

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**AYRIK TUZ ÇİMİ'NDE (*Puccinellia distans*) SELENYUM (Se) TOKSİSİTESİNE
DAYANIKLILIK GENLERİNİN BELİRLENMESİ**

Kübra BUDAK

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

OCAK 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**AYRIK TUZ ÇİMİ'NDE (*Puccinellia distans*) SELENYUM (Se) TOKSİSİTESİNE
DAYANIKLILIK GENLERİNİN BELİRLENMESİ**

Kübra BUDAK

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS**

OCAK 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AYRIK TUZ ÇİMİ'NDE (*Puccinellia distans*) SELENYUM (Se) TOKSİSİTESİNE
DAYANIKLILIK GENLERİNİN BELİRLENMESİ**

Kübra BUDAK
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Bu tez TÜBİTAK 221Z179 nolu ve Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi FYL-2021-5747 nolu projeler ile desteklenmiştir.**

OCAK 2023

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AYRIK TUZ ÇİMİ'NDE (*Puccinellia distans*) SELENYUM (Se) TOKSİSİTESİNE
DAYANIKLILIK GENLERİNİN BELİRLENMESİ**

Kübra BUDAK
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 23/01/2023 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. M. Aydın AKBUDAK (Danışman)

Prof. Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU

Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK

ÖZET

AYRIK TUZ ÇİMİ'NDE (*Puccinellia distans*) SELENYUM (Se) TOKSİSİTESİNE DAYANIKLILIK GENLERİNİN BELİRLENMESİ

Kübra BUDAK

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. M. Aydın AKBUDAK

Ocak 2023; 54 sayfa

Metal/metaloid toksisitesi, bitki gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir ve tarımsal üretimde kayıplara yol açmaktadır. Bir metaloid olan selenyum (Se) insanlar ve hayvanlar için esansiyel bir element olmakla birlikte, fazlalığı bitkiler dahil olmak üzere tüm canlılarda toksisiteye neden olmaktadır. Metal/metaloid faktörlerine karşı tolerans gösteren mekanizmaların araştırılmasında hiperakümülatör bitki türleri kullanılmaktadır. Bu çalışmada, bor hiperakümülatör ve selenyum akümülatör bir tür olan *Puccinellia distans* kullanılmıştır ve bu bitkinin ayrıca kuraklık ve tuzluluk gibi stres faktörlerine de tolerans sağladığı bilinmektedir. Ancak, Se toleranslığı ile ilişkili genler *P. distans*'ta net olarak olarak belirlenmemiştir. Bu nedenle, Se tolerans genlerini belirlemek amacıyla; *P. distans* cDNA kütüphanesi, toksik dozda selenyuma karşı maya hücreleri ile taranmıştır. Tarama sonucunda; toksik dozda selenyuma tolerans gösteren iki farklı gen; kök ve yaprak cDNA kütüphanelerinde belirlenmiş olup, sırasıyla PKS1 ve PYS9.1 olarak isimlendirilmişlerdir. Sekanslama işlemi sonrasında PKS1'in "*Tiyosiyanat metiltransferaz*", PYS9.1'in ise "*Çinko Transporter 8*" olduğu belirlenmiştir. *Çinko Transporter 8* taşıyan kolonilerin, 15 mM'a kadar sodyum seleniti tolere edebildiği belirlenirken; *Tiyosiyanat metiltransferaz*'ın 50 mM'a kadar sodyum seleniti tolere edebildiği belirlenmiştir. Ayrıca bu genlerin, tuz ve kuraklık stresine karşı toleranslığı, maya hücreleri kullanılarak araştırılmıştır. Ancak yüksek konsantrasyonlardaki selenyuma tolerans sağlaması nedeni ile; bu çalışmada *Tiyosiyanat metiltransferaz* geninin karakterizasyonuna yoğunlaşmış ve bu genin ifadesi *P. distans* kök dokuları ve mayada RT-qPCR ile belirlenmiştir. ICP-MS analizi ile hücre içerisindeki selenyum miktarı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların; metal/metaloid stresine karşı toleranslılıkla ilişkili genlerin belirlenmesine yönelik çalışmalara ve bu streslere karşı dayanıklı kültür çeşitlerinin geliştirilmesine yönelik biyoteknolojik araştırmalara katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

ANAHTAR KELİMELE: cDNA kütüphanesi, kuraklık, maya, metal/metaloid toksisitesi, *Puccinellia distans*, selenyum, tolerans, tuz

JÜRİ: Doç. Dr. M. Aydın AKBUDAK (Danışman)

Prof. Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU

Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK

ABSTRACT

DETERMINATION OF SELENIUM (Se) TOXICITY TOLERANCE GENES IN EUROPEAN ALKALI GRASS (*Puccinellia distans*)

Kübra BUDAK

MScThesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. M. Aydın AKBUDAK

January 2023; 54 pages

Abiotic stresses such as metal/metalloid toxicity negatively impact plant growth and development. Selenium (Se), a metalloid, is essential for humans and animals, but excessive amounts of Se can cause toxicity in all organisms, including plants. The identification of mechanisms that tolerance to metal/metalloid factors plant species that are hyperaccumulators often used. In this study, *Puccinellia distans*, an accumulator species of boron and selenium, is known to have multi-tolerance to stress factors such as drought and salinity. While transcriptomic studies have attempted to shed light on Se tolerance mechanisms, the genes involved in this mechanism have not been clearly identified. To identify Se tolerance genes, the existing *P. distans* cDNA library was screened with yeast cells against toxic levels (15 mM) of selenium. As a result of the screening, two different genes that showed tolerance to toxic levels of selenium were identified in the root and leaf cDNA libraries, respectively, and were named PKS1 and PYS9.1. After sequencing, PKS1 was determined to be *Thiocyanate methyltransferase 2*, and PYS9.1 was determined to be *Zinc Transporter 8*. Colonies carrying the *Zinc Transporter 8* gene were found to be able to tolerate up to 15 mM sodium selenite on YNB medium, while yeast cells carrying the *Thiocyanate methyltransferase 2* gene were found to be able to tolerate up to 50 mM sodium selenite. The tolerance of *P. distans* "*Thiocyanate methyltransferase 2*" and "*Zinc Transporter 8*" genes to salt and drought stress was also investigated using yeast cells carrying these genes. However, due to its ability to provide tolerance to high concentrations of selenium, the characterization of the *Thiocyanate methyltransferase 2* gene was not carried out in this study. Future studies on the functional characterization of these genes in plant cells and their roles in the Se tolerance mechanism will contribute to the development of plant species with increased tolerance to metal/metalloid toxicity and other abiotic stresses.

KEYWORDS: cDNA library, drought, metal/metalloid toxicity, *Puccinellia distans*, tolerance, salt, selenium, yeast

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. M. Aydın AKBUDAK

Prof. Dr. Muhammet ŞAKİROĞLU

Assoc. Prof. Dr. Aysun ÖZÇELİK

ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan, çalışmalarına yön vermek ve devam ettirmek için bana fırsatlar sunan ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. M. Aydın AKBUDAK'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca manevi desteğini her zaman hissettiren Mümin İbrahim TEK'e, benimle aynı çalışma ortamını paylaşmakla birlikte bilgi ve birikimlerini bilimsel deneyimlerini esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarıma ve Şeyma Nur ERDEĞER'e teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca attığım her adımda ve eğitim hayatımdaki desteklerini esirgemeyen ve her zaman hissettiğim annem Çiğdem BUDAK, babam Rahmi BUDAK ve kız kardeşlerim Tuğba BUDAK ve Esmâ BUDAK'a teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
AKADEMİK BEYAN	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Selenyum	3
2.2. Selenyumun İnsanlar ve Hayvanlarda Toksik Etkileri	3
2.3. Bitkilerde ve Çevrede Selenyum	3
2.4. Metal–Metaloid Toksitesi ve Toksisitenin Moleküler Mekanizması.....	4
2.5. Se Hiperakümülatör Türler ve Yeni Yaklaşımlar.....	5
2.7. Ayrık Tuz Çimi (<i>P. distans</i>)	6
2.8. Maya cDNA Kütüphaneleri ve Metal Stresi Çalışmaları	7
3. MATERYAL VE METOT	8
3.1. <i>P. distans</i> cDNA Kütüphanesi ve Vektör Yapısı	8
3.2. YNB ve YPD Besiyeri	8
3.3. BY4741 İçin Toksik Selenyum Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	9
3.4. cDNA Kütüphanesinin <i>Escherichia coli</i> Hücrelerinde Çoğaltılması.....	9
3.5. Kök cDNA Kütüphanesinin Maya Hücrelerine Transformasyonu	10
3.6. Yaprak cDNA Kütüphanesinin Maya Hücrelerine Transformasyonu	12
3.7. EV (Empty Vector)’nin Maya Hücrelerine Transformasyonu.....	13
3.8. cDNA Kütüphanesinin Taranması.....	15
3.8.1. <i>P. distans</i> yaprak kütüphanesinin taranması.....	15
3.8.2. <i>P. distans</i> kök kütüphanesinin taranması.....	15
3.9. Damlatma Testi	15
3.9.1 <i>P. distans</i> yaprak kütüphanesi damlatma testi.....	15
3.9.2. <i>P. distans</i> kök kütüphanesi damlatma testi.....	16

3.10. Seri Dilüsyon.....	16
3.10.1. <i>P. distans</i> yaprak kütüphanesi seri dilüsyon.....	16
3.10.2. <i>P. distans</i> kök kütüphanesi seri dilüsyon.....	17
3.11. Maya Koloni PCR	17
3.12. Plazmit Kurtarma	18
3.12.1. <i>P. distans</i> yaprak kütüphanesi plazmit kurtarma.....	18
3.12.2. <i>P. distans</i> kök kütüphanesi plazmit kurtarma.....	18
3.13. DH5 α Kompetent Hücrelerine Transformasyon	18
3.13.2. DH5 α hücrelerine transformasyon.....	19
3.14. Re-Transformasyon	20
3.14.1. <i>P. distans</i> yaprak kütüphanesi re-transformasyon	20
3.14.2. <i>P. distans</i> kök kütüphanesi re-transformasyon	20
3.14.3. Re-transformasyon sonrası seri dilüsyon testi	21
3.15. Tuz ve Kuraklık Stres Denemeleri	21
3.15.1 Tuz stresi denemesi	21
3.15.2. Kuraklık stresi denemesi.....	21
3.16. Sekanslama ve Filogenetik Analizler	22
3.17. <i>P. distans</i> Yetiştirme ve RT-qPCR.....	22
3.18. Maya RT-qPCR.....	24
3.19. Hücre İçi Selenyum Miktarının ICP-MS ile Belirlenmesi	24
4. BULGULAR.....	27
4.1. cDNA Kütüphanesinin PCR ile Çeşitliliğinin Kontrolü	27
4.1.1. <i>P. distans</i> yaprak cDNA kütüphanesi.....	27
4.1.2. cDNA kütüphanesinin maya hücrelerine transformasyonu ve PCR.....	27
4.1.3. EV (Empty Vector) ‘nin restriksiyon enzimleri ile kesimi.....	28
4.2. Yaprak Kütüphanesinden Elde Edilen Koloniler	29
4.3. Kök Kütüphanesinden Elde Edilen Koloniler	29
4.4. Kolonilerin Taşıdıkları cDNA’ların PCR ile Kontrolü (Yaprak kütüphanesi) ...	30
4.5. Kolonilerin Taşıdıkları cDNA’ların PCR ile Kontrolü (Kök kütüphanesi)	30
4.6. Seri Dilüsyon Sonrası Hayatta Kalan Koloniler.....	31
4.7. Yaprak Seri Dilüsyon	31
4.8. Kök Seri Dilüsyon	31

4.9. Plazmit Kurtarma	32
4.9.1. <i>P.distans</i> yaprak kütüphanesi plazmit kurtarma	32
4.9.3. <i>P.distans</i> kök kütüphanesi plazmit kurtarma.....	33
4.10. Re-Transformasyon Sonrası Seri dilüsyon.....	33
4.11. Tuz Stresi Denemesi.....	34
4.12. Kuraklık Stresi Denemesi.....	35
4.13. Sekanslama ve Filogenetik Analizler	36
4.13.1. PKS1 için sekanslama ve filogenetik analizler.....	36
4.13.2. PYS9.1 için sekanslama ve filogenetik analizler.....	37
4.14. <i>P. distans</i> PKS1 için RT-qPCR.....	39
4.15. Maya PKS1 İçin RT-qPCR	39
4.16. Hücre İçi Selenyum Miktarının Belirlenmesi (ICP-MS)	40
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇLAR	47
7. KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Ayrık Tuz Çimi’nde (*P. distans*) Selenyum (Se) Toksisitesine Dayanıklılık Genlerinin Belirlenmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

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

Kübra BUDAK

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

B	: bor
bp	: baz çifti
C	: karbon
CaCl ₂	: kalsiyum klorür
Cd	: kadmiyum
dH ₂ O	: distile su
EtOH	: etanol
Fe	: demir
HCl	: hidroklorik asit
his	: histidin
kb	: kilobaz çifti
kg	: kilogram
kV	: kilovolt
leu	: lösin
M	: molar
met	: metiyonin
mg	: miligram
ml	: mililitre
mM	: milimolar
Mn	: manganez
N	: azot
NaCl	: sodyum klorür
NaClO	: sodyum hipoklorit
Na ₂ SeO ₃	: sodyum selenit

ng	: nanogram
Ni	: nikel
O	: oksijen
P	: fosfor
rpm	: dakikadaki devir sayısı
S	: kükürt
Se	: selenyum
SeCys	: selenosistein
SeMet	: selenometiyonin
SeMetCys	: selenyum-metil-selenosistein
SeO_3^{-2}	: selenit
SeO_4^{-2}	: selenat
Te	: tellür
ura	: urasil
V	: volt
Zn	: çinko
°C	: santigrat derece
.	: ondalık ayraç
+	: artı
/	: bölme
=	: eşittir
%	: yüzde
Ω	: ohm
μl	: mikrolitre
μF	: mikrofarad
μM	: mikromolar

