içinde oluşan değişiklikler sonucu baskılanan veya teşvik edilen genlerin çoğunluğunun, bitkinin oksidatif strese yanıtında görev aldığı tespit edilmiştir (Tablo 4.6). Glutasyon metabolizması, elektron taşınımı, kanal aktivitesi gibi metabolik olaylarda yer alan bu genlerin bitkinin kök, gövde ve yapraklarındaki mRNA seviyesinde anlatım farklılıkları detaylı olarak çalışılmıştır. Tablo 4.7'de görüldüğü gibi kantitatif RT-PZR ve mikroarray analizi sonucunda hedef genlerin mRNA düzeyindeki kat değişimlerinin birbiriyle uyumlu olduğu gözlenmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında, sadece CSD1 geninin mikroarray analizinde baskılandığı, kantitatif RT-PZR'da ise teşvik edildiği ancak bu oranın çok düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.29). Mikroarray analizlerin tekrar edilebilirliğinin düşük olması, çok fazla yanlış negatif ve pozitif sonuçlar verebilmesi nedeniyle verilerin yanlış yorumlanması, bu nedenle elde edilen sonuçların yeterince kantitatif olmaması gibi dezavantajları literatürde birçok çalışmada belirtilmiştir (Sassanfar ve Walker, 2003; Yoltaş ve Karaboz, 2010). Bu tez çalışmasında *B. nigra*'nın Cu toleransı gösteren ve göstermeyen 3 farklı ekotipinde mikroarray verilerden seçilen 8 adet genin, farklı Cu konsantrasyonlarındaki anlatım profilleri kök, gövde ve yaprak dokularında incelenerek, metal homeostazisindeki rolleri detaylı bir şekilde irdelenmiştir.

***B. nigra*, CGN06625, CGN06626 ve Diyarbakır Ekotiplerinin Farklı Dokularında Metal Metabolizması ile İlişkili Saptanan Genler**

LOS2 (Low Expression of Osmotically Responsive Genes 2)

LOS2, iki fonksiyonlu enolaz aktivitesine sahiptir. Pozisyonel klonlama yoluyla izole edilmiş bir *Arabidopsis* mutanti olan bu gen, aynı zamanda glikolitik yolda 2-fosfoglisaratı fosfoenolpiruvata dönüştüren bir enolazı kodlamaktadır (Lee ve diğ., 2002). Ayrıca, düşük sıcaklık stresi altında gen ekspresyonunu doğrudan kontrol eden

düzenleyici bir fonksiyona sahip olduğu bildirilmiştir. LOS2'nin bazı şartlar altında aşırı soğuya gösterilen dirençte ve bitkinin soğuğa alışmasında çok önemli bir fonksiyona sahip olduğu bulunmuştur. Arabidopsis'te yapılan bir çalışmada LOS2 geninin kromozom II içerisinde bulunduğu belirlenmiş ve insan enolaz geni (ENO1) ile %72 aminoasit dizi benzerliği olan bir enolazı kodladığı raporlanmıştır (Lee ve diğ., 2002; Kang ve diğ., 2013). Ayrıca, LOS2 geninin diğer bir fonksiyonu olarak bakır bağlama aktivitesi gösterdiği literatürde belirtilmiş ancak genin bakır alınımlı metabolizması ve sinyal iletim yollarındaki özgün rolleri hakkında yeterli bilgiye ulaşılamamıştır. Buna rağmen, Arabidopsis ile birlikte *Thlaspi caerulescens*, *Brassica rapa* ve *Brassica napus* gibi birçok akümülatör bitkide LOS2 geninin varlığı kanıtlanmıştır (Jiang ve diğ., 2007; Tuomainen ve diğ., 2010).

Bu çalışmada *BnLOS2* geninin her üç ekotipin kök kısmında da teşvik edildiği görülmüştür. Bununla birlikte *BnLOS2*'nin anlatımı diğer dokularda farklılık göstermekle beraber hiçbir ekotipin yaprağında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.24). 72 saat Cu uygulaması yapılmış CGN06625 ekotipine ait sonuçlar incelendiğinde, *BnLOS2*'nin anlatımı en yüksek seviyede 50 µM Cu uygulanmış kök ve gövde dokularında gözlenmiştir. CGN06626 ekotipine ait kök dokularında ise, 25 µM Cu uygulamasında *BnLOS2* geninin anlatım seviyesinin kontrol örneğine göre artarken, 50 µM Cu uygulamasında düştüğü tespit edilmiştir. Bu ekotipte *BnLOS2* en çok 50 µM gövdede anlatım göstermiştir (Şekil 4.24B). Düşük konsantrasyonda iki farklı Cu uygulaması yapılan diğer bir ekotip olan Diyarbakır ekotipinde, bu genin anlatımı en çok 50 µM Cu uygulanmış kökte artış gösterirken bunu gövde dokusu izlemiştir. 25 µM Cu uygulamasında ise kontrol örneği ile karşılaştırıldığında genin anlatımında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.24C). *BnLOS2*'nin, bu ekotipin gövde ve yaprak dokularındaki anlatımı, konsantrasyona bağlı bir şekilde Cu miktarı artışına paralel olarak yükselmiş ancak, kök dokusu ile karşılaştırıldığında bu artışın oldukça düşük olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.24C). Literatürde LOS2 geninin değişik stresler altında gösterdiği anlatım farklılıkları çalışılmış ancak Cu stresi ile ilgili detaylı bir çalışma ilk defa *B. nigra*'da bu çalışma ile ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlar, LOS2 geninin metal alınımlı metabolizmasında da fonksiyonel olarak yer alabileceğini desteklemektedir.

PIP2;5 (Plasma Membrane Intrinsic Protein 2;5)

PIP2;5, kanal protein aktivitesi (aquaporin) gösterir. Hücre içi zarlarda yer alan kanal proteinleri, bitki hücrelerinde plazma ve hücre içi zarlar arasında su ve/veya küçük, nötr moleküllerin (üre, borik asit, salisilik asit) veya gazların (amonyak, karbon dioksit) taşınımında görev alırlar (Murata ve diğ., 2000; Maurel ve diğ., 2008). Prokaryotlar ve ökaryotlarda yaygın olarak bulunan kanal proteinleri, MIP (Major Intrinsic Protein) ailesine üye, geniş bir protein ailesidir. Bitkilerde ise 15 yıl sonra keşfedilen bu proteinler son derece hidrofilik olup moleküler ağırlıkları 26-34 kD arasında değişmektedir (Vandeleur ve diğ., 2009). Vitis genomunda 28 adet kanal proteini belirgin olarak yer alırken, Arabidopsis genomunda 35 tane, pirinçte ise 33 tane homologu tanımlanmıştır (Johanson ve diğ., 2001; Sakurai ve diğ., 2005; Fouquet ve diğ., 2008). Kanal proteinleri birçok bitki grubunda 4 alt gruba ayrılmaktadır: Plazma Zarı Temel Proteinleri (PIP; Plasma Membrane Intrinsic Proteins) birinci grup olup PIP1 ve PIP2 olmak üzere flogenetik iki alt gruba ayrılır. İkinci grubu, plazma zarı ve vakuoler zarda (tonoplast) bol bulunan Tonoplast Temel Proteinler (TIP; Tonoplast Intrinsic Proteins) oluşturmaktadır (Quigley ve diğ., 2001). Üçüncü alt grupta kök nodüllerinde bulunan NOD26-benzeri temel proteinler yer almakta, son grup ise küçük temel proteinlerden (SIP; Small Basic Intrinsic Proteins) oluşmaktadır (Johanson ve diğ., 2001; Wallace ve diğ., 2006).

PIP proteinleri incelendiğinde, Arabidopsis'te 13 izoformu tanımlanan bu proteinlerden PIP1 genel olarak *in vitro* ortamda çok az su kanalı aktivitesi gösterir veya hiç göstermez. PIP2'nin ise *Xenopus laevis*'in oositlerinde sentezlendiğinde yüksek su geçirgenliği gösterdiği bulunmuştur (Chaumont ve diğ., 2000). PIP1 ve PIP2 üyelerinin membran içinde veya hedeflenen plazma membranı içinde birbirleriyle etkileşime girebildikleri gösterilmiştir (Fetter ve diğ., 2004; Zelazny ve diğ., 2007). Arabidopsis'te yapılan birçok çalışmada, düşük hava sıcaklığına maruz kalan bitkilerin köklerinde özellikle PIP2;5 izoformunun anlatım düzeyindeki artış rapor edilmiştir (Jang ve diğ., 2004; 2007). Lee ve diğ. (2012), düşük kök sıcaklığının yabani tip Arabidopsis bitkilerinde (*Arabidopsis thaliana*), bitkinin büyümesini ve kök hücrelerinde suyun taşınmasını nasıl etkilediğini karşılaştırmıştır. PIP1;4 ve PIP2;5, bitkilerin köklerinde aşırı miktarda sentezlettirilmiş ve 5 gün boyunca 10 °C sıcaklığa maruz kalan yabani tiplerin kök hücrelerinde suyun taşınmasının bu durumdan nasıl etkilendiği

incelenmiştir. Özellikle, *PIP1;4*'ün aşırı anlatımı nedeniyle bitkilerin kök ve gövde büyüme oranlarında bir azalma tespit edilmiştir. Bununla birlikte, düşük sıcaklıkta, kökte *PIP2;5*'in aşırı anlatımının bitkilerin büyümesi üzerinde herhangi bir negatif etkisi saptanmamıştır. Yine, Jang ve diğ. (2004; 2007), *Arabidopsis*'te çeşitli fizyolojik şartlar altında strese maruz kalan aquaporinlerin nasıl etkilendiğine dair bir çalışma yapmış ve birçok homolog kanal proteininin anlatım düzeyini incelemiştir. Soğuk stresi altında diğer *PIP* genlerinin ifadesi azalırken, sadece *PIP2;5*'in gen ifadesinin arttığı tespit edilmiştir. *Arabidopsis*' te yapılan başka bir çalışmada ABA etkisiyle aquaporin anlatımında artış olduğu saptanmıştır (Hoth ve diğ., 2002). Ancak, bitki soğuk veya kuraklık stresine maruz kaldığında *PIP2;5* aquaporininin anlatımında artış olurken, ABA'ya karşı herhangi bir yanıt vermediği belirlenmiştir (Cevher-Keskin, 2006).

Bu çalışmada *BnPIP2;5* geni, CGN06626 ve Diyarbakır ekotiplerinin çeşitli dokularında anlatım farklılığı göstermiş ancak CGN06625 ekotipinde çalışmamıştır (Şekil 4.25). *BnPIP2;5* geni, Cu uygulaması yapılan CGN06626 ekotipinin özellikle 25 μ M kök dokusunda çok büyük bir oranda teşvik edilirken, gövde ve yaprak dokularında genin ekspresyonunda herhangi bir değişiklik olmamıştır (Şekil 4.26A). Diyarbakır ekotipinden elde edilen kantitatif RT-PZR analiz sonuçları incelendiğinde ise *BnPIP2;5* gen anlatımının, kök ve gövdede arttığı yaprakta ise değişmediği görülmüştür (Şekil 4.26B). *BnPIP2;5* geninin 25 ve 50 μ M kök dokularındaki anlatımında kontrol örneğine kıyasla bir artış gözlenirken, iki Cu uygulaması kendi arasında karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Gövde dokusunda ise en yüksek gen anlatımı 50 μ M uygulamada saptanmıştır.

BnPIP2;5 gibi özgün aquaporin genlerinin anlatım seviyelerinin çeşitli stresler altındaki bitkilerde su taşınmasını kontrol etmede önemli rolünün olduğu ispatlanmasına rağmen, gen anlatımıyla stres uyaranlarının bağlantısındaki moleküler ve hücrel mekanizmalar hala anlaşılamamıştır (Cevher-Keskin, 2006). Elde edilen sonuçlar, kanal proteinlerinin ağır metal alınımlı ve taşınımı metabolizmasında da yer alabileceğini göstermekte ve ilgili metabolizmanın aydınlatılmasına katkıda bulunmaktadır.

MT1a (Metallothionein 1a)

MT1a, Metalloprotein (MT) protein ailesinden olup, bakır iyonuna bağlanma fonksiyonuna sahiptir. Yapılan stres çalışmalarında metal alınımlı ve taşınmasında

yer alabilecek MT1a gibi doğrudan bakır iyonuna veya diğer metal iyonlarına bağlanabilen proteinleri kodlayan genlerin yüksek oranda anlatım yaptığı belirlenmiştir (Domenech ve diğ., 2006; Freisinger, 2008; Hassinen ve diğ., 2011). Bu genlerin bitkilerde sentezi, kök hücrelerinin ağır metallere maruz kalmasıyla uyarılır. Bitki metallothiyoninleri bitkilerle şelat yapabilen bileşikler olup, sistein kalıntılarının tiyol grupları ile ağır metallere bağlanan, nükleusta sentezlenen küçük proteinlerdir (Dabrowska ve diğ., 2013). Prokaryotlarda ve ökaryotlarda tespit edilen MT'ler bitkilerde ilk olarak olgun *Triticum aestivum* tohumlarında bulunmuştur (Lane ve diğ., 1987). Bitki MT'lerinin metal toleransındaki rolü ise ilk olarak maya mutantların komplementasyonu yoluyla doğrulanmıştır (Zhou ve Goldsbrough, 1994). Hem monokotillerde (mısır, buğday, pirinç) hem de dikotillerde (domates, soya fasülyesi, bezelye, pamuk) cDNA klonlama yoluyla belirlenen MT'ler Brassicaceae familyasına ait *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Brassica juncea*, *Thlaspi caerulescens* gibi bir çok türde de tespit edilmiştir (Dabrowska ve diğ., 2013). Cobbett ve Goldsbrough, (2002) *Arabidopsis*'te çeşitli ağır metallerin stresi altında, 4 farklı MT alt grubuna ait aktif olarak 7 MT geninin anlatım yaptığını rapor etmiştir. Zimeri ve diğ., (2005), MT1 ailesinin devre dışı bırakıldığı ve *AtMT1a* ve *AtMT1c* seviyeleri indirgenmiş *A. thaliana* hatlarının, Cd'ye karşı aşırı duyarlı olduklarını ve yabancı tip bitkilere göre yapraklarında daha az As, Cd ve Zn biriktirdiğini göstermiştir. Elde edilen bu sonuç, Tip 1 MT'lerin Cd toleransını sağladığını ve yüksek olasılıkla Zn homeostazisine katılabildiğini desteklemektedir. Yine, *Arabidopsis*'te yapılan başka bir çalışmada, ayrı ayrı MT1a ve MT2b eksikliğinde yüksek konsantrasyonda Cu ile muamele edilen bitkilerde, köklerde %30 daha az bakırın biriktiği belirlenmiştir (Burkhead ve diğ., 2009). Böylece, MT1a fonksiyon kaybına uğramış bitkilerin köklerinde azalmış Cu konsantrasyonu, MT1a'nın köklerde Cu biriktirilmesinde önemli bir fonksiyona sahip olduğunu göstermektedir (Guo ve diğ., 2008). Ayrıca Rauser (1999), *Arabidopsis*'te diğer abiyotik streslerle beraber bitkinin gelişimi sırasında da MT'lerin gen anlatımının arttığını bildirmiştir. Buğday ve pirinçte de benzer sonuçlar elde edilmiş ve MT'lerin Cu ve Cd gibi metal iyonları ve aşırı sıcaklık ile besin eksikliği gibi abiyotik stresler tarafından uyarıldığı rapor edilmiştir (Cobbett ve Goldsbrough, 2002). MT'lerin bitkilerdeki fonksiyonu farklılık gösterebilir. Örneğin, *A. thaliana*'da MT'lerin, Cu homeostazisine katıldığı bilinirken (Cobbett ve Goldsbrough 2002), *S. cerevisiae*'de yapılan çalışmalar MT1 ve MT2 proteinlerinin Cd toleransı

ilişkili olduğunu işaret etmektedir (Zhou ve Goldsbrough 1994). Son yıllarda özellikle moleküler biyoloji alanındaki gelişmelerle yapılan transgenik bitkilerle ilgili çalışmalarda, MT genlerinin bu bitkilere aktarılmasıyla ağır metalleri biriktirme yeteneklerinin arttığı görülmüştür (Daghan, 2004; Pavlikova ve diğ., 2004; Cherian ve Oliveira, 2005).

Bu çalışmada *BnMT1a* geni 25 ve 50 μ M Cu uygulamaları yapılan CGN06625 ekotipinde, her iki uygulamada da yaprak dokusunda teşvik edilmiştir. Kontrol örnekleriyle karşılaştırıldığında yaprakta genin anlatım seviyesi, en çok 50 μ M Cu uygulamasında olacak şekilde doğrusal bir artış göstermiştir (Şekil 4.27A). Bununla beraber kök ve gövde dokularında ise *BnMT1a* geninin anlatım düzeyinde gözle görülür bir fark yoktur. CGN06626 ekotipine ait elde edilen sonuçlar, CGN06625 ekotipiyle karşılaştırıldığında oldukça benzerlik göstermektedir. Genin anlatımı benzer bir şekilde en çok yaprak dokusunda teşvik edilmiş olup gövdede gen anlatım seviyesinde bir farklılık oluşmamıştır. Bu ekotipte CGN06625'ten farklı olarak 25 μ M Cu uygulamasında *BnMT1a*, kontrol örneği ile karşılaştırıldığında en yüksek seviyede anlatım gösterirken 50 μ M Cu uygulamasında anlatım düzeyinde düşüş tespit edilmiştir (Şekil 4.27B). Ayrıca, CGN06626'nın kök kısmında *BnMT1a* geninin kontrol örneğine göre baskılandığı görülmüştür (Şekil 4.27B). Diyarbakır ekotipinden elde edilen *BnMT1a* geniyle ilgili sonuçlar değerlendirildiğinde, genin CGN06626 ile benzer bir şekilde kökte baskılandığı belirlenmiştir. Ancak, gövdede gen anlatımında bir farklılık oluşmazken 50 μ M Cu uygulanmış yaprakta ise az miktarda bir artışın olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.27C).

Hiperakümülatör bitkilerde yapılan çalışmalarda MT'lerin yüksek ifade seviyeleri, muhtemelen bu proteinlerin ağır metal homeostazisini veya toleransını sağlayarak, bu bitkilerin metal adaptasyonuna katkıda bulunabildiği görüşünü ortaya çıkarmıştır (Hassinen ve diğ., 2011). Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar da, *BnMT1a*'nın literatüre uygun olarak Cu elementiyle ilişkili olduğunu ve Cu stresine karşı bitkinin verdiği yanıtın düzenlenmesinde önemli bir rol üstlendiğini desteklemektedir.

CAT3 (Catalase 3)

CAT3, bitki hücrelerini oksidatif stres sırasında oluşan reaktif oksijen çeşitlerine (ROS) karşı korumada görev alır. Katalazın, hidrojen peroksidin indirgenmesini katalizleyerek

oksidatif stresin önlenmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Weckx ve Clijsters, 1996). CAT3, hidrojeni ortadan kaldırarak antioksidan savunmada görev alan bir enzimdir. Temel ROS-tutuculardan biri olan bu enzim, fotorespirasyon sırasında glikolatın glioksitalata dönüşümünü takiben, peroksizomda serbest kalan H_2O_2 'yi, H_2O ve O_2 'ye metabolize eder (Igamberdiev ve Lea, 2002). CAT, lipid depolayan dokulardaki glioksizomlarda bulunan yağ asitlerinin β -oksidasyonları esnasında da H_2O_2 'yi ayrıştırabilir. Bitkilerde CAT geninin birçok izoenzimi farklı dokularda tanımlanmış ve bunların bitkinin çevresel strese yanıtında etkili olabilecekleri çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Willekens ve diğ., 1994; Scandalios ve diğ., 2000; Bagnoli ve diğ., 2004; Ann ve diğ., 2011; Lin ve Aarts, 2012). Ayrıca, bu izoenzimlerin ışık ve CO_2 gibi çevresel etkenlere karşı yanıtlarının farklı olduğu belirlenmiş ve bulundukları dokuya bağlı olarak geçici bir süre için gen anlatımlarında artış olabileceği gösterilmiştir (Skadsen ve diğ., 1995; Azevedo ve diğ., 1998). CAT izoenzimleri yüksek yapılı bitkilerde ayrıntılı olarak çalışılmış ve genetik olarak birbirinden farklı 3 CAT izoenzimi mısır bitkisinde karakterize edilmiştir (Scandalios ve diğ., 2000). Fakat bunlardan yalnızca iki tanesi arpa ve şeftalide tanımlanmıştır (Skadsen ve diğ., 1995; Bagnoli ve diğ., 2004). Frugoli ve diğ., (1996) *A. thaliana*'nın çiçeklenme sırasında yüksek anlatım yapan CAT çoklu gen ailesine ait 3 gen içerdiğini saptamıştır. Ancak, sadece *cat2* ve *cat3* genlerinin yaprakta yüksek anlatım yaptığını ve sirkadyen ritmin kontrolü altında olduğunu tespit etmişlerdir. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise *A. thaliana*'da 6 farklı izoenzim daha Michael ve McClung (2002) tarafından tanımlanmıştır. Ayrıca, CAT2 aktivitesinin düşürüldüğü transgenik *A. thaliana* soyları elde edilmiş ve gen anlatımında yüksek ışıktan kaynaklanan değişiklikler ayrıntılarıyla çalışılmıştır (Vandenabeele ve diğ., 2004).

Bitkilerde, CAT faaliyetinin ağır metal stresine bağlı olarak önemli ölçüde değişiklik gösterdiği bulunmuştur. Örneğin, Cd varlığında CAT aktivitesinin *Phaseolus vulgaris*, *Lemna minör* ve biberde azalma gösterdiği raporlanmıştır (Somashekaraiah ve diğ., 1992; Mohan ve Hosetti., 1997; León ve diğ., 2002; Gratão ve diğ., 2005). Ayrıca, Fidalgo ve arkadaşları (2004) yüksek konsantrasyonda NaCl'ye maruz kalan patates bitkilerinde CAT faaliyetinin aynı şekilde azaldığını tespit etmişlerdir. Buna karşılık, *Agropyron repens*, *Raphanus sativus* ve şeker kamışında bitki, Cd'ye maruz kaldığında CAT aktivitesinde önemli oranda artış olduğu belirlenmiştir (Brej, 1998; Vitória ve diğ.,

2001; Fornazier ve diğ., 2002a). Ancak, soyada yapılan çalışmada ise katalaz enzimi değişmeden kalmıştır (Ferreira ve diğ., 2002). Al elementine karşı CAT aktivitesinin yanıtının bitki türlerine ve analiz edilen dokuya bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir. Ayrıca, Ni ve Cu elementine maruz kalan bitkilerde CAT aktivitesinde artış olduğu bulunmuştur (Brej, 1998; Jouili ve El Ferjani, 2003). Devi ve Prasad (1998) yaptıkları bir çalışmada, bakır uygulaması sırasında katalaz ve peroksidaz aktivitelerinin arttığını göstererek bakır artışının hidrojen peroksit (H_2O_2) üretimini arttırabileceği görüşünü savunmuşlardır.

Bu çalışmada *BnCAT3* geninin, toleranslı olmayan ekotipler arasında farklı dokularda anlatım yaptığı gösterilmiştir. Cu stresi altında, CGN06625 ekotipinde en yüksek gen anlatımı 25 μM Cu uygulanan gövde dokusunda saptanmış ve bunu sırasıyla yaprak ve kök dokuları izlemiştir (Şekil 4.28A). CGN06626 ekotipinde ise *BnCAT3* geni en yüksek seviyede 50 μM Cu uygulanan kökte anlatım yapmıştır. Gövde dokusunda köke göre daha düşük bir gen anlatımı tespit edilmiş ancak yaprakta anlamlı bir anlatım farkı saptanmamıştır (Şekil 4.28B). Toleranslı ekotip olan Diyarbakır'da da kök ve gövdede *BnCAT3* geni teşvik edilirken, yaprakta gen anlatımında bir farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 4.28C). Kökte belirlenen gen anlatımının, kontrol örneğiyle karşılaştırıldığında her iki Cu uygulamasında da eşit miktarda anlatım gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca, bu ekotipte en yüksek *BnCAT3* anlatımının 50 μM Cu uygulanan gövde dokusunda olduğu gözlenmiştir. Elde edilen tüm bulgular, *B. nigra*'da Cu stresi altında *CAT3* geninin anlatımının arttırılması sağlanarak, bitkinin Cu elementine karşı toleransının yükseltilebileceği sonucunu desteklemektedir.

CSD1 (Copper/Zinc Superoxide Dismutase 1)

CSD1, süperoksit dizmutaz (SOD) aktivitesi göstermektedir. Bitkilerde süperoksit dizmutazlar, süperoksit radikallerini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çevirdikleri için oksidatif stres toleransında önemli bir role sahiptir (Xing ve diğ., 2013). Ağır metaller gibi birçok abiyotik koşullar bitkilerde reaktif oksijen çeşitlerini (ROS) üreterek oksidatif strese yol açabilir (Apel ve Hirt, 2004). Metabolik süreçler sonucunda meydana getirilen ROS'un hücrenin işlevlerini yok edebildiği tespit edilmiş ve yapılan çalışmalarda birçok enzimin ROS kullanmak üzere evrimleştiği rapor edilmiştir (Xing ve diğ., 2013). SOD'lar, süperoksit radikallerine karşı ilk savunma mekanizmasını,

süperoksidi daha az reaktif bir ROS olan moleküler oksijen ve H_2O_2 'ye, dönüştürerek oluşturmaktadır (Fridovich, 1995). SOD enzimleri, içerdikleri metal kofaktörlerine göre demir (FeSOD), mangan (MnSOD) ve bakır/çinko (Cu/ZnSOD) olmak üzere üç gruba ayrılır (Mittler, 2002; Sunkar ve diğ., 2006). Mantarlar ve hayvanlar CuZnSOD ve MnSOD gruplarını içerirken bazı bakteri ve bitkilerin her üç grubu da içerdiği rapor edilmiştir (Kliebenstein ve diğ., 1998). Örneğin, Arabidopsis genomunda yedi adet SOD izozimi bulunmakta ve bunlar metal kofaktörleri ve hücrealtı lokalizasyonlarına göre kodlanmaktadır: CSD1, CSD2 ve CSD3 sırasıyla sitoplazma, kloroplast ve peroksizom yerleşimli Cu/ZnSOD proteinleri, FSD2 ve FSD3 FeSOD proteinleri, MSD1 ise mitokondriyal MnSOD proteinidir (Xing ve diğ., 2013).

Bir bitki mikro besini olan Cu, bitkilerde fotosentez, oksidatif yanıt ve diğer fizyolojik süreçler için mutlak gerekli olan bir elementtir. Bu nedenle de, tolerans çalışmalarında Cu elementi en çok çalışılan metallere biridir (Linve diğ., 2003; Puigve diğ., 2007; Burkhead ve diğ., 2009). Yapılan çalışmalarda mikroRNA'ların (miRNA) bitkinin Cu stresine karşı savunmasında anahtar bir rolü olduğuna dair birçok kanıt bulunmuştur (Sunkar ve diğ., 2006; Gielen ve diğ., 2012). Cu, ortamda sınırlayıcı olduğunda bir mikro RNA olan miR398'in düzeyi giderek yükselir ve bu da CSD1 ve CSD2 için Cu dağılımını azaltır. Bu nedenle de Cu, bitkide sadece temel süreçler için kullanılabilir hale gelir (Khraiwesh ve diğ., 2012). Yüksek yapılı bitkilerde Cu/ZnSOD'ların FeSOD'larla yer değiştirdiği belirlenmiştir. Brassicaceae familyasına ait birçok bitkide mikroRNA'ların Cu stresine ilişkisi tanımlanmıştır. Arabidopsis'te yapılan bir çalışmada, miR398'in Cu homeostazının korunmasında önemli bir düzenleyici olduğu bulunmuştur. miR398'in birbiriyle yakın ilişkili olan CSD1 ve CSD2'yi hedeflediği ve bu genlerle doğrudan bağlantılı olduğu belirlenmiştir. Böylece, ağır metal gibi oksidatif stres koşullarına karşı mikroRNA'ların ve dolayısıyla CSD1 ve CSD2 gibi Cu/ZnSOD'ların bitkinin yanıtında fonksiyonel olarak yer aldığı düşünülmektedir (Jones-Rhoades ve Bartel, 2004; Sunkar ve diğ., 2006; Yu ve diğ., 2011).

Yapılan bu çalışmada, *BnCSD1* geni, her üç ekotipte de kontrol örneklerine kıyasla bitkinin farklı dokularında anlatım göstermiştir (Şekil 4.29). CGN06625 ekotipinde *BnCSD1*, en çok 25 μ M gövde dokusunda teşvik edilmiştir. Kontrolle karşılaştırıldığında 50 μ M gövde örneğinde de gen anlatımında artış belirlenmiş ancak

25 μM gövdeye göre anlatımın daha düşük olduğu görülmüştür. 25 ve 50 μM kök dokularında, *BnCSD1*'de kontrol örneğine göre gözlenen artış incelendiğinde her iki uygulama arasında çok anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Yaprakta ise yine 25 μM Cu uygulamasında genin anlatımında belirlenen artış, 50 μM yaprağa göre daha fazladır (Şekil 4.29A). Diğer bir ekotip olan CGN06626'ya ait elde edilen sonuçların CGN06625 ekotipiyle oldukça benzer olduğu görülmüştür. CGN06626 ekotipinde her bir dokuda *BnCSD1* gen anlatımı en çok 25 μM örneklerinde teşvik edilmiştir. Bu ekotipte CGN06625'ten farklı olarak *BnCSD1*, kökte 25 μM Cu uygulamasında kontrol örneği ile karşılaştırıldığında en yüksek seviyede anlatım gösterirken 50 μM 'da anlatım düzeyinin düştüğü gözlenmiştir. Gövde ve yaprak dokusunda da *BnCSD1*'in 25 μM 'da arttığı 50 μM Cu uygulamasında ise azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.29B). Diyarbakır ekotipinden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, diğer ekotiplerden farklı olarak tüm dokularda *BnCSD1* gen anlatımının 50 μM Cu uygulanan örneklerde en yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.29C). Kök ve gövde dokularında yaprağa göre oluşan gen anlatımı daha fazladır. Literatürde CSD1 geninin Cu stresi altında gösterdiği anlatım farklılıkları Arabidopsis, *Brassica rapa* ve *Brassica napus* gibi Brassicaceae familyasına ait birçok bitkide çalışılmış ancak *Brassica nigra*'da ilk defa bu çalışma ile ortaya konmuştur. CSD1 genini de içeren SOD'ları kodlayan çeşitli birçok genin ifadesinin, çevresel streslere yanıt olarak arttığı bilinmesine rağmen ilgili mekanizma hala tam olarak tanımlanamamıştır. Elde edilen bu sonuçlar literatüre uygun bir şekilde CSD1 geninin metal alınımlı metabolizmasında fonksiyonel olarak yer alabileceğini desteklemektedir. Aynı zamanda mekanizmanın aydınlatılmasına da katkı sağlayacaktır.

GAPC1 (Phosphorylating Glyceraldehyde-3-P Dehydrogenase C Subunit 1)

GAPC1, Gliseraldehid-3-Fosfat dehidrogenaz (GAPDH) aktivitesi gösterir. GAPDH'lar bütün organizmalarda bulunan ve hücrelerin karbon kullanımında merkezi bir rol oynayan enzimlerdir. Yüksek yapılı bitkiler bu genin 4 izoformunu içermektedir (1) GAPC, 1,3-bis-fosfoglisarat için gliseraldehid-3-P dönüşümünü katalizleyen, yüksek oranda korunmuş sitozolik bir enzimdir. GAPC1 ve GAPC2 şeklinde farklı izoformlara sahip olan bu genin hücrede farklı mekanizmalarda rol oynadığı belirlenmiştir. NAD-özgü bir GAPDH olan bu izoenzimin glikolizdeki görevine ek olarak hücre fonksiyonlarının düzenlenmesiyle ilgili olduğu da düşünülmektedir (Rius ve diğ., 2008). (2) NP-GAPDH, NADP-bağımlı fosforilasyon (fosforlama) yapmayan, sitozolik bir

GAPDH izoenzimidir. Bu izoenzim, 3-fosfoglisarat (3PGA) için Ga3P oksidasyonunu katalize eder (Valverde ve diğ., 2005). (3) GAPA/B, bir fosfatlayıcı olup kloroplastlarda fotosentetik CO₂ fiksasyonuna katılan NADP-özgü GAPDH'dır (Cerff ve Chambers, 1979). (4) GAPCp, yeşil olmayan plastidler içerisinde glikolitik enerji üretiminde yer alır (Petersen ve diğ., 2003).

Alg sistemlerinde GAPDH'nin gen yapısı, evrimi ve fonksiyonel özellikleri hakkında yapılan çok fazla çalışma olmasına rağmen yüksek yapılı bitkilerde daha çok GAPDH'nin karakterizasyonu üzerine çalışmalar yapılmıştır (Wolosiuk ve Buchanan, 1978; Koksharova ve diğ., 1998; Valverde ve diğ., 2005; Fermani ve diğ., 2007). Ancak, son yıllarda daha detaylı olarak GAPC1 gibi sitozolik GAPDH'lerin yapı-işlev ilişkileri ve kinetik özelliklerini içeren çalışmalar gerçekleştirilmiştir. GAPC1'in fotosentetik dokularda önemini yaygın olarak bildiren birçok çalışma olmasına rağmen, heterotrofik dokulardaki işlevini anlatan çalışma daha az sayıdadır (Rius ve diğ., 2008). Fakat literatürde ağır metallerle ilişkisine dair herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Chuong ve diğ. (2004) GAPC-1'in bitkileri de içeren birçok organizmada hücre iskeletiyle bağlantılı bir protein olduğunu rapor etmiştir. Buna ek olarak *Arabidopsis thaliana*'da yapılan bir çalışmada, bu izoenzimin mitokondri ve hücre iskeletinin her ikisinde de diğer glikolitik enzimler ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Holtgrawe ve diğ., 2005). Böylece, glikolitik proteinlerin mitokondriyal enerji metabolizmasında ve mitokondriyal fonksiyonların düzenlenmesinde önemli olduğu ileri sürülmektedir. Ayrıca, sitozolde glikolizdeki karbon akışında birlikte görev alan GAPC ve NP-GAPDH'nin, bitkinin çevresel streslere karşı yanıtında önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir (Giege ve diğ., 2003). Son yapılan çalışmalarda ise, GAPC'ın bitkide ROS sinyal iletiminde düzenleyici bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (Hancock ve diğ., 2005, Bedhomme ve diğ., 2012). Rius ve diğ., (2008) *Arabidopsis thaliana*'da GAPC eksikliğinin bitkideki olumsuz etkilerini değerlendirmek için 2 mutant hatla çalışmış ve GAPC eksikliğinde bitkideki ROS seviyelerini ölçmüştür. Her iki hattın da elde edilen ölçüm sonuçları, yabani tip bitkilerle karşılaştırıldığında ROS birikiminde artış olduğunu göstermiştir. Elde edilen tüm bu sonuçlar GAPC geninin oksidatif stres metabolizmasındaki önemini ve bu genin eksikliğinde bitkideki oksidatif stresin arttığını ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada, *BnGAPC1* geninin kontrol örneğiyle karşılaştırıldığında toleranslı ve toleranslı olmayan ekotipler arasında farklı anlatım yaptığı belirlenmiştir (Şekil 4.30). Özellikle, toleranslı ekotip olan Diyarbakır'da Cu uygulamasının *BnGAPC1* gen anlatımını etkilemediği gözlenmiştir (Şekil 4.30C). Cu stresi altında toleranslı olmayan ekotiplerde gövde ve yaprak dokularında oluşan gen anlatımında, anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Şekil 4.30). Her iki ekotipte de yalnızca 25 μ M kök dokusunda *BnGAPC1* yüksek oranda teşvik edilmiş, 50 μ M kökte ise bu gen baskılanmıştır (Şekil 4.30A,B). Diyarbakır ekotipinde ise kök, gövde ve yaprak dokularında kontrol örnekleriyle karşılaştırıldığında aynı düzeyde gen anlatımı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.30C). *BnGAPC1*'in toleranslı olan ve olmayan ekotiplerdeki farklı anlatım profili, bu genin hassas ekotiplerin kök dokusunda yüksek oranda anlatım yapmasının, ağır metal tolerans mekanizmasında kritik bir rolü olabileceğini göstermektedir. İleride protein düzeyinde yapılacak çalışmalarla, bu genin mekanizmadaki işlevi detaylı olarak aydınlatılmış olacaktır.