µg : mikrogram

Δ : mutant

Kısaltmalar

APS1 : ATP sülfürülaz 1

ATP : Adenozin Trifosfat

cDNA : Komplementer Deoksiribonükleik Asit

CSM : Complete Supplement Mixture

DTT : Ditiyotritol

DNA : Deoksiribonükleik Asit

EV : Boş Vektör

GS : Glukosinolat

HMA : Ağır Metal ATPase

ICP-MS : İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektroskopisi

IRT : Demir Düzenleyici Taşıyıcılar

ITC : İzotiyosiyanat

JA : Jasmonik Asit

LB : Luria-Bertani

LiAc : Lityum Asetat

MTP : Metal Tolerans Proteinleri

MS : Murashige and Skoog

NCBI : Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi

NGS : Yeni Nesil Dizileme

NJ : Neighbor joining

NRAMP : Natural Resistance-Associated Macrophage Protein

OD : Optik Yoğunluk

ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PKS	: <i>P. distans</i> Kök Kütüphanesi
POT	: Potasyum Transporter
PR	: Patojen İlişkili
PYS	: <i>P. distans</i> Yaprak Kütüphanesi
RT-qPCR	: Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
RNA-Seq	: Ribonükleik Asit Sekanslama
SA	: Salisilik Asit
SBP	: Selenyum Bağlayıcı Protein
SMT	: Selenosistein Metiltransferaz
SULTR	: Sülfat Taşıyıcı Protein
TMT	: Tiyosiyanat Metiltransferaz
YNB	: Yeast Nitrogen Base
YPD	: Yeast Peptone Dextrose
ZIP	: Çinko-Demir ile Düzenlenmiş Taşıyıcı Benzeri Proteinler
ZRT	: Çinko ile Düzenlenmiş Taşıyıcılar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. cDNA kütüphanesinde kullanılan ifade vektörü (pA426GPD-ccdB)	8
Şekil 3.2. BY4751 Maya suşu için seçici YNB besiyerinde toksik konsantrasyon belirleme çalışması Na ₂ SeO ₃ içeren YNB besiyerleri	9
Şekil 3.3. <i>E. coli</i> hücrelerine <i>P. distans</i> yaprak cDNA kütüphanesinin elektroporasyonu sonrası çıkan transforme hücreler; a) Transformasyon sonrası ampsilin antibiyotiği içeren LB agara ekilen <i>E. coli</i> hücreleri; b) Kanamisin antibiyotiği içeren ortama ekilen <i>E. coli</i> hücreleri (Negatif kontrol); c) LB besiyerine ekilen <i>E. coli</i> hücreleri (Pozitif kontrol)	10
Şekil 3.4. Kök cDNA kütüphanesinin maya hücrelerine transformasyonu; a) YPD besiyerinde hücre (pozitif kontrol); a) YNB besiyerinde hücre (negatif kontrol); c) Transforme hücrelerin YNB besiyerinde 10 ⁻¹ dilüsyonu; d) 10 ⁻² dilüsyonu; e) 10 ⁻³ dilüsyonu	10
Şekil 3.5. Yaprak cDNA kütüphanesinin maya hücrelerine transformasyonu; a) YPD besiyerinde hücre (pozitif kontrol); b) YNB besiyerinde hücre (negatif kontrol); c) Transforme hücrelerin YNB besiyerinde 10 ⁻¹ dilüsyonu; d) 10 ⁻² dilüsyonu; e) 10 ⁻³ dilüsyonu	13
Şekil 3.6. pA426GPD-ccdB (EV) vektörünün maya hücrelerine transformasyonu; a) YPD besiyerinde hücre (pozitif kontrol); b) YNB besiyerinde hücre (negatif kontrol); c) Transforme hücrelerin YNB besiyerinde 10 ⁻¹ dilüsyonu; d) 10 ⁻² dilüsyonu; e) 10 ⁻³ dilüsyonu	14
Şekil 3.7. Yaprak kütüphanesinden seçilen kolonilerin 5mM, 10 mM, 15 mM ve 17 mM Na ₂ SeO ₃ içeren YNB besiyerlerinde damlatma testi.....	16
Şekil 3.8. Kök kütüphanesinden seçilen kolonilerin 5mM, 10 mM, 15 mM ve 17 mM Na ₂ SeO ₃ içeren YNB besiyerlerinde damlatma testi	16
Şekil 3.9. PYS9.1 ve PKS1 plazmitlerinin <i>E. coli</i> hücrelerine transformasyonu; a) LB besiyerinde PKS1 ve PYS 9.1 (Pozitif kontrol); b) Ampisilin içeren LB besiyerinde PKS1'i taşıyan <i>E. coli</i> hücreleri; c) Ampisilin içeren LB besiyerinde PYS9.1'i taşıyan <i>E. coli</i> hücreleri	19
Şekil 3.10. Yaprak kütüphanesinden elde edilen PYS9.1'in re-transformasyonu; a) YNB besiyerinde yabanıl tip BY4741 maya hücreleri (negatif kontrol); b) YPD besiyerinde yabanıl tip BY4741 maya hücreleri (pozitif kontrol); c) Transformasyon sonrasında YNB besiyerinde çıkan PYS9.1 transforme koloniler	20
Şekil 3.11. Kök kütüphanesinden elde edilen PKS1 plazmitinin re-transformasyonu; a) YNB besiyerinde yabanıl tip BY4741 maya hücreleri (negatif kontrol); b) YPD besiyerinde yabanıl tip BY4741 maya hücreleri (pozitif kontrol); c) Transformasyon sonrasında YNB besiyerinde çıkan PKS1 transforme koloniler	21
Şekil 3.12. MS ortamında gelişimlerini sürdüren <i>P. distans</i> bitkileri.....	22
Şekil 3.13. Hidroponik ortamında yetiştirilen <i>P. distans</i> bitkileri	23
Şekil 3.14. ICP analizi için sıvı kültürde farklı konsantrasyonlarda sodyum selenit stresi uygulanan maya (PKS1) hücreleri; a) EV, 5 mM ve 15 mM; b) EV, 30 mM ve 50 mM	25
Şekil 3.15. Elde edilen hücre pelletlerinin ultra saf ile yıkanması.....	25
Şekil 3.16. Farklı konsantrasyonlarda 48 saat stres verilmesinin ardından elde edilen kültüre ait pelletler	26

Şekil 3.17. Maya hücrelerinin asit ile yakılması için hazırlanması; a) 9 ml HNO ₃ ve 3 ml HCl karışımları; b) Elde edilen asit karışımlarına sırası ile hücre pelletlerinin eklenmiş hali	26
Şekil 4.1. Maya yaprak cDNA kütüphanesinden rastgele seçilen 10 koloninin taşıdıkları cDNA boyutlarının agaroz jelde incelenmesi	27
Şekil 4.2. Maya kök cDNA kütüphanesinden rastgele seçilen 6 koloninin taşıdıkları cDNA boyutlarının agaroz jelde incelenmesi	28
Şekil 4.3. pAGPD426-ccdB (EV) vektörünün XbaI enzimi ile kesim yapılarak doğrulanması	28
Şekil 4.4. Yaprak cDNA kütüphanesinin taranması; a) YNB cDNA kütüphanesini taşıyan koloniler (Pozitif kontrol); b) YNB besiyerine ekilen EV taşıyan maya hücreleri (Pozitif kontrol); c) 15 mM YNB besiyerinde EV taşıyan mayalar; e) 15 mM'da çıkan toleranslı maya kolonileri	29
Şekil 4.5. Kök cDNA kütüphanesinin taranması; a) YNB cDNA kütüphanesini taşıyan koloniler (Pozitif kontrol); b) YNB besiyerine ekilen EV taşıyan maya hücreleri (Pozitif kontrol); c) 15 mM YNB besiyerinde EV taşıyan mayalar; d) 15 mM'da çıkan maya kolonileri	29
Şekil 4.6. Yaprak cDNA kütüphanesinde tolerans sağlayan kolonilerin taşıdıkları cDNA boyutlarına ait jel görüntüsü	30
Şekil 4.7. Kök cDNA kütüphanesinde tolerans sağlayan kolonilerin taşıdıkları cDNA boyutlarına ait jel görüntüsü	30
Şekil 4.8. Yaprak kütüphanesinden elde edilen ve tolerans sağladığı belirlenen kolonilerin farklı konsantrasyonlarda seri dilüsyonu; 0 mM (kontrol), 5 mM, 10 mM ve 15 mM	30
Şekil 4.9. Kök kütüphanesinden elde edilen ve tolerans sağladığı belirlenen kolonilerin farklı konsantrasyonlarda seri dilüsyonu; 0 mM (kontrol), 5 mM, 10 mM, 15 mM, 17 mM	30
Şekil 4.10. Sırasıyla; PKS.1 ve PYS9.1 Koloni PCR ile doğrulanması	30
Şekil 4.11. Yaprak kütüphanesinden seçilen PYS9.1 ve kök kütüphanesinden PKS1 kolonilerinin tekrar transformasyonu, ardından seri dilüsyon testinin uygulanması; a) 0 mM ve 15 mM'da EV ve PYS9.1; b) 0 mM ve 15 mM'da EV ve PKS1	30
Şekil 4.12. EV (kontrol) ve PKS1'in farklı konsantrasyonlarda sodyum selenit içeren besiyerlerinde seri dilüsyonu	30
Şekil 4.13. Farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren besiyerlerinde kök ve yaprak kütüphanesinden elde edilen kolonilerin test edilmesi; a) 0 M (kontrol); b) 1.5 M NaCl; c) 2 M NaCl; d) 2.3 M NaCl	35
Şekil 4.14. Farklı konsantrasyonlarda sorbitol içeren besiyerlerinde kök ve yaprak kütüphanesinden elde edilen kolonilerin test edilmesi; a) 0 M (kontrol); b) 2 M sorbitol; c) 3 M sorbitol; d) 3.5 M sorbitol	35
Şekil 4.15. PKS1 plazmine ait sekansdan SnapGene proramı ile vektör haritasının oluşturulması	36
Şekil 4.16. PKS1 plazmitindeki cDNA bölgesinin NCBI BLAST programı ile benzerlik gösteren gen grupları	36
Şekil 4.17. Elde edilen PKS1'e ait cDNA sekansı kullanılarak MEGA 7.0 programında filogenetik ağaç çizilmesi	37
Şekil 4.18. PYS 9.1 plazmine ait sekansdan SnapGene proramı ile vektör haritasının oluşturulması	37

Şekil 4.19. PKS1 plazmitindeki cDNA bölgesinin NCBI BLAST programı ile bakılması sonucunda benzerlik gösteren gen grupları	37
Şekil 4.20. Elde edilen PYS9.1'e ait cDNA sekansı kullanılarak MEGA 7.0 programında filogenetik ağaç çizilmesi	38
Şekil 4.21. <i>P. distans</i> kök dokularından elde edilen RNA'lardan PKS1'e spesifik primerler kullanılarak farklı saatlerde stres sonrası RT-qPCR ile gen ifadelerine bakılması	39
Şekil 4.22. <i>P. distans</i> kök dokularından elde edilen RNA'lardan PKS1'e spesifik primerler kullanılarak farklı saatlerde stres sonrası RT-qPCR ile gen ifadelerine bakılması	40
Şekil 4.23. PKS1 içeren maya hücrelerine farklı konsantrasyonlarda sodyum selenit verilmesi sonucunda hücre içi Se birikiminin ICP-MS ile belirlenmesi.....	40



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. <i>XbaI</i> restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu.....	14
Çizelge 3.2. PCR reaksiyonu	17
Çizelge 3.3. PCR reaksiyonu koşulları	18
Çizelge 3.4. RT-qPCR reaksiyon bileşenleri	23
Çizelge 3.5. <i>P. distans</i> RT-qPCR'da kullanılan primer çiftleri.....	24
Çizelge 3.6. PKS1q2 ve TAF10 ileri (F) ve geri (R) primerleri	24

1. GİRİŞ

Metal ve metaloid elementler gezegenimizin doğal bir parçasıdır ve birçok canlının yaşamını sürdürmesinde temel öneme sahiptirler. Metal/metaloidler doğada yaygın halde bulunmaktadır, ancak yüksek konsantrasyonlarda birçok canlı için toksisiteye sebep olmaktadır. Doğada metal/metaloid toksisitesi, özellikle insan faaliyetlerinin bir sonucu olarak her geçen gün artmaktadır. Bu durum toprak kirliliğine sebep olmakla birlikte, yüksek konsantrasyonlardaki elementler besin zincirine dahil olarak, insanlar ve hayvanlarda toksisiteye neden olmaktadır (Angulo vd. 2021).

Bir metaloid olan selenyum (Se) insanlar ve hayvanlar için esansiyel elementlerden birisidir. Ancak fazlalığı bitkiler dahil tüm canlılarda toksisiteye neden olmaktadır. Se toksisitesi genellikle yoğun sanayi ve madencilik faaliyetlerinin sonucudur (Gebreyesus ve Zewge 2019). Aynı şekilde bazı topraklar ve maden yatakları doğal olarak zengin selenyum içeriğine sahiptir, selenyum içeriği yüksek (selenifer) topraklarda Se toksisitesine sıklıkla rastlanılmaktadır (Zhu vd. 2009). Selenyum toksisitesinin bitkilerdeki etkilerinden birisi toksik metal veya metaloitlerle etkileşime girerek, bu elementlerin toksik etkilerini artırmasıdır (Hasanuzzaman vd. 2020). Ayrıca reaktif oksijen türlerinin (ROS) artmasına ve protein yapılarında bozulmalara sebep olmaktadır (Gomes-Junior vd. 2007). Bu nedenle bitkilerde Se toksisitesine karşı tolerans genlerinin ve mekanizmalarının aydınlatılması önem kazanmaktadır.

Hiperakümülatör bitkilerin, diğer bitkilere kıyasla metal / metaloid elementlerini çok daha yüksek miktarlarda dokularında biriktirebildikleri bilinmektedir (Freeman vd. 2010). Bu bitkiler topraktan bir veya birden fazla metal / metaloidi eş zamanlı olarak alabilmekte ve bunları köklerinde ve/veya toprak üstü aksanlarında depolarken hiçbir toksisite belirtisi göstermemektedirler (Rascio ve Navari-Izzo 2011). Doğada bahsedilen metal/metaloid toksisitesini içeren topraklarda hayatta kalabilen hiperakümülatör bitkilerin sahip oldukları moleküler mekanizmalar ve ilişkili genler, günümüzde araştırma konusu olmuştur.

Çalışmamızda seçilen *Puccinellia distans* bitkisi bor (B) hiperakümülatör ve selenyum (Se) akümülatör bir bitkidir. Mevcut çalışmalar *P. distans*'ın diğer bitkiler için toksik konsantrasyonlarda bor içeren topraklarda rahatlıkla yetişebildiğini göstermiştir (Babaoğlu ve Topal 2004; Stiles vd. 2010). *P. distans*'ın yüksek miktarda borun yanı sıra, kuraklık (Babaoğlu vd. 2004) ve tuzluluk (Dashtebani ve Aliasgharzad 2014) gibi diğer abiyotik stresleri de tolere edebildiği belirlenmiştir. Kök vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada yüksek miktarda Se tolere edebilen akümülatör bir bitki olduğu belirtilmekle birlikte, yapılan transkriptomik çalışmalarda Se stresinde rol alan genler net bir şekilde ortaya konulmamıştır.

Bu nedenle; çalışmamızda *P. distans* bitkisinden elde edilen yaprak ve kök cDNA kütüphanesi kullanılarak, Se stresine karşı toleranslılık ile ilgili genler araştırılmıştır. Kütüphaneyi taramak amacıyla maya (BY4741) hücreleri kullanılmıştır. Kütüphanenin maya hücreleri kullanılarak, toksik dozda selenyum içeren besi ortamında taranması sonucunda iki farklı geni taşıyan kolonilerin hayatta kaldığı tespit edilmiştir. Kök ve yapraklar kütüphanelerinden elde edilen cDNA'ların sırasıyla "PKS1 (*P. distans* Kök Selenyum 1)" ve "PYS9.1 (*P. distans* Yaprak Selenyum 9.1)" olarak isimlendirilmiştir. Belirlenen bu genlerin dizilimi sekanslama ile belirlenmiş olup daha sonrasında bu

genlerin fonksiyonlarını belirlemek amacıyla seri-dilüsyon ve damlatma testi; model organizma olan *S. cerevisiae* BY4741 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca PKS1 olarak isimlendirilen geni taşıyan kolonilerin, PYS9.1'i taşıyan kolonilere göre daha yüksek konsantrasyonlardaki seleniyumu tolere etmesi nedeniyle bu genin fonksiyonuna yönelik; ICP-MS ve RT-qPCR işlemleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca aynı genin ifadesi *P. distans*'dan elde edilen kök dokuları kullanılarak RT-qPCR ile belirlenmiştir.

Elde edilen verilerin; hiperakümülatör veya akümülatör bitki türlerinin kullanıldığı fitoremediasyon yöntemi ile toprak ve çevredeki metal/metaloidlerin arındırılmasına yönelik çalışmalarda veya bu streslere karşı dayanıklı kültür bitkilerinin geliştirilmesine yönelik biyoteknolojik yaklaşımlarda kullanılabileceği düşünülmektedir.



2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Selenyum

Selenyum (Se) ilk olarak İsveçli kimyacı Jacop Berzelius Jöns tarafından, Tellür (Te) izole etmeye çalışırken keşfedilmiştir. Başlangıçta elde edilen element tellür olarak adlandırıldıktan sonra, farklı kimyasal özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır. Selenyum olarak isimlendirilen bu elementin isim kökeni; mitolojik karakter olan Yunan Ay Tanrıçası “Selene”den gelmektedir. Periyodik tabloda kalkojenler (16A) grubunda yer alan ve atom numarası 34 olan selenyum ametal element olarak sınıflandırılmaktadır. Bir metaloid olup, NCBI-PubChem’de kimyasal özellikler bakımından metaller ve ametaller arasındaki bir ara element olarak nitelendirilmektedir. Ayrıca kimyasal ve fiziksel özellikleri kükürt (S) ve tellür (Te) ile oldukça benzerdir (Mehdi vd. 2013). Doğada nadiren element formunda var olan selenyum, bakır, gümüş, kurşun, cıva gibi metallerin cevherlerinde selenit bileşikleri halinde bulunmaktadır (Gebreyessus ve Zewge 2019).

2.2. Selenyumun İnsanlar ve Hayvanlarda Toksik Etkileri

Selenyum insanlar ve hayvanlar için esansiyel olarak nitelendirilen temel elementlerden birisidir. Ancak fazla miktarda alınması toksisiteye neden olmaktadır. Bitkiler insanlar ve hayvanlar için temel selenyum kaynaklarından birisidir. Bu sebeple bitkilerde toksik konsantrasyonlarda bulunan Se besin zinciri ile diğer canlıları etkilemektedir. İnsanlarda selenyum toksisitesinin selenoza, saç ve tırnak dökülmelerine, nörolojik hasara ve ileri boyutta ölümlere sebep olduğu bildirilmiştir (Vinceti vd. 2001). Hayvanlarda minimum alınması gereken Se miktarı 0.05-010 mg/kg’dır. Hayvan yemlerinde bulunan Se konsantrasyonunun 2-5 mg/kg’a ulaşması durumunda bu yemlerin tüketilmesi toksisiteye sebep olmaktadır (Gupta ve Gupta 2017). Hossain vd. (2021) tarafından belirtildiğine göre; Güney Dakato eyaletinde, Se içeriği yüksek buğday danelerinin, tavuk yemi olarak kullanılması sonucunda kümes hayvanlarının ölümü rapor edilmiştir (Franke 1934).

2.3. Bitkilerde ve Çevrede Selenyum

Birçok canlı türü selenyum ihtiyacını büyük ölçüde bitkilerden karşılamaktadır. Ancak, selenyum bitkiler için esansiyel bir element olmamasına rağmen; Se konsantrasyonuna ve kimyasal formlarına göre bitkilerde selenyumun hem olumlu hem de toksik etkileri bildirilmiştir (Hasanuzzaman vd. 2018). Ayrıca, selenyumun bitkilere düşük dozlarda uygulanması sonucunda birçok olumlu etkisi bildirilmiştir. Bilinen olumlu etkilerinden birisi, ağır metal stresinin azaltılmasında görev almasıdır (Bhatia vd. 2013). Ayrıca bitki-biyotik etmen etkileşimlerinin incelenmesi sonucunda Se birikiminin genel olarak biyotik streslere karşı koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir. Ancak, selenyumun bu koruyucu etkisi konsantrasyonla ilişkili olarak değişmektedir (Pilon-Smits 2019).

Fazla miktarda Se alınması durumunda bitkilerde toksik etkilere neden olmaktadır. Aşırı selenyum bitkilerde; solma, kloroz ve bodur kök/sürgün gelişimine neden olmaktadır (Kolbert vd. 2019). Protein yapısının bozulmasına neden olmakla birlikte, ileriki aşamalarda bitki ölümü ile sonuçlanmaktadır (El-Mehdawi vd. 2011). Diğer yandan zararlılar, polinatörler ve bitkiler arasındaki etkileşimler selenyuma

tolerans açısından türlerin evrimine yol açmaktadır ve bu durum ekosistemdeki selenyum döngüsünü etkilemektedir (Schiavon ve Pilon-Smits 2017; Pilon-Smits 2019).

Selenyum doğada organik; selenosistein (Se-Cys), selenometiyonin (Se-Met), Se-metilselenosistein (SeMet-SeCys) ve inorganik; selenat (SeO_4^{2-}), selenit (SeO_3^{2-}) ve selenyum elementi (Se) olmak üzere farklı formlarda bulunmaktadır. Bahsedilen Se formları; topraktaki pH, mikroorganizma aktiviteleri, sıcaklık, nem ve toprak kalitesi gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir (Hasanuzzaman vd. 2020). Bitkiler genel olarak topraktan selenat ve selenit formlarını almaktadır (Kolbert vd. 2019). Aynı zamanda selenat ve selenit; doğada selenyum toksisitesinin %95'ine sebep olan en toksik formlardır (Gebreyesus ve Zewge 2019).

Toprakta Se konsantrasyonu; toprak yapısına, mevcut organik maddeler ve yağışlara bağlı olarak değişmekle birlikte, dünya genelinde topraktaki selenyum miktarı 0,4 mg/kg'dır. Ancak, Se konsantrasyonu yüksek olan selenifer topraklarda bu oran (>2-5000 mg/kg arasında değişmektedir (Gupta ve Gupta 2017).

2.4. Metal–Metaloid Toksitesi ve Toksisitenin Moleküler Mekanizması

Çeşitli doğal süreçler ve endüstriyel faaliyetler, toprakta metal/metaloid birikimini arttırmaktadır. Metaller biyolojik olarak doğada parçalanamazlar. Toprakta ve yer altı sularına karışan metaller besin zincirine dahil olup, ekolojik dengeyi bozarak birçok canlı türü için toksisiteye sebep olmaktadır (Yan vd. 2020).

Düşük dozlarda bulunan metal veya metaloidler bitkilerde gerçekleşen reaksiyonlara dahil olarak mikro besinler gibi hareket edebilir ve bitki gelişiminde önemli roller oynayabilirler. Ancak belli konsantrasyonları aştıklarında bitkilerde bu durum toksisite ile sonuçlanmaktadır. Bitkilerde veya diğer canlılarda yaşamsal faaliyetler için önemli görevler üstlenen kofaktör veya ligandlarda bulunan iyonlarla rekabet etme kapasitesine göre zararlı etkileri ortaya çıkabilmektedir. Bu durum iyonların yer değiştirmesine, moleküllerin yapı ve fonksiyonlarının bozulmasına sebep olmaktadır (Angulo vd. 2021).

Benzer durum selenyum toksisitesi sırasında da meydana gelmektedir. Selenyum kimyasal yapı olarak kükürte (S) benzemektedir. Bu nedenle Se çoğu kez S metabolik yollarıyla ve taşıyıcı proteinlerle bitkilere alınarak diğer organlara taşınabilmektedir. Kloroplastta S metabolik yolları önce selenatı selenite, ardından enzimatik olarak selenosistein (SeCys)'e ve selenomethiyonin (SeMet) formuna indirger. Oluşan SeCys ve SeMet gibi aminoasitlerin, protein zincirinde Cys ve Met'in yerini alması sonucunda proteinlerde yapı ve fonksiyon bozuklukları meydana gelmektedir (Gupta ve Gupta 2017).

Metal/metaloid elementlerin topraktan alınarak sürgünlerine taşınmasında ve depolanmasında, belirli taşıyıcı proteinler rol oynamaktadır. Bu özel taşıyıcılar (transporter) köklerde hücre zarında bulunmaktadır ve metallerin topraktan bitki bünyesine alınmasını sağlamaktadırlar. Aynı şekilde, bitki bünyesine alındıktan sonra elementlerin çeşitli dokulara taşınmasında da rol oynamaktadırlar. Genel olarak tanımlanan metal taşıyıcı gen aileleri ZIP (Zinc-regulated transporters, Iron-regulated

transporter-like Proteins), HMA (Heavy Metal ATPase), MTP (Metal Tolerance Proteins) ve NRAMP (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein)'lerdir (Yan vd. 2020).

ZIP protein ailesinin taşıyıcıları olan ZRT (zinc-regulated transporters) ve IRT (iron-regulated transporter) benzeri proteinler; birçok elementin örneğin, Demir (Fe), Manganez (Mn), Çinko (Zn), Kadmiyum (Cd) vb. kökten alınarak, çeşitli dokulara taşınmasında ve ağır metallerin biriktirilmesi süreçlerinde yer almaktadır (Corso ve Torre 2020).

Bitkilerde Se biriktirebilme ve bu mekanizmada rol oynayan yolların belirlenmesi, yalnızca Se toksisitesin giderilmesinde değil; aynı zamanda eksikliğinin de giderilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir (Zhao ve McGrath 2009).

Bitkiler için selenyumun kullanılabilir formu selenat (SeO_4^{2-}) ve selenit (SeO_3^{2-})'tir. Bitkiler, her iki Se formunu alabilmekle birlikte, topraktan dokulara alınması selenyuma özgü olan taşıyıcı proteinler ile gerçekleşmez. Selenat; S taşıyıcıları olan *SULTR* (Sulfate transporters) ile selenit; fosfat (P) taşıyıcıları ve aquaporinler ile taşınmaktadır (Trippe ve Pilon-Smits 2021).

Literatürde yapılan çalışmalar, Se birikiminde rol alan farklı genleri ortaya koymuştur. *Arabidopsis thaliana*'dan elde edilen ATP sülfürülaz (*APS1*) geninin *Brassica juncea*'da aşırı ifadesi sonucunda bitkilerde Se birikimini üç kat artırmıştır (Pilon-Smits vd. 1999).

Benzer şekilde Se bağlayıcı protein (SBP) homologunun *A. thaliana*'da aşırı ifadenmesi sonucunda selenyuma, ayrıca kadmiyuma karşı toleransın arttığı bildirilmiştir (Schild vd. 2014).

2.5. Se Hiperakümülatör Türler ve Yeni Yaklaşımlar

Hiperakümülatör bitki türleri, birçok metal/metaloid elementi yüksek konsantrasyonlarda biriktirebilmektedirler. Yüksek miktarda metal/metaloid içeren topraklarda, hiçbir toksisite özelliği göstermeden kolaylıkla yetişebilmektedirler (Rascio ve Navari-Izzo 2011). Ayrıca, bu bitki türleri için metal birikimi patojenlere karşı doğal bir savunma aracıdır.

Hiperakümülatör bitkilerin yüksek miktarda metal metaloid biriktirebilme mekanizmalarının aydınlatılması, toksisiteye sebep olan elementlerin ortamdan uzaklaştırılması için oldukça önemlidir (Leitenmaier ve Küpper 2013). Keeran vd. (2019)'e göre hiperakümülatör türlerini diğer bitki türlerinden ayıran sıralanmış üç özellik bulunmaktadır.

- 1- Toprakta bulunan ağır metalleri yüksek konsantrasyonda alma kapasitesi
- 2- Metal/metaloidlerin hızlı ve etkili şekilde köklerden alındıktan sonra sürgünlere taşınması
- 3- Yapraklarda yüksek miktarda elementleri biriktirebilme kapasiteleridir.

Hiperakümülatör türler üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda, yüksek miktarda metal/metaloid biriktirebilme kapasitesinin altında yatan gen veya genler araştırılmıştır. Ancak, bu özelliğin yeni gen/genlerden ziyade hem hiperakümülatör türler hem de diğer bitki gruplarında var olan ancak farklı şekilde ifade edilerek düzenlenen genlerle ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Rascio ve Navari-Izzo 2011).

Bitkilerde genel olarak selenyum biriktirme miktarı, türlere ve yetiştikleri koşullara göre çeşitlilik göstermektedir. Tahıl tohumlarının, yüksek miktarda selenyum biriktirebilme kabiliyetine sahip oldukları bilinmektedir. Aynı zamanda *Brassicaceae* familyasına ait sarımsak, lahanası, brokoli, hardal gibi bitkiler ve Brezilya fıstığı, selenyum içeriği bakımında zengin bitkilerden bazılarıdır (Hasanuzzaman vd. 2020). Yüksek miktarda Se biriktirebilen hiperakümülatör bitkilerin doğal yaşam alanları genellikle selenifer topraklardır ve 1930 yılında bir grup araştırmacı Se hiperakümülatörüne sahip, seleniferli topraklarda yetişen bitki türlerini tanımlamıştır (Hossain vd. 2021).

Bilenen yaklaşık 50 Se hiperakümülatör familyası bulunmakla beraber en bilinen türler; *Fabaceae*, *Asteraceae* ve *Brassicaceae* familyalarında bulunmaktadır (Reynolds ve Pilon-Smits 2018). Bu bitkiler Se içeren topraklarda hiçbir toksisite göstermeden 1000-15,000 mg Se depolayabilmektedirler (El-Mehdawi ve Pilon-Smits 2012).

Hiperakümülatör türler genellikle fitoremediasyon tekniklerinde kullanılmaktadır. Fitoremediasyon; çevredeki yüksek konsantrasyonlarda bulunan metal/metaloidlerin bitkiler aracılığıyla uzaklaştırılmasını kapsayan yöntemlerin bütünüdür (Yan vd. 2020).

Diğer bir yandan bitkilere yüksek miktarlarda Se biriktirebilme kapasitesinin kazandırılması, Se eksikliği görülen bölgeler için bir alternatif yaklaşım olarak görülmektedir. Bitkiler birçok canlı için temel Se kaynağıdır. Bu nedenle belirli gıdalardaki var olan Se miktarının artırılması veya farklı besinlere Se biriktirebilme özelliğinin kazandırılması, küresel olarak Se yetersizliği problemine karşı alternatif bir çözüm olacağı düşünülmektedir (Hasanuzzaman vd. 2020).

Örneğin; *Brassica juncea* L. (Hint hardalı), Kaliforniya’da tarım arazilerinde ve yer altı sularında Se kirliliğini uzaklaştırmak amacıyla kullanılmıştır. Hasat sonrası Se içeriği yüksek hardal bitkileri, hayvanlar için Se takviyesi olarak kullanılmıştır (Bañuelos vd. 2010).

2.7. Ayrık Tuz Çimi (*P. distans*)

Ayrık tuz çimi (*P. distans*) genel olarak tuzlu ve alkali topraklarda yetişen, *Poaceae* familyasına ait monokotiledon bir bitkidir (Öztürk vd. 2017). Mevcut çalışmalar ile *P. distans*’ın bor (B) hiperakümülatörü ve selenyum (Se) akümülatörü bir tür olduğu belirlenmiştir. Diğer bitkiler için toksik konsantrasyonlarda bor içeren topraklarda rahatlıkla yetişebildiğini göstermiştir (Babaoğlu vd. 2004; Stiles vd. 2010). *P. distans*’ın yüksek konsantrasyonlarda borun yanı sıra, kuraklık (Babaoğlu vd. 2004; Stiles vd. 2010) ve tuzluluk (Dashtebani vd. 2014) gibi diğer abiyotik streslere karşı da tolerans gösterdiği belirlenmiştir. Kök vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada *P. distans*’ın Se akümülatörü olduğu ve Se stresi altındaki transkriptomu RNA dizileme (RNAseq) yoluyla ortaya konulmuştur.

2.8. Maya cDNA Kütüphaneleri ve Metal Stresi Çalışmaları

Saccharomyces cerevisiae 16 kromozoma ve 12.068 kb'lık genomik DNA'ya sahip ökaryotik bir organizmadır (Parapouli vd. 2020). Ekmek mayası olan *S. cerevisiae* ökaryot canlılar arasında en çok çalışılan model organizmalardan birisidir (Duina vd. 2014).

S. cerevisiae'nin ökaryotlarda bulunan hemen hemen tüm biyolojik işlevlere sahip olması, kolay üretilmesi, genetik manipülasyonun kolay olması bilimsel çalışmalar için sıklıkla tercih edilmesine sebep olmaktadır (Parapouli vd. 2020). *S. cerevisiae* genel olarak moleküler biyoloji uygulamalarında ve genetik kütüphanelerin oluşturulmasında kullanılır. Bu kütüphaneler; bir promotor kontrolü altında ifade edilen cDNA'lar veya genomik DNA'lardan oluşan kütüphaneler olabilir. Böylece maya hücreleri, indüklenebilir promotör sayesinde yüksek seviyede ifade edilerek istenen genlere sahip vektörlerin seçimine imkân tanır. Yine, stres koşulları altında büyütülen maya hücrelerinde ifade edilen genler, bir cDNA kütüphanesinde mevcut dayanıklılık genlerinin tanımlanmasına olanak sağlamaktadır (Liu 2002). Literatürde cDNA kütüphaneleri ve *S. cerevisiae*'nin stres koşullarında dayanıklılık genlerinin tanımlanmasında faydalandığı pek çok çalışma mevcuttur.

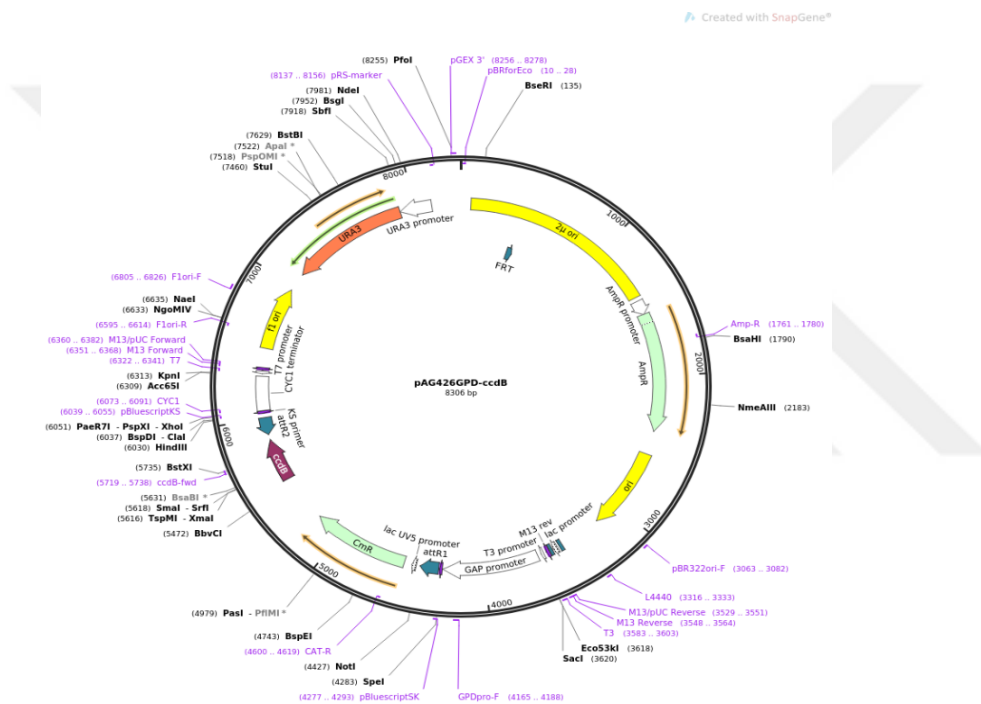
Bu çalışmalardan birisinde; halofit bir tür olan *Paspalum vaginatum* cDNA kütüphanelerinin, maya hücrelerinde tuzluluk ve Cd stresi altında taranmasıyla tuzluluğa karşı tolerans sağladığı düşünülen onsekiz adet ve Cd stresine karşı da beş adet gen belirlenmiştir (Chen vd. 2016).