RBOH1 (Respiratory Burst Oxidase Homologue D)

RBOH1, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz (NADPH) fonksiyonuna sahiptir. RBOH'lar sinyal iletim molekülleri olarak işlev gören ROS'ları üreterek bitkilerde çok sayıda önemli mekanizmaların düzenlenmesinde görev alır. ROS'larla ilgili ilk yapılan çalışmalar her ne kadar onların toksik potansiyelleri üzerine odaklanmış olsa da son yapılan çalışmalarla özellikle ROS'ların sinyal transdüksiyon molekülleri olarak önemlerine odaklanılmıştır (Suzuki ve diğ., 2011). 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 (Torres ve Dangl, 2005). RBOH'lar, 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. Memelilerde de bulunan NADPH oksidase geni bitkilerde ilk olarak pirinçte, memelilerin *gp91phox* geniyle homolog *OsrbohA* geni olarak tanımlanmıştır (Groom ve diğ., 1996). Daha sonraki çalışmalarda ise, Arabidopsis, domates, tütün ve patates gibi diğer bitki türlerinde de farklı *RBOH* genleri tanımlanmıştır (Torres ve Dangl, 2005). Bitki RBOH'ları, Arabidopsis'te tanımlanmış 10 adet *AtRboh* geni ile bir multigen

ailisini oluşturmaktadır (Mittler ve diğ., 2004; Torres ve Dangl, 2005). Son yıllarda yapılan çeşitli çalışmalar RBOH'ların abiyotik stresin de içinde bulunduğu çok sayıda, farklı sinyal yollarında rol aldığını göstermiştir. RBOH-bağımlı ROS'un, çoğunlukla aşırı duyarlı tepkiye bağlı olarak patojenlere karşı bitkinin savunmasında temel rol aldığı belirlenmiştir (Torres ve diğ., 2002; Suzuki ve diğ., 2011). Aynı zamanda, bitki NADPH oksidazları, *Medicago*'da fonksiyonel simbiyotik nodüllerin oluşumu gibi, diğer abiyotik bitki etkileşimlerinde de aracı rol üstlenmektedir (Marino ve diğ., 2011). Ayrıca, RBOH'lar bitkilerde sıcaklık, kuraklık, soğuk, yüksek ışık yoğunluğu, tuzluluk, ağır metal ve yaralanma gibi birçok abiyotik streslere karşı bitkinin yanıtında oluşan sinyalleri düzenlemekle beraber biyotik strese de rol aldığı gösterilmiştir (Jiao ve diğ., 2013; Kadota ve diğ., 2014). Özellikle, *AtrbohD*'nin, en çok gen anlatımı yapılan *Arabidopsis* NADPH oksidaz olduğu ve patojen yanıtında, stoma kapanmasında ve abiyotik strese yanıtta sistemik sinyal iletimi gibi birçok sürece aracılık ettiği bildirilmiştir (Torres ve diğ., 2002; Kwak ve diğ., 2003; Miller ve diğ., 2009). Ayrıca, metal stresi ile ilgili olarak Cuypers ve arkadaşları (2011) *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.

Bu çalışmada *BnRBOHD1* geninin her üç ekotipte de farklı dokularda anlatım yaptığı saptanmıştır. CGN06626 ekotipinde sadece yaprakta *BnRBOHD1*'in gen anlatımı artarken CGN06625 ekotipinde kök, gövde ve yaprak dokusunun her üçünde de gen anlatımında anlamlı bir artış belirlenmiştir (Şekil 4.31). CGN06625'te en yüksek gen anlatımı 25 μ M Cu uygulanan kök dokusunda saptanmış, 50 μ M'da ise genin baskılandığı gözlenmiştir. Ancak, bu sonuç kontrol kök örneğiyle karşılaştırıldığında *BnRBOHD1* anlatımında artış sözkonusudur. Gövde ve yaprak dokusunda ise, 25 ve 50 μ M uygulamaları kontrol örneği ile karşılaştırıldığında gen anlatımında Cu uygulamasına paralel bir artış saptanmıştır (Şekil 4.31A). Her iki doku da gen anlatımı bakımından incelendiğinde gövdede anlatımın yaprağa oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Diyarbakır ekotipinden elde edilen sonuçlar incelendiğinde ise, en yüksek gen anlatımı 25 μ M gövdede belirlenmiştir. Bunu sırasıyla, yaprak ve kök dokusu izlemiştir. Bütün dokularda 25 μ M Cu uygulamasında *BnRBOHD1* geni teşvik

edilirken, 50 μM 'da baskılanmıştır. *Arabidopsis thaliana*'da yapılan çalışmalarda ağır metal stresi altında RBOH geninin farklı izoformlarının gen anlatım seviyelerinin arttığı rapor edilmiştir (Cuypers ve diğ., 2011). Bu tez çalışmasında Cu etkisi altında çeşitli dokularda RBOHD izoformunun anlatımının yükselmesi bu sonuçları destekler niteliktedir. Ayrıca, bu genin Cu etkisiyle konsantrasyona bağlı olarak anlatımında meydana gelen farklılık, moleküler düzeyde *Brassica nigra*'da ilk defa gösterilmiştir.

GSKB6 (Glutamine Synthase Clone KB6)

Glutamine synthetase 1;3 (GLN1;3) olarak da bilinen GSKB6, glutamine synthetase (GS) enziminin bir izoformudur. GS, fitokelatin ailesinden olup amonyum ve glutamattan glutaminin sentezini katalizleyen, azot asimilasyonunun önemli bir enzimidir (Cobbett, 2000; Rea ve diğ., 2004). Ayrıca, fotorespirasyon, peptidoglikan biyosentezi, fenilpropanoid metabolizması, baklagillerde N_2 fiksasyonu ve ağır metal detoksifikasyonu gibi bitkilerde diğer metabolik süreçlerde yer alan anahtar bir enzimdir (Hirel ve Lea, 2011; Betti ve diğ., 2012, Dragičević ve diğ., 2014). Yüksek yapılı bitkilerde sitozolde yer alan GS1 ve kloroplastlarda bulunan GS2 olmak üzere 2 tip GS izoformu tanımlanmıştır (Mathis ve diğ., 2000; Nogueira ve diğ., 2005). GS1 izoformları bütün bitki dokularında bulunmakta ve ana görevi kökte amonyum asimilasyonu olmakla beraber yaprak senesensi sırasında azotun taşınımında da görev almaktadır (Bernard ve Habash, 2009). *Arabidopsis* genomunda GLN1;1, GLN1;2, GLN1;3, GLN1;4 ve GLN1;5 olmak üzere GS1'in 5 ayrı izoformu tanımlanmıştır (Ishiyama ve diğ., 2004). Enzim aktivitesi yüksek konsantrasyonda glutamatla baskılanan GLN1;3 izoformunun, bitkilerdeki karakterizasyonu ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Ancak, literatürde GS'lerin ağır metal metabolizmasındaki rolleri ayrıntılı olarak birçok çalışmada irdelenmesine rağmen GLN1;3 izoformunun bu süreçlerde aldığı görev veya ağır metal stresiyle ilişkisi üzerine bir çalışma yapılmamıştır (Rauser, 1995; Iglesia-Turino ve diğ., 2006; Pal ve Rai, 2010; Mendoza-Cozatl ve diğ., 2008).

Yapılan bu çalışmada, *BnGSKB6* geni üç ekotipte de kontrol örnekleriyle kıyaslandığında bitkinin farklı dokularında anlatım göstermiştir (Şekil 4.32). 72 saat süreyle Cu uygulanan CGN06625, CGN06626 ve Diyarbakır ekotiplerinde kök dokusundan benzer sonuçlar alınmış ve en yüksek gen anlatımının 25 μM Cu uygulamasında olduğu gözlenmiştir. Toleranslı olmayan ekotipler karşılaştırıldığında,

her iki ekotipte de *BnGSKB6* geni anlatım göstermesine rağmen CGN06626 ekotipinde belirlenen anlatım seviyesi çok düşüktür (Şekil 4.32B). CGN06625 ekotipinde ise özellikle, 25 μ M kökte gen anlatımının en yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.32A). Gövdede 50 μ M Cu uygulamasında gen anlatımı artarken, yaprak dokusunda köke benzer şekilde 25 μ M'da anlamlı bir artış tespit edilmiştir. CGN06626 ekotipinde en yüksek gen anlatımı gövdede 25 μ M Cu uygulamasında gözlenirken bunu sırayla 25 μ M kök ve yaprak dokuları izlemiştir. Tüm dokularda 50 μ M Cu uygulamasında *BnGSKB6* geninin anlatımında düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.32B). Toleranslı olmayan ekotipler arasında, *BnGSKB6* gen anlatımında bulunan fark sadece mRNA seviyesinde incelenmiştir ancak protein aktivitesindeki değişiklikler çalışılmamıştır. İleride protein seviyesinde yapılacak detaylı çalışmalarla, CGN06625 ve CGN06626 ekotipleri arasındaki farklılığın nedeni ortaya konabilir. Toleransı yüksek olan Diyarbakır ekotipinin kök dokusunda ise kontrol örneğine göre *BnGSKB6*'nın anlatımında gözlenen artış oldukça yüksektir. Gövde dokusunda, kökle benzer bir şekilde gen anlatımı en çok 25 μ M Cu uygulamasında artış göstermiş ve gerek kökte gerekse gövdede 50 μ M'da anlatım düşmüştür. Yapraktan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde kontrol ve uygulamalar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.32C). *BnGSKB6* geninin Cu uygulaması etkisinde *B. nigra*'nın farklı dokularında meydana gelen anlatım farklılıkları ilk defa bu çalışma ile ortaya konmuştur.

Özetle bu çalışmada, farklı konsantrasyonlarda Cu elementinin uygulandığı *B. nigra*'nın Cu stresine farklı tolerans gösteren 3 ayrı ekotipin (CGN06625, CGN06626 ve Diyarbakır) kök, gövde ve yaprak dokularında ağır metal metabolizmasında yer aldığı düşünülen bazı genler ayrıntılı olarak incelenmiştir. Yapılan fizyolojik çalışmalar sonucunda Diyarbakır ekotipinin Cu elementine karşı toleransının diğer ekotiplerden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Sonraki aşamada moleküler çalışmalara geçilmiş ve öncelikle, mikroarray tekniği ile Cu stresi altında kök dokusunda farklı anlatım yapan bütün genler taranmıştır. Mikroarray verilerinin doğrulanması amacıyla, bu genlerden ağır metal akümüasyonu ve toleransı ile ilişkili olduğu düşünülenler seçilerek, anlatım seviyeleri ayrıntılı bir şekilde daha güvenilir bir metot olan kantitatif RT-PZR yöntemiyle belirlenmiştir. Elde edilen bu genlerin RNA düzeyindeki anlatımlarına dair moleküler düzeyde yapılan ayrıntılı çalışmaları, ağır metal akümüasyonu ve

toleransıyla ilişkili moleküler mekanizmada henüz aydınlatılmamış noktaların açıklanmasına katkıda bulunacaktır. Böylece, fitoremediyasyon çalışmaları bu özgün sonuçlarla bir adım öteye götürülerek, fitoremediyasyon kapasitesi yüksek transgenik bitkilerin geliştirilmesiyle ilgili yapılan çalışmalara kaynak olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- Atlas, R.M. and Philp, J., 2005, Bioremediation. Applied microbial solutions for real-world environmental cleanup, ASM Press.
- Allen, S. E., 1989, Chemical Analysis of Ecological Materials. Blackwell Scientific Publications, Oxford., 368.
- Alonso, J. M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S. and Ecker, J. R., 1999, *EIN2*, A Bifunctional Transducer of Ethylene and Stress Responses in Arabidopsis, *Science*, 284(5423), 2148-2152.
- Alscher, R.G. and Cumming, J.R., 1990, Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms, *Wiley-Liss, Inc.*
- Alva, A.K., Huang, B., Prakash, O., Paramasivam, S., 1999, Effects of copper rates and soil pH on growth and nutrient uptake by citrus seedlings, *J. Plant Nutr.*, 22, 1687–1699.
- Alwine, J.C., Kemp, D.J., and Stark, G.R., 1977, Method for Detection of Specific RNAs in Agarose Gels by Transfer to Diazobenzyloxymethyl Paper and Hybridization with DNA Probes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74:5350-5354.
- Andrés-Colás, N., Perea-García, A., Puig, S. and Peñarrubia, L., 2010, Deregulated Copper Transport Affects *Arabidopsis* Development Especially in the Absence of Environmental Cycles, *Plant physiology*, 153(1), 170-184.
- Anjum, N.A., Umar, S., Ahmad, A., Iqbal, M., 2008, Responses of Components of Antioxidant System in Moongbean Genotypes to Cadmium Stress, *Commun. Soil Sci. Plant Analy.*, 39, 2469–2483.
- Ann, C., Karen, S., Jos, R., Kelly, O., Els, K., Tony, R., Nele, H., Nathalie, V., Suzy, V.S., Frank, V.B., Yves, G., Jan, C., Jacob, V., 2011, The Cellular Redox State As A Modulator in Cadmium and Copper Responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings, *Journal of plant physiology*, 168(4), 309-316.
- Apel, K. and Hirt, H., 2004, Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55:373–399.
- Arazi, T., Sunkar, R., Kaplan, B., Fromm, H., 1999, A Tobacco Plasma Membrane Calmodulin-Binding Transporter Confers Ni²⁺ Tolerance and Pb²⁺ Hypersensitivity in Transgenic Plants, *Plant J.*, 20:171–182.

- Assche, F.V. and Clijsters, H., 1990, Effects of Metals on Enzyme Activity in Plants, *Plant Cell & Environment*, 13(3), 195-206.
- Assunção, A.G.L., Martins, D., Folter, S., Vooijs, R., Schat, H. And Aarts, M.G.M., 2001, Elevated Expression of Metal Transporter Genes in Three Accessions of the Metal Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *Plant, Cell and Environment*, 24, 217-226.
- Athar, R. and Ahmad, M., 2002, Heavy Metal Toxicity: Effect on Plant Growth and Metal Uptake by Wheat, and on Free Living Azotobacter, *Water, Air, and Soil Pollution*, 138(1-4), 165-180.
- ATSDR, 2013, Agency for Toxic Substance and Disease Registry, http://www.atsdr.cdc.gov/spl/resources/ATSDR_2013_SPL_Detailed_Data_Table.pdf.
- Axelsen, K.B., Palmgren, M.G., 2001, Inventory of The Superfamily of P-type Ion Pumps in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 126, 696±706.
- Azevedo, R.A., Alas, R.M., Smith, R.J., Lea, P.J., 1998, Response of Antioxidant Enzymes to Transfer From Elevated Carbon Dioxide to Air and Ozone Fumigation, in Leaves and Roots of Wild-Type and A Catalase-Deficient Mutant of Barley, *Physiologia Plantarum*, 104, 280–292.
- Bagnoli, F., Danti, S., Magherini, V., Cozza, R., Innocenti, A.M., Racchi, M.L., 2004, Molecular Cloning, Characterization and Expression of Two Catalase Genes from Peach, *Functional Plant Biology*, 31, 349–357.
- Baker, A.J.M., and Brooks, R.R., 1989, Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metal elements - a review of their distribution, ecology and phytochemistry, *Biorecovery*. 1:81-126.
- Baker, A.J.M. and Walker, P.L., 1990, Ecophysiology of Metal Uptake by Tolerant Plants: Heavy Metal Tolerance in Plants, In: *Shaw AJ (ed.) Evolutionary Aspects*, CRC Press, Boca Raton.
- Baker, A.J.M., Mcgrath, S.P., Reeves, R.D. and Smith, J.A.C., 2000, Metal Hyperaccumulator Plants: A Review of the Ecology and Physiology of A Biological Resource for Phytoremediation of Metal Polluted Soils. In: Terry, N. ve Banuelos, G., (eds.), *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Lewis, Boca, pp. 85-107.
- Baker, A., 1981, Accumulators and Excluders - Strategies in The Response of Plants to Heavy-Metals, *Journal of Plant Nutrition*, v. 3, p. 643-654.
- Baker, K.H. and Herson, D.S., 1994, Bioremediation. McGraw-Hill, Inc.

- Banks, M.K., Kulakow, P., Schwab, A.P., Chen, Z. and Rathbone, K., 2003, Degradation of Crude Oil in the Rhizosphere of *Sorghum bicolor*, *International Journal of Phytoremediation*, 5, 225-234.
- Banuelos, G.S., 2000, Phytoextraction of Se from Soils Irrigated with Selenium-Laden Effluent, *Plant and Soil*, 224, 251-258.
- Başaran, E., Aras, S. and Cansaran-Duman, D., 2010, Genomik, Proteomik, Metabolomik Kavramlarına Genel Bakış ve Uygulama Alanları, *Türk Hijyen ve Deneyisel Biyoloji Dergisi*, 67 (2): 85-96.
- Baxter, I., Tchieu, J., Sussman, M.R., Boutry, M., Palmgren, M.G., Gribskov, M., Harper, J.F. and Axelsen, K.B., 2003, Genomic Comparison of P-type ATPase Ion Pumps in Arabidopsis and Rice, *Plant Physiology*, 132, 618-628.
- Becher, M., Talke, I.N., Krall, L., Kramer, U., 2004, Cross-Species Microarray Transcript Profiling Reveals High Constitutive Expression of Metal Homeostasis Genes in Shoots of The Zinc Hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*, *Plant J.*, 37:251–68.
- Belouchi, A., Cellier, M., Kwan, T., Saini, H.S., Leroux, G. and Gros, P., 1995, The Macrophage-Specific Membrane Protein *Nramp* Controlling Natural Resistance to Infections in Mice has Homologues Expressed in The Root System of Plants, *Plant molecular biology*, 29(6), 1181-1196.
- Belouchi, A., Kwan, T. and Gros, P., 1997, Cloning and Characterization of the *OsNramp* Family From *Oryza sativa*, A New Family of Membrane Proteins Possibly Implicated in The Transport Of Metal Ions, *Plant molecular biology*, 33(6), 1085-1092.
- Benavides, M.P., Gallego, S.M. and Tomaro, M.L., 2005, Cadmium Toxicity in Plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 21-34.
- Bennett, L.E., Burkhead, J.L., Hale, K.L., Terry, N., Pilon, M., Pilon-Smits, E.A.H., 2003, Analysis of Transgenic Indian Mustard Plants for Phytoremediation of Metal Contaminated, Mine Tailings, *J Environ Qual*, 32:432– 40.
- Bert, V., Bonnin, I., Saumitou-Laprade, P., De Laguerie, P., Petit, D., 2002, Do *Arabidopsis halleri* from Nonmetallicolous Populations Accumulate Zinc and Cadmium More Effectively Than Those from Metallicolous Populations? *New Phytologist*, 155: 47-57.
- Bert, V., Meerts, P., Saumitou-Laprade, P., Salis, P., Gruber, W., Verbruggen, N., 2003, Genetic Basis of Cd Tolerance and Hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*, *Plant Soil*, 249:9–18.
- Bert, V., Girondelot, B., Quatannens, V. and Laboudigue, A., 2005, A Phytostabilisation of A Metal Polluted Dredged Sediment Deposit, Mesocosm Experiment and Field Trial, In: Uhlmann, O., Annokée, G.J. ve Arendt, F. (eds.),

- Proceedings of the 9th International FZK/TNO Conference on Soil–Water Systems, Remediation Concepts and Technologies, Bordeaux, pp. 1544-1550.
- Bernard, S.M., Habash, D.Z., 2009, The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling, *New. Phytol.* 182 (3), 608-620.
- Bernard, P.S. and Wittwer, C.T., 2000, Homogeneous Amplification and Variant Detection by Fluorescent Hybridization Probes, *Clin. Chem.*, 46:147-148.
- Bernard, C., Roosens, N., Czernic, P., Lebrun, M., Verbruggen, N., 2004, A Novel CPx-ATPase from The Cadmium Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *FEBS Lett.*, 569:140–48.
- Bharagava, R.N., Chandra, R. and Rai, V., 2008, Phytoextraction of Trace Elements and Physiological Changes in Indian Mustard Plants (< i>*Brassica nigra*</i> L.) Grown in Post Methanated Distillery Effluent (PMDE) Irrigated Soil. *Bioresource technology*, 99(17), 8316-8324.
- Bizily, S.P., Rugb, C.L., Summers, A.O., and Meagher, R.B., 1999, Phytoremediation of Methylmercury Pollution: Mer B expression in *Arabidopsis thaliana* Confers Resistance to Organomercurials, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 96, 6808-6813.
- Boularbah, A., Schwartz, C., Bitton, G., Aboudrar, W., Ouhammou, A. and Morel, J., 2006, Heavy Metal Contamination from Mining Sites in South Morocco: 2. Assessment of Metal Accumulation and Toxicity in Plants, *Chemosphere*, v. 63, p. 811-817.
- Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T. and Pfaffl, M.W., 2005, Quantitative Real-Time RT-PCR– A Perspective, *Journal of molecular endocrinology*, 34(3), 597-601.
- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy, S. and Vivanco, J.M., 2006, The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 233-266.
- Balcı, D., 2009. *İnsan Göbek Kordonu Stroma Dokusunun Kök Hücreleri Transplantasyonları Amacıyla Kullanılmak Üzere Kontrollü Dondurulması Koşullarının Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü.
- Baldwin, D.R., Marshall, WJ., 1999, Heavy Metal Poisoning and Its Laboratory Investigation (Review Article), *Annals of Clinical Biochemistry*, 36: 267-300.
- Betti, M., García-Calderón, M., Pérez-Delgado, C.M., Credali, A., Estivill, G., Galván, F., Vega, J.M., Márquez, A.J., 2012, Glutamine synthetase in legumes: recent advances in enzyme structure and functional genomics, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (7), 7994-8024.
- Blaudez, D., Kohler, A., Martin, F., Sanders, D. and Chalot, M., 2003, Poplar Metal Tolerance Protein 1 Confers Zinc Tolerance and is An Oligomeric Vacuolar Zinc

- Transporter with An Essential Leucine Zipper Motif, *Plant Cell*, 15, pp. 2911-2928, ISSN 1040-4651.
- Blumwald, E., Poole, R.J., 1986, Kinetics of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ Antiport in Isolated Tonoplast Vesicles Form Storage Tissue of *Beta vulgaris* L. *Plant Physiology*, 80, 727–731.
- Bovet, L., Eggmann, T., Meylan-Bettex, M., Polier, J., Kammer, P., Marin, E., Feller, U., Martinoia, E., 2003, Transcript Levels of *AtMRPs* After Cadmium Treatment: Induction of *AtMRP3*, *Plant, Cell and Environment*, 26, 371±381.
- Brej, T., 1998, Heavy Metal Tolerance in *Agropyron repens* (L.) P. Bauv. Populations from the Legnica Copper Smelter Area, Lower Silesia, *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 67, 325–333.
- Brooks, R., 1994, Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals. In: *Plants and The Chemical Elements*, Ed Farago ME, ed. VCH., Weinheim, Germany, pp 87-105.
- Brooks, R.R., 1998, Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals: Their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, *Mineral Exploration and Phytomining*, CAB international, 384.
- Brown, M., Paulsen, I., Skurray, R., 1999, The Multidrug Efflux Protein *NorM* is A Prototype of A New Family of Transporters, *Mol Microbiol*, 31: 393–395.
- Burkhead, J. L., Gogolin Reynolds, KA, Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M., and Pilon, M., 2009, Copper homeostasis, *New Phytologist*, 182(4), 799-816.
- Bustin, S.A., 2000, Absolute Quantification of mRNA Using Realtime Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays, *J Mol Endocrinol*, 25:169-93.
- Bustin, S.A., 2002, Quantification of mRNA Using Real-Time Reverse Transcription PCR (RT-PCR): trends and problems, *Journal of Molecular Endocrinology*, 29, 23–39.
- Bustin, S.A., 2005, Real-Time PCR, *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*, DOI: 10.1081/E-EDGP 120020684, 1117-1125.
- Bustin, S.A. and Mueller, R., 2005, Review: Real-Time Reverse Transcription PCR (Q RT-PCR) and its Potential Use in Clinical Diagnosis, *Clinical Science*, 109, 365-379.
- Cacherill, F.R., Uhl, J.R., 2001, Applications and Challenges of Real-Time PCR for The Clinical Microbiology Laboratory. In: Reischl U, Wittwer C, Cockerill FR, eds. Rapid Cycle Real-Time PCR, *Methods and Applications*. 1st ed. Germany: Heidelberg, p.11.
- Cailliatte, R., Schikora, A., Briat, J.F., Mari, S. and Curie, C., 2010, High-Affinity Manganese Uptake by The Metal Transporter *NRAMP1* is Essential for

- Arabidopsis Growth in Low Manganese Conditions, *The Plant Cell Online*, 22(3), 904-917.
- Callahan, D.L., Baker, A.J.M., Kolev, S.D. and Wedd, A.G., 2006, Metal Ion Ligands in Hyperaccumulating Plants, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11, 2-12.
- Canonne-Hergaux, F., Gruenheid, S., Govoni, G. and Gros, P., 1999, The *Nramp1* Protein and its Role in Resistance to Infection and Macrophage Function, *Proceedings of the Association of American Physicians*, 111(4), 283-289.
- Cellier, M., Prive, G., Belouchi, A., Kwan, T., Rodrigues, V., Chia, W., and Gros, P., 1995, *Nramp* Defines A Family of Membrane Proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(22), 10089-10093.
- Cerff, R., Chambers, S.E., 1979, Subunit Structure of Higher Plant Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenases (EC 1.2.1.12 and EC 1.2.1.13), *J. Biol Chem* 254: 6094–6098.
- Cevher-Keskin, B., 2006, *Buğdayda (Triticum aestivum L.) Absisik Asitle İlişkili Gen Anlatımı*, Tez (PhD), İstanbul Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik.
- Chaney, R.L., 1983, Plant Uptake of Inorganic Waste, Land Treatment of Hazardous Wastep, In J.E. Parr *et al.* (ed.) *Noyes Data Corp.*, Park Ridge, IL., 50–76.
- Chandna, R., Augustine, R. and Bisht, N.C., 2012, Evaluation of Candidate Reference Genes for Gene Expression Normalization in *Brassica juncea* Using Real Time Quantitative RT-PCR, *Plos one*. Volume 7, Issue 5, e36918.
- Chaplin, B.E., Rasmussen, R.P., Bernard, P.S., Wittwer, C.T., 1999, LightCyclerTM Hybridization Probes The Most Direct Way to Monitor PCR Amplification and Mutation Detection, *Biochemica*, 1:5-8.
- Chaumont, F., Barrieu, F., Jung, R., Chrispeels, M.J., 2000, Plasma Membrane Intrinsic Proteins From Maize Cluster in Two Sequence Subgroups with Differential Aquaporin Activity, *Plant Physiol.*, 122: 1025–1034.
- Chen, Y.C., Banks, M.K., Schwab, A.P., 2003, Pyrene Degradation in The Rhizosphere of Tall Fescue (*Festuca arundinacea*) and Switchgrass (*Panicum virgatum* L.), *Environ Sci Technol*, 37:5778-5782.
- Cherian, S., Oliveira, M.M., 2005, Transgenic Plants in Phytoremediation: Recent Advances and New Possibilities, *Environmental Science Technology*, 39: 9377-90.
- Cheong, Y. H., Moon, B.C., Kim, J.K., Kim, C.Y., Kim, M.C., Kim, I.H., ... & Cho, M.J., 2003, *BWMK1*, A Rice Mitogen-Activated Protein Kinase, Locates in The Nucleus and Mediates Pathogenesis-Related Gene Expression by Activation of A Transcription Factor, *Plant Physiology*, 132(4), 1961-1972.

- Cherian, S. and Oliveira, M.M., 2005, Transgenic Plants in Phytoremediation: Recent Advances and New Possibilities, *Environmental Science & Technology*, Vol. 39, No. 24, 9377-9390.
- Chiang, H.C., Lo, J.C. and Yeh, K.C., 2006, Genes associated with heavy metal tolerance and accumulation in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*: a genomic survey with cDNA microarray, *Environmental science & technology*, 40(21), 6792-6798.
- Chien, A., Edgar, D.B., Trela, J.M., 1976, Deoxyribonucleic Acid Polymerase From The Extreme Thermophile *Thermus aquaticus*, *J. Bact.*, 127 (3): 1550–7. PMC 232952. PMID 8432.
- Cho, U.H, Park, J.O., 2000, Mercury-Induced Oxidative Stress in Tomato Seedlings, *Plant Sci.*, 156:1–9.
- Choi, J.K., Holtzer, S., Chacko, S.A., Lin, Z.X., Hoffman, R.K., Holtzer, H., 1991, Phorbol Esters Selectively and Reversibly Inhibit A Subset of Myofibrillar Genes Responsible for The Ongoing Differentiation Program of Chick Skeletal Myotubes, *Mol Cell Biol.*, 11, 4473–4482.
- Chu, Y., Corey, D.R., 2012, RNA Sequencing: Platform Selection, Experimental Design and Data Interpretation, *Nucleic Acid Ther* 22 (4): 271–4. doi:10.1089/nat.2012.0367. PMC 3426205. PMID 22830413.
- Chuong, S.D., Good, A.G., Taylor, G.J, Freeman, M.C., Moorhead, G.B., Muench, D.G., 2004, Large-Scale Identification of Tubulin-Binding Proteins Provides Insight on Subcellular Trafficking, Metabolic Channeling, and Signaling in Plant Cells. *Mol Cell Proteomics* 3: 970–983.
- Clemens, S., 2001, Molecular Mechanisms of Plant Metal Tolerance and Homeostasis, *Planta*, 212(4), 475-486.
- Clemens, S., Kim, E.J., Neumann, D. and Schroeder, J.L., 1999, Tolerance to Toxic Metals by A Gene Family of Phytochelatin Synthases from Plants and Yeast, *EMBO Journal*, 18, 3325-3333.
- Cobbett, C.S., 2000, Phytochelatin Biosynthesis and Function in Heavy-Metal Detoxification, *Curr Opin Plant Biol*, 3:211–216.
- Cobbett, C. and Goldsbrough, P., 2002, Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis, *Annual review of plant biology*, 53(1), 159-182.
- Courbot, M., Willems, G., Motte, P., Arvidsson, S., Roosens, N., Saumitou-Laprade, P. and Verbruggen, N., 2007, A Major Quantitative Trait Locus for Cadmium Tolerance in *Arabidopsis halleri* Colocalizes with *HMA4*, A Gene Encoding A Heavy Metal ATPase, *Plant Physiology*, 144, 1052-1065.

- Crouzet, J., Trombik, T., Frayssé, A.S. and Boutry, M., 2006, Organization and Function of the Plant Pleiotropic Drug Resistance ABC Transporter Family. *FEBS letters*, 580(4), 1123-1130.
- Curie, C., Alonso, J., Le Jean, M., Ecker, J. and Briat, J., 2000, Involvement of *NRAMP1* from *Arabidopsis thaliana* in Iron Transport, *Biochem. J*, 347, 749-755.
- Curie, C., Panaviene, Z., Loulergue, C., Dellaporta, S.L., Briat, J.F., Walker, E.L., 2001, Maize Yellow Stripe1 Encodes A Membrane Protein Directly Involved in Fe (III) Uptake, *Nature*, 409:346–349.
- Cuypers, A., Karen, S., Jos, R., Kelly, O., Els, K., Tony, R., ... & Jaco, V., 2011, The Cellular Redox State As A Modulator in Cadmium and Copper Responses in *Arabidopsis thaliana* Seedlings, *Journal of plant physiology*, 168(4), 309-316.
- Cuypers, A., Smeets, K. and Vangronsveld, J., 2009, Heavy Metal Stress in Plants, *Plant stress biology: From genomics to systems biology*, 161-178.
- Dabrowska, G., Mierek-Adamska, A. and Goc, A., 2013, Characterisation of '*Brassica napus*' L. Metallothionein Genes ('*BnMTs*') Expression in Organs and During Seed Germination, *Australian Journal of Crop Science*, 7(9), 1324.
- Daghan, H., 2004, *Phytoextraction of Heavy Metal from Contaminated Soils Using Genetically Modified Plants*, Thesis (PhD), Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften Fakultät der RWTH-Aachen.
- Daniel, Nw., 1991, Biostatistics A Foundation for Analysis in The Health Sciences. 5th ed. *New York: John Wiley and Sons*.
- Dalcorso, G., Manara, A. and Furini, A., 2013, An Overview of Heavy Metal Challenge in Plants: From Roots to Shoots, *Metallomics*, 5, 1117-1132.
- Dalcorso, G., Farinati, S. and Furini, A., 2010, Regulatory Networks of Cadmium Stress in Plants, *Plant signaling & behavior*, 5(6), 663.
- Dalvi, A.A., Bhalerao, S.A., 2013, Response of Plants Towards Heavy Metal Toxicity: An Overview of Avoidance, Tolerance and Uptake Mechanism, *Annals of Plant Sciences*, 02 (09), 362-368.
- Delhaize, E., Kataoka, T., Hebb, D.M., White, R.G., Ryan, R.R., 2003, Genes Encoding Proteins of The Cation Diffusion Facilitator Family that Confer Manganese Tolerance, *The Plant Cell*, 15, 1131±1142.
- Desbrosses-Fonrouge, A.G., Voigt, K., Schroder, A., Arrivault, S., Thomine, S. ve Kramer, U., 2005, *Arabidopsis thaliana MTP1* is A Zn Transporter in the Vacuolar Membrane which Mediates Zn Detoxification and Drives Leaf Zn Accumulation, *FEBS Letters*, 579, 4165-4174.