Bir diğer çalışmada ise buğdaydan elde edilen cDNA kütüphanesi tuz, soğuk ve kuraklık stresleri uygulanarak maya hücreleri ile taranmıştır (Wang vd. 2019). Böylelikle, bitkilerde normalde patojen saldırısına karşı savunmada rol oynayan *PR* gen ailesine mensup *TaPR1-1* geninin, maya hücrelerinde üç farklı abiyotik strese karşı tolerans sağladığı belirlenmiştir. Aynı çalışmanın devamında, *TaPR1-1* geni *A. thaliana*'da aşırı ifadelendirilmiştir ve *TaPR1-1*'in, mayada olduğu gibi bitkilerde de tuz, soğuk ve kuraklık streslerine karşı tolerans sağladığı doğrulanmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. *P. distans* cDNA Kütüphanesi ve Vektör Yapısı

Çalışmada, Akdeniz Üniversitesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Transformasyon Laboratuvarı'nda mevcut olan *P. distans* cDNA kütüphanesi kullanılmıştır. cDNA kütüphanesi, *P. distans*'a ait bitkilere bor stresi uygulanmasının ardından kök ve yapraklardan izole edilen RNA'lar kullanılarak hazırlanmıştır. Kütüphane hazırlığında ise pA426GPD-ccdB (Şekil 3.1) vektörü kullanılmıştır. attR1 ve attR2 bölgeleri arasında kalan “ccdB+CmR” yerine, Gateway klonlama sonucunda, farklı boyutlarda *P.distans* bitkisine ait cDNA'lar aktararak, yaprak ve kök olmak üzere kurulmuş iki ayrı kütüphane mevcuttur. pAG46GPD-cDNA vektörleri sonraki aşamalarda kök (PKS) ve yaprak (PYS) cDNA kütüphanesi olarak adlandırılmıştır.



Şekil 3.1. cDNA kütüphanesinde kullanılan ifade vektörü (pA426GPD-ccdB)

Kullanılan BY4741 (MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0) mutant bir maya ırkıdır. Kullanılan vektörün içerdiği URA3 geni nedeniyle, besiyerlerinde transformant kolonileri seçmek için urasil mutasyonundan yararlanılmıştır. Urasil seçiciliği için YNB besiyerleri kullanılmıştır. Vektörü taşıyan transformant maya hücreleri urasil içermeyen YNB besiyerinde “URA3” proteini üreterek kolaylıkla hayatta kalabilmektedir.

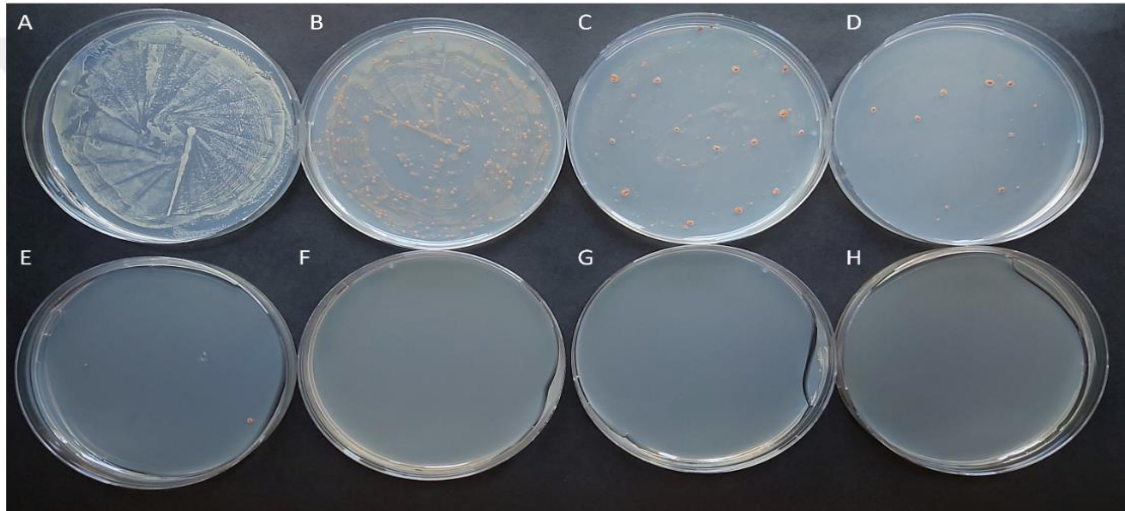
3.2. YNB ve YPD Besiyeri

YNB (Yeast Nitrogen Base): Urasil oksotrafik mayalar için seçici besiyeridir. Amino asit içermez. Bu sebeple aminoasitleri içeren (ancak urasil içermeyen) CSM-ura ile birlikte kullanılır. *S. cerevisiae* suşlarına transformasyon sonucunda transformantların seçiminde kullanılmaktadır.

YPD (Yeast extract Peptone Dextrose): Seçici olmayan bir besi ortamı olup, maya hücrelerinin büyütülmesi için kullanılan yaygın bir besiyeridir.

3.3. BY4741 İçin Toksik Selenyum Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Kütüphane tarama işlemlerine geçilmeden önce, literatürde BY4741 (WT) maya ırkına ait seçici YNB besiyerinde toksik selenyum konsantrasyonuna rastlanmamıştır. Bu nedenle toksik konsantrasyonu belirlemek amacıyla; 0, 1, 3, 5, 7, 10, 15 ve 20 mM olmak üzere farklı konsantrasyonlarda sodyum selenit (Na_2SeO_3) içeren YNB besiyerleri hazırlanmıştır. Sodyum selenit stok solüsyonu Kieliszek vd. (2016)' a göre hazırlanarak kullanılmıştır. Farklı dozlarda sodyum selenit içeren tüm besiyerlerine, boş vektör içeren maya hücreleri (EV) yayılmıştır. 3 ve 7. günler içerisinde petriler gözlemlenerek takibi yapılmıştır. 15 mM'a kadar tüm petrilerde koloni çıktığı görülmüştür (Şekil 3.2). Bu nedenle kütüphane taramak için toksik doz 15 mM olarak seçilmiştir.



Şekil 3.2. BY4751 Maya suşu için seçici YNB besiyerinde toksik konsantrasyon belirleme çalışması; **a)** 0 mM kontrol; **b)** 1mM Na_2SeO_3 **c)** 3 mM Na_2SeO_3 **d)** 5 mM Na_2SeO_3 ; **e)** 7 mM Na_2SeO_3 ; **f)** 10 mM Na_2SeO_3 ; **g)** 15 mM Na_2SeO_3 ; **h)** 20 mM Na_2SeO_3 içeren YNB besiyerleri

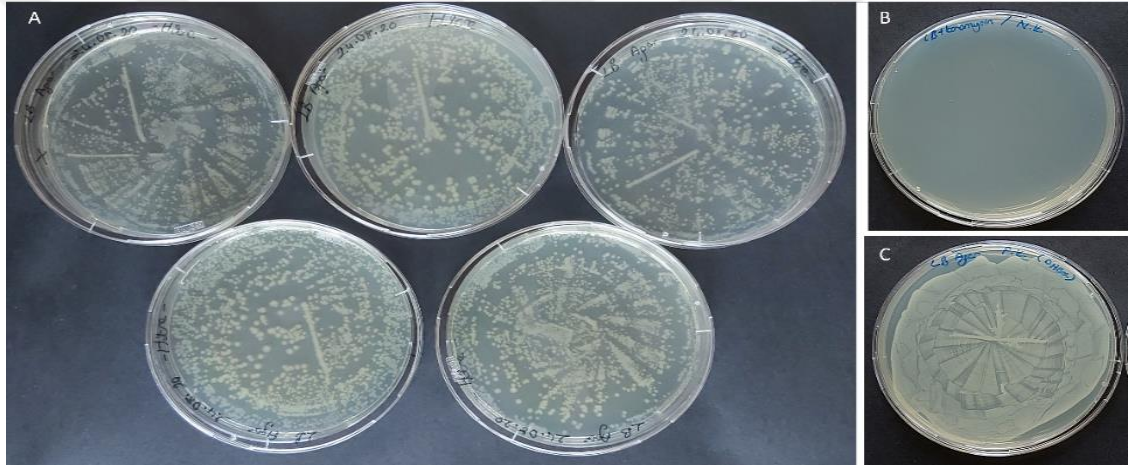
3.4. cDNA Kütüphanesinin *Escherichia coli* Hücrelerinde Çoğaltılması

cDNA kütüphanesini yeteri kadar çoğaltmak amacıyla *E. coli* hücrelerine elektroporasyon ile aktarılmıştır. Elektroporasyon işlemi için;

- Elektroporasyon küvetleri (Biorad) buz üzerinde soğumaya bırakılmıştır ve $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilen DH10B T1 kompetent *E. coli* hücreleri (ElectroMax) buz üzerinde çözdürülmüştür.
- Ardından elektroporasyon küvetlerine 100 μL *E. coli* ve 5 μL pAG426-cDNA vektörü eklenerek (her bir kütüphane için ayrı olarak) pipet yardımıyla hafifçe karıştırılmıştır. Küvetler cihaza yerleştirildikten sonra elektroporasyon işlemi; 2.2 kV, 200 Ω ve 25 μF şartlarında gerçekleştirilmiştir.
- Elektroporasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra küvetlere 900 μL LB besiyeri

eklenmiştir ve hücreler 15 ml'lik tüplere alınmıştır.

- Transformasyon yapılan hücreler çalkalayıcıya alınarak 37 °C'de 250 rpm'de 1 saat boyunca çalkalanmaya bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonrasında daha önceden hazırlanmış 100 µg/ml ampicilin antibiyotiği içeren LB agar besiyerlerine 100'er µL hücreler yayılmıştır ve 37 °C'de inkübe edilmiştir
- Ertesi gün tüm petrilerde koloni oluşumu gözlemlenmiştir. Elde edilen transforme hücreler petrilerden kazıyıcı yardımı ile 30 ml sıvı LB besiyerine toplanmıştır.
- Tüm petrilerden hücreler toplandıktan sonra soğutmalı santrifüjde 10 dk 4000 rpm'de çöktürülmüştür.
- Pellete zarar vermeden üst fazda bulunan sıvı LB besiyeri uzaklaştırılmıştır. GeneJET Plasmid Miniprep kiti kullanılarak plazmit izolasyonu aşamasına geçilmiştir.
- Elde edilen plazmitlerde bulunan cDNA'ların çeşitliliğini kontrol etmek amacıyla rastgele 10 plazmit seçilerek cDNA bölgelerinin uçlarında bulunan CYC ve GPD-F pro primerleri ile PCR reaksiyonu kurulmuştur.



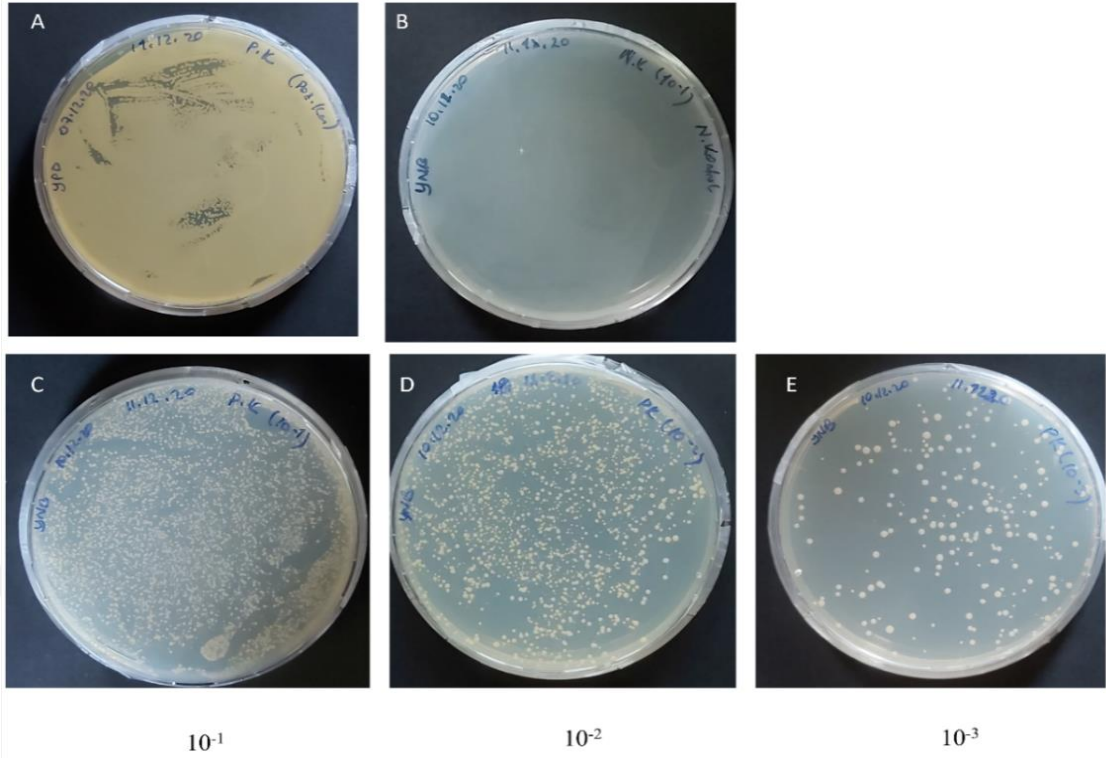
Şekil 3.3. *E. coli* hücrelerine *P. distans* yaprak cDNA kütüphanesinin elektroporasyonu sonrası çıkan transforme hücreler; **a)** Transformasyon sonrası ampicilin antibiyotiği içeren LB agara ekilen *E. coli* hücreleri; **b)** Kanamisin antibiyotiği içeren ortama ekilen *E. coli* hücreleri (Negatif kontrol); **c)** LB besiyerine ekilen *E. coli* hücreleri (Pozitif kontrol)

3.5. Kök cDNA Kütüphanesinin Maya Hücrelerine Transformasyonu

Kök cDNA kütüphanesi, *E. coli* hücrelerinde çoğaltıldıktan sonra yabanil tip BY4741 maya hücrelerine transformasyonu yapılmıştır. Maya transformasyon protokolü Benatuil vd. (2010)'ye göre takip edilmiştir:

- -80 °C'de muhafaza edilen BY4741 maya hücreleri öze yardımıyla YPD agar besiyerine çizilmiştir. Koloni oluşumu gözlemlenene kadar yaklaşık 2 gün 30 °C'de inkübe edilmiştir.
- Petriden elde edilen kolonilerden, tek koloni kürdan yardımıyla alınarak 10 ml sıvı YPD besiyerine bırakılmıştır. Vorteks yardımıyla iyice karıştırılan tüp, çalkalayıcıda 30 °C'de 225 rpm'de gece boyunca çalkalanmaya bırakılmıştır.

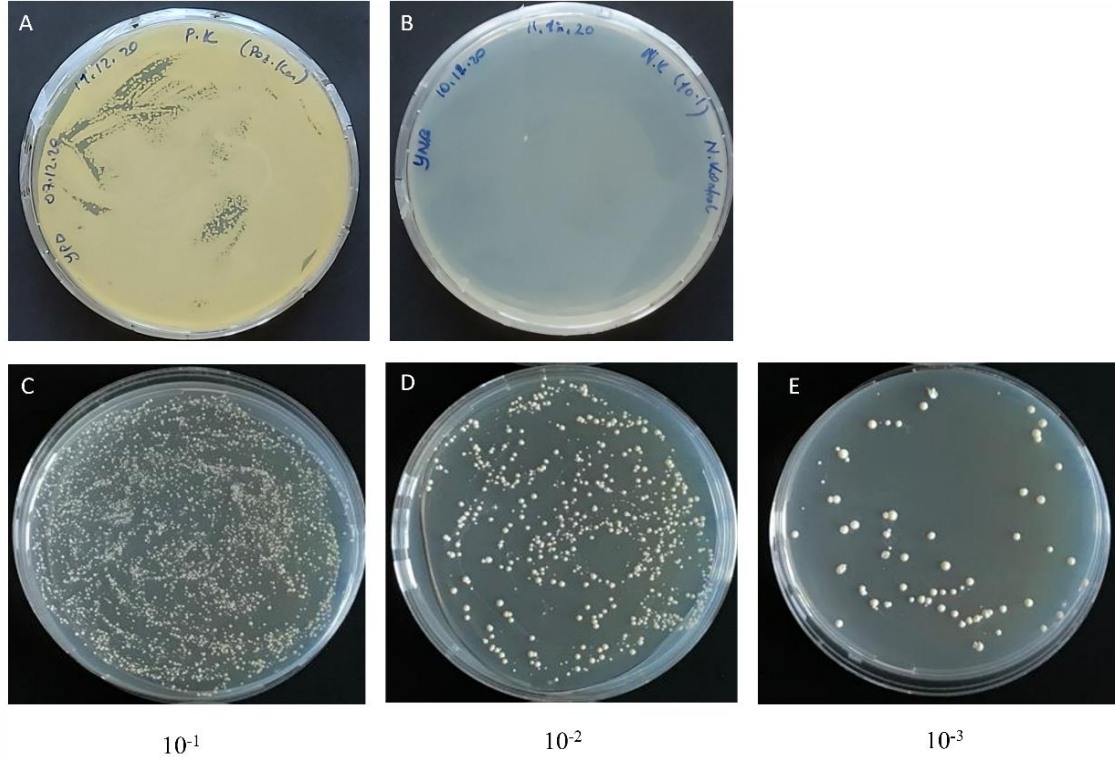
- Ertesi gün hücrelerin miktarını belirlemek için OD₆₀₀'deki değeri spektrofotometre cihazıyla ölçülmüştür.
- Miktarı ölçülen hücreler 50 ml sıvı YPD besiyerinde OD₆₀₀= 0.2 olacak şekilde seyreltilmiştir. Çalkalayıcıda 30 °C 225 rpm'de çalkalanmaya bırakılan hücre kültürü her saat başı spektrofotometre cihazında OD₆₀₀= 1.2 'ye gelinceye kadar ölçülmeye devam edilmiştir.
- Yaklaşık 5 saat sonra OD₆₀₀ değeri 1.2'ye gelmiştir. Hücreler 3000 rpm'de 3 dakika santriüj sonrası pellet elde edilmiştir.
- Pellet 50 ml soğuk dH₂O ile iki kez yıkanmıştır. Ardından bir kez 50 ml soğuk elektroporasyon bufferı (1 M Sorbitol/ 1 mM CaCl₂) ile yıkanmıştır.
- Elde edilen hücreler, 300 rpm'de 3 dk santrifüj yapılmıştır. Pellet 20 ml 0.1 M LiAc/10 mM DTT ile çözdürüldükten sonra 30 °C 225 rpm'de 30 dakika çalkalanmaya bırakılmıştır.
- İnkübasyon süresinin ardından, hücreler tekrar 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj ile bir araya toplanarak sıvı faz uzaklaştırılmıştır.
- Hücreler 50 ml soğuk elektroporasyon bufferı ile yıkanmıştır.
- Santrifüjün ardından, pellet yaklaşık 100 ile 200 µL elektroporasyon bufferı ile çözdürülerek final hacim 1 ml'ye tamamlanmıştır. Yaklaşık 1.6x10⁹ hücre/ ml'ye karşılık gelmektedir.
- Daha önceden buz üzerinde bekletilen elektroporasyon küvetlerinin her birine 400 µL olmak üzere hücreler eklenmiştir. 400 µL hücreye 1 µg pAG426-cDNA plazmiti eklendikten sonra tüpler nazikçe karıştırılmıştır.
- Elektroporasyon işlemi; 2.5 kV, 25 uF ve 3.0 milisaniye şartlarında gerçekleştirilmiştir.
- Elektroporasyon işlemi sonrası hücreler 8 ml 1:1 oranında 1 M sorbitol ve YPD besiyeri içeren tüplere alınmıştır.
- Tüpler, karıştırıcıda 30 °C, 225 rpm'de 1 saat boyunca çalkalanmaya bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonrasında hücreler 3000 rpm de 3 dakika santrifüj yapılarak bir araya toplanarak besiyeri uzaklaştırılmıştır.
- Hücreler, 1 ml YNB besiyeri ile çözdürülerek iyice karıştırılmıştır. Daha sonra önceden hazırlanmış olan YNB agar besiyerlerine 1/10¹, 1/10² ve 1/10³ dilüsyonlar 100 µL yayılmıştır.
- Petri kapları, 30 °C'ye hücre büyüme kabininde koloniler çıkana kadar yaklaşık 2 gün inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonrasında, her petride 1000'i aşkın koloni görülmüştür (Şekil 3.4). Oluşan koloniler petrilerden kazıyıcı yardımıyla 25 ml sıvı YNB besiyerine toplanmıştır.
- Bu şekilde oluşturulan maya kök cDNA kütüphanesi ependorf tüplere bölünerek gliserol stok alınmış ve -80 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.4. Kök cDNA kütüphanesinin maya hücrelerine transformasyonu; **a)** YPD besiyerinde hücre (pozitif kontrol); **b)** YNB besiyerinde hücre (negatif kontrol); **c)** Transforme hücrelerin YNB besiyerinde 10^{-1} dilüsyonu; **d)** 10^{-2} dilüsyonu; **e)** 10^{-3} dilüsyonu

3.6. Yaprak cDNA Kütüphanesinin Maya Hücrelerine Transformasyonu

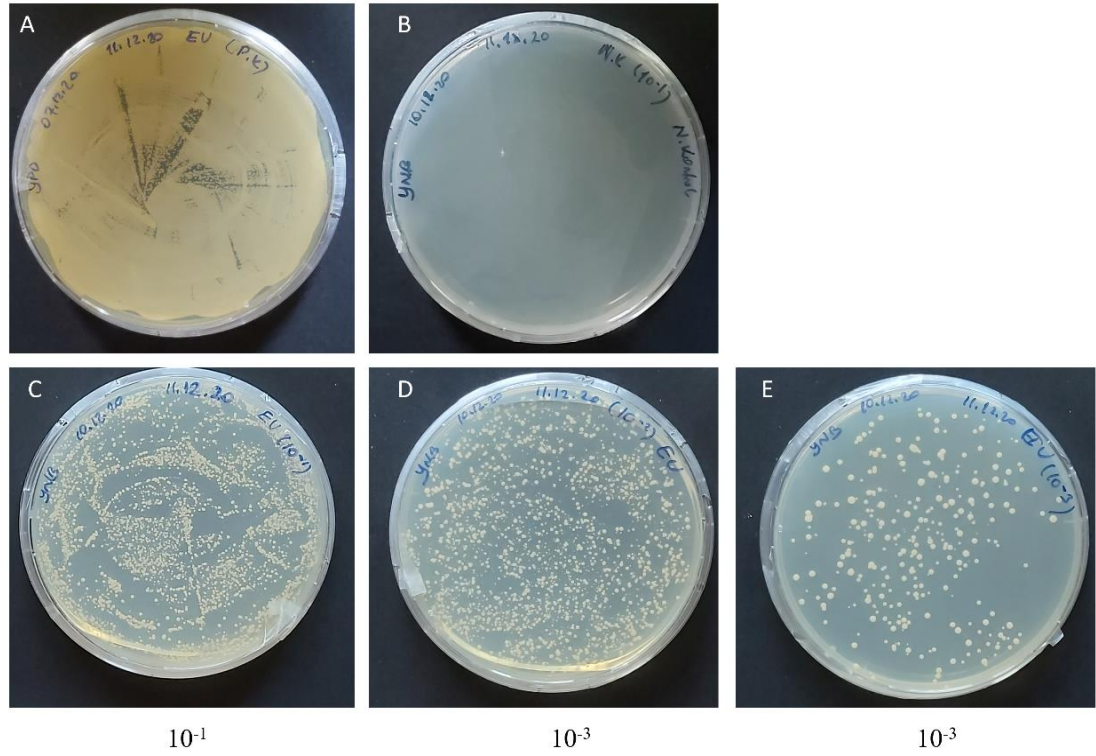
Kök kütüphanesindeki cDNA'ların, maya hücrelerine transformasyonu için 3.4'teki işlem tekrar edilmiştir. Transformasyon sonrasında elde edilen koloniler Şekil 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.5. Yaprak cDNA kütüphanesinin maya hücrelerine transformasyonu; **a)** YPD besiyerinde hücre (pozitif kontrol); **b)** YNB besiyerinde hücre (negatif kontrol); **c)** Transforme hücrelerin YNB besiyerinde 10^{-1} dilüsyonu; **d)** 10^{-2} dilüsyonu; **e)** 10^{-3} dilüsyonu

3.7. EV (Empty Vector)'nin Maya Hücrelerine Transformasyonu

EV olarak adlandırılan pAG426GPD-ccdB boş vektörün kontrol olarak kullanılması amacıyla maya hücrelerine transformasyonu yapılmıştır. cDNA'ları taşıyan vektörler gibi EV'inde BY4741 maya hücrelerine transformasyonu bölüm 3.5'te verilen protokoldeki aşamalar takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Böylece her aşamada, cDNA taşıyan vektörleri içeren maya hücreleri ile boş vektörleri (EV) içeren maya hücreleri karşılaştırılmıştır (Şekil 3.6). Bu şekilde cDNA'ların maya hücrelerine Se stresi karşısında sağladıkları tolerans belirlenmeye çalışılmıştır.



Şekil 3.6. pA426GPD-ccdB (EV) vektörünün maya hücrelerine transformasyonu; **a)** YPD besiyerinde hücre (pozitif kontrol); **b)** YNB besiyerinde hücre (negatif kontrol); **c)** Transforme hücrelerin YNB besiyerinde 10^{-1} dilüsyonu; **d)** 10^{-2} dilüsyonu; **e)** 10^{-3} dilüsyonu

Elde edilen EV'leri kontrol etmek amacıyla, rastgele seçilen kolonilerin içerdiği plazmitler izole edilerek restriksiyon enzimleri ile kesim yapılmıştır. Kesim reaksiyonu için *XbaI* enzimi kullanılmıştır. Reaksiyonda aşağıdaki protokol takip edilmiştir.

Çizelge 3.1. *XbaI* restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu

Reaksiyon içeriği	Miktar
pA426GPD-cDNA plazmiti	12 µL
<i>XbaI</i>	1 µL
Buffer (CutSmart)	2 µL
Nükleaz içermeyen su	5 µL
Toplam	20 µL

Hazırlanan reaksiyon 37 °C'de 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra %1'lik agaroz jelde 75 V'da yürütülerek kesim ürünleri kontrol edilmiştir.

3.8. cDNA Kütüphanesinin Taranması

Maya kütüphanesini taramak için daha önceden belirlenmiş olan toksik selenyum konsantrasyonu (15 mM) kullanılmıştır. Hazırlanan 20 petriye 150 µL maya cDNA kütüphanesi yayılmıştır. Pozitif kontrol olarak maya kütüphanesi de YPD besiyerine yayılmıştır. Negatif kontrol olarak daha önceden transformasyonu yapılmış olan cDNA içermeyen boş vektörü taşıyan (EV) hücreler YNB-URA+15 mM sodyum selenit içeren besiyerlerine yayılmıştır.

3.8.1. *P. distans* yaprak kütüphanesinin taranması

30 °C’ de inkübasyona bırakılan, yaprak cDNA kütüphanesini taşıyan maya hücrelerinin yayıldığı petriler, her gün gözlemlenmiştir. Ayrıca EV içeren maya kolonileri ile karşılaştırılmıştır. 3. günün sonunda kütüphaneyi taşıyan ve selenyuma tolerant olduğu muhtemel olan 10 maya kolonisi belirlenmiştir. Ancak 15 mM sodyum selenit içeren besiyerlerinde EV içeren herhangi bir maya kolonisi görülmemiştir. yaprak kütüphanesinin taranması sonucunda belirlenen tolerant koloniler: PYS1, PYS7.1, PYS7.3, PYS7.4, PYS8, PYS9.1, PYS10, PYS11.1, PYS12.1 ve PYS12.3 şeklinde isimlendirilmiştir. Daha sonra isimlendirilen her koloni kürdan yardımıyla tek tek seçilerek 10 ml sıvı YNB besiyerinde büyütülmüştür. Büyütülen koloniler gliserol stok olarak alınarak -80 °C’ye atılmıştır.

3.8.2. *P. distans* kök kütüphanesinin taranması

30 °C’ de inkübasyona bırakılan ve kök cDNA kütüphanesini taşıyan maya hücrelerinin yayıldığı petriler, her gün gözlemlenmiştir. 3. günün sonunda selenyuma tolerant olduğu muhtemel olan 8 koloni belirlenerek: PKS1, PKS2, PKS3, PKS4, PKS5, PKS6, PKS7, PKS8 olarak isimlendirilmiştir.

3.9. Damlatma Testi

Selenyuma tolerant olduğu belirlendikten sonra isimlendirilen maya kolonileri, farklı konsantrasyonlarda selenyum içeren besiyerlerinde damlatma testine tabi tutulmuştur.

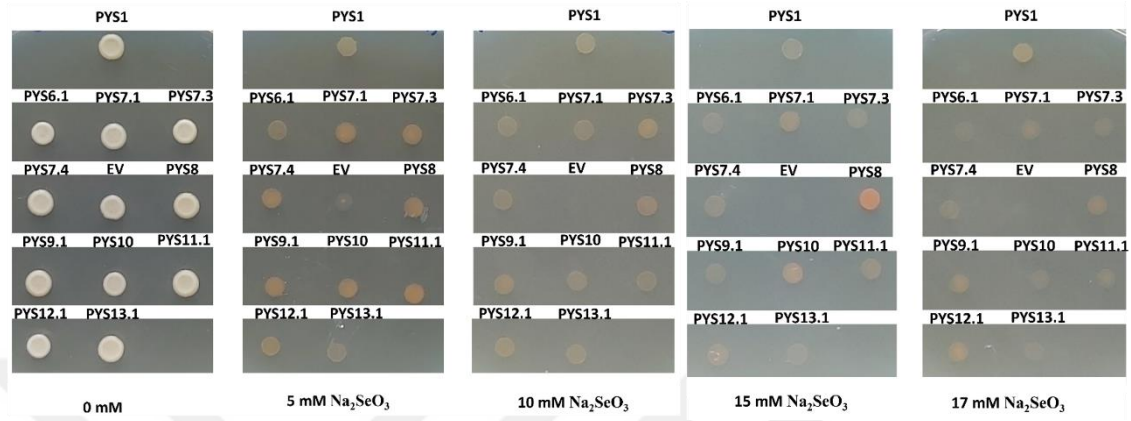
3.9.1 *P. distans* yaprak kütüphanesi damlatma testi

Damlatma testi için öncelikle 0, 5, 10, ve 15 ve 17 mM konsantrasyonlarda sodyum selenit içeren YNB-URA besiyerleri hazırlanmıştır.

Py (*Puccinellia* yaprak) cDNA kütüphanesinden seçilen: PYS1, PYS7.1, PYS7.3, PYS7.4, PYS8, PYS9.1, PYS10, PYS11.1, PYS12.1 ve PYS12.3 kolonilerin her biri 5 ml YNB-URA sıvı besiyerlerine alınmıştır. Daha sonra hücreler 30 °C 225 rpm’e ayarlanan çalkalayıcıda bir gün boyunca çalkalanmaya bırakılmıştır.

Ertesi sabah her bir hücrenin miktarı spektrofotometre cihazında OD₆₀₀’ deki değeri ölçülmüştür. Absorbans değerleri belirlenen hücreler OD₆₀₀= 0.2 olacak şekilde seyreltilmiştir. Daha sonra 0 mM (kontrol), 5 mM, 10 mM 15 mM ve 17 mM artan dozlarda sodyum selenit içeren YNB besiyerlerine her bir hücreden 5 µL pipet yardımı ile damlatılmıştır. Petriler 30 °C ‘ye inkübasyona bırakılarak her gün koloni gelişimleri

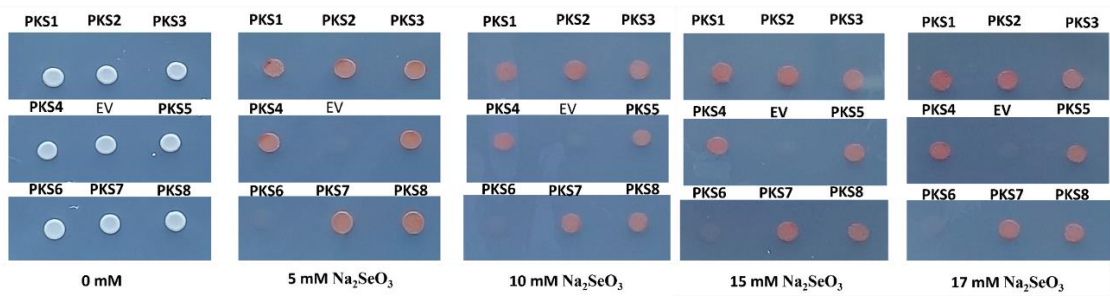
takip edilmiştir. Beklendiği üzere pozitif kontrolde (0 mM YNB-URA) tüm koloniler gelişmiştir. Artan sodyum selenit konsantrasyonuna göre çıkan kolonilerde farklılıklar gözlemlenmiştir. Koloniler EV içeren hücrelere göre kıyaslanmıştır. EV'nin gelişim göstermediği petriyeler esas alınmıştır. Seçici dozda (15 mM) gelişen ve gelişim göstermeyen koloniler belirlenmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Yaprak kütüphanesinden seçilen kolonilerin 5mM, 10 mM, 15 mM ve 17 mM Na_2SeO_3 içeren YNB besiyerlerinde damlatma testi

3.9.2. *P. distans* kök kütüphanesi damlatma testi

Aynı işlemler PK (*Puccinellia* kök) cDNA kütüphanesinden seçilen; PKS1, PKS2, PKS3, PKS4, PKS5, PKS6, PKS7, PKS8 kolonileri için de uygulanmıştır. Kök kütüphanesine ait damlatma testi Şekil 3.8'de verilmiştir.