- Devi, R.S. and Prasad, M.N.V., 1998, Copper Toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), A Free Floating Macrophyte: Response of Antioxidant Enzymes and Antioxidants, *Plant Sci.*, 138, 157-165.
- Dhankher, O.P., Li, Y., Rosen, B.P., Shi, J. and Harden, P.N., 2002, Engineering Tolerance and Hyperaccumulation of Arsenic in Plants by Combining Arsenate Reductase and Gamma-Glutamylcysteine Synthetase Expression, *Nature Biotechnology*, 20, 1094-1095.
- Di Bacciod., Galla, G., Bracci, T., Andreucci, A., Barcaccia, G., Tognetti, R., Sebastiani, L. and Moshelion, M., 2011, Transcriptome Analyses of *Populus × euramericana* Clone I-214 Leaves Exposed to Excess Zinc, *Tree Physiol.*, 31, 1293-1308.
- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M.J. and Dveksler, G.S., 1993, General Concepts for PCR Primer Design, *PCR Methods and Applications*, 530-537.
- Dietz, K.J., Baier, M. and Krämer, U., 1999, Free Radicals and Reactive Oxygen Species as Mediators of Heavy Metal Toxicity in Plants. In Heavy Metal Stress in Plants, *Springer Berlin Heidelberg*, pp. 73-97.
- Domènech, J., Mir, G., Huguet, G., Capdevila, M., Molinas, M. and Atrian, S., 2006, Plant Metallothionein Domains: Functional Insight into Physiological Metal Binding and Protein Folding, *Biochimie*, 88(6), 583-593.
- Doucette, W.J., Bugbee, B.G., Smith, S.C., Pajak, C.J., Ginn, C.S., 2003, In McCutcheon, S.C. and Schnoor, J.L., (Eds.), *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, Hoboken, NJ: Wiley-Interscience, Inc., 561-588.
- Dräger, D.B., Desbrosses-Fonrouge, A.G., Krach, C., Chardonnens, A.N., Meyer, R.C., Saumitou-Laprade, P. and Krämer, U., 2004, Two Genes Encoding *Arabidopsis halleri* MTP1 Metal Transport Proteins Co-segregate with Zinc Tolerance and Account for High MTP1 Transcript Levels, *The Plant Journal*, 39, 425-439.
- Dragičević, M., Todorović, S., Bogdanović, M., Filipović, B., Mišić, D., Simonović, A., 2014, Knockout mutants as a tool to identify the subunit composition of *Arabidopsis* glutamine synthetase isoforms, *Plant Physiol Biochem.*, 79, 1-9.
- Duffus, J.H., 2002, Heavy Metals, A Meaningless Term, *Pure and Applied Chemistry*, 74 (5), 793-807.
- Durrett, T.P., Gassmann, W. and Rogers, E.E., 2007, The FRD3-Mediated Efflux of Citrate into the Root Vasculature is Necessary for Efficient Iron Translocation, *Plant Physiology*, 144, 197-205.
- Dushenkov, V., Kumar, P.B.A.N., Motto, H. and Raskin, I., 1995, Rhizofiltration: The Use of Plants to Remove Heavy Metals from Aqueous Streams, *Environmental Science and Technology*, 29, 1239-1245.

- Eide, D., Broderius, M., Fett, J., Guerinot, M.L., 1996, A Novel Iron-Regulated Metal Transporter from Plants Identified by Functional Expression In Yeast, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:5624–5628.
- Eide, D.J., 1998, The Molecular Biology of Metal Ion Transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *Annual Review of Nutrition*, 18, 441±469.
- Ellis, D.R., Sors, T.G., Brunk, D.G., Albrecht, C., Orser, C., Lahner, B., Wood, K.V., Harris, H.H., Pickering, I.J. and Salt, D.E., 2004, Production of Semethylselenocysteine in Transgenic Plants Expressing Selenocysteine Methyltransferase, *BMC Plant Biology*, 4, 1-11.
- EPA (Environmental Protection Agency), 2000. Introduction to Phytoremediation, EPA/600/R-99/107, National Risk Management Research Laboratory Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency Cincinnati, Ohio 45268, USA.
- Erakhrumen, A. and Agbontalor, A., 2007, Review Phytoremediation: An Environmentally Sound Technology for Pollution Prevention, Control and Remediation in Developing Countries, *Educational Research and Review*. Vol. 2, no. 7, pp. 151–156.
- Ernst, W.H.O., 2006, Evolution of Metal Tolerance in Higher Plants. *Forest Snow and Landscape Research*, 80, 251-274.
- Ettinger, W.F., Clear, A.M., Fanning, K.J., Peck, M.L., 1999, Identification of A $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ Antiport in The Plant Chloroplast Thylakoid Membrane. *Plant Physiology*, 119, 1379–1386.
- Evans, K.M., Gatehouse, J.A., Lindsay, W.P., Shi, J., Tommey, A.M., Robinson, N.J., 1992, Expression of the pea metallothionein like gene Ps MTA in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and Analysis of Trace Metal Ion Accumulation: Implications of Ps MTA Function, *Plant Mol Biol*, 20:1019– 28.
- Fermani, S., Sparla, F., Falini, G., Martelli, P.L., Casadio, R., Pupillo, P., Ripamonti, A., Trost, P., 2007, Molecular Mechanism of Thioredoxin Regulation in Photosynthetic A2B2-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 11109–11114.
- Fernandes, J.C. and Henriques, F.S., 1991, Biochemical, Physiological and Structural Effects of Excess Copper in Plants. *The Botanical Review*, 57, 246-273 pp.
- Ferreira, R.R., Fornazier, R.F., Vitória, A.P., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2002, Changes in Antioxidant Enzyme Activities in Soybean Under Cadmium Stress, *Journal of Plant Nutrition*, 25, 327–342.
- Fetter, K., Van Wilder, V., Moshelion, M., Chaumont, F., 2004, Interactions Between Plasma Membrane Aquaporins Modulate their Water Channel Activity, *Plant Cell*, 16: 215–228.

- Fidalgo, F., Santos, A., Santos, I., Salema, R., 2004, Effects of Long-Term Salt Stress on Antioxidant Defence Systems, Leaf Water Relations and Chloroplast Ultrastructure of Potato Plants, *Annals of Applied Biology*, 145, 185–192.
- Fifield, F.W. and Haines, P.J., 2000, Environmental Analytical Chemistry. Wiley-Blackwell, 512.
- Finnegan, M.C., Goepel, J.R., Hancock, B.W., Goyns, M.H., 1993, Investigation of the Expression of Housekeeping Genes in Non-Hodgkin's Lymphoma, *Leuk. Lymphoma*, 10, 387–393.
- Fornazier, R.F., Ferreira, R.R., Pereira, G.J.G., Molina, S.M.G., Smith, R.J., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2002b, Cadmium Stress in Sugar Cane Callus Cultures: Effect on Antioxidant Enzymes, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71, 125–131.
- Francesconi, K., Visoottiviseth, P., Sridokchan, W., Goessler, W., 2002, Arsenic Species in An Arsenic Hyperaccumulating Fern, *Pityrogramma calomelanos*: A Potential Phytoremediator of Arsenic-Contaminated Soils, *Sci. Total Environ.*, 284(1):27–35.
- Freeman, W.M., Walker, S.J., Vrana, K.E., 1999, Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential, *BioTechniques*, 26 (1): 112–22, 124–5.
- Freisinger, E., 2008, Plant MTs—Long Neglected Members of The Metallothionein Superfamily, *Dalton Transactions*, (47), 6663–6675.
- Fridovich, I., 1995, Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, 64: 97–112.
- Frugoli, J.A., Zhong, H.H., Nuccio Ml, Mccourt, P., Mcpeek, M.A., Thomas, T.L., Mcclung, C.R., 1996, Catalase is Encoded by A Multigene Family in *Arabidopsis thaliana* (L.), *Plant Physiology*, 112, 327–336.
- Gaither, L.A., and Eide, D.J., 2001, Zinc Transporters and Their Regulation, *Biometals*, 14, 251–270.
- Gendre, D., Czernic, P., Conejero, G., Pianelli, K., Briat, J.F., Lebrun, M., Mari, S., 2007, *TcYSL3* A Member of The YSL Gene Family from The Hyper-Accumulator *Thlaspi caerulescens* Encodes A Nicotianamine Ni/Fe transporter, *The Plant Journal*, 49, 1–15.
- Ghosh, M. Ve Singh, S.P., 2005, A Review on Phytoremediation of Heavy Metals and Utilization of its Byproducts, *Applied Ecology and Environmental Research*, 3, 1–18.
- Gielen, H., Remans, T., Vangronsveld, J. and Cuypers, A., 2012, MicroRNAs in Metal Stress: Specific Roles or Secondary Responses? *International Journal Of Molecular Sciences*, 13(12), 15826–15847.

- Giglio, S., Monis, P.T and Saint, C.P., 2003, Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR, *Nucleic Acids Research*, 31 (22), 1-5.
- Gill, S.S. and Tuteja, N., 2010, Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Giritch, A., Ganai, M., Stephan, U.W., Baumlein, H., 1998, Structure, Expression and Chromosomal Localization of The Metallothionein-Like Gene Family of Tomato, *Plant Mol Biol*, 37:701–714.
- Godsy, E.M., Warren, E., Paganelli, V.V., 2003, The Role of Microbial Reductive Dechlorination of TCE at A Phytoremediation Site, *Int J Phytoremed*, 5:73-88.
- Holtgrawe, D., Scholz, A., Altmann, B., Scheibe, R., 2005, Cytoskeleton-associated, Carbohydrate-Metabolizing Enzymes in Maize Identified by Yeast Two-Hybrid Screening, *Physiol Plant*, 125: 141–156.
- Goyer, R. A., 1991, Toxic Effects of Metals. In: Caserett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons (Eds. Amdur M. O., Doull, J., Klaassen, C. D.) Pergamon Press, New York, 1032.
- Guerinot, M.L., 2000, The ZIP Family of Metal Transporters, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1), 190-198.
- Guo, J., Dai, X., Xu, W. and Ma, M., 2008, Overexpressing GSH1 and AsPCS1 Simultaneously Increases the Tolerance and Accumulation of Cadmium and Arsenic in *Arabidopsis thaliana*, *Chemosphere*, 72, 1020-1026.
- Gupta, M., Sharma, P., Sarin, N.B., Sinha, A.K., 2009, Differential Response of Arsenic Stress in Two Varieties of *Brassica juncea* L., *Chemosphere*, 74, 1201-1208.
- Günel, T., 2007, Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR, Türkiye Klinikleri, *J Med Sci*, 27:763-767.
- Gratão, P.L., Polle, A., Lea, P.J. and Azevedo, R.A., 2005, Making the Life of Heavy Metal-Stressed Plants A Little Easier, *Functional Plant Biology*, 32(6), 481-494.
- Greger, M., 1999, Metal Availability and Bioconcentration in Plants, In Heavy Metal Stress in Plants, *Springer Berlin Heidelberg*, pp. 1-27.
- Grispen, V.M.J., Irtelli, B., Hakvoort, H.W.J., Vooijs, R., Blik, T., Ten Bookum, W.M., Verkleij, J.A.C. and Schat, H., 2009, Expression of the Arabidopsis Metallothionein 2b Enhances Arsenite Sensitivity and Root to Shoot Translocation in Tobacco, *Environmental and experimental botany*, 66(1), 69-73.

- Groom, Q.J., Torres, M.A., Fordham-Skelton, A.P., Hammond-Kosack, K.E., Robinson, N.J. and Jones, J.D., 1996, *rbohA*, A Rice Homologue of the Mammalian *gp91phox* Respiratory Burst Oxidase Gene, *The Plant Journal*, 10(3), 515-522.
- Haag-Kerwer, A., Schäfer, H.J., Heiss, S., Walter, C., Rausch, T., 1999, Cadmium Exposure in *Brassica juncea* Causes A Decline in Transpiration Rate and Leaf Expansion without Effect on Photosynthesis, *J. Exp. Bot.*, 50, 1827–1835.
- Hagemeyer, J., 1999, Ecophysiology of Plant Growth under Heavy Metal Stress, In Heavy Metal Stress in Plants, *Springer Berlin Heidelberg*, pp. 157-181.
- Hamer, D.H., 1986, Metallothionein, *The Annual Review of Biochemistry*, 55: 913-951.
- Hancock, J.T., Henson, D., Nyirenda, M., Desikan, R., Harrison, J., Lewis, M., Hughes, J., Neill, S.J., 2005, Proteomic Identification of Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase as An Inhibitory Target of Hydrogen Peroxide in Arabidopsis. *Plant Physiol Biochem*, 43: 828–835.
- Hanikenne, M., Merchant, S.S. and Hamel, P., 2009, Transition Metal Nutrition: A Balance Between Deficiency and Toxicity, *The Chlamydomonas Sourcebook: Organellar and Metabolic Processes*, 2, 333.
- Hall, J.L., 2002, Cellular Mechanisms for Heavy Metal Detoxification and Tolerance, *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 1-11.
- Hall, J. L. and Williams, L.E. 2003, Transition Metal Transporters in Plants, *Journal of Experimental Botany*, 54(393), 2601-2613.
- Harald, Z., 2009, Product survey: Real-time PCR kits, TaqMan or SYBR Green? *Lab. Times*, 47-52.
- Hartley-Whitaker, J., Ainsworth, G., Meharg, A.A., 2001, Copper- and Arsenate-Induced Oxidative Stress in *Holcus lanatus* L. Clones with Differential Sensitivity, *Plant Cell and Environ*, 24:713–722.
- Harrison, R.M. and Chirgawi, M.B., 1989, The Assessment of Air and Soil as Contributors of Some Trace-Metals to Vegetable Plants I. Use of A Filtered Air Growth Cabinet, *Sci. Total Environ.* , 83, 13-34.
- Harrison, P.M., Arosio, P., 1996, The Ferritins: Molecular Properties, Iron Storage Function and Cellular Regulation, *Biochim Biophys Acta*, 275:161–203.
- Hassinen, V., 2009, Search for Metal-Responsive Genes in Plants, Thesis (PhD), *Kuopio University*.
- Hassinen, V.H., Tervahauta, A.I., Schat, H. and Kärenlampi, S.O., 2011, Plant Metallothioneins–Metal Chelators with ROS Scavenging Activity? *Plant Biology*, 13(2), 225-232.

- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M. and Ahmad, A., 2010, Effect of Exogenous Salicylic Acid under Changing Environment: A Review, *Environmental and Experimental Botany*, 68(1), 14-25.
- Haydon, M.J., Cobbett, C.S., 2007, Transporters of Ligands for Essential Metal Ions in Plants, *New Phytol*, 174:499–506.
- Haydon, M.J., Kawachi, M., Wirtz, M., Stefan, H., Hell, R., Kramer, U., 2012, Vacuolar Nicotianamine has Critical and Distinct Roles Under Iron Deficiency and for Zinc Sequestration in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 24:724–737.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. and Williams, P.M., 1996, Real Time Quantitative PCR. *Genome research*, 6(10), 986-994.
- Heller, M.J., 2002, DNA Microarray Technology: Devices, Systems, and Applications, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 4:129–153.
- Higuchi, T., Hisada, H., Morishima, S., Okada, Y., Maeshima, M., 1998, Molecular cloning, water channel activity and tissue specific expression of two isoforms of radish vacuolar aquaporin, *Plant Cell Physiol.*, 39 (9), 905-913.
- Hirel, B. and Lea, P.J., 2011, The molecular genetics of nitrogen use efficiency in crops. In: Hawkesford, M.J., Barraclough, P. (Eds.), *The Molecular and Physiological Basis of Nutrient Use Efficiency in Crops*, Wiley-Blackwell, pp. 139-164.
- Hirschi, K., 2001, Vacuolar H^+/Ca^{2+} Transport: Who's Directing the Traffic? *Trends in Plant Science*, 6, 100±104.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H., 1991, Detection of Specific Polymerase Chain Reaction Product By Utilizing The 5'----3' Exonuclease Activity of *Thermus aquaticus* DNA Polymerase, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 15;88(16):7276-80.
- Hossain, M.A., Piyatida, P., Da Silva, J.A.T. and 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*.
- Hoth, S., Morgante, M., Sanchez, J.P., Hanafey, M.K., Tingey, S.V., Chua, N.H., 2002, Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant, *J. Cell Sci.*, 115, 4891–4900.
- Hou, W., Chen, X., Song, G., Wang, Q., Chang, C.C., 2007, Effects of (Copper and Cadmium on Heavy Metal Polluted Waterbody Restoration by Duckweed *Lemna minor*), *Plant Physiology and Biochemistry*, Volume 45, Issue 1, 62–69.

- Howden, R., Goldsbrough, P.B., Andersen, C.R., Cobbett C.S., 1995, Cadmium-Sensitive, CAD1, Mutants of *Arabidopsis thaliana* are Phytochelatin Deficient, *Plant Physiol*, 107:1059–1066.
- Hu, P., Brodie, E.L., Suzuki, Y., McAdams, H.H. and Andersen, G.L., 2005, Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*, *Journal of bacteriology*, 187(24), 8437-8449.
- Hudspeth, R.L., Hobbs, S.L., Anderson, D.M., Rajasekaran, K. And Grula, J.W., 1996, Characterization and Expression of Metallothionein-Like Genes in Cotton, *Plant Molecular Biology*, 31, 701-705.
- Igamberdiev, A.U., Lea, P.J., 2002, The Role Of Peroxisomes in The Integration of Metabolism and Evolutionary Diversity of Photosynthetic Organism. *Phytochemistry* 60, 651–674.
- Iglesia-Turino, S., Febrero, A., Jauregui, O., Caldelas, C., Araus, J.L. and Bort, J., 2006. Detection and Quantification of Unbound Phytochelatin 2 in Plant Extracts of *Brassica napus* Grown with Different Levels of Mercury, *Plant Physiology*, 142, 742-749.
- Ingle, R.A., Mugford, S.T., Rees, J.D., Campbell, M.M., Smith, J.A.C., 2005, Constitutively High Expression of the Histidine Biosynthetic Pathway Contributes to Nickel Tolerance in Hyperaccumulator Plants, *Plant Cell*, 17:2089–2106.
- Inoue, K.I., 2013, Heavy Metal Toxicity, *J Clinic Toxicol S*, 3, 2161-0495.
- Ishiyama, K., Inoue, E., Watanabe-Takahashi, A., Obara, M., Yamaya, T., & Takahashi, H., 2004, Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase in *Arabidopsis*, *Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 16598-16605.
- Jang, J.Y., Kim, D.G., Kim, Y.O., Kim, J.S., Kang, H., 2004, An Expression Analysis of A Gene Family Encoding Plasma Membrane Aquaporins in Response to Abiotic Stresses in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol Biol*, 54: 713–725.
- Jang, J.Y., Lee, S.H., Rhee, J.Y., Chung, G.C., Ahn, S.J., Kang, H., 2007 Transgenic *Arabidopsis* and Tobacco Plants Overexpressing An Aquaporin Respond Differently to Various Abiotic Stresses, *Plant Mol Biol*, 64: 621–632.
- Jean, M.L., Schikora, A., Mari, S., Briat, J.F., Curie, C., 2005, A Loss-Of-function Mutation in *AtYSL1* Reveals its Role in Iron and Nicotianamine Seed Loading, *The Plant Journal*, 44, 769–782.
- Ji, G.D., Yang, Y.S., Zhou, Q., Sun, T., Ni, J.R., 2004, Phytodegradation of Extra Heavy Oil-Based Drill Cuttings Using Mature Reed Wetland: An *in situ* Pilot Study, *Environment international, Elsevier*, Volume 30, Issue 4, Pages 509–517.

- Jiang, F.L., Hou, X.L., Shi, G.J. and Cui, X.M., 2007, Cloning and Characterization of Full Length cDNA of *BrLOS2* Gene from *Brassica campestris* ssp. *Chinensis*, *Journal-Nanjing Agricultural University*, 30(3), 27.
- Jiao, Y., L. Sun, Y. Song, L., Wang, L., Liu et al., 2013, *AtrbohD* and *AtrbohF* Positively Regulate Absciscic Acid-Inhibited Primary Root Growth by Affecting Ca^{2+} Signalling and Auxin Response of Roots in *Arabidopsis*, *J Exp Bot*, 64: 4183-4192.
- Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., SJ "Ovall S, *et al.*, 2001, The Complete Set of Genes Encoding Major Intrinsic Proteins in *Arabidopsis* Provides A Framework for A New Nomenclature for Major Intrinsic Proteins in Plants, *Plant Physiol.*, 126:1358–69.
- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K. and Sharma, S., 2009, Heavy Metal Toxicity: Effect on Plant Growth, Biochemical Parameters and Metal Accumulation by *Brassica juncea* L., *Int J Plant Prod*, 3(3), 65-75.
- Jones-Rhoades, M.J. and Bartel, D.P., 2004, Computational Identification of Plant Micrnas and Their Targets, Including A Stress Induced miRNA, *Mol. Cell*, 14: 787–799.
- Jouili, H., El Ferjani, E., 2003, Changes in Antioxidant and Lignifying Enzyme Activities in Sunflower Roots (*Helianthus annuus* L.) Stressed with Copper Excess, *Comptes Rendus Biologies*, 326, 639–644.
- Jung, M., Ramankulov, A., Roigas, J., Johannsen, M., Ringsdorf, M., Kristiansen, G., Jung, K., 2007, In Search of Suitable Reference Genes for Gene Expression Studies of Human Renal Cell Carcinoma by Real-Time PCR, *BMC Mol Biol*, 8;8:47.
- Kadota, Y., Sklenar, J., Derbyshire, P., Stransfeld, L., Asai, S., *et al.*, 2014, Direct Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD by the PRR-Associated Kinase BIK1 during Plant Immunity, *Mol Cell*, 54:43–55, doi:10.1016/j.molcel.2014.02.021.
- Kagi, J.H.R., 1991, Overview of Metallothioneins, *Method. Enzymol.*, 205, 613-626.
- Kampfenkel, K., Kushnir, S., Babiychuk, E., Inzé, D., Van Montagu, M., 1995a, Molecular Characterization of A Putative *Arabidopsis thaliana* Copper Transporter and its Yeast Homologue, *J Biol Chem*, 270:28479–28486.
- Kang, M., Abdelmageed, H., Lee, S., Reichert, A., Mysore, K.S. and Allen, R.D., 2013, *AtMBP-1*, An Alternative Translation Product of *LOS2*, Affects Absciscic Acid Responses and is Modulated by the E3 Ubiquitin Ligase *AtSAP5*, *The Plant Journal*, 76(3), 481-493.
- Karenlampi, S., Schat, H., Vangronsveld, J., Verkleij, J.A.C., Van Der Lelie, D., Mergeay, M. and Tervahauta, A.I., 2000, Genetic Engineering in the Improvement

- of Plants for Phytoremediation of Metal Polluted Soils. *Environmental Pollution*, 107, 225-231.
- Karimi, N., Ghaderian, S.M., Raab, A., Feldmann, J., Meharg, A.A., 2009, An Arsenic-Accumulating, Hypertolerant Brassica, *Isatis cappadocica*, *New Phytol.* 184:41–47.
- Kennedy, C.D. and Gonsalves, F.A.N., 1987, The Action of Divalent Zinc, Cadmium, Mercury, Copper and Lead on the Trans-Root Potential and H^+ , Efflux of Excised Roots, *Journal of experimental Botany*, 38(5), 800-817.
- Keltjens, W.G. and Van Beusichem, M.L., 1998, Phytochelatins as Biomarkers for Heavy Metal Stress in Maize (*Zea mays* L.) and Wheat (*Triticum aestivum* L.): Combined Effects of Copper and Cadmium, *Plant and soil*, 203(1), 119-126.
- Kerkeb, L. and Krämer, U., 2003, The Role of Free Histidine in Xylem Loading of Nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*, *Plant Physiology*, 131, 716-724.
- Khraiweh, B., Zhu, J.K. and 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.
- Kim, D.Y., Bovet, L., Maeshima, M., Martinoia, E., Lee, Y., 2007, The ABC Transporter *AtPDR8* is A Cadmium Extrusion Pump Conferring Heavy Metal Resistance, *Plant J*, 50:207–218.
- Kim, D.Y., Bovet, L., Kushnir, S., Noh, E.W., Martinoia, E. and Lee, Y., 2006, *AtATM3* is Involved in Heavy Metal Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 140, 922-932.
- Knight, H., 1999, Calcium Signaling During Abiotic Stress in Plants, *Int Rev Cytol*, 195:269–324.
- Klein, D., 2002, Quantification Using Real-Time PCR Technology: Applications and Limitations, *Trends Mol. Med.*, 8: 257–260.
- Klein, M.A., 2007, *Mechanisms of Zinc Tolerance in the Heavy Metal Hyperaccumulator Thlaspi caerulescens*, Thesis (Phd), Cornell University.
- Kliebenstein, D.J., Monde, R.A., and Last, R.L., 1998, Superoxide Dismutase in Arabidopsis: An Eclectic Enzyme Family with Disparate Regulation and Protein Localization, *Plant Physiology*, 118(2), 637-650.
- Kobae, Y., Sekino, T., Yoshioka, H., Nakagawa, T., Martinoia, E., Maeshima, M., 2006, Loss of *AtPDR8*, A Plasma Membrane ABC Transporter of *Arabidopsis thaliana*, Causes Hypersensitive Cell Death upon Pathogen Infection, *Plant Cell Physiol*, 47:309–318.

- Kocaer, F.O. ve Başkaya, H.S., 2003, Metallerle Kirlenmiş Toprakların Temizlenmesinde Uygulanan Teknolojiler. *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, Cilt 8, Sayı 1.
- Koch, M.A., Al-Shehbaz, I.A., 2009, Molecular Systematics and Evolution of “Wild” Crucifers (Brassicaceae or Cruciferae), In *Biology and Breeding of Crucifers*, ed. SK Gupta, pp. 1–19. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis Group.
- Koksharova, O., Schubert, M., Shestakov, S., Cerff, R., 1998, Genetic and Biochemical Evidence for Distinct Key Functions of Two Highly Divergent GAPDH Genes in Catabolic and Anabolic Carbon Flow of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol Biol* 36: 183–194.
- Koller, C.E., Patrick, J.W., Rose, R.J., Offler, C.E., Macfarlane, G.R., 2007, *Pteris umbrosa* R. Br. as An Arsenichyperaccumulator: Accumulation, Partitioning and Comparison with the Established as Hyperaccumulator *Pteris vittata*, *Chemosphere*, 66:1256–63.
- Korenkov, V., Park, S.H., Cheng, N.H., Sreevidya, C., Lachmansingh, J., Morris, J., Hirschi, K., Wagner, G.J., 2007, Enhanced Cd^{2+} Selective Root-Tonoplast-Transport in Tobaccos Expressing *Arabidopsis* Cation Exchangers, *Planta*, 225:403–411.
- Kotrba, P., 2013, Transgenic Approaches to Enhance Phytoremediation of Heavy Metal-Polluted Soils. In *Plant-Based Remediation Processes* (pp. 239-271). Springer Berlin Heidelberg.
- Krämer, U., Cotter-Howells, J.D., Charnock, J.M., Baker, A.J.M, Smith, J.A.C., 1996, Free Histidine as A Metal Chelator in Plants that Accumulate Nickel, *Nature*, 379:635–638.
- Krämer, U., Talke, I.N., Hanikenne, M., 2007, Transition Metal Transport, *FEBS Lett*, 581:2263–2272.
- Krämer, U., 2010, Metal Hyperaccumulation in Plants, *Annual Review of Plant Biology*, 61, 517-534.
- Kruger, C., Hell, R. and Stephan, U.W., 2001, A Metal-Binding LEA Protein Trafficks Micronutrients in the Phloem of *Ricinus communis* L., *Developments In Plant And Soil Sciences*, 92, 194-195.
- Kubista, M., 2008, Emerging real-time PCR applications, *Drug Discovery World summer*, 57-66.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., et al., 2006, The Real-Time Polymerase Chain Reaction, *Mol Aspects Med*, 27:95-125.

- Küpper, H., Šetlík, I., Spiller, M., Küpper, F.C., & Prášil, O., 2002, Heavy Metal-Induced Inhibition of Photosynthesis: Targets of *in-vivo* Heavy Metal Chlorophyll Formation¹, *Journal of Phycology*, 38(3), 429-441.
- Küpper, H., Lombi, H., Zhao, F.J., Wieshammer, G., McGrath, S.P., 2001, Cellular Compartmentation of Nickel in the Hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*, *Journal of Experimental Botany*, 52 2291-2300.
- Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangl, J.L., Bloom, R.E., Bodde, S., Jones, J.D., Schroeder, J.I., 2003, NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* Genes Function in ROS-Dependent ABA Signaling in Arabidopsis, *EMBO J*, 22:2623-2633.
- Lane, B., Kajioka, R. and Kennedy, T., 1987, The Wheat-Germ Ec Protein is A Zinc-Containing Metallothionein, *Biochem. Cell Biol.*, 65, 1001-1005.
- Lanquar, V., Lelièvre, F., Barbier-Brygoo, H., & Thomine, S., 2004, Regulation and Function of *AtNRAMP4* Metal Transporter Protein, *Soil Science and Plant Nutrition*, 50(7), 1141-1150.
- Lasat, M.M., 2002, Phytoextraction of Toxic Metals: A Review of Biological Mechanisms, *J. Environ. Qual.* Vol. 31, 109-120.
- Le Jean, M., Schikora, A., Mari, M., Briat, J.F., Curie, C., 2005, A Loss-of-Function Mutation in *Atysl1* Reveals its Role in Iron and Nicotianamine Seed Loading, *Plant J*, 44:769–782.
- Lee, J., Reeves, R.D., Brooks, R.R. and Jaffre, T., 1977, Isolation and Identification of A Citrato-Complex of Nickel from Nickel Accumulating Plants, *Phytochemistry*. Vol. 16, no. 10, pp. 1503–1505, 1977.
- Lee, J., Reeves, R.D., Brooks, R.R. and Jaffre, T., 1978, The Relation Between Nickel and Citric Acid in Some Nickel-Accumulating Plants, *Phytochemistry*. Vol. 17, no. 6, pp. 1033–1035.
- Lee, H., Guo, Y., Ohta, M., Xiong, L., Stevenson, B., & Zhu, J. K., 2002, LOS2, A Genetic Locus Required for Cold-Responsive Gene Transcription Encodes A Bi-functional Enolase, *The EMBO journal*, 21(11), 2692-2702.
- Lee, J., Bae, H., Jeong, J., Lee, J.Y., Yang, Y.Y., Hwang, I., et al., 2003, Functional Expression of Heavy Metal Transporter in *Arabidopsis* enhances Resistance to and Decreases Uptake of Heavy Metals, *Plant Physiol*, 133:589– 96.
- Lee, J., Shim, D., Song, W.Y., Hwang, I. and Lee, Y., 2004, Arabidopsis Metallothioneins 2a and 3 Enhance Resistance to Cadmium When Expressed in *Vicia faba* Guard Cells, *Plant Molecular Biology*, 54, 805-815.

- León, A.M., Palma, J.M., Corpas, F.J., Gomez, M., Romero-Puertas, M.C., Chatterjee, D., Mateos, R.M., Del Rio, L.A., Sandalio, L.M., 2002, Antioxidative Enzymes in Cultivars of Peppers Plants with Different Sensitivity to Cadmium, *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 813–820.
- Li, H., Sheng, G., Sheng, W., Xu, O., 2002, Uptake of Trifluralin and Lindane From Water by Ryegrass, *Chemosphere*, 48:335-341.
- Li, T.Q., Yang, X.E. and Long, X.X., 2004, Potential of Using *Sedum alfredii* Hance for Phytoremediating Multi-Metal Contaminated Soils, *Journal of Soil and Water Conservation*, 18, 79-83.
- Lin, J., Jiang, W., Liu, D., 2003, Accumulation of Copper by Roots, Hypocotyls, Cotyledons and Leaves of Sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Bioresource Technology*, Volume 86, Issue 2, 151–155.
- Lin, Y.F. and Aarts, M.G., 2012, The Molecular Mechanism of Zinc and Cadmium Stress Response in Plants, *Cellular and molecular life sciences*, 69(19), 3187-3206.
- Liu, G.S., Sanchez-Fernandez, R., Li, Z.S. and Rea, P.A., 2001, Enhanced Multispecificity of *Arabidopsis* Vacuolar Multidrug Resistance-Associated Protein-Type ATP-Binding Cassette Transporter, *AtMRP2*, *Journal of Biological Chemistry*, 276, 8648-8656.
- Luo, G.Z., Wang, H.W., Huang, J., Tian, A.G., Wang, Y.J., Zhang, J.S., Chen, S.Y., 2005, A Putative Plasma Membrane Cation/Proton Antiporter from Soybean Confers Salt Tolerance in *Arabidopsis*, *Plant Molecular Biology*, 59, 809–820.
- Madejon, P., Marañón, T., Murillo, J.M. and Robinson, B., 2004, White Poplar (*Populus alba*) as A Biomonitor of Trace Elements in Contaminated Riparian Forests, *Environmental Pollution*, 132(1), 145-155.
- Maestri, E., Marmiroli, M., Visioli, G. and Marmiroli, N., 2010, Metal Tolerance and Hyperaccumulation: Costs and Trade-Offs Between Traits and Environment, *Environ. Exp. Bot.*, 68, 1-13.
- Maestri, E. and Marmiroli, M., 2012, Genetic and Molecular Aspects of Metal Tolerance and Hyperaccumulation. in: Gupta, D.K. and Sandalio, L.M. (Editors). Metal toxicity Coping Mechanisms of Plants to Metal Contaminated Soil in plants: Perception, signaling and remediation, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 41-63.
- Maksymiec, W., Wianowska, D., Dawidowicz, A.L., Radkiewicz, S., Mardarowicz, M., Krupa, Z., 2005, The Level of Jasmonic Acid in *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus coccineus* Plants under Heavy Metal Stress, *J Plant Physiol*, 162:1338–1346.