Şekil 3.8. Kök kütüphanesinden seçilen kolonilerin 5mM, 10 mM, 15 mM ve 17 mM Na_2SeO_3 içeren YNB besiyerlerinde damlatma testi

3.10. Seri Dilüsyon

3.10.1. *P. distans* yaprak kütüphanesi seri dilüsyon

Seçilen PYS1, PYS7.1, PYS7.3, PYS7.4, PYS8, PYS9.1, PYS10, PYS11.1, PYS12.1 ve PYS12.3 kolonilerinin her biri kürdan yardımıyla alınarak, 5 ml falconlar

içerisinde bulunan sıvı YNB-URA besiyerine bırakılmıştır. Hücreler bir gün boyunca 30 °C 225 rpm'e çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır.

Ertesi sabah hücrelerin absorbansı spektrofotometre cihazında ölçülmüştür. Ölçülen OD₆₀₀ değerlerinin hesaplanması sonucunda hücrelerden 10 kat seri dilüsyonlar (OD 0.5, 0.02, 0.002, 0.0002, 0.00002) hazırlanmıştır. Daha önceden hazırlanmış 0 mM (kontrol), 5 mM, 10 mM ve 15 mM sodyum selenit içeren YNB-URA katı besiyerlerine her koloni için dilüsyonlar pipet yardımıyla 5 µL damlatılmıştır.

3.10.2. *P. distans* kök kütüphanesi seri dilüsyon

Damlatma testine tabi tutulan aynı kolonilere: PKS1, PKS2, PKS3, PKS4, PKS5, PKS6, PKS7, PKS8 yukarıda yaprak kütüphanesinde bahsedildiği şekilde seri dilüsyon yapılmıştır.

3.11. Maya Koloni PCR

Seri dilüsyon sonrasında seçilen maya kolonilerinin taşıdıkları cDNA'ların bant boyunu görmek amacıyla maya koloni PCR'ı yapılmıştır. Maya koloni PCR reaksiyonu aşağıdaki protokol takip edilerek kurulmuştur:

- PCR tüplerine her koloni için 20 µL NaOH eklenmiştir.
- Steril kabinde her bir maya kolonisinden pipet ucu kullanarak susam tanesi kadar maya kolonisi nazıkçe NaOH içerisinde çözündürülmüştür.
- Ardından tüpler thermocycler cihazında 95 °C, 45 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyonun ardından 10 dakika maksimum hızda santrifüj edilen tüplerde, hücrelerin çökmesi sağlanmıştır.
- Ardından elde edilen süpernetanttan PCR reaksiyonuna 1 µL template olarak ilave edilmiştir.

PCR reaksiyonu için kullanılan primerler:

GDP-F: CGGTAGTATTGATTGTAATTCTG (Forward primer)

CYC1: GCGTGAATGTAAGCGTGAC (Reverse primer)' dir.

PCR reaksiyonu Çizelge 3.2'de gösterildiği gibi kurulmuştur:

Çizelge 3.2. PCR reaksiyonu

Reaksiyon içeriği	Miktar
Dream Taq Green PCR Master Mix (2X)	12 µl
Forward Primer (CYC1)	1 µl
Reverse Primer (GPD-F)	1 µl
Template	1 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	10 µl
Toplam Hacim	25 µl

PCR işlemi ise Çizelge 3.3'te verilen döngülere göre gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. PCR reaksiyonu koşulları

Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
95 °C	3 dk.	1
95 °C	30 sn	35
58 °C	45 sn	
72 °C	30 sn	
72 °C	5 dk.	1

3.12. Plazmit Kurtarma

3.12.1. *P. distans* yaprak kütüphanesi plazmit kurtarma

Gerçekleştirilen damlatma testi ve seri dilüsyon testi sonrasında toksik selenyum konsantrasyonlarında hayatta kalan koloniler belirlenmiştir. Tolerant olduğu belirlenen koloniler; PYS1, PYS7.1 PYS7.3, PYS8, PYS9.1, PYS10, PYS11.1, PYS12.1'dir.

Seçilen maya hücrelerinden, tolerans sağladığı düşünülen plazmitler Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep (Zymo Research, ABD) kiti kullanılarak izole edilmiştir. Ardından izole edilen plazmitlerin taşıdıkları cDNA bölgelerinin uçlarında bulunan CYC1 ve GPD-F primerleri kullanılarak PCR kurulmuştur. Elde edilen PCR ürünleri %1 konsantrasyonda agaroz jelde 1 kb'lık ladder ile 75 V'da yürütülmüştür. Jel sonuçları incelenerek elde edilen cDNA çeşitliliği belirlenmeye çalışılmıştır. Ancak koloni PCR sonuçlarının incelenmesi sonucunda elde edilen toleranslı kolonilerin taşıdığı cDNA ürünlerinin boyutlarının aynı olduğu görülmüştür. Bu nedenle yaprak kütüphanesinden temsilen "PYS9.1" plazmiti seçilerek işlemlere devam edilmiştir.

3.12.2. *P. distans* kök kütüphanesi plazmit kurtarma

Yaprak kütüphanesinde olduğu gibi damlatma testi ve seri dilüsyon testi sonrasında toksik selenyum konsantrasyonlarında hayatta kalan koloniler belirlenmiştir. Seçilen koloniler; PKS1, PKS2, PKS3, PKS4, PKS5, PKS7, PKS8 olmuştur. Aynı şekilde kurulan maya koloni PCR'ı sonucunda elde edilen tolerant kolonilerde mevcut cDNA'ların boyutlarının aynı olduğu görülmüştür. Bu sebeple kök kütüphanesinden ise temsilen PKS1 seçilerek işlemlere devam edilmiştir.

Maya hücrelerinden izole edilen yaprak kütüphanesi için PYS9.1 ve kök kütüphanesi için PKS1 plazmitlerinin miktarlarını arttırmak amacıyla, DH5α kompetent *E. coli* hücrelerine ısı şoku ile aktararak çoğaltılmıştır.

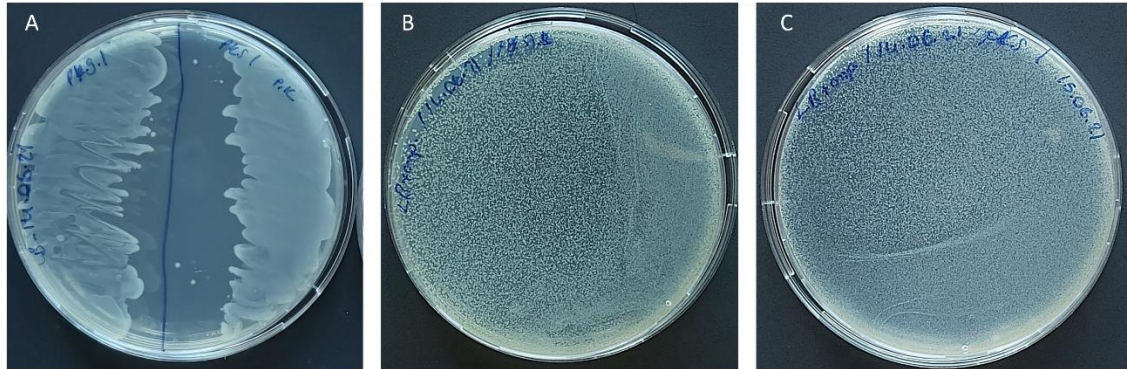
3.13. DH5α Kompetent Hücrelerine Transformasyon

Dayanıklılık gösteren kolonilerden izole edilen ve yukarıda isimleri verilen plazmitleri yeteri kadar çoğaltılmak amacıyla her biri *E. coli* hücrelerine aktarılmıştır.

3.13.2. DH5 α hücrelerine transformasyon

Transformasyon işlemi için aşağıdaki işlemler takip edilmiştir.

- Hazırlanmış olan ve -80 °C'ye gliserol stok atılmış olan DH5 α hücreler çıkarılarak buz üzerine alınmıştır.
- Hücreler buz üzerinde çözünene kadar bekletildikten sonra, her bir koloni için 100 μ L hücre olacak şekilde ependorf tüplere bölünmüştür.
- Buz üzerine alınan ependorf tüplere 5 μ L her bir plazmitten eklenerek nazıkçe karıştırılmıştır.
- Elde edilen hücre ve plazmit karışımı 30 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır.
- Inkübasyon sonrası daha önceden 42 °C ısı bloğuna alınan ependorf tüpler 30 saniye bekletilerek plazmitlerin hücre içerisine ısı etkisiyle girmesi sağlanmıştır.
- Isı şoku sonrası buz üzerine alınan ependorflara oda sıcaklığında bekletilmiş olan 900 μ L sıvı LB besiyeri pipet yardımıyla eklenmiştir.
- Sıvı besiyerinin eklenmesinin ardından tüpler 37 °C'ye çalkalayıcıya alınarak 225 rpm'de 60 dakika çalkalanmaya bırakılmıştır.
- Inkübasyon sonrasında hücreler daha önceden 37 °C'de ısıtılmış olan 100 μ g/ml ampisilin antibiyotigi içeren LB agar besiyerlerine 150 μ L yayılmıştır.
- Kontrol olarak antibiyotik içermeyen petriye DH5 α hücreleri yayılmıştır.
- Petri kapları 37° C'ye bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır.
- Ertesi gün transforme olduğu gözlemlenen kolonilerden plazmit izolasyonu yapmak için kürdan yardımıyla tek koloni seçilmiştir.
- Her bir koloni bu şekilde 10 ml 100 μ g/ml ampisilin içeren sıvı LB besiyerine alınmıştır. Daha sonra bir gece boyunca 37 °C'de 225 rpm'de çalkalanmaya bırakılmıştır. Bir gece boyunca büyütülen kolonilerden (Şekil 3.9), GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific) kiti kullanılarak plazmit izolasyonu yapılmıştır.

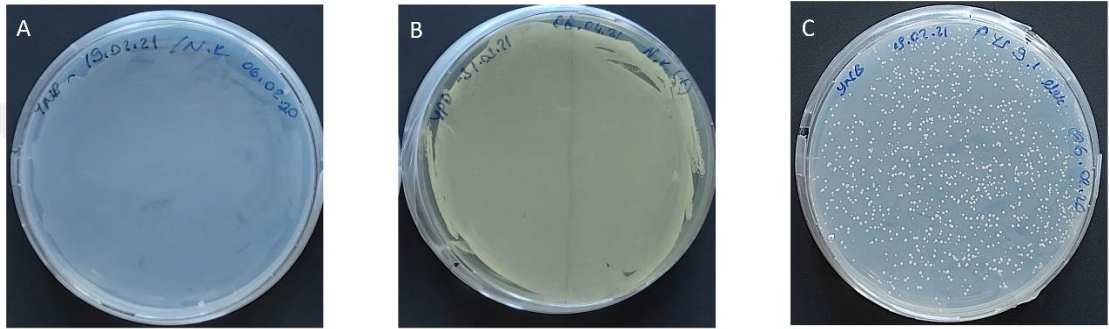


Şekil 3.9. PYS9.1 ve PKS1 plazmitlerinin *E. coli* hücrelerine transformasyonu; **a)** LB besiyerinde PKS1 ve PYS 9.1 (Pozitif kontrol); **b)** Ampisilin içeren LB besiyerinde PKS1'i taşıyan *E. coli* hücreleri; **c)** Ampisilin içeren LB besiyerinde PYS9.1'i taşıyan *E. coli* hücreleri

3.14. Re-Transformasyon

3.14.1. *P. distans* yaprak kütüphanesi re-transformasyon

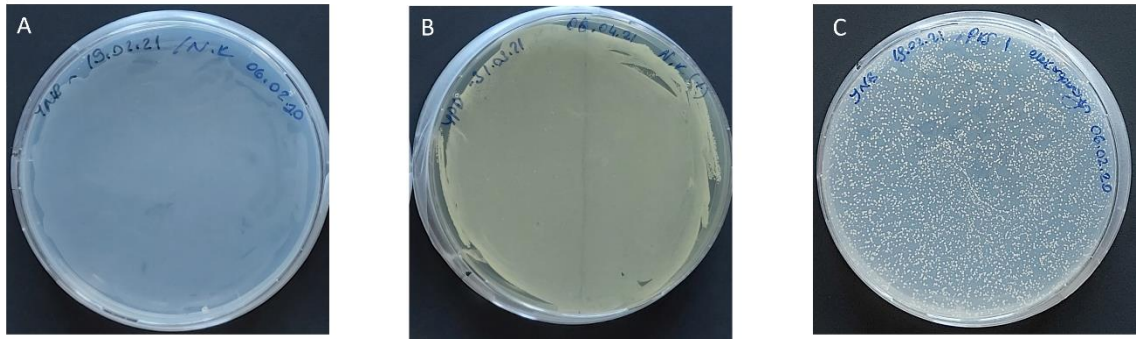
E. coli hücrelerinde çoğaltılan plazmitler yeteri kadar elde edilmiştir. Ardından maya kolonilerinin gösterdiği toleransın hücrelerin kendi dayanıklılığından mı yoksa plazmitlerin içerdiği cDNA'ların sağladığı toleranslıktan mı kaynaklandığını test etmek amacıyla re-transformasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla izole edilen PYS9.1 plazmiti yabancı tip BY4741 maya hücrelerine tekrar elektroporasyon yöntemi ile aktarılmıştır. Elektroporasyon protokolü Benatuil vd. (2010)'ye göre takip edilmiştir. Elektroporasyon sonucunda seçici YNB besiyerine her bir koloni ayrı ayrı yayılmıştır. Petri kapları bir gün boyunca 30 °C'de inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Yaprak kütüphanesinden elde edilen PYS9.1'in re-transformasyonu; **a)** YNB besiyerinde yabancı tip BY4741 maya hücreleri (negatif kontrol); **b)** YPD besiyerinde yabancı tip BY4741 maya hücreleri (pozitif kontrol); **c)** Transformasyon sonrasında YNB besiyerinde çıkan PYS9.1 transforme koloniler

3.14.2. *P. distans* kök kütüphanesi re-transformasyon

Yukarıda yaprak kütüphanesi için yapılan re-transformasyon işlemleri kök kütüphanesinden seçilen PKS1 plazmiti için de tekrar edilmiştir. Transformasyon sonrası petrilere ait görüntü Şekil 3.11'de verilmiştir.



Şekil 3.11. Kök kütüphanesinden elde edilen PKS1 plazmitinin re-transformasyonu; **a)** YNB besiyerinde yabanıl tip BY4741 maya hücreleri (negatif kontrol); **b)** YPD besiyerinde yabanıl tip BY4741 maya hücreleri (pozitif kontrol); **c)** Transformasyon sonrasında YNB besiyerinde çıkan PKS1 transforme koloniler

3.14.3. Re-transformasyon sonrası seri dilüsyon testi

Re-transformasyon sonrasında, yaklaşık 2 gün sonra yeteri büyüklüğe ulaşan transforme PYS9.1 ve PKS1 kolonilerinden tek koloni seçilerek sıvı YNB besiyerine alınmıştır. Hücreler 30 °C 225 rpm’de bir gece çalkalayıcıda büyümeye bırakılmıştır. Ertesi gün hücrelerin spektrofotometre cihazında OD₆₀₀’deki değeri ölçülmüştür. Hücre kültürünün OD₆₀₀ değeri 0.2 olacak şekilde seyreltilmiştir. Ardından yukarıda “Seri dilüsyon” başlığı altında anlatıldığı üzere 0, 10 ve 15 mM sodyum selenit içeren YNB besiyerlerine damlatılmıştır.

3.15. Tuz ve Kuraklık Stres Denemeleri

Puccinellia yaprak ve kök kütüphanesi tarandıktan sonra, selenyuma tolerant maya kolonileri, farklı konsantrasyonlarda tuz ve sorbitol içeren besiyerlerinde de denenmiştir. Bu şekilde bulunan kolonilerin tuz ve kuraklık stresine karşı tolerans gösterip göstermediği araştırılmıştır.

3.15.1 Tuz stresi denemesi

Tuz denemesi için NaCl stok solüsyonu hazırlanarak pH =5.1’e ayarlanmıştır. Ardından YNB besiyerleri hazırlanarak, her bir ortama final konsantrasyonları 1.5, 2, 2.3 M NaCl içerecek şekilde eklenmiştir Yu vd. (2017)’nin kullandığı konsantrasyonlardan yararlanılarak; 0 mM(kontrol), 1.5, 2, 2.3 M hazırlanan NaCl içeren besiyerlerinde bulunan koloniler “Seri Dilüsyon” başlığı altında tarif edildiği üzere dilüsyonlar hazırlanarak YNB agar besiyerinde test edilmiştir.