- Maksymiec, W. and Krupa, Z., 2006, The Effects of Short-Term Exposition to Cd, Excess Cu Ions and Jasmonate on Oxidative Stress Appearing in *Arabidopsis thaliana*, *Environ Exp Bot*, 57:187–194.
- Mathis, R., Gamas, P., Meyer, Y., Cullimore, J.V., 2000, The presence of GSI-like genes in higher plants: support for the paralogous evolution of GSI and GSII genes, *Journal of Molecular Evolution*, 50: 116–122.
- Mäser, P., Thomine, S., Schroeder, J.I., Ward, J.M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I.N., Amtmann, A., Maathuis, F.J.M., Sanders, D., Harper, J.F., Tchieu, J., Gribskov, M., Persans, M.W., Salt, D.E., Kim, S.A., Gueriot, M.L., 2001, Phylogenetic Relationships within Cation Transporter Families of Arabidopsis, *Plant Physiol*, 126:1646–1667.
- Mathys, W., 1977, The Role of Malate, Oxalate, and Mustard Oil Glucosides in The Evolution of Zincresistance in Herbage Plants, *Physiol Plantarum*, 40:130–136.
- May, M.J., Leaver, C.J., 1995, *Arabidopsis thaliana* G-Glutamylcysteine Synthetase is Structurally Unrelated to Mammalian, Yeast and *Escherichia coli* Homologues, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 10059–10063.
- Marino, D., Andrio, E., Danchin, E.G., Oger, E., Gucciardo, S., Lambert, A., Puppo, A., Pauly, N., 2011, A *Medicago truncatula* NADPH Oxidase is Involved in Symbiotic Nodule Functioning, *New Phytol*, 189:580-592.
- Marras, S.A., Kramer, F.R. and Tyagi, S., 2003, Genotyping SNPs with Molecular Beacons, *In Single Nucleotide Polymorphisms Springer New York*, (pp. 111-128).
- Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D.T. and Santoni, V., 2008, Plant Aquaporins: Membrane Channels With Multiple Integrated Functions, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 595-624.
- Meagher, R.B., Rugh, C.L., Kandasamy, M.K., Gragson, G. and Wang, G., 2000, Engineered Phytoremediation of Mercury Pollution in Soil and Water Using Bacterial Genes, In: Terry, N. ve Banuelos, G. (eds.), *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*, Lewis, Boca Raton, pp. 201-219.
- Mei, H., Zhao, J., Pittman, J.K., Lachmansingh, J., Park, S. and Hirschi, K.D., 2007, In Planta Regulation of the *Arabidopsis* $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ Antiporter CAX1, *Journal of experimental botany*, 58(12), 3419-3427.
- Meharg, A.A., Macnair, M.R., 1992, Genetic Correlation Between Arsenate Tolerance and The Rate of Influx of Arsenate and Phosphate in *Holcus lanatus* L., *Heredity*, 69:336–341.
- Memon, A.R. and Zahirovic, 2014, E., Genomics and Transcriptomics Analysis of Cu Accumulator Plant *Brassica nigra* L., *Journal of Applied Biological Sciences*, 8 (2): 01-08.

- Mendoza-Cózatl, D.G., Butko, E., Springer, F. and Harper, L., 2008, Identification of High Levels of Phytochelatins, Glutathione and Cadmium in the Phloem Sap of *Brassica napus*. A Role for Thiol-Peptides in the Long-Distance Transport of Cadmium and the Effect of Cadmium on Iron Translocation, *Plant Journal*, 54, 249-259.
- Mcbride, M.B., 2001, Cupric ion activity in peat soil as a toxicity indicator for maize, *J. Environ. Qual.*, 30, 78–84.
- Mcintyre, T., 2003, Phytoremediation of Heavy Metals from Soils, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, *Phytoremediation*, Volume 78, pp 97-123.
- Mehes-Smith, M., Nkongolo, K. and Cholewa, E., 2013, Coping Mechanisms of Plants to Metal Contaminated Soil, *Environmental Change and Sustainability*, Chapter 3, 53-89.
- Mei, H., Cheng, N.H., Zhao, J., Park, S., Escareno, R.A., Pittman, J.K., Hirschi, K.D., 2009, Root Development under Metal Stress in *Arabidopsis thaliana* Requires the H⁺/Cation Antiporter CAX4, *New Phytol*, 183:95–105.
- Mengoni, A., Cecchi, L., Gonnelli, C., 2012, Nickel Hyperaccumulating Plants and *Alyssum Bertolonii*: Model Systems for Studying Biogeochemical Interactions in Serpentine Soils, Bio-Geo Interactions in Metal-Contaminated Soils, *Soil Biology*, Volume 31, pp 279-296.
- Mleczek, M., Piechalak, A., Tomaszewska, B., Drzewiecka, K. and Nuc, P., 2013, Metal/Metalloid Phytoremediation: Ideas and Future, *In Plant-Based Remediation Processes* (pp. 39-58). Springer Berlin Heidelberg.
- Merrifield, M.E., Ngu, T. and Stillman, M.J., 2004, Arsenic Binding to *Fucus vesiculosus* Metallothionein, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324, 127-132.
- Mganga, N., Manoko, M.L.K., Rulangeranga, Z.K., 2011, Classification of Plants According to Their Heavy Metal Content Around North Mara Gold Mine, Tanzania: Implication for Phytoremediation, *Tanzania Journal of Science*, 37, 109-119.
- Mganga, N., Manoko, M. and Rulangeranga, Z., 2012, Classification of Plants According to Their Heavy Metal Content around North Mara Gold Mine, *Tanzania: Implication for Phytoremediation*: 37.
- Mhlanga, M.M., Malmberg, L., 2001, Using Molecular Beacons to Detect Single-Nucleotide Polymorphisms with Real-Time PCR, *Methods*, 25(4):463-471.
- Michalak, A., 2006, Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress, *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4), 523.

- Michael, T.P. and McClung, C.R., 2002, Phase-Specific Circadian Clock Regulatory Elements in Arabidopsis, *Plant Physiology*, 130, 627–638.
- Minglin, L., Yuxiu, Z. and Tuanyao, C., 2005, Identification of Genes Up-Regulated in Response to Cd Exposure in *Brassica juncea* L., *Gene*, 363, 151-158.
- Milner, M.J. and Kochian, L.V., 2008, Investigating Heavy-Metal Hyperaccumulation Using *Thlaspi caerulescens* as A Model System, *Annals of Botany*, 102, 3-13.
- Mills, R.F., Krijger, G.C., Baccarini, P.J., Hall, J.L. and Williams, L.E., 2003, Functional Expression of *AtHMA4*, A P1B-type ATPase of the Zn/Co/Cd/Pb Subclass, *The Plant Journal*, 35(2), 164-176.
- Mills, R.F., Francini, A., Da Rocha, P.S.C.F., Baccarini, P.J., Aylett, M., Krijger, G.C. and Williams, L.E., 2005, The Plant P-1B-Type ATPase *AtHMA4* Transports Zn and Cd and Plays A Role in Detoxification of Transition Metals Supplied at Elevated Levels, *FEBS Letters*, 579, 783-791.
- Mills, R.F., Valdes, B., Duke, M., Peaston, KA, Lahner, B., Salt, D.E. and Williams, L.E., 2010, Functional Significance of *AtHMA4* C-terminal Domain in Planta, *PloS one*, 5(10), e13388.
- Mittler, R., 2002, Oxidative Stress, Antioxidants and Stress Tolerance, *Trends Plant Sci.*, 7: 405–410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F., 2004, Reactive Oxygen Gene Network of Plants, *Trends Plant Sci*, 9:490-498.
- Miyasaka, S.C., Buta, J.G., Howell, R.K. and Foy, C.D., 1991, Mechanism of Aluminum Tolerance in Snapbeans Root Exudation of Citric Acid, *Plant Physiology*, 96(3), 737-743.
- Mohan, B.S., Hosetti, B.B., 1997, Potential Phytotoxicity of Lead and Cadmium to *Lemna minor* Grown in Sewage Stabilization Ponds, *Environmental Pollution*, 98, 233–238.
- 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*, 8:107. doi:10.1186/1471-2164-8-107.
- Morita, Y., Kataoka, A., Shiota, S., Mizushima, T., Tsuchiya, T., 2000, NorM of *Vibrio parahaemolyticus* is A Na⁺-Driven Multidrug Efflux Pump, *J Bacteriol*, 182: 6694–6697.
- Morita, Y., Kodama, K., Shiota, S., Mine, T., Kataoka, A., Mizushima, T., Tsuchiya, T., 1998, NorM, A Putative Multidrug Efflux Protein, of *Vibrio parahaemolyticus*

- and Its Homolog in *Escherichia coli*, *Antimicrob Agents Chemother*, 42: 1778–1782.
- Morrissey, J., Baxter, I.R., Lee, J., Li, L., Lahner, B., Grotz, N. *et al.*, 2009, The Ferroportin Metal Efflux Proteins Function in Iron and Cobalt Homeostasis in Arabidopsis, *Plant Cell*, 21: 3326–3338.
- Mulligan, C.N., Yong, R.N. and Gibbs, B.F., 2001, Remediation Technologies For Metalcontaminated Soils And Groundwater: An Evaluation, *Engineering Geology*, 60, 193-207.
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hirai, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J.B., Engel, A., Fujiyoshi, Y., 2000, Structural determinants of water permeation throughaquaporin-1, *Nature*, 407: 599–605.
- Murata, Y., Ma, J.F., Yamaji, N., Ueno, D., Nomoto, K., Iwashita, T., 2006, A Specific Transporter For Iron(II)–Phytosiderophore in Barley Roots, *The Plant Journal*, 46, 563–572.
- Murgia, I., Briat, J.F., Tarantino, D., Soave, C., 2001, Plant Ferritin Accumulates in Response to Photoinhibition But its Ectopic Overexpression Does Not Protect Against Photoinhibition, *Plant Physiol Bioc*, 39:797–805.
- Murgia, I., Delledonne, M., Soave, C., 2002, Nitric Oxide Mediates Iron-Induced Ferritin Accumulation in Arabidopsis, *Plant J*, 30:521–528.
- Neuman, D. and Ford, K.L., 2006, Phytostabilization as a Remediation Alternative at Mining Sites, *U.S. Bureau of Land Management Papers*. Paper 21. <http://digitalcommons.unl.edu/usblmpub/21>.
- Nevitt, T., Öhrvik, H., & Thiele, D.J., 2012, Charting the travels of copper in eukaryotes from yeast to mammals, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823(9), 1580-1593.
- Nies, D.H., 1992, Resistance to Cadmium, Cobalt, Zinc, and Nickel in Microbes, *Plasmid*, 27:17–28.
- Nishida, S., Tsuzuki, C., Kato, A., Aisu, A., Yoshida, J. and Mizuno, T., 2011, *AtIRT1*, The Primary Iron Uptake Transporter in The Root, Mediates Excess Nickel Accumulation in *Arabidopsis thaliana*, *Plant and Cell Physiology*, 52(8), 1433-1442.
- Newman, L.A., Reynolds, C.M., 2004, Phytodegradation of Organic Compounds, Current Opinion in Biotechnology, *Elsevier*, Volume 15, Issue 3, June 2004, Pages 225–230.
- Nogueira, E.D., Olivares, F.L., Japiassu, J.C., Vilar, C., Vinagre, F., Baldani, J.I., Hemery, A.S., 2005, Characterization of glutamine synthetase genes in sugarcane

- genotypes with different rates of biological nitrogen fixation, *Plant Science*, 169: 819–832.
- Ohl, F., Jung, M., Xu, C., Stephan, C., Rabien, A., Burkhardt, M., Nitsche, A., Kristiansen, G., Loening, S.A., Radonić, A., Jung, K., 2005, Gene Expression Studies in Prostate Cancer Tissue: Which Reference Gene Should Be Selected for Normalization? *J Mol Med.*, 83(12):1014-24.
- Ortiz, D.F., Kreppel, L., Speiser, D.M., Scheel, G., McDonald, G. and Ow, D.W., 1992, Heavy Metal Tolerance in The Fission Yeast Requires An ATP-Binding Cassette-Type Vacuolar Membrane Transporter, *Embo J*, 11, pp. 3491-3499, ISSN 0261-4189.
- Ortiz, D.F., Ruscitti, T., Mccue, K.F. and Ow, D.W., 1995, Transport of Metal-Binding Peptides by HMT1, A Fission Yeast ABC-Type Vacuolar Membrane Protein, *J Biol Chem*, 270, pp. 4721-4728, ISSN 0021-9258.
- Özay, C. ve Mammadov, R., 2013, Ağır Metaller ve Süs Bitkilerinin Fitoremediyasyonda Kullanılabilirliği, *BAÜ Fen Bil. Enst. Dergisi Cilt*, 15(1) 67-76.
- Pal, R. and Rai, J.P.N., 2010, Phytochelatins: Peptides Involved in Heavy Metal Detoxification, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160, 945-963.
- Palmgren, M.G. and Nissen, P., 2011, P-type ATPases, *Annual review of biophysics*, 40, 243-266.
- Palmgren, M.G., Axelsen, K.B., 1998, Evolution of P-type ATPases, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1365, 37±45.
- Palmiter, R.D., Findley, S.D., 1995, Cloning and Functional Characterization of A Mammalian Zinc Transporter that Confers Resistance to Zinc, *EMBO J*, 14:639–649.
- Papoyan, A., Kochian, L.V., 2004. Identification of *Thlaspi Caerulescens* Genes That May Be Involved in Heavy Metal Hyperaccumulation and Tolerance. Characterization of A Novel Heavy Metal Transporting Atpase, *Plant Physiol.* 136:3814–23.
- Padmavathiamma, P.K. and Li, L.Y., 2007, Phytoremediation Technology: Hyper-Accumulation Metals in Plants, *Water, Air, and Soil Pollution*, 184(1-4), 105-126.
- Paulsen, I.T., Saier Jr, M.H., 1997, A Novel Family of Ubiquitous Heavy Metal Ion Transport Proteins, *Journal of Membrane Biology*, 156, 99±103.
- Pavlíková, D., Macek, T., Macková, M., Száková, J., Balík, J., 2004, Cadmium Tolerance and Accumulation in Transgenic Tobacco Plants with A Yeast Metallothionein Combined with A Polyhistidine Tail, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 54, 233-237.

- Peiter, E., Montanini, B., Gobert, A., Pedas, P., Husted, S., Maathuis, F.J.M., Blaudez, D., Chalot, M., Sanders, D., 2007, A Secretory Pathway-Localized Cation Diffusion Facilitator Confers Plant Manganese Tolerance, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:8532–8537.
- Persans, M.W., Nieman, K. and Salt, D.E., 2001, Functional Activity and Role of Cation-Efflux Family Members in Ni Hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98, 9995-10000.
- Peters, I.R., Helps, C.R., Hall, E.J., & Day, M.J., 2004, Real-time RT-PCR: Considerations for Efficient and Sensitive Assay Design, *Journal Of Immunological Methods*, 286 (1), 203-217.
- Petersen, B.H., Rapaport, R., Henry, D.P., Huseman, C. and Moore, W. V., 1990, Effect of Treatment with Biosynthetic Human Growth Hormone (GH) on Peripheral Blood Lymphocyte Populations and Function in Growth Hormone-Deficient Children, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 70(6), 1756-1760.
- Petersen, J., Brinkmann, H., Cerff, R., 2003, Origin, Evolution and Metabolic Role of A Novel Glycolytic GAPDH Enzyme Recruited by Land Plant Plastids, *J Mol Evol*, 57: 16–26.
- Pich, A., Scholz, G., 1996, Translocation of Copper and Other Micronutrients in Tomato Plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): Nicotianamine-Stimulated Copper Transport in the Xylem, *J Exp Bot*, 47:41–47.
- Pilon-Smits, E., Pilon, M., 2000, Breeding Mercury-Breathing Plants for Environmental Clean-up, *Trends in Plant Sci*, 5: 235-236.
- Pilon, M., Owen, J.D., Garifullina, G.F., Kurihara, T., Mihara, H., Esaki, N., *et al.*, 2003, Enhanced Selenium Tolerance and Accumulation in Transgenic Arabidopsis Expressing A Mouse Selenocysteine Lyase, *Plant Physiol*, 131:1250–
- Pittman, J.K., 2005, Managing the Manganese: Molecular Mechanisms of Manganese Transport and Homeostasis, *New Phytologist*, 167(3), 733-742.
- Price, D.J., Joshi, J.G., 1982, Ferritin. Binding of Beryllium and Other Divalent Metal Ions, *J Biol Chem*, 258:10873–10880.
- Pivet, B.E., 2001, Phytoremediation of Contaminated Soil and Ground Water at hazardous Waste Sites, *United States Environmental Protection Agency EPA*, 540/S-01/500, 36 p.
- Ponchel, F., 2006, Real-Time PCR Using SYBR®Green, Real Time PCR (Dorak MT, ed) *New York, Taylor & Francis Group*. 139-154.

- Puig, S., Andrés- Colás, N., García- Molina, A. and Penarrubia, L., 2007, Copper and Iron Homeostasis in Arabidopsis: Responses to Metal Deficiencies, Interactions and Biotechnological Applications, *Plant, cell & environment*, 30(3), 271-290.
- Pulford, I.D. and Watson, C., 2003, Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Land by Trees: A Review. *Environment International*, 29, 529-540.
- Quartacci, M. F., Cosi, E., Meneguzzo, S., Sgherri, C., & Navari-Izzo, F., 2003, Uptake and translocation of copper in Brassicaceae, *Journal of plant nutrition*, 26(5), 1065-1083.
- Qi, J., Yu, S., Zhang, F., Shen, X., Zhao, X., Yu, Y., Zhang, D., 2010, Reference Gene Selection for Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction of Mrna Transcript Levels in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*), *Plant Molecular Biology Reporter*, 28, 597–604.
- Quigley, F., Rosenberg, J.M., Shachar-Hill, Y., Bohnert, H.J., 2001, From Genome to Function: the Arabidopsis Aquaporins, *Genome Biol.*, 3:1–17.
- Rascio, N. and Navari-Izzo, F., 2011, Heavy Metal Hyperaccumulating Plants: How and Why Do They Do it? And What Makes them So Interesting? *Plant Science*, 180, 169-181.
- Raskin, I., Ensley, B.D., editors, 2002, *Phytoremediation of toxic metals using plants to clean the environment*, New York7 John Wiley & Sons; 2000.
- Rausser, W.E., 1999, The Structure and Function of Metal Chelators Produced by Plants, *Cell Biol. Biophys.*, 31, 19-48.
- Rausser, W.E., 1995, Phytochelatins and Related Peptides: Structure, Biosynthesis, and Function, *Plant Physiol.*, 109:1141–49.
- Rawat, K., Fulekar, M.H. and Pathak, B., 2012, Rhizofiltration: A Green Technology For Remediation Of Heavy Metals, *International Journal of Innovations in Bio-Sciences*, Vol. 2 (4), 2012, pp. 193-199.
- Ravet, K., Touraine, B., Boucherez, J., Briat, J-F., Gaymard, F., Cellier, F., 2009, Ferritins Control Interaction Between Iron Homeostasis and Oxidative Stress in Arabidopsis, *Plant J*, 57:400–412.
- Rea, P.A., Li, Z-S., Lu, Y-P., Drozdowicz, Y.M., 1998, From Vacuolar GS-X Pumps to Multispecific ABC Transporters, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 727±760.
- Rea, P.A., Vatamaniuk, O.K., Rigden, D.J., 2004, Weeds, Worms, and More, Papain's Long-Lost Cousin, Phytochelatin Synthase, *Plant Physiol*, 136, 2463–2474.
- Rea, P.A., 2007, Plant ATP-Binding Cassette Transporters, *Annual Reviews of Plant Biology*, 58, 347-375.

- Reeves, R.D., Baker, A.J.M., 2000, Metal-Accumulating Plants. In *Phytoremediation of Toxic Metals—Using Plants to Clean Up the Environment*, ed. I Raskin, BD Ensley, New York: Wiley, pp. 193–229.
- Remans, T., Smeets, K., Opdenakker, K., Mathijsen, D., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2008, Normalisation of Real-Time RT-PCR Gene Expression Measurements in *Arabidopsis thaliana* Exposed to Increased Metal Concentrations, *Planta*, Volume 227, Issue 6, pp 1343-1349.
- Rigola, D., Fiers, M., Vurro, E., Aarts, M.G.M., 2006, The Heavy Metal Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* Expresses Many Species-Specific Genes as Identified by Comparative EST Analysis, *New Phytologist*, 170: 753-766.
- Rius, S.P., Casati, P., Iglesias, A.A. and Gomez-Casati, D.F., 2008, Characterization of Arabidopsis Lines Deficient in GAPC-1, A Cytosolic NAD-Dependent Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, *Plant physiology*, 148(3), 1655-1667.
- Rizzi, L., Petruzzelli, G., Poggio, G. and Vigna Guidi, G., 2004, Soil Physical Changes and Plant Availability of Zn and Pb in A Treatability Test of Phytostabilization, *Chemosphere*, 57, 1039-1046.
- Rotkittikhun, P., Kruatrachue, M., Chaiyarat, R., Ngernsansaruay, C., Pokethitiyook, P., Pajitpraporn, A. and Baker, A.J.M., 2006, Uptake and Accumulation of Lead by Plants from the Bo Ngam Lead Mine Area in Thailand, *Environmental Pollution*, 144, 681-688.
- Ruan, Y., Gilmore, J., Conner T., 1998, Towards Arabidopsis Genenome Analysis: Monitoring Expression Profiles of 1400 Genes Using cDNA Microarrays, *Plant J.*, 15, 821-833.
- Sakakibara, M., Watanabe, A., Sano, S., Inoue, M. and Kaise, T., 2007, Proceedings of the Annual International Conference on Soils, Sediments, *Water and Energy*, Vol. 12, Art. 26, Contaminated Soils-Remediation, 1-15-2010 Phytoextraction And Phytovolatilization Of Arsenic From As-Contaminated Soils By *Pteris vittata*,
- Sachdeva, S. and Sharma, A., 2012, Azolla: Role in Phytoremediation of Heavy Metals Paper from Proceeding of the National Conference “Science in Media 2012” Organized by YMCA University of Science and Technology, Faridabad, Haryana (India) December 3rd-4th 2012 Published by *IJMRS's International Journal of Engineering Sciences*, ISSN (Online): 2277-9698 www.ijmrs.com.
- Sakurai, J., Ishikawa, F., Yamaguchi, T., Uemura, M., Maeshima, M., 2005, Identification of 33 Rice Aquaporin Genes and Analysis of Their Expression and Function, *Plant Cell Physiol.* 46:1568–77.

- Sancenon, 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.
- Sancenón, V., Puig, S., Mateu-Andrés, I., Dorcey, E., Thiele, D.J., Peñarrubia, L., 2004, The *Arabidopsis* Copper Transporter *COPT1* Functions in Root Elongation and Pollen Development, *J Biol Chem*, 279:15348–15355.
- Salt, D.E., Wagner, G.J., 1993, Cadmium Transport Across Tonoplast of Vesicles from Oat Roots. Evidence for a $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiport activity, *J Biol Chem*, 268:12297–12302.
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar Nanda, P.B.A., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I. and Raskin, I., 1995, Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals From the Environment Using Plants, *Bio/Technology*, 13, 468-474.
- Salt, D.E., Smith, R.D. and Raskin, I., 1998, Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49, 643-668.
- Salt, D.E. and Krämer, U., 2000, Mechanisms of Metal Hyperaccumulation in Plants. In: Raskin, I. ve Ensley, B.D. (eds.), *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean-up the Environment*, Wiley, New York, pp. 231-246.
- Samarghandi, M.R., Nouri, J., Mesdaghinia, A.R., Mahvi, A.H., Nasser, S. ve Vaezi, F., 2007, Efficiency Removal of Phenol, Lead and Cadmium by Means of $\text{UV}/\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ Processes, *International Journal of Environmental Science and Technology*, 4, 19-25.
- Sambrook, J., Fritschi, E.F., Maniatis, T., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 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, *Journal of Environmental Science and Technology*, 4(2), 118-138.
- Sassanfar, S., Walker, G., 2003, DNA Microarray Technology, What Is It and How Is It Useful, MIT, *Biology Science Outreach*.
- Sauve', S., McBride, M.B., Norvell, W.A., 1997, Copper solubility and speciation of *in situ* contaminated soils: effects of copper level, pH and organic matter, *Water Air Soil Pollut.*, 100, 133–149.
- Scandalios, J.G., Acevedo, A., Ruzsa, S., 2000, Catalase Gene Expression in Response to Chronic High Temperature Stress in Maize, *Plant Science*, 156, 103–110.

- Schaaf, G., Schikora, A., Häberle, J., Vert, G., Ludewig, U., Briat, J. F., ... & Von Wirén, N., 2005, A Putative Function for the Arabidopsis Fe-Phytosiderophore Transporter Homolog *AtYSL2* in Fe and Zn Homeostasis, *Plant and Cell Physiology*, 46(5), 762-774.
- Schaaf, G., Honsbein, A., Meda, A.R., Kirchner, S., Wipf, D. and Von Wiren, N., 2006, *AtIREG2* Encodes A Tonoplast Transport Protein Involved in Iron-Dependent Nickel Detoxification in *Arabidopsis thaliana* Roots, *J. Biol. Chem.*, 281: 25532–25540.
- Schat, H., Llugany, M., Bernhard, R., 2000, Metal-Specific Patterns of Tolerance, Uptake, and Transport of Heavy Metals in Hyperaccumulating and Non-Hyperaccumulating Metallophytes, In: Terry N, Banuelos G, eds. *Phytoremediation of Contaminated Soils and Water*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 171-188.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O., 1995, Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with A Complementary DNA Microarray, *Science*, 270: 467- 470.
- Schmidke, I. and Stephan, U.W., 1995, Transport of Metal Micronutrients in the Phloem of Castor Bean (*Ricinus communis*) Seedlings, *Physiologia Plantarum*, 95(1), 147-153.
- Schoenbeck, M.A., Samac, D.A., Fedorova, M., Gregerson, R.G., Gantt, J.S. and Vance, C.P., 1999, The Alfalfa (*Medicago sativa*) *TDY1* Gene Encodes A Mitogen-Activated Protein Kinase Homolog, *Molecular plant-microbe interactions*, 12(10), 882-893.
- Serrano, R., 1989, Structure and Function of Plasma Membrane ATPase, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40, 61±94.
- Sharkey, F.H., Banat, I.M., Marchant, R., 2004, Detection and Quantification of Gene Expression in Environmental Bacteriology. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 (7): 3795–806, doi:10.1128/AEM.70.7.3795-3806.2004. PMC 444812. PMID 15240248.
- Shaul, O., Hilgemann, D.W., De-Almeida-Engler, J.J., Van Montagu, M., Inzé, D., Galili, G., 1999, Cloning and Characterization of A Novel Mg^{2+}/H^{+} Exchanger, *EMBO J*, 18:3973–3980.
- Shi, M.M., 2002, Technologies for Individual Genotyping, *American Journal of Pharmacogenomics*, 2(3), 197-205.
- Shojima, S., Nishizawa, N.K., Fushiya, S., Nozoe, S., Irifune, T., Mori, S., 1990, Biosynthesis of Phytosiderophores: *In vitro* Biosynthesis of 20-Deoxymugineic Acid from L-methionine and Nicotianamine, *Plant Physiol*, 93:1497–1503.

- Singh, P.K., Tewari, R.K., 2003. Cd Toxicity Induced Changes in Plant Water Relations and Oxidative Metabolism of *Brassica juncea* L. *Plants, J. Environ. Biol.*, 24, 107–112.
- Silver, S., 1996, Bacterial Resistance to Toxic Metal Ions, A review, *Gene*, 179:9–19.
- Skadsen, R.W., Schulze-Lefert, P., Herbst, J.M., 1995, Molecular Cloning, Characterization and Expression Analysis of Two Catalase Isozyme Genes in Barley, *Plant Molecular Biology*, 29, 1005–1014.
- Solioz, M. and Vulpe, C., 1996, CPx-type ATPases: A Class of P-type ATPases that Pump Heavy Metals, *Trends in biochemical sciences*, 21(7), 237-241.
- Somashekaraiah, B.V., Padmaja, K., Prasad A.R.K., 1992, Phytotoxicity of Cadmium Ions on Germinating Seedlings of Mung Bean (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of Lipid Peroxides in Chlorophyll Degradation, *Physiologia Plantarum*, 85, 85–89.
- Sossé, B.A., Genet, P., Dunand-Vinit, F., Toussaint, L.M., Epron, D., and Badot, P.M., 2004, Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents, *Plant Science* (166):1213-1218.
- Sovljanski, R., Obradovic, S., Kisgeci, J., Lazie, S., Macko, V., 1989, Heavy Metals Contents and Quality of Hop Cones Treated by Pesticides During The Vegetation, *Acta Hortic.* 249, 81-88.
- Spaczynski, M., Seta-Koselska, A., Patrzylas, P., Betlej, A.K. and Skorzynska-Polit, E., 2012, Phytodegradation and Biodegradation in Rhizosphere as Efficient Methods of Reclamation of Soil Contaminated by Organic Chemicals (a review), *Acta Agrophysica*, 19(1), 155-169.
- Speiser, D.M., Abrahamson, S.L., Banuelos, G., & OW, D.W., 1992, *Brassica juncea* Produces A Phytochelatin-Cadmium-Sulfide Complex, *Plant physiology*, 99(3), 817-821.
- Stephan, U.W. & Scholz, G., 1993, Nicotianamine: Mediator of Transport of Iron and Heavy Metals in the Phloem? *Physiologia Plantarum*, 88(3), 522-529.
- Stephan, U.W., Schmidke, I., Stephan, V.W., Scholz, G., 1996, The Nicotianamine Molecule is Madeto- Measure for Complexation of Metal Micronutrients in Plants, *Biometals*, 9:84–90.
- Stolt, J.P., Sneller, F.E.C., Bryngelsson, T., Lundborg, T., & Schat, H., 2003, Phytochelatin and Cadmium Accumulation in Wheat, *Environmental and Experimental Botany*, 49(1), 21-28.
- 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, *The Plant Cell*, 18:2051-2065.
- Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M.A. and Mittler, R., 2011, Respiratory Burst Oxidases: the Engines of ROS Signaling, *Current opinion in plant biology*, 14(6), 691-699.
- Talke, I.N., Hanikenne, M., Krämer, U., 2006, Zinc-Dependent Global Transcriptional Control, Transcriptional Deregulation and Higher Gene Copy Number for Genes in Metal Homeostasis of the Hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*, *Plant Physiol.* 142, 148–167.
- Tan, W., Wang, K., Drake, T.J., 2004, Molecular Beacons, *Current Opinion in Chemical Biology*, Volume 8, Issue 5, Pages 547–553.
- Tangahu, B.V., Abdullah, S., Rozaimah, S., 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*, Volume 2011, Article ID 939161, 31 pages.
- Tarradellas, J., Bitten, G. and Rossel, D., 1997, Soil Ecotoxicology, *Lewis publishers*.
- Taylor, K.C., Albrigo, L.G., Chase, C.D., 1988, Zinc Complexation in the Phloem of Blight-Affected Citrus, *J Am Soc Hortic Sci*, 113:407–411.
- Tefferi, A., Wieben, E.D., Dewald, W.G., Whiteman, D.A.H., Bernard, M.E., Spelsberg, T.C., 2002, Primer on Medical Genomics Part II: Background Principles and Methods in Molecular Genetics, *Mayo Clin Proc*, 77: 785-808.
- Terzi, H., Yıldız, M., 2011, Ağır Metaller ve Fitoremediyasyon: Fizyolojik ve Moleküler Mekanizmalar, *Afyon Kocatepe University Journal of Sciences, AKU-J. Sci*, 11 011001 (1-22).
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., ... & Heinen, E., 1999, Housekeeping Genes as Internal Standards: Use and Limits, *Journal of biotechnology*, 75(2), 291-295.
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M., & Schroeder, J.I., 2000, Cadmium and Iron Transport by Members of A Plant Metal Transporter Family in *Arabidopsis* with Homology to Nramp genes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), 4991-4996.
- Tiffin, L.O., 1970, Translocation of Iron Citrate and Phosphorus in Xylem Exudate of Soybean, *Physiol*, 45:280–283.
- TKKY (Toprak Kirliliğinin Kontrolü Yönetmeliği), 2005, Resmi Gazete 31/05/2005, Sayı:25831, Ankara.