3.15.2. Kuraklık stresi denemesi

Kuraklık denemesi için kuraklık stresi sorbitol ile verilmiştir. Tuz denemesinde olduğu gibi stok solüsyonu hazırlanarak pH =5.1’e ayarlanmıştır. Sorbitol konsantrasyonları Wang vd. (2019)’a göre; 0, 2, 3, 3.5, 3.6 M seçilerek hazırlanmıştır.

Farklı konsantrasyonlarda sorbitol içeren YNB besiyerlerde koloniler seri dilüsyon yapılarak test edilmiştir.

3.16. Sekanslama ve Filogenetik Analizler

Sekanslanmak üzere kök kütüphanesinden “PKS1” olarak adlandırılan cDNA’yı taşıyan plazmit, yaprak kütüphanesinden ise “PYS9.1” olarak isimlendirilen plazmit seçilmiştir. Seçilen plazmitler için Yeni Nesil Sekanslama (NGS) hizmeti alınarak tüm plazmit sekanslanmıştır. Sekanslama sonucunda gelen sekans kullanılarak, SnapGene Programı kullanılarak vektörler oluşturulmuştur. Oluşturulan vektör içerisinde attb1 ve attb2 arasında kalan cDNA bölgesinin sekansı tespit edilmiştir. Elde edilen cDNA bölgelerinin sekansları NCBI-Blast kullanılarak benzerlik gösterdiği genler tespit edilmiştir. Ardından NCBI-ORF finder kullanılarak elde edilen açık okuma çerçevesi protein sekansına çevrilmiştir. Protein sekansları kullanılarak MEGA 7.0 programında NJ filogenetik ağaç çizilmiştir.

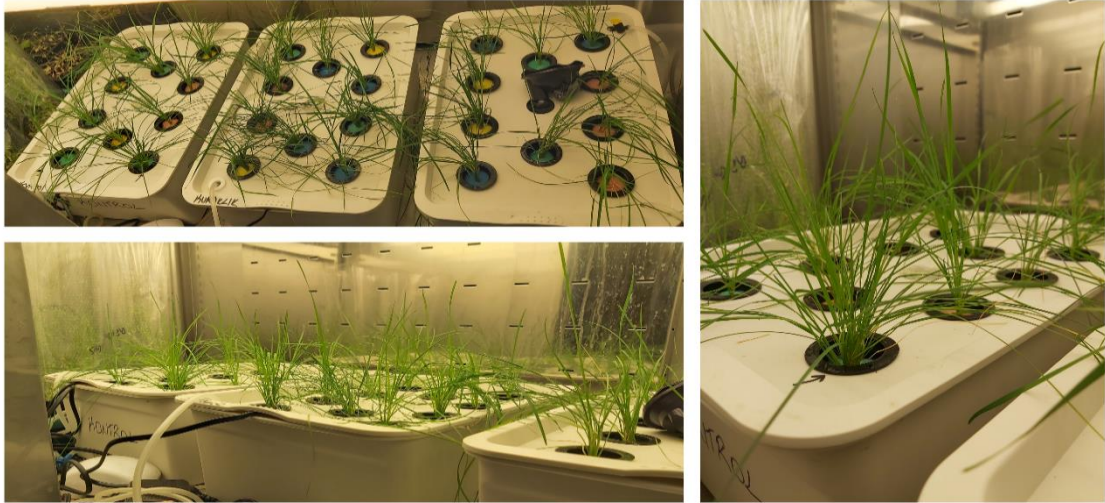
3.17. *P. distans* Yetiştirme ve RT-qPCR

P. distans’ta yalnızca PKS1 geninin ifade seviyesini belirlemek için RT-qPCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu analizler için *P. distans*’a ait tohumlar %70 EtOH ve %50 NaClO ile steril edilerek ve dH₂O 3 kez durulanmıştır. MS ortamına ekilen tohumlar 24 °C 16/8 uzun gün koşullarında büyümeye bırakılmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. MS ortamında gelişimlerini sürdüren *P. distans* bitkileri

İki aylık bitkiler ½ Hoagland solüsyonu içeren hidroponik sistemlere aktarılmıştır. 10 gün alışma ve büyüme süresi sonrası *P. distans* bitkileri sırası ile 80 µM sodyum selenit içeren ½ Hoagland solüsyonu ile strese maruz bırakılmıştır (Şekil 3.13). 0, 6, 12, 24 ve 48 saat stres uygulaması sonrasında hasat edilen örnekler sıvı azot ile öğütülerek RNA izolasyonunda kullanılmıştır. Bu işlem 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.13. Hidroponik ortamında yetiştirilen *P. distans* bitkileri

Bitkilerin yaprak ve kök total RNA izolasyonları, Plant RNA Isolation Kit (Qiagen) kullanılarak kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. RNA miktarları, Qubit Fluorometer (Invitrogen) kullanılarak belirlendi. DNA kirlilikleri Turbo Dnase uygulaması ile giderilmiştir. RT-qPCR çalışmaları One-Step RT-qPCR Kit (NEB) kullanılarak Light Cycler 96 System (Roche) cihazında gerçekleştirilmiştir. Her bir stres saatine ait RNA örnekleri RT-qPCR reaksiyonunda kullanılmak üzere konsantrasyonları 5 ng olacak şekilde seyreltilmiştir. Ardından RT-qPCR master mix ve diğer reaksiyon bileşenleri oda sıcaklığında çözündürülmüştür ve buz üzerine alınmıştır. Tamamen çözündükten sonra tüm bileşenler vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımları örnek RNA'ları hariç olmak üzere mix olarak hazırlanmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. RT-qPCR reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim
Luna Universal One Step Reaction Mix (2X)	2.5 ul
Luna WarmStart RT Enzyme Mix (20X)	0.25 ul
Forward primer (10 uM)	0.4 ul
Reverse primer (10 uM)	0.4 ul
Template RNA (5ng/ul)	2 ul
Nükleaz içermeyen su	1.45 ul
Toplam hacim	7 ul

Reaksiyonda kullanılan primer çiftleri ise Çizelge 3.5'te verilmiştir

Çizelge 3.5. *P. distans* RT-qPCR'da kullanılan primer çiftleri

cDNA spesifik primerler	Kontrol (aktin) primerleri
PKS1q2_F: GCAATCCAAAAGGCCAGACA	PHK-F: CCATTGGTGCTGAGCGTTT
PKS1q2_R: GGTCGTACATTCTTCTTGCCC	PHK-R: GCTTCCATCCCAATGAAGGA

3.18. Maya RT-qPCR

Maya hücrelerinde PKS1 geninin ekspresyon seviyelerini belirlemek amacıyla RNA izolasyonu yapılmıştır. PKS1 cDNA bölgesin içeren maya hücreleri ve boş vektör içeren (EV) maya hücreleri 20 ml YPD içeren besiyerinde sabaha kadar büyütülmüştür. Ardından spektrofotometre ile OD₆₀₀'de hücrelerin miktarları ölçülmüştür. Final konsantrasyonları 1, 3, 7 ve 10 mM olacak şekilde sodyum selenit içeren YPD besiyerlerine başlangıç hücre miktarları OD₆₀₀=0.2 olacak şekilde hücreler eklenmiştir.

Kontrol grubu olacak şekilde hiç stres verilmeyen (0 mM) boş vektör içeren maya hücreleri aynı koşullarda büyütülmüştür. Ardından 250 rpm'de 30 °C'de karıştırıcıda 3 saat stres verilen hücreler ve kontrol grubu hasat edilmiştir. Elde edilen maya hücrelerinden Green ve Sambrook (2021)'e göre RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Belirlenen genler için tasarlanmış primerler ve kontrol olarak Teste vd., (2009)'a göre elde edilen maya housekeeping *TAF10* genine ait primerler (Çizelge 3.6) kullanılarak stres uygulamasının 0. (kontrol), 1 mM, 3 mM, 7 mM ve 10 mM sodyum selenit konsantrasyonlarına göre gen ekspresyonları delta-delta CT metodu kullanılarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.6. PKS1q2 ve TAF10 ileri (F) ve geri (R) primerleri

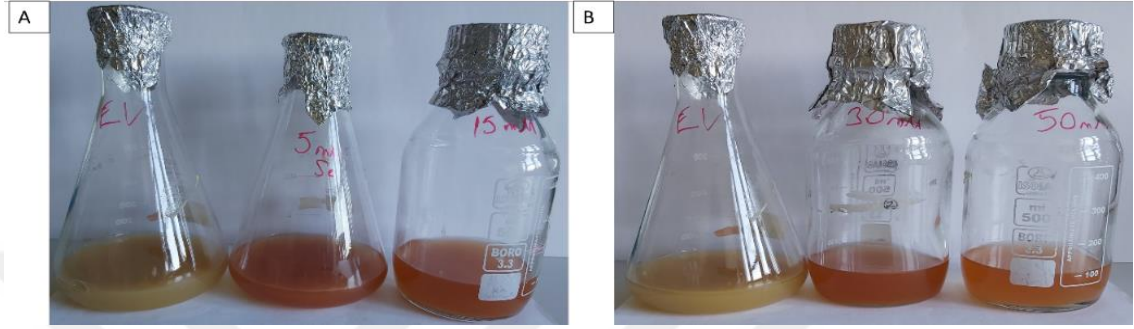
cDNA spesifik primerler	Kontrol (housekeeping) primerleri
PKS1q2-F: GCAATCCAAAAGGCCAGACA	TAF10-F: ATATTCCAGGATCAGGTCTTCCGTAGC
PKS1q2-R: GGTCGTACATTCTTCTTGCC	TAF10-R: GTAGTCTTCTCATTCTGTTGATGTTGTTGT

3.19. Hücre İçi Selenyum Miktarının ICP-MS ile Belirlenmesi

ICP-MS için tüm cam ve plastik malzemeler, %10 nitrik asit ile bekletilerek steril edildi. PKS1 cDNA bölgesini içeren maya hücreleri YPD besiyerine çizilerek 2 gün

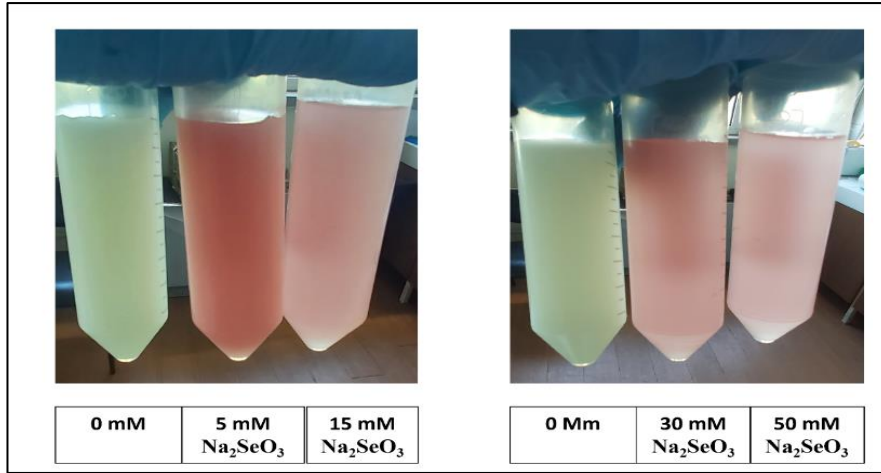
boyunca 30 °C’de inkübe edilmiştir. Ardından tek koloni seçilerek 50 ml sıvı YPD besiyerinde bir gün boyunca büyütülmüştür. Ertesi gün, hücre miktarını belirlemek amacıyla spektrofotometre cihazında OD₆₀₀ değeri ölçülmüştür.

Final konsantrasyonları 5, 15, 30 ve 50 mM olacak şekilde sodyum selenit içeren 100 ml YPD besiyerlerine başlangıç hücre miktarları OD₆₀₀=0.2 olacak şekilde eklenmiştir. Ardından hücreler 48 saat büyütülmüştür. Kontrol olarak hiç stres verilmeyen ve 0 mM olarak adlandırılan hücreler kullanılmıştır. (Şekil 3.14).



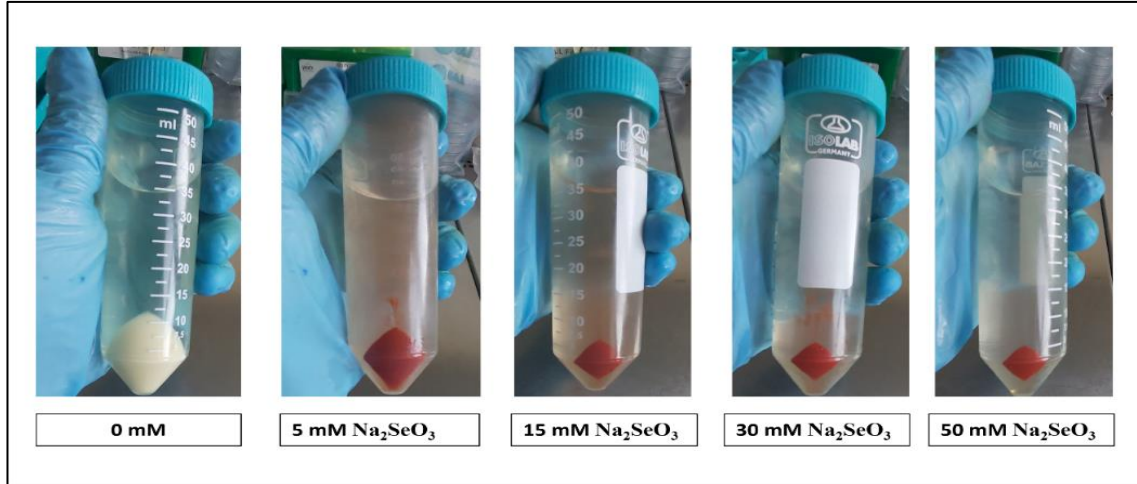
Şekil 3.14. ICP analizi için sıvı kültürde farklı konsantrasyonlarda sodyum selenit stresi uygulanan maya (PKS1) hücreleri; **a)** EV, 5 mM ve 15 mM; **b)** EV, 30 mM ve 50 mM

İnkübasyon süresinin ardından hücreler 6000 g’de 5 dakika (4 °C)’de santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı döküldükten sonra hücreler soğuk ultra saf su ile iki kere yıkanmıştır (Şekil 3.15).



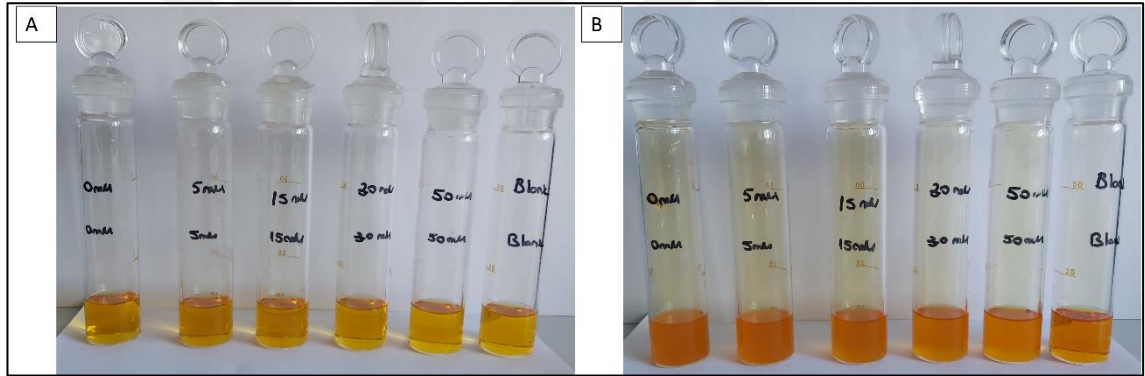
Şekil 3.15. Elde edilen hücre pelletlerinin ultra saf su ile yıkanması

Ardından hücrelere ait pelletler (Şekil 3.16) kuru ağırlığı ölçmek üzere 60 °C’de 24 saat inkübe edilmiştir.



Şekil 3.16. Farklı konsantrasyonlarda 48 saat stres verilmesinin ardından elde edilen kültüre ait pelletler

Hücrelerin kuru ağırlıkları tartılmıştır. Hücreler 9 ml HNO₃ (nitrik asit) ve 3 ml HCl (hidroklorik asit) eklenerek (Şekil 3.17) yakılmıştır.