- Tong, Y.P., Kneer, R. and Zhu, Y.G., 2004, Vacuolar Compartmentalization: A Second-Generation Approach to Engineering Plants for Phytoremediation, *Trends in Plant Science*, 9, 7-9.
- Torres, M.A., Dangl, J.L., Jones, J.D., 2002, Arabidopsis *gp91 phox* Homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are Required for Accumulation of Reactive Oxygen Intermediates in the Plant Defense Response, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:517-522.
- Torres, M.A. and Dangl, J.L., 2005, Functions of the Respiratory Burst Oxidase in Biotic Interactions, Abiotic Stress and Development, *Current opinion in plant biology*, 8(4), 397-403.
- Tyagi, S., Kramer, F.R., 1996, Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization, *Nat Biotechnol*, 14:303-8.
- Tuomainen, M., Tervahauta, A., Hassinen, V., Schat, H., Koistinen, K.M., Lehesranta, S., ... & Kärenlampi, S., 2010, Proteomics of *Thlaspi caerulescens* Accessions and An Inter-Accession Cross Segregating for Zinc Accumulation, *Journal of experimental botany*, 61(4), 1075-1087.
- Türkoğlu, B., 2006, Toprak Kirlenmesi ve Kirlenmiş Toprakların Islahı, Tez (Msc), Çukurova Üniversitesi, Fenbilimleri Enstitüsü, Toprak Anabilimdalı.
- Ueno, D., Yamaji, N. and Ma, J.F., 2009, Further Characterization of Ferric—Phytosiderophore Transporters *ZmYS1* and *HvYS1* in Maize and Barley, *Journal of experimental botany*, 60(12), 3513-3520.
- Utsunomyia, T., 1980, Japanese Patent, Application No. 55-72959.
- Vajpayee, P., Tripathi, R.D., Rai, U.N., Ali, M.B. and Singh, S.N., 2000, Chromium (VI) Accumulation Reduces Chlorophyll Biosynthesis, Nitrate Reductase Activity and Protein Content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere*, 41(7), 1075-1082.
- Vallee, B.L., 1991, Introduction to Metallothionein, *Methods Enzymol*, 205, 3-7.
- Valverde, F., Ortega, J.M., Losada, M., Serrano, A., 2005, Sugar-Mediated Transcriptional Regulation of the Gap Gene System and Concerted Photosystem II Functional Modulation in the Microalga *Scenedesmus vacuolatus*, *Planta*, 221: 937–952.
- Van Huysen, T., Terry, N., Pilon-Smits, E.A., 2004, Exploring the Selenium Phytoremediation Potential of Transgenic Indian Mustard Overexpressing ATP Sulfurylase or Cystathione Gamma Synthase, *Int J Phytoremediat*, 2004;6:111– 8.
- Van De Mortel, J.E., Villanueva, L.A., Schat, H., Kwekkeboom, J., Coughlan, S., Moerland, P.D., Ver Loren Van Themaat, E., Koornneef, M. and Aarts, M.G.M., 2006, Large Expression Differences in Genes for Iron and Zinc Homeostasis,

- Stress Response, and Lignin Biosynthesis Distinguish Roots of *Arabidopsis thaliana* and the Related Metal Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *Plant Physiology*, 142, 1127-1147.
- Van De Mortel, J.E., 2007, *Heavy Metal Tolerance and Accumulation in Thlaspi caerulescens, A Heavy Metal Hyperaccumulating Plant Species*, Thesis (PhD), Wageningen University.
- Van Der Zaai, B.J., Neuteboom, L.W., Pinas, J.E., Chardonens, A.N., Schat, H., Verkleij, J.A.C. and Hooykaas, P.J.J., 1999, Overexpression of A Novel Arabidopsis Gene Related to Putative Zinc-Transporter Genes from Animals can Lead to Enhanced Zinc Resistance and Accumulation, *Plant Physiology*, 119, 1047-1055.
- Vandenabeele, S., Vanderauwera, S., Vuylsteke, M., Rombauts, S., Langebartels, C., Seidlitz, H.K., Zabeau, M., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F., 2004, Catalase Deficiency Drastically Affects Gene Expression Induced by High Light in *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Journal*, 39, 45–58.
- Vandeleur, R.K., Mayo, G., Shelden, M.C., Gilliam, M., Kaiser, B.N. and Tyerman, S.D., 2009, The Role of Plasma Membrane Intrinsic Protein Aquaporins in Water Transport Through Roots: Diurnal and Drought Stress Responses Reveal Different Strategies Between Isohydric and Anisohydric Cultivars of Grapevine, *Plant Physiology*, 149(1), 445-460.
- Vanlı, Ö., 2007, *Pb, Cd, B Elementlerinin Topraklardan Şelat Destekli Fitoremediyasyon Yöntemiyle Giderilmesi*, Tez (Yüksek Lisans), İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lu, Y.P., Rea, P.A., 1999, AtPCS1, A Phytochelatase Synthase From Arabidopsis: Isolation and *in vitro* Reconstitution, *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:7110–7115.
- Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Leonhardt, N., David, P., Nussaume, L., Vavasseur, A., Richaud, P., 2004, Overexpression of AtHMA4 Enhances Root-to-Shoot Translocation of Zinc and Cadmium and Plant Metal Tolerance, *FEBS (The Federation of European Biochemical Societies) letters*, 576(3), 306-312.
- Vert, G., Grotz, N., Dédaldéchamp, F., Gaymard, F., Guerinot, M.L., Briat, J.F. and Curie, C., 2002, IRT1, An Arabidopsis Transporter Essential For Iron Uptake From the Soil and for Plant Growth, *The Plant Cell Online*, 14(6), 1223-1233.
- Vert, G., Barberon, M., Zelazny, E., Seguela, M., Briat, J.F. and Curie, C., 2009, Arabidopsis IRT2 Cooperates with the High-Affinity Iron Uptake System to Maintain Iron Homeostasis in Root Epidermal Cells, *Planta*, 229: 1171–1179.
- Vestergaard, M., Matsumoto, S., Nishikori, S., Shiraki, K. and Hirata, K., 2008, Chelation of Cadmium Ions by Phytochelatase Synthase: Role of the Cysteine-Rich C-Terminal, *Anal. of Science*, 24, 277-281.

- Vitória, A.P., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2001, Antioxidant Enzymes Responses to Cadmium in Radish Tissues, *Phytochemistry*, 57, 701–710.
- Vranova, E., 2002, Signal Transduction During Oxidative Stress, *J. Exp. Bot.*, 53, 1227–1236.
- Vogel-Mikus, K., Drobne, D., Regvar, M., 2005, Zn, Cd and Pb Accumulation and Arbuscular Mycorrhizal Colonisation of Pennycress *Thlaspi praecox* Wulf. (Brassicaceae) from the Vicinity of A Lead Mine and Smelter in Slovenia, *Environ. Pollut.* 133:233–42.
- Wallace, I.S., Choi, W.G., Roberts, D.M., 2006, The Structure, Function and Regulation of the Nodulin 26-like Intrinsic Protein Family of Plant Aquaglyceroporins, *Biochim. Biophys. Acta*, 1758:1165–75.
- Wang, C., Lyon, D.Y., Hughes, J.B., Bennett, G.N., 2003, Role of Hydroxylamine Intermediates in the Phytotransformation of 2,4,6- Trinitrotoluene by *Myriophyllum aquaticum*, *Environ Sci Technol*, 37:3595–3600.
- Watanabe, M.E., 1997, Phytoremediation on the Brink of Commercialization, *Environ. Sci. Technol.*, 31, 182A–186A.
- Weber, M., Harada, E., Vess, C., Roepenack-Lahaye, E.V. and Clemens, S., 2004, Comparative Microarray Analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* Roots Identifies Nicotianamine Synthase, a ZIP Transporter and Other Genes as Potential Metal Hyperaccumulation Factors, *The Plant Journal*, 37(2), 269–281.
- Weckx, J.E.J. and Clijsters, H.M.M., 1996, Oxidative Damage and Defense Mechanisms in Primary Leaves of *Phaseolus vulgaris* as A Result of Root Assimilation of Toxic Amounts of Copper, *Physiol. Plant*, 96, 506–512.
- Wei, S., Zhou, Q. and Wang, X., 2005, Identification of Weed Plants Excluding the Uptake of Heavy Metals, *Environ. Int.*, 31, 829–834.
- Wenzel, W.W., 2009, Rhizosphere Processes and Management in Plant-Assisted Bioremediation (Phytoremediation) of Soils, *Plant Soil*, 321:385–408.
- Whitcombe, D., Theaker, J., Guy, S.P., Brown, T., Little, S., 1999, Detection of PCR Products Using Self-Probing Amplicons and Fluorescence, *Nature*, 17, 804–807.
- White, P.J., Whitingm, S.N., Baker, A.J.M., Broadley, M.R., 2002, Does Zinc Move Apoplastically to the Xylem in Roots of *Thlaspi caerulescens*? *New Phytol.*, 153, 201–207.
- Willekens, H., Langebartels, C., Tiré, C., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W., 1994, Differential Expression of Catalase Genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.), *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91, 10450–10454.

- Williams, L.E., Pittman, J.K. and Hall, J.L., 2000, Emerging Mechanisms for Heavy Metal Transport in Plants, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1), 104-126.
- Willems, G., Drager, D.B., Courbot, M., Godé, C., Verbruggen, N., Saumitou-Laprade, P., 2007, The Genetic Basis of Zinc Tolerance in the Metallophyte *Arabidopsis halleri* ssp. *halleri* (Brassicaceae): An Analysis of Quantitative Trait Loci., *Genetics*, 176(1), 659-674.
- Wolosiuk, R.A., Buchanan, B.B., 1978, Activation of chloroplast NADP-Linked Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase by the Ferredoxin/Thioredoxin System, *Plant Physiol*, 61: 669–671.
- Wong, M.H., 2003, Ecological Restoration of Mine Degraded Soils, with Emphasis on Metal Contaminated Soils, *Chemosphere*, 50:775-780.
- Wong, C.K.E., Cobbett, C.S., 2009, HMA P-type ATPases are the Major Mechanism for Root-to-Shoot Cd Translocation in *Arabidopsis thaliana*, *New Phytol*, 181:71–78.
- Wong, M.L. and Medrano, J.F., 2005, Real-Time PCR for mRNA Quantitation, *Biotechniques*, 39(1), 75.
- Xing, Y., Cao, Q., Zhang, Q., Qin, L., Jia, W., & Zhang, J., 2013, MKK5 Regulates High Light-Induced Gene Expression of Cu/Zn Superoxide Dismutase 1 and 2 in *Arabidopsis*, *Plant and Cell Physiology*, 54(7), 1217-1227.
- 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.
- Yang, Z. and Chu, C., 2011, “Towards Understanding Plant Response to Heavy Metal Stress,” in *Abiotic Stress in Plants – Mechanisms and Adaptations*, eds A. Shanker and B. Venkateswarlu (Shanghai: InTech). Available at: <http://www.intechopen.com/books/abiotic-stress-in-plants-mechanisms-andadaptations>.
- Yang, X., Feng, Y., He, Z. and Stoffella, P.J., 2005, Molecular Mechanisms of Heavy Metal Hyperaccumulation and Phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18(4), 339-353.
- Yang, T., Poovaiah, B.W., 2003, Calcium/Calmodulin-Mediated Signal Network in Plants, *Trends Plant Sci*, 8:505–512.
- Yeh, C.M., Chien, P.S. and Huang, H.J., 2007, How Do Plants Sense Heavy Metal Pollutants? *Journal of Experimental Botany*, 58(3):659-671.
- Yen, Mr., Tseng, Y.H., Saier, M.H., 2001, Maize Yellow Stripe1, An Iron-Phytosiderophore Uptake Transporter, is A Member of the Oligopeptide Transporter (OPT) Family, *Microbiology*, 147, 2881–2883.

- Yıldız, M., Terzi, H. ve Uruşak, B., 2011, Bitkilerde Krom Toksisitesi ve Hücrel Cevaplar, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 27(2): 163-176.
- Yoltaş, A. ve Karaboz, İ., 2010, DNA Mikroarray Teknolojisi ve Uygulama Alanları, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, Cilt: 08 Sayı: 1 Sayfa: 01-19.
- Yruela, I., 2005, Copper in Plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 145-156.
- Yu, X., Wang, H., Lu, Y., De Ruiter, M., Cariaso, M., Prins, M., Van Tunen, A. and He, Y., 2011, Identification of Conserved and Novel Micrnas that are Responsive to Heat Stress in *Brassica rapa*, *Journal of experimental botany*, err337.
- Yüksel, B., Cevher-Keskin, B., Yıldızhan, Y., Kaplan, E., 2010, Sürdürülebilir Toprak Kullanımını ve Gıda Güvenliğini Arttırmak için Fitoteknolojiler, COST 859 (104 O 211) proje final raporu, Ankara.
- Yüzbaşıoğlu, A., 2008, Dejenerasyon Sürecindeki Kas Dokusunda Housekeeping Genlerin Ekspresyon Düzeyinin İncelenmesi, Tez (Yüksek Lisans), Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü.
- Zhang, Z., Gao, X. and Qiu, B., 2008, Detection of Phytochelatins in the Hyperaccumulator *Sedum alfredii* Exposed to Cadmium and Lead, *Phytochemistry*, 69, 911-918.
- Zelazny, E., Borst, J.W., Muylaert, M., Batoko, H., Hemminga, M.A., Chaumont, F., 2007, FRET Imaging in Living Maize Cells Reveals that Plasmamembrane Aquaporins Interact to Regulate their Subcellular Localization, *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 12359–12364.
- Zenk, M.H., 1996, Heavy Metal Detoxification in Higher Plants, A Review, *Gene*, 179:21–30.
- Zhou, J., Goldsbrough P.B., 1994, Functional Homologs of Fungal Metallothionein Genes from *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 6:875–884.
- Zhou, J.M. and Goldsbrough, P.B., 1995, Structure, Organization and Expression of the Metallothionein Gene Family in *Arabidopsis*, *Molecular and General Genetics*, 248, 318-328.
- Zhou, G., Xu, Y., Li, J., Yang, L., & Liu, J., 2006, Molecular Analyses of the Metallothionein Gene Family in Rice (*Oryza sativa* L.), *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 39(5), 595.
- Zimeri, A.M., Dhankher, O.P., Mccaig, B., Meagher, R.B., 2005, The Plant MT1 Metallothioneins are Stabilized by Binding Cadmiums and are Required for Cadmium Tolerance and Accumulation, *Plant molecular biology*, 58(6), 839-855.

A_thaliana_gene_15227987_ref	-----
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	-----
A_thaliana_gene_15221107_ref	ATGGCTTTGACTACAAAACCTCACCATCTTCAGAGATCTTTCTCTCTCC
A_thaliana_gene_15227987_ref	-----
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	-----TTCCTCAGCTACTACTGTTGAAGCGATTCTCACTAAAACCTC
A_thaliana_gene_15221107_ref	GTCGCGTGTTTCCGGCGAACGATATTGGAATCTGCGCCATCATGTCTGA
A_thaliana_gene_15227987_ref	-----ATGGCTACT
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	GAACACATCGCCTTTATCTCTTTCTCTAGATC-TACTCGCTATGGCTACT
A_thaliana_gene_15221107_ref	GATTCCGTCGCAGCGGTGTCCAATGCTCGTGGTGGCTAAGGAGTGCAGA
	* *
A_thaliana_gene_15227987_ref	ATCACCGTTGTTAAGGCTAGACAGATCTTCGACAGTCGTGGTAATCCAC
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	ATCACCGTTGTTAAGGCTAGACAGATCTTCGACAGTCGTGGTAATCCAC
A_thaliana_gene_15221107_ref	GTGAAAGGAGTGAAAGCGAGACAGATTATTGATAGTAGAGGGAATCCGAC
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *
A_thaliana_gene_15227987_ref	CGTTGAGGTTGATATCCACACGTCAAATGGTAT-TAAGGTTACAGCAGCT
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	CGTTGAGGTTGATATCCACACGTCAAATGGTAT-TAAGGTTACAGCAGCT
A_thaliana_gene_15221107_ref	GGTGGAGGTTGATCTGATTA---CCGATGATCTGTATCGTT---CGGT
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *
A_thaliana_gene_15227987_ref	GTTCCAAGTGGAGCTTCCACTGGTATCTATGAGGCTCTTGAGCTGAGGGA
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	GTTCCAAGTGGAGCTTCCACTGGTATCTATGAGGCTCTTGAGCTGAGGGA
A_thaliana_gene_15221107_ref	GTTCCAAGTGGTGCATCTACCGGGATCTACGAAGCGCTTGAGCTTAGAGA
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *
A_thaliana_gene_15227987_ref	TGGAGG---ATCTGACTACCTTGGAAAGGGTGTATCTAAGGCTGTTGGCA
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	TGGAGG---ATCTGACTACCTTGGAAAGGGTGTATCTAAGGCTGTTGGCA
A_thaliana_gene_15221107_ref	TGGAGACAAGAGCGTCTATGTTGGTAAAGGTGATTACAGGCTATTAAAA
	**** * * * * * * * * * * * * * *
A_thaliana_gene_15227987_ref	ATGTGAACAACATCATCGGGCCAGCACTTATTGGAAAGGACCCAACTCAG
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	ATGTGAACAACATCATCGGGCCAGCACTTATTGGAAAGGACCCAACTCAG
A_thaliana_gene_15221107_ref	ACATCAATGAACCTGTGGCTCCAAACTCATTGGAGTTGACGTTAGGAAC
	* * * * * * * * * * * * * * * * *
A_thaliana_gene_15227987_ref	CAGACTGCTATTGACAACTTCATGGTCCATGAACCTGACGGAACCCAAAA
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	CAGACTGCTATTGACAACTTCATGGTCCATGAACCTGACGGAACCCAAAA
A_thaliana_gene_15221107_ref	CAAGCTGATGTCGATGCTCTTATG---CTGGAACCTGGATGGGACCCAAAA
	* * * * * * * * * * * * * * * * *
A_thaliana_gene_15227987_ref	CGAGTGGGGGTGGTGCAGCAAAAGCTTGGAGCCAATGCGATTCTTGCTG
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	CGAGTGGGGGTGGTGCAGCAAAAGCTTGGAGCCAATGCGATTCTTGCTG
A_thaliana_gene_15221107_ref	CAAGTCG-----AAACTCGGGGCTAATGCGATATTAGGAG
	* * * * * * * * * * * * * * * *
A_thaliana_gene_15227987_ref	TGTCTCTTGCTGTCTGCAAAGCTGGGGCTGTTGTCAGCGGCATTCTCTTA
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	TGTCTCTTGCTGTCTGCAAAGCTGGGGCTGTTGTCAGCGGCATTCTCTTA
A_thaliana_gene_15221107_ref	TGTCATTGAGCGTTTCGAGGCGAGGTGCTGGAGCTAAAGGAGTGCTTTG
	* * * * * * * * * * * * * * * *

A_thaliana_gene_15227987_ref	TACAAGCACATTGCCAACCTTGCTGGTAACCCCAAGATTGTGCTACCAGT
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	TACAAGCACATTGCCAACCTTGCTGGTAACCCCAAGATTGTGCTACCAGT
A_thaliana_gene_15221107_ref	TACAACACATCCAGGAAACATCAGGAACAAAGGAGCTTGTGCATGCCAGT
	***** ***** * * * * * ***** * *****
A_thaliana_gene_15227987_ref	TCCTGCCTTCAACGTCATCAATGGTGGATCCCATGCCGGAACAAGCTTG
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	TCCTGCCTTCAACGTCATCAATGGTGGATCCCATGCCGGAACAAGCTTG
A_thaliana_gene_15221107_ref	TCCTGCATTCAATGTGATCAATGGAGGCAGTCATGCTGGGAATAGTTTGG
	***** ***** * ***** * ***** * * * * *
A_thaliana_gene_15227987_ref	CTATGCAGGAGTTTATGATCCTCCCTGTTGGAGCTGCTTCTTTCAAGGAA
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	CTATGCAGGAGTTTATGATCCTCCCTGTTGGAGCTGCTTCTTTCAAGGAA
A_thaliana_gene_15221107_ref	CTATGCAAGAGTTTATGATACTACCTGTAGGAGCTACCTCATTTCTCGGAG
	***** ***** ***** * ***** ***** * * * * *
A_thaliana_gene_15227987_ref	GCCATGAAGATGGGTGTGGAAGTTTACCACCACCTTGAAGTCTGTGATTAA
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	GCCATGAAGATGGGTGTGGAAGTTTACCACCACCTTGAAGTCTGTGATTAA
A_thaliana_gene_15221107_ref	GCCTTCCAGATGGGAAGTGAAGTTTATCATACATTGAAGGGGATAATCAA
	*** * ***** ***** * ***** * * *
A_thaliana_gene_15227987_ref	GAAGAAGTACGGCCAGGATGCCACAAATGTTGGTGATGAAGGTGGGTTTG
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	GAAGAAGTACGGCCAGGATGCCACAAATGTTGGTGATGAAGGTGGGTTTG
A_thaliana_gene_15221107_ref	AACTAAGTATGGTCAAGATGCTTGTAAATGTCGGAGATGAAGGAGGGTTTG
	* ***** * * ***** ***** * ***** *****
A_thaliana_gene_15227987_ref	CACCAAACATTCAGGAGAACAAGGAGGGTCTTGAATTGCTCAAGACTGCT
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	CACCAAACATTCAGGAGAACAAGGAGGGTCTTGAATTGCTCAAGACTGCT
A_thaliana_gene_15221107_ref	CGCCGAATGTTCAAGATAACAGAGAGGGACTAGTTCTGCTCATAGATGCA
	* * * * ***** * ***** * * ***** ***
A_thaliana_gene_15227987_ref	ATCGAGAAGGCTGGATACACTGGAAGGTTGTCATTGGAATGGATGTTGC
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	ATCGAGAAGGCTGGATACACTGGAAGGTTGTCATTGGAATGGATGTTGC
A_thaliana_gene_15221107_ref	ATTGAAAAGGCCGGTTACACTGGAAGATCAAAATAGGAATGGATGTTGC
	* * ***** * ***** ***** * * ***** *****
A_thaliana_gene_15227987_ref	CGCTTCAGAGTTCTACTCAGAAGACAAGACCTACGACTTGAACCTCAAAG
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	CGCTTCAGAGTTCTACTCAGAAGACAAGACCTACGACTTGAACCTCAAAG
A_thaliana_gene_15221107_ref	TGCATCAGAATTTTTTCATGAAAGATGGTAGATACGATTGAACTTCAAGA
	* * ***** * * ***** * ***** ***** *****
A_thaliana_gene_15227987_ref	AAGAGAACAACAATGGCTCTCAGAAGATTTCTGGTGATGCTCTAAAGGAC
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	AAGAGAACAACAATGGCTCTCAGAAGATTTCTGGTGATGCTCTAAAGGAC
A_thaliana_gene_15221107_ref	AACAGCCAAACGATGGAGCTCACGTACTGTGAGCGAGAGTCTTGCTGAC
	* * * ***** ***** * * * * * ***
A_thaliana_gene_15227987_ref	CTGTACAAGTCCCTTTGTGCTGAGTACCCAATCGTGTCCATTGAGGACCC
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	CTGTACAAGTCCCTTTGTGCTGAGTACCCAATCGTGTCCATTGAGGACCC
A_thaliana_gene_15221107_ref	CTCTACAGAGAATTCATCAAGGATTTCCTCAATTGTCTCTATCGAAGATCC
	* * ***** * * * * ***** * * * * *
A_thaliana_gene_15227987_ref	ATTTGACCAAGATGACTGGGAGCACTATGCTAAGATGACCACTGAGTGTG
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	ATTTGACCAAGATGACTGGGAGCACTATGCTAAGATGACCACTGAGTGTG
A_thaliana_gene_15221107_ref	TTTTGACCAGGATGATTGGAGCTCATGGGCTTC-ATTGCAATCCTCTGTG
	***** ***** * * * * * * ***
A_thaliana_gene_15227987_ref	GAACCGAGGTTGAGATTGTCGGTGATGATTGTTGGTCTACTAACCCCAAG
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	GAACCGAGGTTGAGATTGTCGGTGATGATTGTTGGTCTACTAACCCCAAG
A_thaliana_gene_15221107_ref	GAT----ATCCAACCTCGTGGGAGATGACTTGTTAGTCTACTAACCCGAAG
	* * * * * * ***** ***** ***** ***** ***
A_thaliana_gene_15227987_ref	AGAGTTGCTAAGGCAATCGCAGAGAAGTCTTGCAATGCTCTTCTTTTGAA
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	AGAGTTGCTAAGGCAATCGCAGAGAAGTCTTGCAATGCTCTTCTTTTGAA
A_thaliana_gene_15221107_ref	AGGATAGCTGAAGCTATTAAGAAACAGTCTTGCAATGCTCTACTCTTGAA
	* * * * * * * ***** ***** * *****
A_thaliana_gene_15227987_ref	GGTTAACCAAATCGGATCTGTAACCGAGAGTATCGAGGCAGTTAAGATGT
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	GGTTAACCAAATCGGATCTGTAACCGAGAGTATCGAGGCAGTTAAGATGT
A_thaliana_gene_15221107_ref	GGTTAACCAGATTGGGACAGTCACTGAGTCAATTCAAGCAGCACTTGACT
	***** * * * * * * * * * * *
A_thaliana_gene_15227987_ref	CGAAGAAAGCAGGTTGGGGAGTGATGACCAGCCACAGAAGTGGTGAAACC
LOS2_phosphopyruvate_hydrata	CGAAGAAAGCAGGTTGGGGAGTGATGACCAGCCACAGAAGTGGTGAAACC
A_thaliana_gene_15221107_ref	CAAAAGCTGCAGGCTGGGGTGATGGTTAGTCACAGGAGTGGCGAGACA
	* * ***** ***** * ***** ***** * *

```

A_thaliana_gene_15227987_ref      GAGGACACATTCATTGCTGACTTAGCCGTTGGCTTGTCCTGACAAAAT
LOS2_phosphopyruvate_hydrata      GAGGACACATTCATTGCTGACTTAGCCGTTGGCTTGTCCTGACAAAAT
A_thaliana_gene_15221107_ref      GAGGATAACTTCATCGCAGATCTCTCTGTTGGTTTAGCAAGCGGACAGAT
***** * ***** ** ** * * ***** ** * * ***** **

A_thaliana_gene_15227987_ref      CAAAACCGGTGCTCCTTGCAGATCCGAGCGTCTTGCCAAGTACAACCAGC
LOS2_phosphopyruvate_hydrata      CAAAACCGGTGCTCCTTGCAGATCCGAGCGTCTTGCCAAGTACAACCAGC
A_thaliana_gene_15221107_ref      CAAAACCTGGTGCTCCATGCCGAAGTGAACGATTGTCAAAATACAACCAGC
***** ***** ** ** * * * * *****

A_thaliana_gene_15227987_ref      TTTTGCGTATTGAGGAGGAGTTGGGATCAGAGGCAATTTACGCTGGAGTC
LOS2_phosphopyruvate_hydrata      TTTTGCCTATTGAGGAGGAGTTGGGATCAGAGGCAATTTACGCTGGAGTC
A_thaliana_gene_15221107_ref      TTCTCCGTATCGAAGAGGAACCTCGGC--AATGTGCGCTACGCCGGTGAA
** * ***** ** ***** * ** * * ***** ** *

A_thaliana_gene_15227987_ref      AACTTCCGCAAACCTGTGGAACCCCTACTAA-----
LOS2_phosphopyruvate_hydrata      AACTTCCGCAAACCTGTGGAACCCCTACTAAATGGAGCTTTTAGAAGCAAA
A_thaliana_gene_15221107_ref      GCTTTCCGATCACC-ATGA-----
***** ** **

A_thaliana_gene_15227987_ref      -----
LOS2_phosphopyruvate_hydrata      GTGGTCTTCTTTGTGACGAGGAGAAGATGACCTGAGTTTGATCATTTGCT
A_thaliana_gene_15221107_ref      -----

A_thaliana_gene_15227987_ref      -----
LOS2_phosphopyruvate_hydrata      TTAATTAATAAAACGTTCTGTTTTTGTCTTCTTCTTGTGTTGTTTCTTA
A_thaliana_gene_15221107_ref      -----

A_thaliana_gene_15227987_ref      -----
LOS2_phosphopyruvate_hydrata      CGTCTTTTGTGAACCCCTTTTGGGAAAAGTTACTCATTTTGTAAAGGA
A_thaliana_gene_15221107_ref      -----

A_thaliana_gene_15227987_ref      -----
LOS2_phosphopyruvate_hydrata      AACATGAGAATGCTCTGCCTTTGTGAGGACGGTAGCCCTTATTTCAAT
A_thaliana_gene_15221107_ref      -----

A_thaliana_gene_15227987_ref      -----
LOS2_phosphopyruvate_hydrata      CTAATTCGGCTTTACTCTTTAATCTCTCATGTGATTGTTATGATCTCT
A_thaliana_gene_15221107_ref      -----

A_thaliana_gene_15227987_ref      -----
LOS2_phosphopyruvate_hydrata      GGTGACATACGATGGAGTTTAAACAAAAATAAAATAAGTTCTTCATTATT
A_thaliana_gene_15221107_ref      -----

A_thaliana_gene_15227987_ref      -----
LOS2_phosphopyruvate_hydrata      ATATT
A_thaliana_gene_15221107_ref      -----

```

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment: **PIP2;5**

```

A_thaliana_gene_15233102_ref      -----
PIP2_5_[PLASMA_MEMBRANE_INTR      ACCACATCAATTCTCTCATATCTCTCTCACTTTCGAATATATCTTAAAG
A_thaliana_gene_15224999_ref      -----
A_thaliana_gene_79314872_ref      -----
A_thaliana_gene_15231810_ref      -----

A_thaliana_gene_15233102_ref      -----ATGA
PIP2_5_[PLASMA_MEMBRANE_INTR      ATAACAGAGACACATACTCTTAAGTTTGGTGAAGAATAAGAAGACAAATGA
A_thaliana_gene_15224999_ref      -----ATGA
A_thaliana_gene_79314872_ref      -----ATGG
A_thaliana_gene_15231810_ref      -----ATGG
***

A_thaliana_gene_15233102_ref      CGAAGGAAGTGGTTGGTGATA--AGAGATCTTTCTCCGGGAAA-GACTAT
PIP2_5_[PLASMA_MEMBRANE_INTR      CGAAGGAAGTGGTTGGTGATA--AGAGATCTTTCTCCGGGAAA-GACTAT

```

A_thaliana_gene_15224999_ref
 A_thaliana_gene_79314872_ref
 A_thaliana_gene_15231810_ref

A_thaliana_gene_15233102_ref
 PIP2_5_[PLASMA MEMBRANE INTR
 A_thaliana_gene_15224999_ref
 A_thaliana_gene_79314872_ref
 A_thaliana_gene_15231810_ref

A_thaliana_gene_15233102_ref
 PIP2_5_[PLASMA MEMBRANE INTR
 A_thaliana_gene_15224999_ref
 A_thaliana_gene_79314872_ref
 A_thaliana_gene_15231810_ref

A_thaliana_gene_15233102_ref
 PIP2_5_[PLASMA MEMBRANE INTR
 A_thaliana_gene_15224999_ref
 A_thaliana_gene_79314872_ref
 A_thaliana_gene_15231810_ref

A_thaliana_gene_15233102_ref
 PIP2_5_[PLASMA MEMBRANE INTR
 A_thaliana_gene_15224999_ref
 A_thaliana_gene_79314872_ref
 A_thaliana_gene_15231810_ref

A_thaliana_gene_15233102_ref
 PIP2_5_[PLASMA MEMBRANE INTR
 A_thaliana_gene_15224999_ref
 A_thaliana_gene_79314872_ref
 A_thaliana_gene_15231810_ref

A_thaliana_gene_15233102_ref
 PIP2_5_[PLASMA MEMBRANE INTR
 A_thaliana_gene_15224999_ref
 A_thaliana_gene_79314872_ref
 A_thaliana_gene_15231810_ref

A_thaliana_gene_15233102_ref
 PIP2_5_[PLASMA MEMBRANE INTR
 A_thaliana_gene_15224999_ref
 A_thaliana_gene_79314872_ref
 A_thaliana_gene_15231810_ref

A_thaliana_gene_15233102_ref
 PIP2_5_[PLASMA MEMBRANE INTR
 A_thaliana_gene_15224999_ref
 A_thaliana_gene_79314872_ref
 A_thaliana_gene_15231810_ref

A_thaliana_gene_15233102_ref
 PIP2_5_[PLASMA MEMBRANE INTR
 A_thaliana_gene_15224999_ref
 A_thaliana_gene_79314872_ref
 A_thaliana_gene_15231810_ref

A_thaliana_gene_15233102_ref
 PIP2_5_[PLASMA MEMBRANE INTR
 A_thaliana_gene_15224999_ref
 A_thaliana_gene_79314872_ref
 A_thaliana_gene_15231810_ref

CGAAGGATGAGTTGACGGAGG--AAGAGTCGCTCTCCGGCAAG-GACTAC
 CAAAGGATGTGGAAGCCGTTCCCGGAGAAGGATTTAGACACAGAGACTAT
 CAAAGGATGTGGAAGCCGTTCCCGGAGAAGGATTTAGACACAGAGACTAT
 * * * * *

CAAGACCCACCACCTGAACCTCTATTTCGACGCTACTGAGCTTGGGAAGTG
 CAAGACCCACCACCTGAACCTCTATTTCGACGCTACTGAGCTTGGGAAGTG
 TTAGACCCACCAGCTGTGAAGACGTTTCGAGGTGAGAGAGCTCAAGAAAGTG
 CAAGATCCGCCACCAGCTCCGTTTATTTGATGGAGCGGAGCTAAAGAAGTG
 CAAGATCCGCCACCAGCTCCGTTTATTTGATGGAGCGGAGCTAAAGAAGTG
 * * * * *

GTCTTTCTACAGAGCTCTCATCGCTGAGTTTCATAGCCACTCTCCTTTTCC
 GTCTTTCTACAGAGCTCTCATCGCTGAGTTTCATAGCCACTCTCCTTTTCC
 GTCTTTCTACAGAGCTGTCTCATCGCTGAGTTTCATAGCTCTTGTCTTTTCC
 GTCTTTCTACAGAGCAGTTATCGCAGAGTTTCGTAGCCACTCTCCTTTTCT
 GTCTTTCTACAGAGCAGTTATCGCAGAGTTTCGTAGCCACTCTCCTTTTCT
 * * * * *

TCTATGTCACTATTATGACTGTCATCGGTTACAAGAGCCAGACCGAT-CC
 TCTATGTCACTATTATGACTGTCATCGGTTACAAGAGCCAGACCGAT-CC
 TATACGTGACTGTTTTGACAGTCATCGGCTTAAAGAGCCAGACTGATATC
 TATACATCACCGTTTTGACAGTCATCGGTTACAAGATTTCAGTCCGATACT
 TATACATCACCGTTTTGACAGTCATCGGTTACAAGATTTCAGTCCGATACT
 * * * * *

AGCCCTGAATCCTGACCAGTGTACAGGCGTTGGCGTCTTGGTATCGCAT
 AGCCCTGAATCCTGACCAGTGTACAGGCGTTGGCGTCTTGGTATCGCAT
 AACGCCGGCGCGGAGCT-TGTGCCAGTGTGCGCTTCTAGGCATCTCTT
 GATGCCGGTGGCGTAGAT-TGCGCGGAGTTGGAATCCTCGGTATCGCTT
 GATGCCGGTGGCGTAGAT-TGCGCGGAGTTGGAATCCTCGGTATCGCTT
 * * * * *

GGGCCTTTGGTGGCATGATCTTCATCCTCGTCTACTGCACCGCCGGCATC
 GGGCCTTTGGTGGCATGATCTTCATCCTCGTCTACTGCACCGCCGGCATC
 GGGCCTTTGGTGGCATGATCTTCATCCTCGTCTACTGCACCGCCGGCATC
 GGGCCTTTGGTGGTATGATCTTCATCCTCGTCTACTGCACCGCCGGTATC
 GGGCCTTTGGTGGTATGATCTTCATCCTCGTCTACTGCACCGCCGGTATC
 * * * * *

TCTGGTGGGCATATTAATCCGGCAGTGACTTTTGGGCTGTTGTTGGCTCG
 TCTGGTGGGCATATTAATCCGGCAGTGACTTTTGGGCTGTTGTTGGCTCG
 TCTGGTGGACACATCAATCCCGCGGTGACGTTTGGGCTATTCTTAGCTAG
 TCTGGTGGTCACATTAACCCAGCGGTGACATTTGGGCTATTCTTGGCACG
 TCTGGTGGTCACATTAACCCAGCGGTGACATTTGGGCTATTCTTGGCACG
 * * * * *

GAAAGTGACGTTGGTGAGAGCAGTGATGTACATGGTGGCTCAGTGCCCTCG
 GAAAGTGACGTTGGTGAGAGCAGTGATGTACATGGTGGCTCAGTGCCCTCG
 CAAGGTATCATTTGGTTAGAGCTGTGTCGTACATGGTGGCTCAGTGCTCTCG
 TAAAGTGTCGTTTACCTAGGGCCCTATTGTACATAATCGCTCAGTGTTTGG
 TAAAGTGTCGTTTACCTAGGGCCCTATTGTACATAATCGCTCAGTGTTTGG
 * * * * *

GTGCCATTTGTGGTGTGGCTTTGGTCAAGGCTTCCAGTCTGCTTACTTC
 GTGCCATTTGTGGTGTGGCTTTGGTCAAGGCTTCCAGTCTGCTTACTTC
 GAGCCACTTTGTGGAGTTGGTTTGGTCAAAGCTTCCAGTCGACTTATTAC
 GTGCCATTTGTGGAGTTGGTTTGTCAAAGCTTCCAAAGCTCTTACTAC
 GTGCCATTTGTGGAGTTGGTTTGTCAAAGCTTCCAAAGCTCTTACTAC
 * * * * *

ACCCGCTACGGTGGTGGCGCAAATGGTCTCTCTGACGGTTACAGCATCGG
 ACCCGCTACGGTGGTGGCGCAAATGGTCTCTCTGACGGTTACAGCATCGG
 AACCGCTACGGTGGTGGAGCCAACATGCTCTCCGACGGATACAATGTTGG
 ACCCGTTACGGAGGTGGAGCCAACCTCTAGCCGATGGCTACAGCACAGG
 ACCCGTTACGGAGGTGGAGCCAACCTCTAGCCGATGGCTACAGCACAGG
 * * * * *

CACCGGTGTTGCAGCCGAGATCATTGGTACATTCGTCTTAGTCTACACCG
 CACCGGTGTTGCAGCCGAGATCATTGGTACATTCGTCTTAGTCTACACCG
 CGTTGGGTTGGTGTGAGATTATCGGCACCTTTGTCTCTGTCTACACCG
 GACCGGTCTAGCCGAGAGATCATTGGTACTTTGTTCTTGTCTACACCG
 GACCGGTCTAGCCGAGAGATCATTGGTACTTTGTTCTTGTCTACACCG
 * * * * *

A_thaliana_gene_15233102_ref
PIP2_5_[PLASMA MEMBRANE_INTR
A_thaliana_gene_15224999_ref
A_thaliana_gene_79314872_ref
A_thaliana_gene_15231810_ref

A_thaliana_gene_15233102_ref
PIP2_5_[PLASMA MEMBRANE_INTR
A_thaliana_gene_15224999_ref
A_thaliana_gene_79314872_ref
A_thaliana_gene_15231810_ref

A_thaliana_gene_15233102_ref
PIP2_5_[PLASMA MEMBRANE_INTR
A_thaliana_gene_15224999_ref
A_thaliana_gene_79314872_ref
A_thaliana_gene_15231810_ref

A_thaliana_gene_15233102_ref
PIP2_5_[PLASMA MEMBRANE_INTR
A_thaliana_gene_15224999_ref
A_thaliana_gene_79314872_ref
A_thaliana_gene_15231810_ref

A_thaliana_gene_15233102_ref
PIP2_5_[PLASMA MEMBRANE_INTR
A_thaliana_gene_15224999_ref
A_thaliana_gene_79314872_ref
A_thaliana_gene_15231810_ref

A_thaliana_gene_15233102_ref
PIP2_5_[PLASMA MEMBRANE_INTR
A_thaliana_gene_15224999_ref
A_thaliana_gene_79314872_ref
A_thaliana_gene_15231810_ref

A_thaliana_gene_15233102_ref
PIP2_5_[PLASMA MEMBRANE_INTR
A_thaliana_gene_15224999_ref
A_thaliana_gene_79314872_ref
A_thaliana_gene_15231810_ref

A_thaliana_gene_15233102_ref
PIP2_5_[PLASMA MEMBRANE_INTR
A_thaliana_gene_15224999_ref
A_thaliana_gene_79314872_ref
A_thaliana_gene_15231810_ref

A_thaliana_gene_15233102_ref
PIP2_5_[PLASMA MEMBRANE_INTR
A_thaliana_gene_15224999_ref
A_thaliana_gene_79314872_ref
A_thaliana_gene_15231810_ref

A_thaliana_gene_15233102_ref
PIP2_5_[PLASMA MEMBRANE_INTR
A_thaliana_gene_15224999_ref
A_thaliana_gene_79314872_ref
A_thaliana_gene_15231810_ref

A_thaliana_gene_15233102_ref
PIP2_5_[PLASMA MEMBRANE_INTR
A_thaliana_gene_15224999_ref

TCTTCTCTGCCACTGATCCCAAGAGGAGTGCGCGTGACTCTCACGTTCCCT
TCTTCTCTGCCACTGATCCCAAGAGGAGTGCGCGTGACTCTCACGTTCCCT
TCTTCTCCGCTACCGACCCTAAGCGAAATGCCCGTGACTCTCACATTCCCT
TCTTCTCTGCCACTGACCCCAACGCTAGTGCCAGAGACTCCCAAGTTCCG
TCTTCTCTGCCACTGACCCCAACGCTAGTGCCAGAGACTCCCAAGTTCCG
***** *

GTATTGGCTCCATTGCCAATTGGATTGTCAGTGTTTCATCGTTCACTTAGC
GTATTGGCTCCATTGCCAATTGGATTGTCAGTGTTTCATCGTTCACTTAGC
GTATTAGCACCATTTGCCAATTGGATTTCCTGTTTCATGGTTCATTAGC
GTGTTGGCGCCACTTCCAATCGGATTGTCCTGTTTCATGGTACATTGGC
GTGTTGGCGCCACTTCCAATCGGATTGTCCTGTTTCATGGTACATTGGC
* *

TACAATCCCAATCACGGGCACTGTTATCAACCTGCAAGAAGTCTCGGAG
TACAATCCCAATCACGGGCACTGTTATCAACCTGCAAGAAGTCTCGGAG
CACAATTCCAATTACTGGCACCGGAATAAACCCGGCTAGGAGTTTGGAG
TACCATTCCCATTTACCGGAACCGGAATTAACCCGGCAAGGAGTTTCGGAG
TACCATTCCCATTTACCGGAACCGGAATTAACCCGGCAAGGAGTTTCGGAG
* *

CTGCAATCATCTACAACAAGGACAAAGCTTGGGACCATCATTTGGATATTC
CTGCAATCATCTACAACAAGGACAAAGCTTGGGACCATCATTTGGATATTC
CTGCCGTATCTACAACAATCAAAAGGCTTGGGATGATCAGTGGATCTTC
CTGCCGTAATCTACAACAAGAGCAAGCCATGGGATGACCACTGGATATTT
CTGCCGTAATCTACAACAAGAGCAAGCCATGGGATGACCACTGGATATTT
***** * ***** * * * * * * * * * * * * * * * *

TGGGTGGGTCCGTTTGTCTGGTGCAGCCATCGCAGCTTTCTACCATCAGTT
TGGGTGGGTCCGTTTGTCTGGTGCAGCCATCGCAGCTTTCTACCATCAGTT
TGGGTCCGTCCATTTGTGGGTGCAGCCATTGCAGCATTTTACCATCAGTT
TGGGTGGGACCATTTCATTGGAGCTGCGATAGCTGCATTCTACCACCAATT
TGGGTGGGACCATTTCATTGGAGCTGCGATAGCTGCATTCTACCACCAATT
***** *

TGTGTTGAGGGCTGGTGCATTAAGGCGCTCGGGTCTTTCAGGAGCCAGC
TGTGTTGAGGGCTGGTGCATTAAGGCGCTCGGGTCTTTCAGGAGCCAGC
TGTGTTGAGAGCTGGTGCATTAAGGCGCTATGGGTGAGTCAGGAGCCAGC
CGTTCTGAGAGCTTCAGGTTCTAAGTCTCTTGGATCATTCAGAAGTGCTG
CGTTCTGAGAGCTTCAGGTTCTAAGTCTCTTGGATCATTCAGAAGTGCTG
* *

CTCACGTTTAA-----
CTCACGTTTAACTTTGATATGCTCTTCCCTGAGTACATCAAGAGAGAAA
TTCATGAGCTCCATGCTTAA-----
CCAACGTCTAA-----
CCAACGTCTAA-----
* *

AAGAGAAGATAATAAGAGAGGCTTGTAAATTTATCTGTGTAGACGGTTG

GAGCCAAGTGACGTGTAGTACTAGTATCTAATTTCTAGCTTTGGTGAGGA

GAGATATTTTGAAGTGTCGCTTGCGGGCCAACTTTGAATTGCTACTTCTA

TGATTAAATCTATGTCTCTACTCTTACTATTGAAGATTGCTCTATTAT

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment: **CAT3**

```

A_thaliana_gene_18394888_ref -----
A_thaliana_gene_186478702_re -----
A_thaliana_gene_79318278_ref -----
CAT3_[CATALASE_3]_catalase TAGGATCTCAACACTCTCACTAAACCAAATCCTCAAAGCCTATTGCG
A_thaliana_gene_42571565_ref -----

A_thaliana_gene_18394888_ref -----ATGGATCCTTACAAGTATCGTCCTT
A_thaliana_gene_186478702_re -----
A_thaliana_gene_79318278_ref -----ATGGATCCTTACAAGTATCGTCCTT
CAT3_[CATALASE_3]_catalase GGATCATCAACCTTCTATCATCACCATGGATCCTTACAAGTATCGTCCTT
A_thaliana_gene_42571565_ref -----ATGGATCCTTACAAGTATCGTCCTT

A_thaliana_gene_18394888_ref CAAGCGCGTACAACGCCCCATTCTACACCACAAACGGTGGTGCTCCAGTC
A_thaliana_gene_186478702_re -----
A_thaliana_gene_79318278_ref CAAGCGCGTACAACGCCCCATTCTACACCACAAACGGTGGTGCTCCAGTC
CAT3_[CATALASE_3]_catalase CAAGCGCGTACAACGCCCCATTCTACACCACAAACGGTGGTGCTCCAGTC
A_thaliana_gene_42571565_ref CAAGCGCGTACAACGCCCCATTCTACACCACAAACGGTGGTGCTCCAGTC

A_thaliana_gene_18394888_ref TCCAACAACATCTCTTCCCTCACCATCGGAGAAAGAGGTCCGGTTCTTCT
A_thaliana_gene_186478702_re -----
A_thaliana_gene_79318278_ref TCCAACAACATCTCTTCCCTCACCATCGGAGAAAGAGGTCCGGTTCTTCT
CAT3_[CATALASE_3]_catalase TCCAACAACATCTCTTCCCTCACCATCGGAGAAAGAGGTCCGGTTCTTCT
A_thaliana_gene_42571565_ref TCCAACAACATCTCTTCCCTCACCATCGGAGAAAGAGGTCCGGTTCTTCT

A_thaliana_gene_18394888_ref TGAGGATTATCATTTGATCGAGAAGGTTGCTAATTTACCAGAGAGAGGA
A_thaliana_gene_186478702_re -----
A_thaliana_gene_79318278_ref TGAGGATTATCATTTGATCGAGAAGGTTGCTAATTTACCAGAGAGAGGA
CAT3_[CATALASE_3]_catalase TGAGGATTATCATTTGATCGAGAAGGTTGCTAATTTACCAGAGAGAGGA
A_thaliana_gene_42571565_ref TGAGGATTATCATTTGATCGAGAAGGTTGCTAATTTACCAGAGAGAGGA

A_thaliana_gene_18394888_ref TCCCTGAGAGAGTGGTTCATGCTAGAGGAATCAGTGCTAAGGGTTTCTTT
A_thaliana_gene_186478702_re -----
A_thaliana_gene_79318278_ref TCCCTGAGAGAGTGGTTCATGCTAGAGGAATCAGTGCTAAGGGTTTCTTT
CAT3_[CATALASE_3]_catalase TCCCTGAGAGAGTGGTTCATGCTAGAGGAATCAGTGCTAAGGGTTTCTTT
A_thaliana_gene_42571565_ref TCCCTGAGAGAGTGGTTCATGCTAGAGGAATCAGTGCTAAGGGTTTCTTT

A_thaliana_gene_18394888_ref GAAGTCACCCATGACATTTCAAACCTCACTTGTGCTGATTTTCTCAGAGC
A_thaliana_gene_186478702_re -----
A_thaliana_gene_79318278_ref GAAGTCACCCATGACATTTCAAACCTCACTTGTGCTGATTTTCTCAGAGC
CAT3_[CATALASE_3]_catalase GAAGTCACCCATGACATTTCAAACCTCACTTGTGCTGATTTTCTCAGAGC
A_thaliana_gene_42571565_ref GAAGTCACCCATGACATTTCAAACCTCACTTGTGCTGATTTTCTCAGAGC

A_thaliana_gene_18394888_ref CCCTGGTGTTCAAACCTCCGGTTATTGTCCGTTTCTCCACCGTTGTCCACG
A_thaliana_gene_186478702_re -----
A_thaliana_gene_79318278_ref CCCTGGTGTTCAAACCTCCGGTTATTGTCCGTTTCTCCACCGTTGTCCACG
CAT3_[CATALASE_3]_catalase CCCTGGTGTTCAAACCTCCGGTTATTGTCCGTTTCTCCACCGTTGTCCACG
A_thaliana_gene_42571565_ref CCCTGGTGTTCAAACCTCCGGTTATTGTCCGTTTCTCCACCGTTGTCCACG

A_thaliana_gene_18394888_ref AACGTGCCAGTCCTGAAACCATGAGGGATATTCGTGGTTTTGCTGTCAAG
A_thaliana_gene_186478702_re -----ATGAGGGATATTCGTGGTTTTGCTGTCAAG
A_thaliana_gene_79318278_ref AACGTGCCAGTCCTGAAACCATGAGGGATATTCGTGGTTTTGCTGTCAAG
CAT3_[CATALASE_3]_catalase AACGTGCCAGTCCTGAAACCATGAGGGATATTCGTGGTTTTGCTGTCAAG
A_thaliana_gene_42571565_ref AACGTGCCAGTCCTGAAACCATGAGGGATATTCGTGGTTTTGCTGTCAAG
*****

A_thaliana_gene_18394888_ref TTTTACACCAGAGAGGGAAACTTTGATCCTTGTGGGAACAACACTCCGGT
A_thaliana_gene_186478702_re TTTTACACCAGAGAGGGAAACTTTGATCCTTGTGGGAACAACACTCCGGT
A_thaliana_gene_79318278_ref TTTTACACCAGAGAGGGAAACTTTGATCCTTGTGGGAACAACACTCCGGT
CAT3_[CATALASE_3]_catalase TTTTACACCAGAGAGGGAAACTTTGATCCTTGTGGGAACAACACTCCGGT
A_thaliana_gene_42571565_ref TTTTACACCAGAGAGGGAAACTTTGATCCTTGTGGGAACAACACTCCGGT
*****

A_thaliana_gene_18394888_ref GTTCTTCATCCGTGATGGGATTCAGTTCCTCCGATGTTGTCCACGCGTTGA
A_thaliana_gene_186478702_re GTTCTTCATCCGTGATGGGATTCAGTTCCTCCGATGTTGTCCACGCGTTGA

```

A_thaliana_gene_79318278_ref
CAT3_[CATALASE_3]__catalase
A_thaliana_gene_42571565_ref

A_thaliana_gene_18394888_ref
A_thaliana_gene_186478702_ref
A_thaliana_gene_79318278_ref
CAT3_[CATALASE_3]__catalase
A_thaliana_gene_42571565_ref

A_thaliana_gene_18394888_ref
A_thaliana_gene_186478702_ref
A_thaliana_gene_79318278_ref
CAT3_[CATALASE_3]__catalase
A_thaliana_gene_42571565_ref

A_thaliana_gene_18394888_ref
A_thaliana_gene_186478702_ref
A_thaliana_gene_79318278_ref
CAT3_[CATALASE_3]__catalase
A_thaliana_gene_42571565_ref

A_thaliana_gene_18394888_ref
A_thaliana_gene_186478702_ref
A_thaliana_gene_79318278_ref
CAT3_[CATALASE_3]__catalase
A_thaliana_gene_42571565_ref

A_thaliana_gene_18394888_ref
A_thaliana_gene_186478702_ref
A_thaliana_gene_79318278_ref
CAT3_[CATALASE_3]__catalase
A_thaliana_gene_42571565_ref

A_thaliana_gene_18394888_ref
A_thaliana_gene_186478702_ref
A_thaliana_gene_79318278_ref
CAT3_[CATALASE_3]__catalase
A_thaliana_gene_42571565_ref

A_thaliana_gene_18394888_ref
A_thaliana_gene_186478702_ref
A_thaliana_gene_79318278_ref
CAT3_[CATALASE_3]__catalase
A_thaliana_gene_42571565_ref

A_thaliana_gene_18394888_ref
A_thaliana_gene_186478702_ref
A_thaliana_gene_79318278_ref
CAT3_[CATALASE_3]__catalase
A_thaliana_gene_42571565_ref

A_thaliana_gene_18394888_ref
A_thaliana_gene_186478702_ref
A_thaliana_gene_79318278_ref
CAT3_[CATALASE_3]__catalase
A_thaliana_gene_42571565_ref

A_thaliana_gene_18394888_ref
A_thaliana_gene_186478702_ref
A_thaliana_gene_79318278_ref
CAT3_[CATALASE_3]__catalase
A_thaliana_gene_42571565_ref

GTTCTTCATCCGTGATGGGATTCAGTTCCTCGGATGTTGTCCACGCGTTGA
GTTCTTCATCCGTGATGGGATTCAGTTCCTCGGATGTTGTCCACGCGTTGA
GTTCTTCATCCGTGATGGGATTCAGTTCCTCGGATGTTGTCCACGCGTTGA

AACCTAACCCGAAAAACAAACATCCAAGAGTACTGGAGGATTCTGGACTAC
AACCTAACCCGAAAAACAAACATCCAAGAGTACTGGAGGATTCTGGACTAC
AACCTAACCCGAAAAACAAACATCCAAGAGTACTGGAGGATTCTGGACTAC
AACCTAACCCGAAAAACAAACATCCAAGAGTACTGGAGGATTCTGGACTAC
AACCTAACCCGAAAAACAAACATCCAAGAGTACTGGAGGATTCTGGACTAC

ATGTCCCACCTTGCCCTGAGAGTTTGCTCACATGGTGTGGATGTTTGATGA
ATGTCCCACCTTGCCCTGAGAGTTTGCTCACATGGTGTGGATGTTTGATGA
ATGTCCCACCTTGCCCTGAGAGTTTGCTCACATGGTGTGGATGTTTGATGA
ATGTCCCACCTTGCCCTGAGAGTTTGCTCACATGGTGTGGATGTTTGATGA
ATGTCCCACCTTGCCCTGAGAGTTTGCTCACATGGTGTGGATGTTTGATGA

TGTTGGTATTCCACAAGATTACAGGCACATGGAGGGTTTCGGTGTCCACA
TGTTGGTATTCCACAAGATTACAGGCACATGGAGGGTTTCGGTGTCCACA
TGTTGGTATTCCACAAGATTACAGGCACATGGAGGGTTTCGGTGTCCACA
TGTTGGTATTCCACAAGATTACAGGCACATGGAGGGTTTCGGTGTCCACA
TGTTGGTATTCCACAAGATTACAGGCACATGGAGGGTTTCGGTGTCCACA

CCTACACTCTTATTGCCAAATCTGGAAAAGTTCTCTTTGTGAAGTTCCAC
CCTACACTCTTATTGCCAAATCTGGAAAAGTTCTCTTTGTGAAGTTCCAC
CCTACACTCTTATTGCCAAATCTGGAAAAGTTCTCTTTGTGAAGTTCCAC
CCTACACTCTTATTGCCAAATCTGGAAAAGTTCTCTTTGTGAAGTTCCAC
CCTACACTCTTATTGCCAAATCTGGAAAAGTTCTCTTTGTGAAGTTCCAC

TGGAACCAACTTGTGGGATCAAGAATCTGACTGATGAAGAGGCCAAGGT
TGGAACCAACTTGTGGGATCAAGAATCTGACTGATGAAGAGGCCAAGGT
TGGAACCAACTTGTGGGATCAAGAATCTGACTGATGAAGAGGCCAAGGT
TGGAACCAACTTGTGGGATCAAGAATCTGACTGATGAAGAGGCCAAGGT
TGGAACCAACTTGTGGGATCAAGAATCTGACTGATGAAGAGGCCAAGGT

TGTTGGAGGAGCCAATCACAGCCACGCCACTAAGGATCTCCACGATGCCA
TGTTGGAGGAGCCAATCACAGCCACGCCACTAAGGATCTCCACGATGCCA
TGTTGGAGGAGCCAATCACAGCCACGCCACTAAGGATCTCCACGATGCCA
TGTTGGAGGAGCCAATCACAGCCACGCCACTAAGGATCTCCACGATGCCA
TGTTGGAGGAGCCAATCACAGCCACGCCACTAAGGATCTCCACGATGCCA

TTGCATCTGGCAACTACCCCGAGTGGAAACTTTTCATCCAGACCATGGAT
TTGCATCTGGCAACTACCCCGAGTGGAAACTTTTCATCCAGACCATGGAT
TTGCATCTGGCAACTACCCCGAGTGGAAACTTTTCATCCAGACCATGGAT
TTGCATCTGGCAACTACCCCGAGTGGAAACTTTTCATCCAGACCATGGAT
TTGCATCTGGCAACTACCCCGAGTGGAAACTTTTCATCCAGACCATGGAT

CCTGCAGATGAGGATAAGTTTGACTTTGACCCACTTGATGTGACCAAGAT
CCTGCAGATGAGGATAAGTTTGACTTTGACCCACTTGATGTGACCAAGAT
CCTGCAGATGAGGATAAGTTTGACTTTGACCCACTTGATGTGACCAAGAT
CCTGCAGATGAGGATAAGTTTGACTTTGACCCACTTGATGTGACCAAGAT
CCTGCAGATGAGGATAAGTTTGACTTTGACCCACTTGATGTGACCAAGAT

CTGGCCTGAGGATATTTTGCCCTCTGCAACCGGTTGGTCGCTTGGTTCTGA
CTGGCCTGAGGATATTTTGCCCTCTGCAACCGGTTGGTCGCTTGGTTCTGA
CTGGCCTGAGGATATTTTGCCCTCTGCAACCGGTTGGTCGCTTGGTTCTGA
CTGGCCTGAGGATATTTTGCCCTCTGCAACCGGTTGGTCGCTTGGTTCTGA
CTGGCCTGAGGATATTTTGCCCTCTGCAACCGGTTGGTCGCTTGGTTCTGA

ACAGGACCATTGACAATTTCTTCAATGAAACTGAGCAGCTTGCGTTCAAC
ACAGGACCATTGACAATTTCTTCAATGAAACTGAGCAGCTTGCGTTCAAC
ACAGGACCATTGACAATTTCTTCAATGAAACTGAGCAGCTTGCGTTCAAC
ACAGGACCATTGACAATTTCTTCAATGAAACTGAGCAGCTTGCGTTCAAC
ACAGGACCATTGACAATTTCTTCAATGAAACTGAGCAGCTTGCGTTCAAC

```

A_thaliana_gene_18394888_ref
A_thaliana_gene_186478702_ref
A_thaliana_gene_79318278_ref
CAT3_[CATALASE_3]_catalase
A_thaliana_gene_42571565_ref

CCGGGTCTTGTGGTTCTCTGGAATCTACTACTCAGACGACAAGCTGCTCCA
CCGGGTCTTGTGGTTCTCTGGAATCTACTACTCAGACGACAAGCTGCTCCA
CCGGGTCTTGTGGTTCTCTGGAATCTACTACTCAGACGACAAGCTGCTCCA
CCGGGTCTTGTGGTTCTCTGGAATCTACTACTCAGACGACAAGCTGCTCCA
CCGGGTCTTGTGGTTCTCTGGAATCTACTACTCAGACGACAAGCTGCTCCA
*****

A_thaliana_gene_18394888_ref
A_thaliana_gene_186478702_ref
A_thaliana_gene_79318278_ref
CAT3_[CATALASE_3]_catalase
A_thaliana_gene_42571565_ref

GTGTAGGATCTTTGCTTATGGTGACACTCAGAGACATCGCCTTGGACCGA
GTGTAGGATCTTTGCTTATGGTGACACTCAGAGACATCGCCTTGGACCGA
GTGTAGGATCTTTGCTTATGGTGACACTCAGAGACATCGCCTTGGACCGA
GTGTAGGATCTTTGCTTATGGTGACACTCAGAGACATCGCCTTGGACCGA
GTGTAGGATCTTTGCTTATGGTGACACTCAGAGACATCGCCTTGGACCGA
*****

A_thaliana_gene_18394888_ref
A_thaliana_gene_186478702_ref
A_thaliana_gene_79318278_ref
CAT3_[CATALASE_3]_catalase
A_thaliana_gene_42571565_ref

ATTATTTGCAGCTTCCAGTCAATGCTCCCAAATGTGCTCACCACAACAAT
ATTATTTGCAGCTTCCAGTCAATGCTCCCAAATGTGCTCACCACAACAAT
ATTATTTGCAGCTTCCAGTCAATGCTCCCAAATGTGCTCACCACAACAAT
ATTATTTGCAGCTTCCAGTCAATGCTCCCAAATGTGCTCACCACAACAAT
ATTATTTGCAGCTTCCAGTCAATGCTCCCAAATGTGCTCACCACAACAAT
*****

A_thaliana_gene_18394888_ref
A_thaliana_gene_186478702_ref
A_thaliana_gene_79318278_ref
CAT3_[CATALASE_3]_catalase
A_thaliana_gene_42571565_ref

CACCATGAAGGTTTTATGAACCTTCATGCACAGAGATGAGGAGATCAATTA
CACCATGAAGGTTTTATGAACCTTCATGCACAGAGATGAGGAGATCAATTA
CACCATGAAGGTTTTATGAACCTTCATGCACAGAGATGAGGAGATCAATTA
CACCATGAAGGTTTTATGAACCTTCATGCACAGAGATGAGGAGATCAATTA
CACCATGAAGGTTTTATGAACCTTCATGCACAGAGATGAGGAGATCAATTA
*****

A_thaliana_gene_18394888_ref
A_thaliana_gene_186478702_ref
A_thaliana_gene_79318278_ref
CAT3_[CATALASE_3]_catalase
A_thaliana_gene_42571565_ref

CTACCCCTCAAAGTTTGATCCTGTCCGCTGCGCTGAGAAAGTTCCCACCC
CTACCCCTCAAAGTTTGATCCTGTCCGCTGCGCTGAGAAAGTTCCCACCC
CTACCCCTCAAAGTTTGATCCTGTCCGCTGCGCTGAGAAAGTTCCCACCC
CTACCCCTCAAAGTTTGATCCTGTCCGCTGCGCTGAGAAAGTTCCCACCC
CTACCCCTCAAAGTTTGATCCTGTCCGCTGCGCTGAGAAAGTTCCCACCC
*****

A_thaliana_gene_18394888_ref
A_thaliana_gene_186478702_ref
A_thaliana_gene_79318278_ref
CAT3_[CATALASE_3]_catalase
A_thaliana_gene_42571565_ref

CTACAAACTCCTACACTGGAATTCGAACAAAG-----
CTACAAACTCCTACACTGGAATTCGAACAAAG-----
CTACAAACTCCTACACTGGAATTCGAACAAAG-----
CTACAAACTCCTACACTGGAATTCGAACAAAGGTCGGATTCTGCCATGC
CTACAAACTCCTACACTGGAATTCGAACAAAGGTCGGATTCTGCCATGC
*****

A_thaliana_gene_18394888_ref
A_thaliana_gene_186478702_ref
A_thaliana_gene_79318278_ref
CAT3_[CATALASE_3]_catalase
A_thaliana_gene_42571565_ref

-----
-----
-----
CTTCTCTAAATCTTCAAATCCTAAACTCAAGTTTATTAGAAATATTGGTGC
CTTCTCTAA-----

A_thaliana_gene_18394888_ref
A_thaliana_gene_186478702_ref
A_thaliana_gene_79318278_ref
CAT3_[CATALASE_3]_catalase
A_thaliana_gene_42571565_ref

-----TGCGTCATCAAGAAAGAGA
-----TGCGTCATCAAGAAAGAGA
-----TGCGTCATCAAGAAAGAGA
TAAGAAAACCTTTTAATTGCTAATGTTGCAGTGCGTCATCAAGAAAGAGA
-----

A_thaliana_gene_18394888_ref
A_thaliana_gene_186478702_ref
A_thaliana_gene_79318278_ref
CAT3_[CATALASE_3]_catalase
A_thaliana_gene_42571565_ref

ACAACTTCAAACAGGCTGGAGACAGGTACAGATCATGGGCACCAGACAGG
ACAACTTCAAACAGGCTGGAGACAGGTACAGATCATGGGCACCAGACAGG
ACAACTTCAAACAGGCTGGAGACAGGTACAGATCATGGGCACCAGACAGG
ACAACTTCAAACAGGCTGGAGACAGGTACAGATCATGGGCACCAGACAGG
-----

A_thaliana_gene_18394888_ref
A_thaliana_gene_186478702_ref
A_thaliana_gene_79318278_ref
CAT3_[CATALASE_3]_catalase
A_thaliana_gene_42571565_ref

CAAGACAGGTTTGTTAAGAGATGGGTGGAGATTCTATCGGAGCCACGTCT
CAAGACAGGTTTGTTAAGAGATGGGTGGAGATTCTATCGGAGCCACGTCT
CAAGACAGGTTTGTTAAGAGATGGGTGGAGATTCTATCGGAGCCACGTCT
CAAGACAGGTTTGTTAAGAGATGGGTGGAGATTCTATCGGAGCCACGTCT
-----

A_thaliana_gene_18394888_ref
A_thaliana_gene_186478702_ref
A_thaliana_gene_79318278_ref

CACCCACGAGATCCGCGGCATCTGGATCTCTTACTGGTCTCAGGCTGATC
CACCCACGAGATCCGCGGCATCTGGATCTCTTACTGGTCTCAGGCTGATC
CACCCACGAGATCCGCGGCATCTGGATCTCTTACTGGTCTCAG-----

```

```

CAT3 [CATALASE_3] catalase      CACCCACGAGATCCGCGGCATCTGGATCTCTTACTGGTCTCAGGCTGATC
A_thaliana_gene_42571565_ref    -----

A_thaliana_gene_18394888_ref    GATCCTTGGGACAGAACTTGCAAGCCGTCTGAACGTGAGGCCAAGCATC
A_thaliana_gene_186478702_re    GATCCTTGGGACAGAACTTGCAAGCCGTCTGAACGTGAGGCCAAGCATC
A_thaliana_gene_79318278_ref    -----AAACTTGCAAGCCGTCTGAACGTGAGGCCAAGCATC
CAT3 [CATALASE_3] catalase      GATCCTTGGGACAGAACTTGCAAGCCGTCTGAACGTGAGGCCAAGCATC
A_thaliana_gene_42571565_ref    -----

A_thaliana_gene_18394888_ref    TAG-----
A_thaliana_gene_186478702_re    TAG-----
A_thaliana_gene_79318278_ref    TAG-----
CAT3 [CATALASE_3] catalase      TAGAGGCCAATCTCCATATAAGCTCAGTCTATGTGAGGTACAATCAATCT
A_thaliana_gene_42571565_ref    -----

A_thaliana_gene_18394888_ref    -----
A_thaliana_gene_186478702_re    -----
A_thaliana_gene_79318278_ref    -----
CAT3 [CATALASE_3] catalase      CATCGATCTATCATCGCTTGGTCGTTAAATCCGTCAAAAAGATAATCACA
A_thaliana_gene_42571565_ref    -----

A_thaliana_gene_18394888_ref    -----
A_thaliana_gene_186478702_re    -----
A_thaliana_gene_79318278_ref    -----
CAT3 [CATALASE_3] catalase      TGTGTTGTTGTTTCTTGTCTATATAATAATAATGCTTGAATCCCAAAA
A_thaliana_gene_42571565_ref    -----

A_thaliana_gene_18394888_ref    -----
A_thaliana_gene_186478702_re    -----
A_thaliana_gene_79318278_ref    -----
CAT3 [CATALASE_3] catalase      CTCATGTTTCCTTCCTTTCTACTCTCACTGTCTTTGTAATCTCTTTTAC
A_thaliana_gene_42571565_ref    -----

A_thaliana_gene_18394888_ref    -----
A_thaliana_gene_186478702_re    -----
A_thaliana_gene_79318278_ref    -----
CAT3 [CATALASE_3] catalase      AATAAATCAATGTTTCTTGAAGCAGTAAACAATTTCTAAGATTTATGGTG
A_thaliana_gene_42571565_ref    -----

A_thaliana_gene_18394888_ref    -----
A_thaliana_gene_186478702_re    -----
A_thaliana_gene_79318278_ref    -----
CAT3 [CATALASE_3] catalase      GTCGTTATACATATTATTAATTCAGGAAAAAAAGAGAAGATACCGTAAT
A_thaliana_gene_42571565_ref    -----

A_thaliana_gene_18394888_ref    -----
A_thaliana_gene_186478702_re    -----
A_thaliana_gene_79318278_ref    -----
CAT3 [CATALASE_3] catalase      TGAACATGTATTATTTTAAGGAGAATCCTGAAATGGATCAACAATTGTCT
A_thaliana_gene_42571565_ref    -----

```

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment: **CSD1**

```

CSD1_Copper/Zinc_Superox_de    -----CCCAGCTTTTGGACC
A_thaliana_gene_145323810_re    -----
A_thaliana_gene_15223944_ref    -----
A_thaliana_gene_18401659_ref    ATGGCTGCCACCAACACAATCCTCGCATTCTCATCTCCTTCTCGTCTTCT

CSD1_Copper/Zinc_Superox_de    TCGTGGGCTATATAGAAAACAAGTAACCAAGAGAGACGAAGCAAAAACA
A_thaliana_gene_145323810_re    -----
A_thaliana_gene_15223944_ref    -----
A_thaliana_gene_18401659_ref    CATTCCTCCTTCCTCCAATCCTTCAACTCTCCGTTCTCTTCCGCGGCG

```



```

CSD1_Copper/Zinc_Superox_de_      AGACCTGGGTTTGGTAGTTGTGTGTATCTTCTGGTGTGTGGCTAAAAACC
A_thaliana_gene_145323810_re_      -----
A_thaliana_gene_15223944_ref       -----
A_thaliana_gene_18401659_ref       -----

```

```

CSD1_Copper/Zinc_Superox_de_      TATGAGCTTAGTGTGGCTCAAAGCATTTTTAATTCAGACAGAAAACAGAG
A_thaliana_gene_145323810_re_      -----
A_thaliana_gene_15223944_ref       -----
A_thaliana_gene_18401659_ref       -----

```

```

CSD1_Copper/Zinc_Superox_de_      AAAATTCGGTACTTTTATTATTTCATGAATAAAAAAGAGTTGATTTACTG
A_thaliana_gene_145323810_re_      -----
A_thaliana_gene_15223944_ref       -----
A_thaliana_gene_18401659_ref       -----

```

```

CSD1_Copper/Zinc_Superox_de_      TTATAAGTTCTTAAAGGTAACAAGAGTCCTGGATATGGTACTTCAATATG
A_thaliana_gene_145323810_re_      -----
A_thaliana_gene_15223944_ref       -----
A_thaliana_gene_18401659_ref       -----

```

```

CSD1_Copper/Zinc_Superox_de_      CGAATGTTTTT
A_thaliana_gene_145323810_re_      -----
A_thaliana_gene_15223944_ref       -----
A_thaliana_gene_18401659_ref       -----

```

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment: **GAPC1**

```

GAPC1_Phosphorylating_Glycer      CCCTCCTCCACGTTCTTCTCTCTTTTAAATAACCTCTTCACGGAACCCCTT
A_thaliana_gene_15229231_ref       -----
A_thaliana_gene_15222848_ref       -----
A_thaliana_gene_145323882_re       -----

```

```

GAPC1_Phosphorylating_Glycer      CTCACTCACCTATCTCACTCTAAAATCTCTCTCTGCCAATCTCATCTTCA
A_thaliana_gene_15229231_ref       -----
A_thaliana_gene_15222848_ref       -----
A_thaliana_gene_145323882_re       -----

```

```

GAPC1_Phosphorylating_Glycer      ACCTCTCTCTAACTCTCGTTTTTCGATTCTACAATGGCTGACAAGAAGATT
A_thaliana_gene_15229231_ref       -----
A_thaliana_gene_15222848_ref       -----
A_thaliana_gene_145323882_re       -----
                                     ATGGCTGACAAGAAGATT
                                     ATGGCTGACAAGAAGATC
                                     ATGGCTGACAAGAAGATC
                                     *****

```

```

GAPC1_Phosphorylating_Glycer      AGGATCGGAATCAACGGATTTCGGAAGAATTGGTCGTTTGGTTGCTAGAGT
A_thaliana_gene_15229231_ref       -----
A_thaliana_gene_15222848_ref       -----
A_thaliana_gene_145323882_re       -----
AGGATCGGAATCAACGGATTTCGGAAGAATTGGTCGTTTGGTTGCTAGAGT
** *****

```

```

GAPC1_Phosphorylating_Glycer      TGTTCCTCAGAGGGACGATGTTGAGCTCGTCGCTGTCAACGACCCCTTCA
A_thaliana_gene_15229231_ref       -----
A_thaliana_gene_15222848_ref       -----
A_thaliana_gene_145323882_re       -----
TGTTCCTCAGAGGGACGATGTTGAGCTCGTCGCTGTCAACGACCCCTTCA
TGTTCCTCAGAGGGATGATGTTGAGCTCGTCGCTGTTAACGATCCTTTCA
*****

```

```

GAPC1_Phosphorylating_Glycer      TCACTACTGAGTACATGACCTACATGTTCAAGTACGACAGTGTTACCGGT
A_thaliana_gene_15229231_ref       -----
A_thaliana_gene_15222848_ref       -----
A_thaliana_gene_145323882_re       -----
TCACTACTGAGTACATGACCTACATGTTCAAGTACGACAGTGTTACCGGT
TCACCACCGAGTACATGACATACATGTTTAAAGTATGACAGTGTTACCGGT
TCACCACCGAGTACATGACATACATGTTTAAAGTATGACAGTGTTACCGGT
**** *

```

```

GAPC1_Phosphorylating_Glycer      CAATGGAAACACAATGAACTCAAGATCAAGGATGAGAAGACCCCTTCTCTT
A_thaliana_gene_15229231_ref       -----
A_thaliana_gene_15222848_ref       -----
A_thaliana_gene_145323882_re       -----
CAATGGAAACACAATGAACTCAAGATCAAGGATGAGAAGACCCCTTCTCTT
CAGTGGAAGCACCATGAGCTTAAGGTGAAGGATGACAAAACCTCTTCTCTT
CAGTGGAAGCACCATGAGCTTAAGGTGAAGGATGACAAAACCTCTTCTCTT
** *****

```

```

GAPC1_Phosphorylating_Glycer      CGGTGAGAAGCCAGTCACTGTTTTTCGGCATCAGGAACCCCTGAGGATATCC
A_thaliana_gene_15229231_ref       -----

```

A_thaliana_gene_15222848_ref A_thaliana_gene_145323882_re	CGGTGAGAAGCCAGTCACTGTTTTTCGGCATCAGGAACCCCTGAGGACATCC CGGTGAGAAGCCAGTCACTGTTTTTCGGCATCAGGAACCCCTGAGGACATCC *****
GAPC1_Phosphorylating_Glycer A_thaliana_gene_15229231_ref A_thaliana_gene_15222848_ref A_thaliana_gene_145323882_re	CATGGGCCGAGGCTGGAGCTGACTACGTTGTTGAGTCTACTGGTGTCTTC CATGGGCCGAGGCTGGAGCTGACTACGTTGTTGAGTCTACTGGTGTCTTC CATGGGGTGAGGCTGGAGCTGACTTTGTTGTTGAGTCTACTGGTGTCTTC CATGGGGTGAGGCTGGAGCTGACTTTGTTGTTGAGTCTACTGGTGTCTTC *****
GAPC1_Phosphorylating_Glycer A_thaliana_gene_15229231_ref A_thaliana_gene_15222848_ref A_thaliana_gene_145323882_re	ACTGACAAAGACAAGGCTGCAGCTCACTTGAAGGGTGGTGCCAAGAAGGT ACTGACAAAGACAAGGCTGCAGCTCACTTGAAGGGTGGTGCCAAGAAGGT ACTGACAAAGACAAGGCTGCTGCTCACTTGAAGGGTGGTGCTAAAAAGGT ACTGACAAAGACAAGGCTGCTGCTCACTTGAAGGGTGGTGCTAAAAAGGT *****
GAPC1_Phosphorylating_Glycer A_thaliana_gene_15229231_ref A_thaliana_gene_15222848_ref A_thaliana_gene_145323882_re	TGTTATCTCTGCCCCAGCAAAGACGCTCCAATGTTTGTGTTGGTGTCA TGTTATCTCTGCCCCAGCAAAGACGCTCCAATGTTTGTGTTGGTGTCA TGTCATCTCTGCCCCAAGCAAAGATGCGCCCATGTTGCTGTTGGTGTCA TGTCATCTCTGCCCCAAGCAAAGATGCGCCCATGTTGCTGTTGGTGTCA ***
GAPC1_Phosphorylating_Glycer A_thaliana_gene_15229231_ref A_thaliana_gene_15222848_ref A_thaliana_gene_145323882_re	ACGAGCACGAATACAAGTCCGACCTTGACATTGTCTCCAACGCTAGCTGC ACGAGCACGAATACAAGTCCGACCTTGACATTGTCTCCAACGCTAGCTGC ACGAGCACGAGT----- ACGAGCACGAGTACAAGTCTGACCTTGACATTGTTTCCAACGCTAGTTGC *****
GAPC1_Phosphorylating_Glycer A_thaliana_gene_15229231_ref A_thaliana_gene_15222848_ref A_thaliana_gene_145323882_re	ACCACTAACTGCCTTGCTCCCTTGCCAAGGTTATCAATGACAGATTGG ACCACTAACTGCCTTGCTCCCTTGCCAAGGTTATCAATGACAGATTGG -----TTGG ACCACTAACTGCCTTGCTCCTTGGCCAAGGTTATTAATGACAGGTTGG ****
GAPC1_Phosphorylating_Glycer A_thaliana_gene_15229231_ref A_thaliana_gene_15222848_ref A_thaliana_gene_145323882_re	AATTGTTGAGGGTCTTATGACTACAGTCCACTCAATCACTGCTACTCAGA AATTGTTGAGGGTCTTATGACTACAGTCCACTCAATCACTGCTACTCAGA CATTGTTGAGGGACTCATGACCACTGTCCACTCTATCACTGCTACTCAGA CATTGTTGAGGGACTCATGACCACTGTCCACTCTATCACTGCTACTCAGA *****
GAPC1_Phosphorylating_Glycer A_thaliana_gene_15229231_ref A_thaliana_gene_15222848_ref A_thaliana_gene_145323882_re	AGACTGTTGATGGGCCTTCAATGAAGGACTGGAGAGGTGGAAGAGCTGCT AGACTGTTGATGGGCCTTCAATGAAGGACTGGAGAGGTGGAAGAGCTGCT AGACAGTTGATGGTCCATCAATGAAGGACTGGAGAGGTGGAAGAGCTGCT AGACAGTTGATGGTCCATCAATGAAGGACTGGAGAGGTGGAAGAGCTGCT ****
GAPC1_Phosphorylating_Glycer A_thaliana_gene_15229231_ref A_thaliana_gene_15222848_ref A_thaliana_gene_145323882_re	TCATTCAACATTATTCCCAGCAGCACTGGAGCTGCCAAGGCTGTGCGAAA TCATTCAACATTATTCCCAGCAGCACTGGAGCTGCCAAGGCTGTGCGAAA TCCTTCAACATTATTCTAGCAGCACTGGTGCCGCCAAGGCTGTTGGGAA TCCTTCAACATTATTCTAGCAGCACTGGTGCCGCCAAGGCTGTTGGGAA **
GAPC1_Phosphorylating_Glycer A_thaliana_gene_15229231_ref A_thaliana_gene_15222848_ref A_thaliana_gene_145323882_re	GGTGCTTCCAGCTCTTAACGAAAGTTGACTGGAATGTCTTCCGTGTCC GGTGCTTCCAGCTCTTAACGAAAGTTGACTGGAATGTCTTCCGTGTCC AGTGTGCCATCCCTCAATGGAATAATGACCGGAATGTCTTCCGTGTTC AGTGTGCCATCCCTCAATGGAATAATGACCGGAATGTCTTCCGTGTTC ***
GAPC1_Phosphorylating_Glycer A_thaliana_gene_15229231_ref A_thaliana_gene_15222848_ref A_thaliana_gene_145323882_re	CAACCGTTGATGTCTCAGTTGTTGACCTTACTGTGCACTCGAGAAAGCT CAACCGTTGATGTCTCAGTTGTTGACCTTACTGTGCACTCGAGAAAGCT CAACCGTTGATGTCTCAGTTGTTGATCTCACCCTTAGACTTGAGAAAGCT CAACCGTTGATGTCTCAGTTGTTGATCTCACCCTTAGACTTGAGAAAGCT *****
GAPC1_Phosphorylating_Glycer A_thaliana_gene_15229231_ref A_thaliana_gene_15222848_ref A_thaliana_gene_145323882_re	GCTACCTACGATGAAATCAAAAGGCTATCAAGGAGGAATCCGAAGGCAA GCTACCTACGATGAAATCAAAAAGGCTATCAAGGAGGAATCCGAAGGCAA GCAACATACGACGAAATCAAGAAGGCCATCAAGGAGGAATCTGAAGGCAA GCAACATACGACGAAATCAAGAAGGCCATCAAGGAGGAATCTGAAGGCAA **
GAPC1_Phosphorylating_Glycer A_thaliana_gene_15229231_ref A_thaliana_gene_15222848_ref A_thaliana_gene_145323882_re	ACTCAAGGGAATCCTTGATACACCGAGGATGATGTTGTCTCAACTGACT ACTCAAGGGAATCCTTGATACACCGAGGATGATGTTGTCTCAACTGACT AATGAAGGGAATTTTGGGATACACTGAGGATGATGTTGTGTCTACCGACT AATGAAGGGAATTTTGGGATACACTGAGGATGATGTTGTGTCTACCGACT

GAPC1 Phosphorylating Glycer

A_thaliana_gene_15229231_ref
A_thaliana_gene_15222848_ref
A_thaliana_gene_145323882_re

GAPC1 Phosphorylating Glycer
A_thaliana_gene_15229231_ref
A_thaliana_gene_15222848_ref
A_thaliana_gene_145323882_re

GAPC1 Phosphorylating Glycer
A_thaliana_gene_15229231_ref
A_thaliana_gene_15222848_ref
A_thaliana_gene_145323882_re

GAPC1 Phosphorylating Glycer
A_thaliana_gene_15229231_ref
A_thaliana_gene_15222848_ref
A_thaliana_gene_145323882_re

GAPC1 Phosphorylating Glycer
A_thaliana_gene_15229231_ref
A_thaliana_gene_15222848_ref
A_thaliana_gene_145323882_re

GAPC1 Phosphorylating Glycer
A_thaliana_gene_15229231_ref
A_thaliana_gene_15222848_ref
A_thaliana_gene_145323882_re

GAPC1 Phosphorylating Glycer
A_thaliana_gene_15229231_ref
A_thaliana_gene_15222848_ref
A_thaliana_gene_145323882_re

GAPC1 Phosphorylating Glycer
A_thaliana_gene_15229231_ref
A_thaliana_gene_15222848_ref
A_thaliana_gene_145323882_re

GAPC1 Phosphorylating Glycer
A_thaliana_gene_15229231_ref
A_thaliana_gene_15222848_ref
A_thaliana_gene_145323882_re

GAPC1 Phosphorylating Glycer
A_thaliana_gene_15229231_ref
A_thaliana_gene_15222848_ref
A_thaliana_gene_145323882_re

GAPC1 Phosphorylating Glycer
A_thaliana_gene_15229231_ref
A_thaliana_gene_15222848_ref
A_thaliana_gene_145323882_re

GAPC1 Phosphorylating Glycer
A_thaliana_gene_15229231_ref
A_thaliana_gene_15222848_ref
A_thaliana_gene_145323882_re

* *

TCGTTGGCGACAACAGGTCGAGCATTTTGTACGCCAAGGCTGGAATTGCA
TCGTTGGCGACAACAGGTCGAGCATTTTGTACGCCAAGGCTGGAATTGCA
TTGTTGGTGACAACAGGTCAGCATTTTCGATGCCAAGGCTGGGATTGCA
TTGTTGGTGACAACAGGTCAGCATTTTCGATGCCAAGGCTGGGATTGCA
* *

TTGAGCGACAAGTTTGTGAAATTGGTGTTCATGGTACGACAACGAATGGGG
TTGAGCGACAAGTTTGTGAAATTGGTGTTCATGGTACGACAACGAATGGGG
TTGAGCGACAAGTTTGTGAAATTGGTGTTCATGGTACGACAACGAATGGGG
TTGAGCGACAAGTTTGTGAAATTGGTGTTCATGGTACGACAACGAATGGGG
* *

TTACAGTTCCCGTGTGGTCGACTTGATCGTCCACATGTCAAAGGCCTAAG
TTACAGTTCCCGTGTGGTCGACTTGATCGTCCACATGTCAAAGGCCTAAG
TTACAGTTCCCGTGTGGTCGACTTGATCGTCCACATGTCAAAGGCCTAAG
TTACAGTTCCCGTGTGGTCGACTTGATCGTCCACATGTCAAAGGCCTAAG
* *

CTAAGAAGCAGATCTCGAATGATAGGGAGTGGAAGTCATCTGTTTCATCC

CCTTTTATGGTCTGAATTTGTCGTTTTCGAATAAAATTTCTTTGAACTTG

GAACTTTTTTTTTTTTTTGGTTTTCTTAATTCATTCATGTGAGGTGATG

GGAGTTTGTAGACCGATGTTTTACTGGAAGCCCTTTGTTTTTGGCTTTTG

ATATATTGAGTTAACGTTATGGTTTTCAATTTTGTTCACCTCTCTTTTT

AACTATATACTAAATCAAATCTGAACGAAAAATGAACTAAATGAGCTCC

CGTTGATGATGACGTAGCAAATCTAAGGAAGTAGAGGTGTACACTTATTA

ATCTAGCTTCTCTAGTTTTTCGAATAAAAGTTTCTAAGTGAACCTATAT

TTTATGTTTGCATTCTCATTTATGCGAGTTTGTAGACTGATGTTTGAAT


```

GAPC1 Phosphorylating Glycer
A_thaliana_gene_15229231_ref
A_thaliana_gene_15222848_ref
A_thaliana_gene_145323882_re
GAAAAGTATTTTCATGTTGCCTTTTGTT
-----
-----
-----
-----

```

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment: **RBOH1**

```

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2 RESPIRATORY BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref
-----
-----
-----
ATACACAAAAATCAAACACCTTTTGAGAGCGGTTATTTTTCTCTATCAA
-----

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2 RESPIRATORY BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref
-----
-----
-----
CTAATACAGTAACCTTACGGGTGTTTATTTGTATAGATCTCTGTGGTTTT
-----

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2 RESPIRATORY BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref
-----
-----
-----
CTTGGCCAAATCTAGTGAGATCTTTTGGTTTCTCGAATTCGATGAAAAAT
-----ATGAAAAAT

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2 RESPIRATORY BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref
-----
-----
-----
GAGACGAGGCAATTCAAGTAACGACCATGAACTTGGGATTCTACGAGGAG
GAGACGAGGCAATTCAAGTAACGACCATGAACTTGGGATTCTACGAGGAG

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2 RESPIRATORY BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref
-----
-----
-----
CTAGAGTGAGTTTTGAAGTGTACAGGAGGCTATCACCTCTGATGCAGAGGCC
CTAACTCGGACACCAACTCGGACACGGAGAGCATCGCTAGCGACCGTGGT
CTAACTCGGACACCAACTCGGACACGGAGAGCATCGCTAGCGACCGTGGT

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2 RESPIRATORY BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref
-----
-----
-----
GGAACAGCGGACCAATGAGCGGTGGTCAATTACCACC---GATCTATAA
GCCTTTAGCGGTCGCTTGGCCGGCCTAAACGTGCGTCCAAGAAAAACGC
GCCTTTAGCGGTCGCTTGGCCGGCCTAAACGTGCGTCCAAGAAAAACGC
*

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2 RESPIRATORY BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref
AGAG-----AGTGAGCTTTGAAGTAAAGGACACAGAGGCGGAGAAGAGC
AGAG-----AGTGAGCTTTGAAGTAAAGGACACAGAGGCGGAGAAGAGC
AAAAC----CGGGGAAGTCCAGATTCACTG-CTGAGAACAGTCAGAGAAC
AAGATTCCGCCGACGATCTTCCCAAGAGAAGCAATAGTGTTGCTGGCGGCC
AAGATTCCGCCGACGATCTTCCCAAGAGAAGCAATAGTGTTGCTGGCGGCC
*      *      *      *      *      *      *      *

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2 RESPIRATORY BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref
AGCAGCGAGATACTGAGCG---GATCTTTGCCGTCGACCTACCGAA--AT
AGCAGCGAGATACTGAGCG---GATCTTTGCCGTCGACCTACCGAA--AT
ACGTACGGCACCATACGTG---GACCTC-ACGGTAGATGTACAAGACGAT
GTGGTGATGACGATGAGTACGTGGAGATCAGCTAGACATCAGGGACGAC
GTGGTGATGACGATGAGTACGTGGAGATCAGCTAGACATCAGGGACGAC
*      *      *      *      *      *      *      *

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2 RESPIRATORY BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref
CCGG---CGATGGAAAACGTTGGAAAACGCGGTGGATGATGGATCGAGCGT
CCGG---CGATGGAAAACGTTGGAAAACGCGGTGGATGATGGATCGAGCGT
ACAGT--CTCTGTACATAGCTTGAAA---ATGGAAGGTGGATCTAGCGT
TCGGTGGCCGTCCATAGTGTCCAACAAGCAGCTGGAGGTGGAGGCCACCT
TCGGTGGCCGTCCATAGTGTCCAACAAGCAGCTGGAGGTGGAGGCCACCT
*      *      *      *      *      *      *      *

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2 RESPIRATORY BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref
GAAGAACAATCCGAAACTTGATATGCAGAAACAGAACGGTTT-----
GAAGAACAATCCGAAACTTGATATGCAGAAACAGAACGGTTT-----
TGAAGAGAGTCCGGAGCTTACTTTGCTGAAACGAAACCGTCTTGAGAAGA
GGAGGAC---CCGGAGCTAGCCCTTCTTACGAAGAAGACTCTCGAGAGCA
GGAGGAC---CCGGAGCTAGCCCTTCTTACGAAGAAGACTCTCGAGAGCA
*      *      *      *      *      *      *      *

```

A_thaliana_gene_334186908_re
 A_thaliana_gene_30686753_ref
 A_thaliana_gene_15241361_ref
 RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
 A_thaliana_gene_15238842_ref

-----GGTGAAGTGGTT-----CAAG---AAGTGC
 -----GGTGAAGTGGTT-----CAAG---AAGTGC
 AAACAACGGTGGTGAACGTTTGGCGTCTGTTTCTCACGAGCTTAAGCGT
 GCCTCAACAACACCACCTCCTTATCTTTCTCCGAAGCACCTCCTCACGC
 GCCTCAACAACACCACCTCCTTATCTTTCTCCGAAGCACCTCCTCACGC
 * ** * *

A_thaliana_gene_334186908_re
 A_thaliana_gene_30686753_ref
 A_thaliana_gene_15241361_ref
 RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
 A_thaliana_gene_15238842_ref

TTGACAATGGTATCTGGAGA-----GAGTAAGGCAC
 TTGACAATGGTATCTGGAGA-----GAGTAAGGCAC
 TTGACATCTGTTTCTGGTGGTATTGGTGG-----AAGAAAGCCGC
 ATCAAGAACGCTCCCGCGAGCTCCGCCGCGTGTCTCTAGACGTCCCTC
 ATCAAGAACGCTCCCGCGAGCTCCGCCGCGTGTCTCTAGACGTCCCTC
 * * * ** * * * *

A_thaliana_gene_334186908_re
 A_thaliana_gene_30686753_ref
 A_thaliana_gene_15241361_ref
 RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
 A_thaliana_gene_15238842_ref

CTCGA-----TTGGACCGGTCAAGTCAACGGCCGGTCAGGCCCT
 CTCGA-----TTGGACCGGTCAAGTCAACGGCCGGTCAGGCCCT
 CTCGACCGGCTAA--GTTAGACCGGACTAAATCCGCCGCGAGTCAAGCGT
 CCCGGCCGTGCGGCGGTTTGACCGCACGAGCTCCGCCGCCATCCACGCAC
 CCCGCCGTGCGGCGGTTTGACCGCACGAGCTCCGCCGCCATCCACGCAC
 * * ** ***** * * ** * ** ** **

A_thaliana_gene_334186908_re
 A_thaliana_gene_30686753_ref
 A_thaliana_gene_15241361_ref
 RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
 A_thaliana_gene_15238842_ref

TGAAAGGGCTCAAGATCATCAGTAAGACCGACGGTAACGTCGCTGGACC
 TGAAAGGGCTCAAGATCATCAGTAAGACCGACGGTAACGTCGCTGGACC
 TGAAGGGACTTAAGTTCATTAGTAAACCGACGGTGGCGCCGGTTGGTCT
 TCAAAGGTCTCAAGTTCATTG-----CCACCAAGACGGCCGCATGGCCG
 TCAAAGGTCTCAAGTTCATTG-----CCACCAAGACGGCCGCATGGCCG
 * * * * * * * * ** * * * * * *

A_thaliana_gene_334186908_re
 A_thaliana_gene_30686753_ref
 A_thaliana_gene_15241361_ref
 RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
 A_thaliana_gene_15238842_ref

GTCGTGGAGAAGCGGTACTTGAAGATCACGGCCAATACTGATGGATTGCT
 GTCGTGGAGAAGCGGTACTTGAAGATCACGGCCAATACTGATGGATTGCT
 GCCGTGGAGAAGCGGTTTAATCAGATTACCGCGACTACCGGTGGACTACT
 GCCGTGCGACCAACGTTTCGATAAACTCTCCGCTGATTCCAACGGCTCTT
 GCCGTGCGACCAACGTTTCGATAAACTCTCCGCTGATTCCAACGGCTCTT
 * * * * * * * * * * * * * * * *

A_thaliana_gene_334186908_re
 A_thaliana_gene_30686753_ref
 A_thaliana_gene_15241361_ref
 RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
 A_thaliana_gene_15238842_ref

GCTTCGGTCAAAATTCGGTGAATGCATAGGGATGAAC-----TCAAAG
 GCTTCGGTCAAAATTCGGTGAATGCATAGGGATGAAC-----TCAAAG
 TCTTCGGACAAAAGTTTCGGTGAATGCATAGGAATGACT-----TCAAAG
 ACTCTCTGCCAAGTTTTGGGAATGCTTAGGAATGAATAAGGAATCTAAAG
 ACTCTCTGCCAAGTTTTGGGAATGCTTAGGAATGAATAAGGAATCTAAAG
 * * * * * * * * * * * * *

A_thaliana_gene_334186908_re
 A_thaliana_gene_30686753_ref
 A_thaliana_gene_15241361_ref
 RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
 A_thaliana_gene_15238842_ref

AATTTGCCTTGGAATGTTTGACGCCTTAGCTAGAAAAAGTCACTTGAAA
 AATTTGCCTTGGAATGTTTGACGCCTTAGCTAGAAAAAGTCACTTGAAA
 ATTTTGCTTTGGAATGTTTGATGCATTGGCTAGAGAAGGAATATAACA
 ACTTCGCTAGCCAGCTCTTTAGAGCATTAGCTCGCCGGAATAACGCTCC
 ACTTCGCTAGCCAGCTCTTTAGAGCATTAGCTCGCCGGAATAACGCTCTCC
 * * * * * * * * * * * * * * *

A_thaliana_gene_334186908_re
 A_thaliana_gene_30686753_ref
 A_thaliana_gene_15241361_ref
 RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
 A_thaliana_gene_15238842_ref

GGGGATGTGATTACTGAGACCGAGTTGAAGAAATTTGGGAACAAATAAA
 GGGGATGTGATTACTGAGACCGAGTTGAAGAAATTTGGGAACAAATAAA
 GGGGAAGTGATTGATGGAGATCAACTAAAGGAGTTTGGGAACAAATAAA
 GGCGATGCAATCACAAAGGAACAGCTTAGGATATTCTGGGAACAGATCTC
 GGCGATGCAATCACAAAGGAACAGCTTAGGATATTCTGGGAACAGATCTC
 ** * * * * * * * * * * ** * * *

A_thaliana_gene_334186908_re
 A_thaliana_gene_30686753_ref
 A_thaliana_gene_15241361_ref
 RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
 A_thaliana_gene_15238842_ref

TGATAAAAGCTTTGATTCAAGGCTTATCACGTTCTTTGACTTGATGGATA
 TGATAAAAGCTTTGATTCAAGGCTTATCACGTTCTTTGACTTGATGGATA
 TGATCAAAGTTTGTATTCTCGGCTTAAGACATTCTTTGACATGGTGGATA
 AGACGAAAGCTTTGTATGCCAACTCCAAGTCTTTTTTGACATGGTGGACA
 AGACGAAAGCTTTGTATGCCAACTCCAAGTCTTTTTTGACATGGTGGACA
 ** ***** ***** * ** ** ***** * ***** *

A_thaliana_gene_334186908_re
 A_thaliana_gene_30686753_ref
 A_thaliana_gene_15241361_ref
 RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
 A_thaliana_gene_15238842_ref

AAGACTCGGATGGTAGACTTACGGAAGACGAAGTTAGAGAGATCATCAAG
 AAGACTCGGATGGTAGACTTACGGAAGACGAAGTTAGAGAGATCATCAAG
 AAGACTGATGGTAGACTTACAGAAGACGAAGTTAGAGAGATTATCAGT
 AAGATGAAGATGGGCGAGTAACAGAAGAAGAGGTGGCTGAGATTATTAGT
 AAGATGAAGATGGGCGAGTAACAGAAGAAGAGGTGGCTGAGATTATTAGT
 ***** * * * * * * * ***** * *

A_thaliana_gene_334186908_re
 A_thaliana_gene_30686753_ref
 A_thaliana_gene_15241361_ref

CTTAGTTCTTCTGCCAATCATCTGTCATGCATCCAAAACAAGGCAGATGA
 CTTAGTTCTTCTGCCAATCATCTGTCATGCATCCAAAACAAGGCAGATGA
 CTTAGTGCTTCTGCGAATAATCTATCTACAATACAGAAGAGAGCTGATGA

RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref

CTTAGTGCTTCTGCAAACAAGCTCTCAAATATTTCAAAGCAAGCCAAAGA
CTTAGTGCTTCTGCAAACAAGCTCTCAAATATTTCAAAGCAAGCCAAAGA

ATATGCAGCAATGATAATGGAAGAGCTTGACCCCTGATCATATGGGATACA
ATATGCAGCAATGATAATGGAAGAGCTTGACCCCTGATCATATGGGATACA
ATATGCAGCAATGATAATGGAAGAGCTTGATCCAGACAATATAGGATACA
ATATGCGGCACTGATAATGGAAGAGTTGGACCCAGACAATGCTGGGTTTA
ATATGCGGCACTGATAATGGAAGAGTTGGACCCAGACAATGCTGGGTTTA

TCATGATGGAGAGTCTAAAGAAATTGCTTCTGCAAGCGGAAACAAAATCT
TCATGGT-----AAACT--TTCT-----
TCATGTTGGAGAGTCTTGAGACTCTGCTTTTGCAAGCGGCAACA-----
TTATGATCGAAAACCTGGAAATGTTGCTATTACAAGCAC-----
TTATGATCGAAAACCTGGAAATGTTGCTATTACAAGCAC-----
* * * * *

GTAAGCACAGATATTAA-TAGTGAAGAAAGAAAGGAGCTGAGCGACATGC
-TGATCAT-GATATTAA-TAGTGAAGAAAGAAAGGAGCTGAGCGACATGC
-CAGTCTGTGATAACAAGTACTGGGAGAGAAAGAACTCTGAGTCATATGA
-CAACCA-GTCGGTGGGATGGGAGACAGCAGGATACTTAGTCAGATGT
-CAACCA-GTCGGTGGGATGGGAGACAGCAGGATACTTAGTCAGATGT
* * * * *

TAACTGAGAGTCTCAAGCCTACACGTGACCCCTAACCATTTGAGGAGATGG
TAACTGAGAGTCTCAAGCCTACACGTGACCCCTAACCATTTGAGGAGATGG
TGAGTCAGAGGCTTAAGCCTACGTTTAAACCGCAACCCGTTGAAGCGATGG
TAAGTCAGAAGCTTAGACCGGCAAAAGAGAGCAACCCCTTTAGTGAGATGG
TAAGTCAGAAGCTTAGACCGGCAAAAGAGAGCAACCCCTTTAGTGAGATGG
* * * * *

TATTGTCAACTAAGATTCTTTGTATTGGATAGTTGGCAAAGAGTTTGGGT
TATTGTCAACTAAGATTCTTTGTATTGGATAGTTGGCAAAGAGTTTGGGT
TACCGTGGTCTTAGATTCTTCTTGTAGACAACTGGCAAAGATGTTGGGT
TCGGAGAAAATCAAATATTTTACTACTTGACAATTGGCAGAGACTATGGAT
TCGGAGAAAATCAAATATTTTACTACTTGACAATTGGCAGAGACTATGGAT
* * * * *

GATAGCGTTATGGCTCACGATTATGGCCATCCTCTTCGCGTACAAGTATA
GATAGCGTTATGGCTCACGATTATGGCCATCCTCTTCGCGTACAAGTATA
TATAGTGCTATGGTTTATAGTTATGGCTTACTCTTACCTACAAATATA
AATGATGTTATGGCTTGGCATCTGTGGTGGCTCTTACTTATAAATTCA
AATGATGTTATGGCTTGGCATCTGTGGTGGCTCTTACTTATAAATTCA
* * * * *

TTCAATACAAGAATAGAGCAGTGTATGAAGTGTGGGGCCTTGTGTGTGC
TTCAATACAAGAATAGAGCAGTGTATGAAGTGTGGGGCCTTGTGTGTGC
TCCAATACAGGCGTAGCCCTGTGTATCCAGTGATGGGTGATTGTGTGTGC
TTCAGTACAAGAACAAGCTGCCTATGGTGTATGGGTGATTGCGTTTGT
TTCAGTACAAGAACAAGCTGCCTATGGTGTATGGGTGATTGCGTTTGT
* * * * *

TTGGCTAAAGGTGCAGCAGAGACGCTGAAGCTAAACATGGCCCTAATTCT
TTGGCTAAAGGTGCAGCAGAGACGCTGAAGCTAAACATGGCCCTAATTCT
ATGGCTAAAGGTGCTGCAGAAACAGTGAAGCTGAACATGGCTTGTATTCT
GTCGCCAAAGGAGGCGCCGAGACTCTCAAATTCACATGGCTCTCATATT
GTCGCCAAAGGAGGCGCCGAGACTCTCAAATTCACATGGCTCTCATATT
* * * * *

GTTACCTGTTTGCAGAAATACCATCACATGGCTTAGAAATAAGACTAGGT
GTTACCTGTTTGCAGAAATACCATCACATGGCTTAGAAATAAGACTAGGT
CTTACTGTTTGTAGAAACACCATCACATGGCTTAGAAATAAGACTAGGT
GTTGCTGTTTGTGCGAAACACCATCACTTGGCTTAGGAACAAGACTAAGC
GTTGCTGTTTGTGCGAAACACCATCACTTGGCTTAGGAACAAGACTAAGC
* * * * *

TGGGTGTTTTTGTTCCTTTTGTATGACAACCTCAATTTTACAAGGTTATA
TGGGTGTTTTTGTTCCTTTTGTATGACAACCTCAATTTTACAAGGTTATA
TGGGTGCTGTTGTCCATTTGTATGACAATCTCAACTTCCACAAGGTTATA
TTGGTACTGTGCTTCTTTTGTATGATAGTCTTAACCTCCACAAGGTTATT
TTGGTACTGTGCTTCTTTTGTATGATAGTCTTAACCTCCACAAGGTTATT
* * * * *

```

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref

GCGGTGGGAATTGCGATAGGAGTAGCCATACACTCTGTGTCCCCTTGGC
GCGGTGGGAATTGCGATAGGAGTAGCCATACACTCTGTGTCCCCTTGGC
GCGGTGGGGATTATAGTTGGAGTAACGATGCACGCCGGGGCACATTTAGC
GCAAGCGGGATAGTCGTCGGTGTCTTACTCCATGCGGGTGCCCATTTAAC
GCAAGCGGGATAGTCGTCGGTGTCTTACTCCATGCGGGTGCCCATTTAAC
**      **      *      *      *      *      *      *      *

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref

GTGTGATTTTCCACTGCTAATCGCGGCAACTCCAGCGGAATACATGCCTC
GTGTGATTTTCCACTGCTAATCGCGGCAACTCCAGCGGAATACATGCCTC
GTGTGATTTCCCGCGGTACTACATGCAACTCCAGAGGCATATAGGCCTT
GTGTGATTTTCCACGTTAATTGCCGCGGATGAGGACACCTATGAGCCGA
GTGTGATTTTCCACGTTAATTGCCGCGGATGAGGACACCTATGAGCCGA
*****      **      **      *      *      *      *      *

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref

TCGGAATAATCTTCGGAGAGGAGCAACCAAGAGATACTTGCATTTTGTG
TCGGAATAATCTTCGGAGAGGAGCAACCAAGAGATACTTGCATTTTGTG
TAAGACAGTTTTTTGGGGATGAGCAACCAAGAGCTACTGGCATTTTGTG
TGGAAAAATACTTTGGGGAT---CAACCGACTAGCTACTGGTGGTTTGTG
TGGAAAAATACTTTGGGGAT---CAACCGACTAGCTACTGGTGGTTTGTG
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref

AAGTCAACAGAAGGAATAACAGGGCTTGTAAATGGTTTTCTTGATGGTTAT
AAGTCAACAGAAGGAATAACAGGGCTTGTAAATGGTTTTCTTGATGGTTAT
AACTCGGTAGAAGGTATAACCGGACTTGTGATGGTTTTGTAAATGGCGAT
AAAGGAGTGAAGGATGGACTGGCATTTGTGATGGTTGTGCTAATGGCTAT
AAAGGAGTGAAGGATGGACTGGCATTTGTGATGGTTGTGCTAATGGCTAT
**      *****      **      *      *      *      *      *      *

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref

TGCTTTTACACTGGCTATGCCTTGGTTTAGACGGGGGAAGCTAGAGAAAA
TGCTTTTACACTGGCTATGCCTTGGTTTAGACGGGGGAAGCTAGAGAAAA
TGCAATTCACACTAGCCACGCCTTGGTTCAGAAGAGGGAAGCTA---AACT
AGCCTTTACACTCGCGACGCCTTGGTTCGACGTAACAAGCTT-----A
AGCCTTTACACTCGCGACGCCTTGGTTCGACGTAACAAGCTT-----A
**      *      *      *      *      *      *      *      *      *

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref

AGCTACCAGGGCCACTAAAGAACTTGCAGCTTCAATGCCTTCTGGTAC
AGCTACCAGGGCCACTAAAGAACTTGCAGCTTCAATGCCTTCTGGTAC
ATCTTCCAGGACCATTAAAGAACTAGCTAGCTTCAATGCCTTCTGGTAC
ACTTACCTAATCTTCTCAAGAAGCTTACCGGTTTCAACGCCTTTTGGTAC
ACTTACCTAATCTTCTCAAGAAGCTTACCGGTTTCAACGCCTTTTGGTAC
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref

ACTCACCATTGTTCGTTATAGTCTACATTCTCCTTGTCTTTCACGGATA
ACTCACCATTGTTCGTTATAGTCTACATTCTCCTTGTCTTTCACGGATA
ACTCATCATTGTTCGTTATAGTCTACATTCTCCTTGTCTTTCACGGATA
ACCCACCATTGTTCATCATTGTTTATGCTCTTCTCATTGTCCATGGTAT
ACCCACCATTGTTCATCATTGTTTATGCTCTTCTCATTGTCCATGGTAT
**      *      *      *      *      *      *      *      *      *

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref

CTACATATATCTCAACAAGGAATGGTACAAGAAAACGACGTGGATGTACT
CTACATATATCTCAACAAGGAATGGTACAAGAAAACGACGTGGATGTACT
CTACTTGTATCTCACCAGAGACTGGCACAATAAAACGACTTGGATGTATT
CAAGCTCTACCTCACAAGATTTGGTATCAGAAAACGACATGGATGTATC
CAAGCTCTACCTCACAAGATTTGGTATCAGAAAACGACATGGATGTATC
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref

TGGCAGTACCAGTAGCTCTTTATGCATACGAGAGATTGATACGAGCATTC
TGGCAGTACCAGTAGCTCTTTATGCATACGAGAGATTGATACGAGCATTC
TGGTGGTACCAGTGGTTCTATACGCGTGTGAAGGTTGATAAGAGCATTC
TTGCTGTACCCATCCTTCTATATGCATCGGAGAGGCTGCTCCGTGCTTTC
TTGCTGTACCCATCCTTCTATATGCATCGGAGAGGCTGCTCCGTGCTTTC
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX
A_thaliana_gene_15238842_ref

AGGTCCAGCATCAGGACAGTAAAAGTCCTTAAGATGGCAGCTTATCCTGG
AGGTCCAGCATCAGGACAGTAAAAGTCCTTAAGATGGCAGCTTATCCTGG
AGGTCCAGCATCAAGGCGGTGACTATTAGGAAAAGTAGCAGTTTATCCAGG
AGATCAAGCATCAAAACCGGTTAAGATGATCAAGGTGGCTGTTTACCCCGG
AGATCAAGCATCAAAACCGGTTAAGATGATCAAGGTGGCTGTTTACCCCGG
**      *      *      *      *      *      *      *      *      *

A_thaliana_gene_334186908_re
A_thaliana_gene_30686753_ref
A_thaliana_gene_15241361_ref
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX

AAAAGTATTGACTTTGCAGATGTCAAAGCCTACAACTTCAAATACATGA
AAAAGTATTGACTTTGCAGATGTCAAAGCCTACAACTTCAAATACATGA
AAACGTGCTGGCAATCACTTGTCAAGGCCTCAAACTTCAAATACAAGA
GAACGTGTTGTCTCTACACATGACGAAGCCACAAGGATTCAAATACAAA

```

RBOHD-2 RESPIRATORY BURST OX


```

A_thaliana_gene_334186908_re -----
A_thaliana_gene_30686753_ref -----
A_thaliana_gene_15241361_ref -----
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX TTTATATAGTTACAGCTTTGGTGTGTAAACATGTAATCATGGAGTTATC
A_thaliana_gene_15238842_ref -----

```

```

A_thaliana_gene_334186908_re -----
A_thaliana_gene_30686753_ref -----
A_thaliana_gene_15241361_ref -----
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX TGTACTATTATTTTGTACTTATATTCGAATATTAACAACATAAGATAGTT
A_thaliana_gene_15238842_ref -----

```

```

A_thaliana_gene_334186908_re ---
A_thaliana_gene_30686753_ref ---
A_thaliana_gene_15241361_ref ---
RBOHD-2_RESPIRATORY_BURST_OX TTG
A_thaliana_gene_15238842_ref ---

```

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment: **GSKB6**

```

A_thaliana_gene_334183671_re -----
A_thaliana_gene_15219598_ref -----
A_thaliana_gene_15240288_ref -----
A_thaliana_gene_18418013_ref -----
A_thaliana_gene_15229530_ref -----
ATGSKB6__copper_ion_binding_ CTCTATAAACACACACTCTCAGGAGAGAAGTTGTATTGATCGTCTTCTCT

```

```

A_thaliana_gene_334183671_re -----ATGAGTCTTCT
A_thaliana_gene_15219598_ref -----ATGAGTCTTCT
A_thaliana_gene_15240288_ref -----ATGAGTCTTGT
A_thaliana_gene_18418013_ref -----ATGTCTTCACT
A_thaliana_gene_15229530_ref -----ATGTCTCTGCT
ATGSKB6__copper_ion_binding_ TTCCCTAAACACACTGATTATTTTCTCTCCGACGCCCATGTCTCTGCT
                               *** *

```

```

A_thaliana_gene_334183671_re TGCAGATCTTGTTAACCTTGACATCTCAGACAACAGTGAAAAGATCATCG
A_thaliana_gene_15219598_ref TGCAGATCTTGTTAACCTTGACATCTCAGACAACAGTGAAAAGATCATCG
A_thaliana_gene_15240288_ref TTCAGATCTCATCAACCTTAACCTCTCAGACTCCACTGACAAAATCATGTG
A_thaliana_gene_18418013_ref TGCAGATTTAATCAATCTCGATCTCTCCGATTCCACTGACCAGATCATCG
A_thaliana_gene_15229530_ref CTCAGATCTCGTTAACCTCAACCTCACCGATGCCACCGGGAATATCATCG
ATGSKB6__copper_ion_binding_ CTCAGATCTCGTTAACCTCAACCTCACCGATGCCACCGGGAATATCATCG
                               *****

```

```

A_thaliana_gene_334183671_re CTGAATACATATGGGTTGGTGGTTCTGGTATGGACATGAGAAGCAAAGCC
A_thaliana_gene_15219598_ref CTGAATACATATGGGTTGGTGGTTCTGGTATGGACATGAGAAGCAAAGCC
A_thaliana_gene_15240288_ref CTGAATACATATGGGTTGGTGGTTCTGGTATGGACATGAGAAGCAAAGCC
A_thaliana_gene_18418013_ref CCGAGTACATATGGATTGGTGGATCGGGCTTGGATATGAGAAGCAAAGCA
A_thaliana_gene_15229530_ref CCGAATACATATGGATCGGTGGATCTGGAATGGATATCAGAAGCAAAGCC
ATGSKB6__copper_ion_binding_ CCGAATACATATGGATCGGTGGATCTGGAATGGATATCAGAAGCAAAGCC
                               * * *

```

```

A_thaliana_gene_334183671_re AGGACTCTCCCTGGACCTGTGACCGATCCATCAAACTTCCAAAGTGGA
A_thaliana_gene_15219598_ref AGGACTCTCCCTGGACCTGTGACCGATCCATCAAACTTCCAAAGTGGA
A_thaliana_gene_15240288_ref AGGACTCTACCTGGACCACTGACTGACCTTCGCAGCTACCAAAGTGGA
A_thaliana_gene_18418013_ref AGGACTTTGCTGGACCACTGACGGATCCATCGCAGTTACCGAAATGGA
A_thaliana_gene_15229530_ref AGGACACTACCAGGACCACTGACTGATCCATCAAAGCTTCCCAAGTGGA
ATGSKB6__copper_ion_binding_ AGGACACTACCAGGACCACTGACTGATCCATCAAAGCTTCCCAAGTGGA
                               *****

```

```

A_thaliana_gene_334183671_re CTATGATGGTTCAAGCACTGGTCAAGCTCCTGGTCAAGACAGTGAAGTGA
A_thaliana_gene_15219598_ref CTATGATGGTTCAAGCACTGGTCAAGCTCCTGGTCAAGACAGTGAAGTGA
A_thaliana_gene_15240288_ref CTATGATGGTTCAAGCACAGGCCAAGCTCCTGGTGAAGACAGTGAAGTCA
A_thaliana_gene_18418013_ref CTACGACGGTTCAAGCACCGGCCAAGCTCCGGGCGATGACAGTGAAGTCA
A_thaliana_gene_15229530_ref CTACGACGGATCCAGCACCGGTGAGGCTGCTGGAGAAGACAGTGAAGTCA
ATGSKB6__copper_ion_binding_ CTACGACGGATCCAGCACCGGTGAGGCTGCTGGAGAAGACAGTGAAGTCA
                               *****

```

```

A_thaliana_gene_334183671_re TCTTATACCTCAAGCAATTTTCAAAGATCCATTCCGTAGAGGCAACAAC

```

A_thaliana_gene_15219598_ref
 A_thaliana_gene_15240288_ref
 A_thaliana_gene_18418013_ref
 A_thaliana_gene_15229530_ref
 ATGSKB6__copper_ion_binding_

A_thaliana_gene_334183671_re
 A_thaliana_gene_15219598_ref
 A_thaliana_gene_15240288_ref
 A_thaliana_gene_18418013_ref
 A_thaliana_gene_15229530_ref
 ATGSKB6__copper_ion_binding_

A_thaliana_gene_334183671_re
 A_thaliana_gene_15219598_ref
 A_thaliana_gene_15240288_ref
 A_thaliana_gene_18418013_ref
 A_thaliana_gene_15229530_ref
 ATGSKB6__copper_ion_binding_

A_thaliana_gene_334183671_re
 A_thaliana_gene_15219598_ref
 A_thaliana_gene_15240288_ref
 A_thaliana_gene_18418013_ref
 A_thaliana_gene_15229530_ref
 ATGSKB6__copper_ion_binding_

A_thaliana_gene_334183671_re
 A_thaliana_gene_15219598_ref
 A_thaliana_gene_15240288_ref
 A_thaliana_gene_18418013_ref
 A_thaliana_gene_15229530_ref
 ATGSKB6__copper_ion_binding_

A_thaliana_gene_334183671_re
 A_thaliana_gene_15219598_ref
 A_thaliana_gene_15240288_ref
 A_thaliana_gene_18418013_ref
 A_thaliana_gene_15229530_ref
 ATGSKB6__copper_ion_binding_

A_thaliana_gene_334183671_re
 A_thaliana_gene_15219598_ref
 A_thaliana_gene_15240288_ref
 A_thaliana_gene_18418013_ref
 A_thaliana_gene_15229530_ref
 ATGSKB6__copper_ion_binding_

A_thaliana_gene_334183671_re
 A_thaliana_gene_15219598_ref
 A_thaliana_gene_15240288_ref
 A_thaliana_gene_18418013_ref
 A_thaliana_gene_15229530_ref
 ATGSKB6__copper_ion_binding_

A_thaliana_gene_334183671_re
 A_thaliana_gene_15219598_ref
 A_thaliana_gene_15240288_ref
 A_thaliana_gene_18418013_ref
 A_thaliana_gene_15229530_ref
 ATGSKB6__copper_ion_binding_

A_thaliana_gene_334183671_re
 A_thaliana_gene_15219598_ref
 A_thaliana_gene_15240288_ref

TCTTATACCCTCAAGCAATTTTCAAGATCCATTCCGTAGAGGCAACAAC
 TCTTATACCCTCAAGCCATATTCAGGATCCTTTCCGTAGAGGAAACAAC
 TCATCTACCCTCAAGCTATCTTCAAGACCCCTTCAGAAGAGGCAACAAC
 TTCTATACCCTCAGGCAATATTCAGGATCCCTTCAGGAAAGGCAACAAC
 TTCTATACCCTCAGGCAATATTCAGGATCCCTTCAGGAAAGGCAACAAC
 *

ATCCTT-----GTTATGTGTGATGCTTA
 ATCCTTATTAACGTTTTTTATCGGTTTGATCAGGTTATGTGTGATGCTTA
 ATTCTT-----GTCATGTGCGATGCGTA
 ATCCTT-----GTGATGTGTGACGCATA
 ATCTG-----GTGATGTGTGATGCTTA
 ATCTG-----GTGATGTGTGATGCTTA
 *

CACCTCAGCGGGAGAGCCAATCCCTACTAACAAGCGACATGCTGCGGCTG
 CACTCAGCGGGAGAGCCAATCCCTACTAACAAGCGACATGCTGCGGCTG
 CACTCCCGCGGGTGAACCAATCCCGACTAACAAGACACGCTGCGGCTA
 TACACCGGAGAGAGCCGATTCGACGAACAAAGGCATGTCGCGGCTA
 CACACAGCTGGTGATCCTATTCACCAACAAGAGGCACACGCTGCTA
 CACACAGCTGGTGATCCTATTCACCAACAAGAGGCACACGCTGCTA
 *

AGATCTTTGCTAACCTGATGTTATTGCTGAAGTGCCATGGTATGGAATC
 AGATCTTTGCTAACCTGATGTTATTGCTGAAGTGCCATGGTATGGAATC
 AGGTCTTTAGCAACCCTGATGTTGCAGCTGAAGTGCCATGGTATGGTATT
 AGATCTTTGAGACCTAGTGTGTCGCGAAGAAACATGGTACGGAATT
 AGATCTTCAGCCACCCGACGTTGCCAAGGAGGAGCCTTGGTATGGGATT
 AGATCTTCAGCCACCCGACGTTGCCAAGGAGGAGCCTTGGTATGGGATT
 *

GAACAAGAATACACTTTGTTGCAGAAGGATGTGAAGTGCCCTCTTGGATG
 GAACAAGAATACACTTTGTTGCAGAAGGATGTGAAGTGCCCTCTTGGATG
 GAGCAAGAATACACTTTACTCCAGAAAGATGTGAAGTGCCCTGTTGGTTG
 GAACAAGAGTATACCTTGTGCAAAAGGATATTAAGTGCCCGGTGAGGTTG
 GAGCAAGAATACACTTTGATGCAAAAGGATGTGAAGTGCCCAATTGGTTG
 GAGCAAGAATACACTTTGATGCAAAAGGATGTGAAGTGCCCAATTGGTTG
 *

GCCCATTTGGTGGCTTCCCTGGCCCTCAGGGACCATACTACTGCAGTATTG
 GCCCATTTGGTGGCTTCCCTGGCCCTCAGGGACCATACTACTGCAGTATTG
 GCCTATTGGTGGTTATCCCGGCCCTCAGGGACCGTACTATTGCGGTATTG
 GCCGTGCGGCGGTTTCCAGGTCTCAGGGACCGTACTACTGTGGAGTTG
 GCCTGTTGGTGGCTACCCTGGCCCTCAGGGACCTTACTACTGTGGTGTGG
 GCCTGTTGGTGGCTACCCTGGCCTCAGGGACCTTACTACTGTGGTGTGG
 *

GAGCTGACAAATCTTTTGAAGAGACATTGTTGATGCTCACTACAAAGCC
 GAGCTGACAAATCTTTTGAAGAGACATTGTTGATGCTCACTACAAAGCC
 GAGCAGACAAATCTTTTGGCAGAGATGTTGTTGATCTCACTACAAGGCC
 GAGCAGACAAAGCCCTTGGAGAGACATCGTTGATTCTCATTACAAGCT
 GAGCTGACAAAGCCATTGGTCGTGACATTGTGGATGCTCACTACAAGGCC
 GAGCTGACAAAGCCATTGGTCGTGACATTGTGGATGCTCACTACAAGGCC
 *

TCTTTGTATGCTGGAATCAACATCAGTGGGATCAATGGAGAAGTCATGCC
 TCTTTGTATGCTGGAATCAACATCAGTGGGATCAATGGAGAAGTCATGCC
 TGCTTATACGCTGGGATCAACATTAGTGGCATCAATGGAGAAGTCATGCC
 TGTCTTTACGCCGAATCAATGTGAGTGGGACTAACGGCGAAGTTATGCC
 TGTCTTTACGCCGATTTGGTATTTCTGGTATCAATGGAGAAGTCATGCC
 TGTCTTTACGCCGATTTGGTATTTCTGGTATCAATGGAGAAGTCATGCC
 *

GGGACAAATGGGAGTTCCAAGTCGGCCCATCGGTGCGTATCTCAGCTGCTG
 GGGACAAATGGGAGTTCCAAGTCGGCCCATCGGTGCGTATCTCAGCTGCTG
 GGGTCAGTGGGAGTTCCAGGTCGGTCCAGCTGTTGGTATCTCGGCTGCTG
 TGGCCAGTGGGAGTTCCAAGTCGGTCCAGCTTGAATCGCTGCCGCCG
 AGGCCAGTGGGAGTTCCAAGTCGGCCCTGTTGAGGGTATTAGTTCTGGTG
 AGGCCAGTGGGAGTTCCAAGTCGGCCCTGTTGAGGGTATTAGTTCTGGTG
 *

ATGAAATATGGATCGCTCGTTACATTTTGGAGAGGATCACAGAGATTGCT
 ATGAAATATGGATCGCTCGTTACATTTTGGAGAGGATCACAGAGATTGCT
 ATGAAATTTGGGTCGCTCGTTACATTTTGGAGAGGATCACAGAGATTGCT

A_thaliana_gene_18418013_ref
A_thaliana_gene_15229530_ref
ATGSKB6__copper_ion_binding__

A_thaliana_gene_334183671_re
A_thaliana_gene_15219598_ref
A_thaliana_gene_15240288_ref
A_thaliana_gene_18418013_ref
A_thaliana_gene_15229530_ref
ATGSKB6__copper_ion_binding__

A_thaliana_gene_334183671_re
A_thaliana_gene_15219598_ref
A_thaliana_gene_15240288_ref
A_thaliana_gene_18418013_ref
A_thaliana_gene_15229530_ref
ATGSKB6__copper_ion_binding__

A_thaliana_gene_334183671_re
A_thaliana_gene_15219598_ref
A_thaliana_gene_15240288_ref
A_thaliana_gene_18418013_ref
A_thaliana_gene_15229530_ref
ATGSKB6__copper_ion_binding__

A_thaliana_gene_334183671_re
A_thaliana_gene_15219598_ref
A_thaliana_gene_15240288_ref
A_thaliana_gene_18418013_ref
A_thaliana_gene_15229530_ref
ATGSKB6__copper_ion_binding__

A_thaliana_gene_334183671_re
A_thaliana_gene_15219598_ref
A_thaliana_gene_15240288_ref
A_thaliana_gene_18418013_ref
A_thaliana_gene_15229530_ref
ATGSKB6__copper_ion_binding__

A_thaliana_gene_334183671_re
A_thaliana_gene_15219598_ref
A_thaliana_gene_15240288_ref
A_thaliana_gene_18418013_ref
A_thaliana_gene_15229530_ref
ATGSKB6__copper_ion_binding__

A_thaliana_gene_334183671_re
A_thaliana_gene_15219598_ref
A_thaliana_gene_15240288_ref
A_thaliana_gene_18418013_ref
A_thaliana_gene_15229530_ref
ATGSKB6__copper_ion_binding__

A_thaliana_gene_334183671_re
A_thaliana_gene_15219598_ref
A_thaliana_gene_15240288_ref
A_thaliana_gene_18418013_ref
A_thaliana_gene_15229530_ref
ATGSKB6__copper_ion_binding__

A_thaliana_gene_334183671_re
A_thaliana_gene_15219598_ref
A_thaliana_gene_15240288_ref
A_thaliana_gene_18418013_ref

ATCAGGTCTGGGTTGCTCGTTACATTCTTGAGAGGATCACAGAATTGGCT
ATCAAGTCTGGGTTGCTCGATACCTTCTCGAGAGGATCACTGAGATCTCT
ATCAAGTCTGGGTTGCTCGATACCTTCTCGAGAGGATCACTGAGATCTCT
** *

GGTGTGGTTGTATCTTTTGACCCAAAACCTATTTCCTGGTGACTGGAATGG
GGTGTGGTTGTATCTTTTGACCCAAAACCTATTTCCTGGTGACTGGAATGG
GGTGTAGTGGTATCTTTTGACCCGAAACCGATTCCCCTGGTGACTGGAACGG
GGAGTTGTTCTGTCTCTAGACCTTAAACCAATCCCGGAGATTGGAATGG
GGTGTAATTGTCAGCTTCGACCCGAAACAGTCCCCTGGTGACTGGAATGG
GGTGTAAATTGTCAGCTTCGACCCGAAACAGTCCCCTGGTGACTGGAATGG
** *

AGCTGGTGCTCACACCAATTACAGTACTAAATCAATGAGGGAAGAAGGAG
AGCTGGTGCTCACACCAATTACAGTACTAAATCAATGAGGGAAGAAGGAG
TGCTGGTGCTCACTGCAACTACAGTACCAAGTCAATGAGGGAAGAAGGCG
TGCAGGGGCACACACAAATTACAGTACGAAGTCGATGAGAGAAGATGGAG
AGCTGGAGCTCACTGCAACTACAGCACTAAGACAATGAGAAACGATGGAG
AGTTGAAGTCACTGCAACTACAGCACTAAGACAATGAGAAACGATGGAG
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

GATACGAGATAAATCAAGAAGGCGATCGAGAAGCTTGCTTGAGACACAAG
GATACGAGATAAATCAAGAAGGCGATCGAGAAGCTTGCTTGAGACACAAG
GTTACGAGATCATCAAGAAAGCAATCGATAAATTGGGACTGAGACACAAA
GGTACGAGGTGATAAAGAAAGCAATAGAGAAGCTTGATTGCGTCAACAAG
GATTAGAAGTGATCAAGAAAGCGATAGGGAAGCTTCAGCTGAAACACAAA
GATTAGAAGTGATCAAGAAAGCGATAGGGAAGCTTCAGCTGAAACACAAA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

GAACACATTTCCGCTTACGGTGAAGGAAACGAGCGTCGTCTCACGGGACA
GAACACATTTCCGCTTACGGTGAAGGAAACGAGCGTCGTCTCACGGGACA
GAACACATTTGCTGCTTACGGTGAAGGCAATGAGCGTCGTCTCACAGGACA
GAACACATTTGCTGCTTATGGTGAAGGCAACGAGCGTCGTCTCACCGGAAA
GAACACATTTGCTGCTTACGGTGAAGGAAACGAGCGTCGTCTCACTGGAAA
GAACACATTTGCTGCTTACGGTGAAGGAAACGAGCGTCGTCTCACTGGAAA
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CCATGAAACTGCTGACATCAACACTTTCCTTTGGGGTGTTGCGAACCCTG
CCATGAAACTGCTGACATCAACACTTTCCTTTGGGGTGTTGCGAACCCTG
CCACGAGACTGCTGACATCAACACTTTCCTTTGGGGTGTTGCGAACCCTG
ACATGAAACCGCCGATATCAACACTTTCCTTTGGGGTGTTGCGAACCCTG
GCACGAAACCGCAGACATCAACACATTCTCTTGGGGAGTCGCGAACCCTG
GCACGAAACCGCAGACATCAACACATTCTCTTGGGGAGTCGCGAACCCTG
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

GTGCATCGATCCGAGTAGGACGTGACACCGAGAAAGAAGGGAAGGGATAC
GTGCATCGATCCGAGTAGGACGTGACACCGAGAAAGAAGGGAAGGGATAC
GAGCATCGATCCGAGTAGGACGTGATACGGAGAAAGAAGGGAAGGATAC
GGGCATCGATTAGGGTTGGGCGTGACACTGAGCAGGCTGGAAGGATAC
GAGCGTCAGTGAGAGTGGGACGTGACACAGAGAAGGAAGGTAAAGGGTAC
GAGCGTCAGTGAGAGTGGGACGTGACACAGAGAAGGAAGGTAAAGGGTAC
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

TTTGAGGATAGGAGGCCAGCTTCAAACATGGACCCCTTACGTTGTTACTTC
TTTGAGGATAGGAGGCCAGCTTCAAACATGGACCCCTTACGTTGTTACTTC
TTTGAGGACAGGAGGCCAGCTTCGAACATGGATCCTTACATTGTCACTTC
TTTGAAGATCGTAGGCCAGCTTCGAACATGGATCCTTACACTGTGACCTC
TTCGAAGACAGAAGGCCAGCTTCTAACATGGATCCTTACGTTGTCACTTC
TTCGAAGACAGAAGGCCAGCTTCTAACATGGATCCTTACGTTGTCACTTC
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CATGATTGCAGAGACTACACTCCTCTGGAACCCCTTGA-----
CATGATTGCAGAGACTACACTCCTCTGGAACCCCTTGA-----
CATGATTGCAGAGACTACAATCCTCTGGAATCCTTGA-----
CATGATTGCTGAATCCACAATCCTTTGGAACCATGA-----
CATGATCGCTGAGACGACCATACTCGGTTGA-----
CATGATCGCTGAGACGACCATACTCGGTTGATGACACATTTCATGATTTG
***** * * * * * * * * * *


```

A_thaliana_gene_15229530_ref
ATGSKB6__copper_ion_binding_
-----
ATTCTCTCCAATTTGGTTTTTTTTTTTCCCTTTTGATTGCACTTTTCG

```

```

A_thaliana_gene_334183671_re
A_thaliana_gene_15219598_ref
A_thaliana_gene_15240288_ref
A_thaliana_gene_18418013_ref
A_thaliana_gene_15229530_ref
ATGSKB6__copper_ion_binding_
-----
ATAATAAAAAAATAATTCTTATTATGGGCGTATTGTTGTGACATTTTGTG

```

```

A_thaliana_gene_334183671_re
A_thaliana_gene_15219598_ref
A_thaliana_gene_15240288_ref
A_thaliana_gene_18418013_ref
A_thaliana_gene_15229530_ref
ATGSKB6__copper_ion_binding_
-----
TTTTGTTTCGAATAATTAAATAAGCGCTTCTTAAGGTGAAAATAAATAAT

```

```

A_thaliana_gene_334183671_re
A_thaliana_gene_15219598_ref
A_thaliana_gene_15240288_ref
A_thaliana_gene_18418013_ref
A_thaliana_gene_15229530_ref
ATGSKB6__copper_ion_binding_
-----
AATTAGTGATTTTAAATC

```

8. ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Yasemin YILDIZHAN
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	18.05.1980, Bodrum/Yalıkavak
Telefon	05323870771
E-mail	yasemin.yildizhan@tubitak.gov.tr
Web adres	www.mam.gov.tr

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Doktora	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoloji Anabilim Dalı/Botanik Programı	2015
Yüksek Lisans	Yıldız Teknik Üniversitesi / Kimya ve Metalurji Fakültesi / Biyomühendislik Programı	2007
Lisans	Süleyman Demirel Üniversitesi /Fen-Edebiyat Fakültesi Anabilim Dalı/Biyoloji	2003
Lise	Bodrum Süper Lisesi	1998

Makaleler / Bildiriler

Ertekin, Ö., Kösesakal, T., Ünlü, V. S., Dağlı, S., Pelitli, V., Uzyol, H., Tuna, Y. , ... & Memon, A., 2015, Phytoremediation potential of <i>Landoltia punctata</i> on petroleum hydrocarbons, <i>Turkish Journal of Botany</i> , 39(1):23-29 .
Ertekin, O., Erol, C., Ünlü, S., Yildizhan, Y. , Pelitli, V., Yüksel, B. and Memon,

A.R., 2011, Aliphatic Hydrocarbon Fingerprints in *Trifolium spp.* *Fresenius Environmental Bulletin*, 20 (2): 367-371.

Erol, C., Ertekin, O., Ünlü, S., **Yıldızhan, Y.**, Onarıcı, S., Yüksel, B. and Memon, A.R., 2011, The Effect of Siberian Light Crude Oil on Alfalfa (*Medicago sativa* L.), *Asian Journal of Chemistry*, 23 (2): 593-596.

Memon, A.R., **Yıldızhan, Y.** and Kaplan, E., 2008, Trace Elements as Contaminants and Nutrients: Consequences in Ecosystems and Human Health, edit. M.N.V. Prasad, ISBN: 978-0-470-18095-2, *Metal Accumulation in Crops-Human Health Issues*. Citation:2.

Bildiriler:

Yıldızhan, Y., Cevher-Keskin, B., Cevahir-Öz, G., Memon A R, 2014, Comparison of CAT3 Gene Expression Profiles under Copper Stress in Tolerant and Non-tolerant *Brassica nigra* Ecotypes, 40th FEBS Congress, 15th FEBS Young Scientists' Forum, Paris, France.

Yıldızhan, Y., Cevher-Keskin, B., Cevahir-Öz, G., Memon A R, 2014, Expression Profiling of LOS2 Associated with Copper Stress in *Brassica nigra*, European Biotechnology Congress, Italy.

Yüksel, B., **Yıldızhan, Y.**, Ertekin, Ö., Onarıcı, S., Külen, O., Selçukcan-Erol, Ç., Kurtoğlu, H.,... & Memon, A., 2011, Petrol Hidrokarbonlarıyla Kirlenmiş Ortamların Biyoremediyasyonunda Kullanılabilecek Organizmaların Belirlenmesi ve İyileştirilmesi, II. Ulusal Toprak ve Su Kaynakları Kongresi Bildiri Kitabı, Cilt I; 666-674, Editör Dr. Hesna ÖZCAN, Sevinç MADENOĞLU, Fatma ÖZKAY, 22-25 Kasım 2011, ANKARA.

Keskin, B.C., **Yıldızhan, Y.**, Külen, O., Yüksel, B., Onarıcı, S. and Tekel, D., 2011, The investigation of drought-associated genes in bread wheat through comparative transcriptome profiling. *Current Opinion in Biotechnology*, Volume 22, Supplement 1, September, P138, İstanbul, Turkey.

Cevher-Keskin, B., **Yıldızhan, Y.**, Yüksel, B., Külen, O., Memon, A.R., 2010, Transcriptome Profiling for *Brassica nigra* in Heavy Metal Tolerance, XVII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB). P10-057 Valencia, Spain 4-9 July.

Keskin, B.C., **Yıldızhan, Y.**, Yüksel, B., Külen, O., Memon, A.R., Comparative Transcriptome Analysis of Cu-tolerant and non-tolerant *B. nigra* Ecotypes using Arabidopsis Genome Arrays, 0-BGE011, Oral Presentation, Vth International Bioengineering Congress, Izmir, Turkey, June 16-19, 2010.

Yıldızhan, Y., Demirel, U., Memon, A.R., Metal accumulator Plant *Brassica nigra*;

Development of *in vitro* Regeneration System and Determination of Metal Uptake Capacity”, Oral Presentation, IVth National Congress of Bioengineering with International Participation, GBE-S1, 56-57, Izmir, Turkey, October 15-18, 2008.

Memon, A.R., Altuğ, G., Erol, Ç., Kösesakal, T., Pelitli, V., Gürün S., Kurtoğlu, H., Onarıcı, S., Külen, O., **Yildizhan, Y.**, Ünlü, Selma., 2008, Phytoremediation of Petrol Hydrocarbon Contaminated Areas by Use of Bacteria and Plants, Oral Presentation, IVth National Congress of Bioengineering with International Participation, GBE-S3-59, Izmir, Turkey, October 15-18.

Cevher Keskin, B., **Yildizhan Y.**, Memon, A.R., 2008, Transcription level of γ -glutamylcysteine synthetase (γ -ECS) and phytochelatin synthase (PCS) in Cu accumulator plant *Brassica nigra*, Poster Presentation, IVth National Congress of Bioengineering with International Participation, GBE-P2, 137-138, Izmir, Turkey, October 15-18.

Memon, A.R., **Yildizhan Y.**, Cevher Keskin B., 2008, Phytoremediation of Heavy Metals from Contaminated Areas of Turkey IV.th European BioRemediation Conference e-proceedings, Oral Presentation, pp1-5. ISBN 978-960-8475-12-0, Editors: Nicolas Kalogerakis, September 2-6.

Yildizhan, Y., Demirel, U., Memon, A.R., 2008, Poster Presentation, Determination of metal uptake capacity and development of *in vitro* regeneration system for metal accumulator plant *Brassica nigra*, 33. FEBS Congress, Biochemistry of Cell Regulation, FEBS Journal 275 (Suppl. 1) 99-437, 8A-365, Athens, Greece, June 28 – July 3..

Yildizhan, Y., Demirel, U., Memon, A.R., 2006, Poster Presentation, Development of *in vitro* regeneration system for a metal accumulator plant *Brassica nigra*, 31. FEBS Congress, Molecules in Health & Disease, İstanbul, Türkiye (FEBS Bursar), June 24 – 29.