Şekil 3.17. Maya hücrelerinin asit ile yakılması için hazırlanması; **a)** 9 ml HNO₃ ve 3 ml HCl karışımları; **b)** Elde edilen asit karışımlarına sırası ile hücre pelletlerinin eklenmiş hali

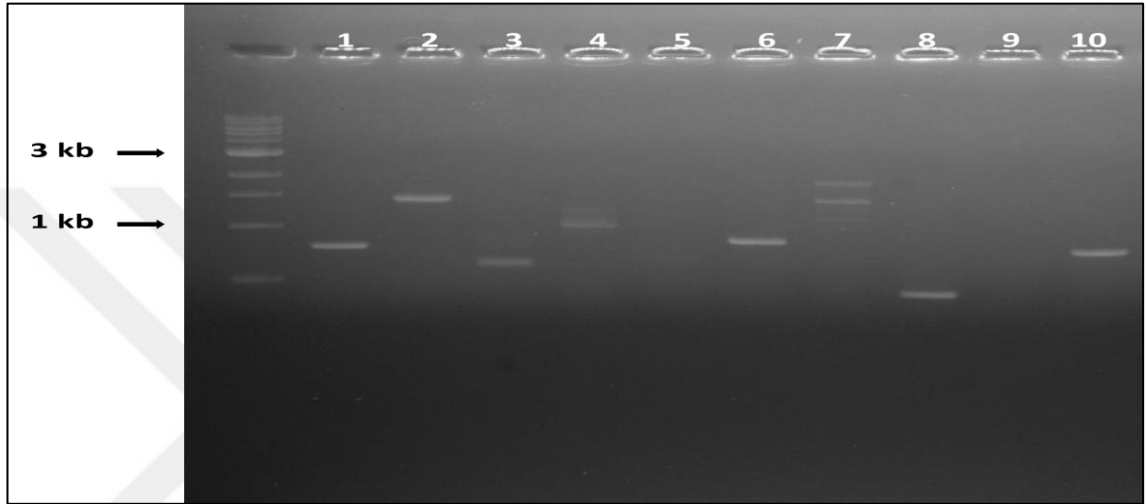
Yakılan hücreler filtreden geçirildikten sonra ultra saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak ICP-MS ölçümü için (Laben- Antalya) gönderilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. cDNA Kütüphanesinin PCR ile Çeşitliliğinin Kontrolü

4.1.1. *P. distans* yaprak cDNA kütüphanesi

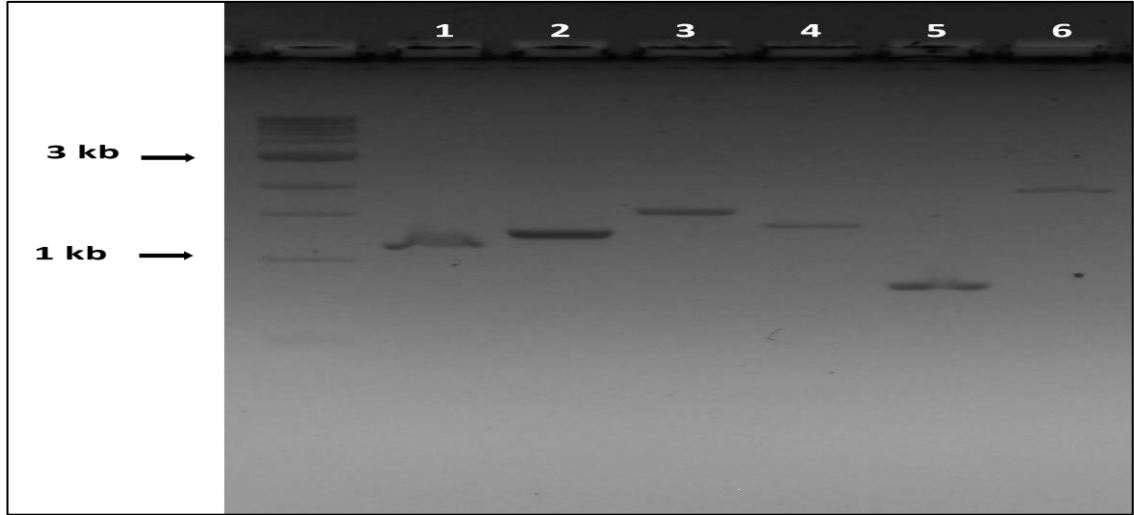
Maya yaprak kütüphanesi aktarıldıktan sonra rastgele 10 koloni seçilerek kolonilerdeki cDNA'ların çeşitliliğine bakılmıştır. CYC ve GPD-F primerleri ile yapılan koloni PCR'da cDNA'ların boyutlarının 500 bp ve 3 kb arasında değiştiği görülmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Maya yaprak cDNA kütüphanesinden rastgele seçilen 10 koloninin taşıdıkları cDNA boyutlarının agaroz jelde incelenmesi

4.1.2. cDNA kütüphanesinin maya hücrelerine transformasyonu ve PCR

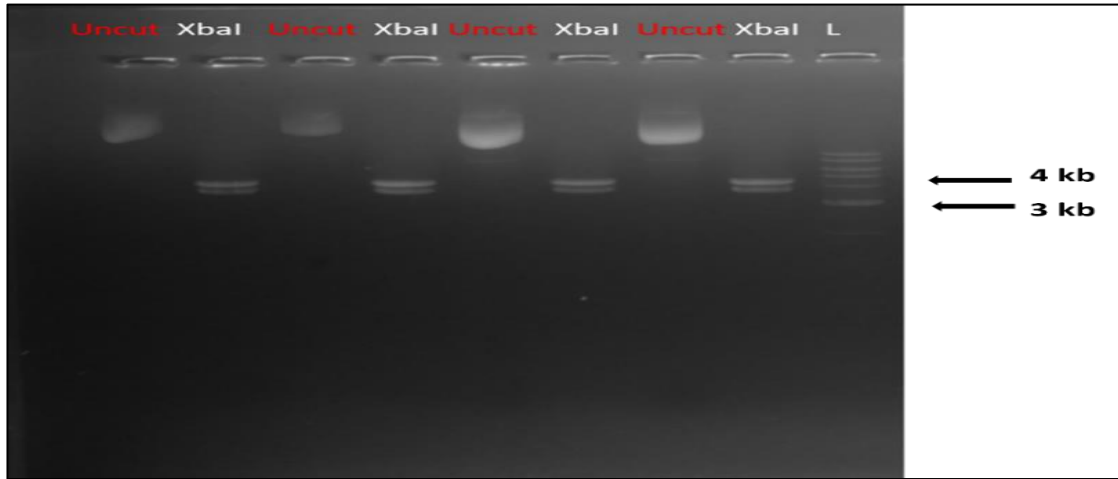
Aynı işlem kök kütüphanesi için de gerçekleştirilmiştir. Maya hücrelerine transformasyonu sonucunda, çıkan 6 transforme koloni rastgele seçilmiştir ve koloni PCR yapılmıştır. %1'lik konsantrasyona sahip agaroz jelde PCR ürünleri yürütülerek, seçilen 6 rastgele koloninin taşıdıkları cDNA'ların farklı boyutlarda olduğu, 500 bp ve 2 kb arasında değiştiği görülmüştür (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Maya kök cDNA kütüphanesinden rastgele seçilen 6 koloninin taşıdıkları cDNA boyutlarının agaroz jelde incelenmesi

4.1.3. EV (Empty Vector) 'nin restriksiyon enzimleri ile kesimi

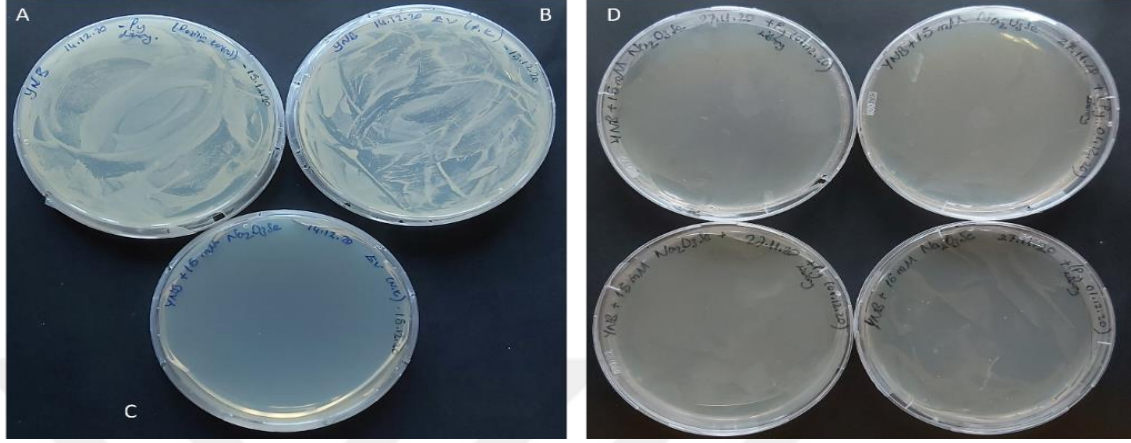
Çalışmada kütüphane taramak için ve tolerans denemesinde kontrol olarak kullanmak amacıyla, EV (pAGPD426-ccdB) maya hücrelerine aktarılmıştır. Transformasyon sonrası rastgele seçilen kolonilerden plazmit izolasyonu yapılmıştır. Vektörün doğruluğu *XbaI* ile kesim yapılarak kontrol edilmiştir. Kesim enzimi vektörü 428. ve 4277. Bölgelerden kesmekte ve 3 kb ile 4 kb arasında çift bant oluşumu beklenmektedir. Şekil 4.3'te vektörün kesim yapılmamış hali ve kesim işlemi sonrası yürütülen jel görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 4.3. pAGPD426-ccdB (EV) vektörünün *XbaI* enzimi ile kesim yapılarak doğrulanması

4.2. Yaprak Kütüphanesinden Elde Edilen Koloniler

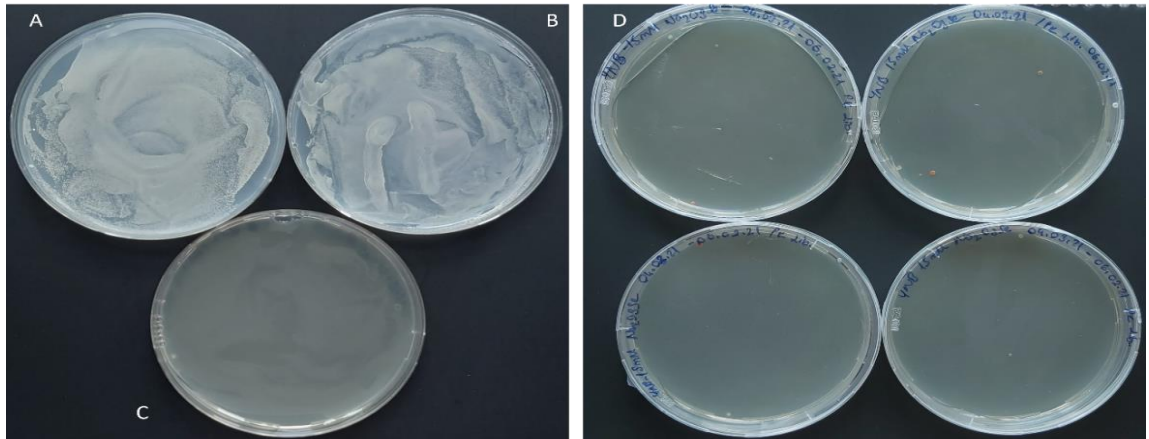
P. distans yaprak kütüphanesinin taranması sonucunda 10 koloni elde edilmiştir. Koloniler oldukça küçük olduğundan dolayı gözüken 4 petri fotoğraflanmış, temsili olarak Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Yaprak cDNA kütüphanesinin taranması; **a)** YNB cDNA kütüphanesini taşıyan koloniler (Pozitif kontrol); **b)** YNB besiyerine ekilen EV taşıyan maya hücreleri (Pozitif kontrol); **c)** 15 mM YNB besiyerinde EV taşıyan mayalar; **e)** 15 mM'da çıkan toleranslı maya kolonileri

4.3. Kök Kütüphanesinden Elde Edilen Koloniler

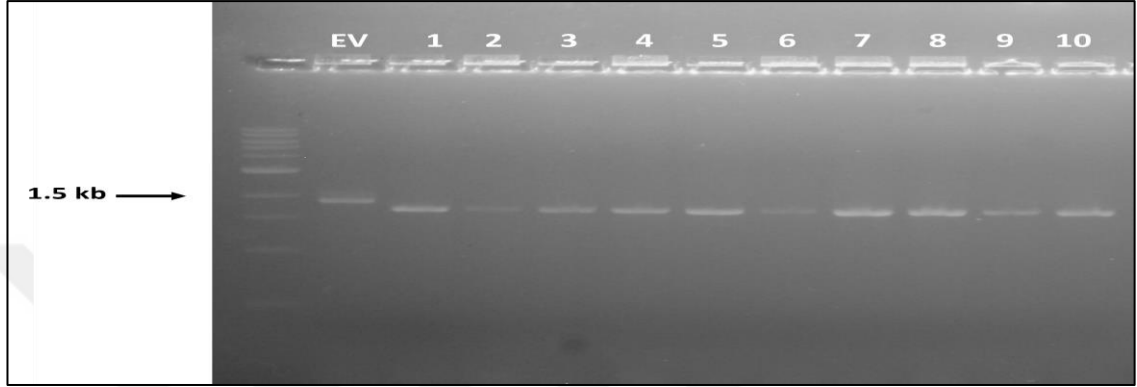
PKS kütüphanesinin taranması sonucunda 8 koloni elde edilmiştir. Elde edilen koloniler yaprak kütüphanesinde bulunan kolonilere göre daha iyi gelişim göstermiştir. Ancak seçilen bazı koloniler aynı şekilde küçük olduğundan dolayı yalnızca 4 petrideki koloniler net şekilde gözükmemektedir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Kök cDNA kütüphanesinin taranması; **a)** YNB cDNA kütüphanesini taşıyan koloniler (Pozitif kontrol); **b)** YNB besiyerine ekilen EV taşıyan maya hücreleri (Pozitif kontrol); **c)** 15 mM YNB besiyerinde EV taşıyan mayalar; **d)** 15 mM'da çıkan maya kolonileri

4.4. Kolonilerin Taşıdıkları cDNA'ların PCR ile Kontrolü (Yaprak kütüphanesi)

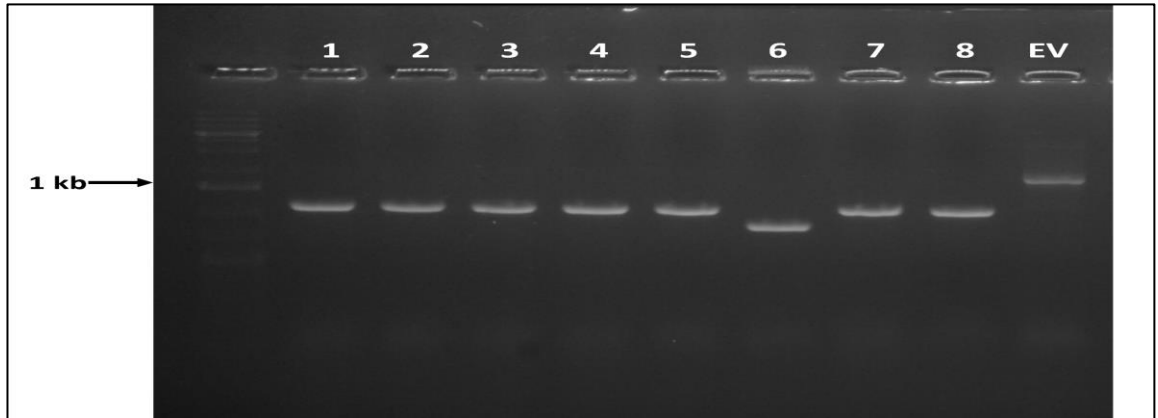
Damlatma testi yapıldıktan sonra çıkan koloniler seçilerek taşıdıkları cDNA'ların boyutlarını belirlemek için maya koloni PCR'ı yapılmıştır. Ardından Agaroz jelde yürütülmüştür. Elde edilen jel görüntüsü 4.6'da görüldüğü gibidir ve ürün boyutlarının hepsinde 1.5 kb olduğu görülmektedir. Jel görüntüsü sonrasında yaprak kütüphanesinde bulunan kolonilerin taşıdıkları cDNA'ların boyutlarının aynı olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.6. Yaprak cDNA kütüphanesinde tolerans sağlayan kolonilerin taşıdıkları cDNA boyutlarına ait jel görüntüsü

4.5. Kolonilerin Taşıdıkları cDNA'ların PCR ile Kontrolü (Kök kütüphanesi)

Kütüphane tarandıktan sonra bulunan koloniler farklı konsantrasyonlarda damlatma testine tabi tutulmuştur. Bulunan 8 maya kolonisi ve EV'den CYC-GPD-F primerleri kullanılarak koloni PCR yapılmıştır. PKS6 kolonisi hariç diğer cDNA'ların boyutlarının aynı olduğu görülmüştür. Ancak PKS6 kolonisi damlatma testi sonrasında gelişim göstermediği için elenmiştir. EV'ye ait PCR ürünü beklendiği şekile 1.5 kb'da bant vermiştir (Şekil 4.7).



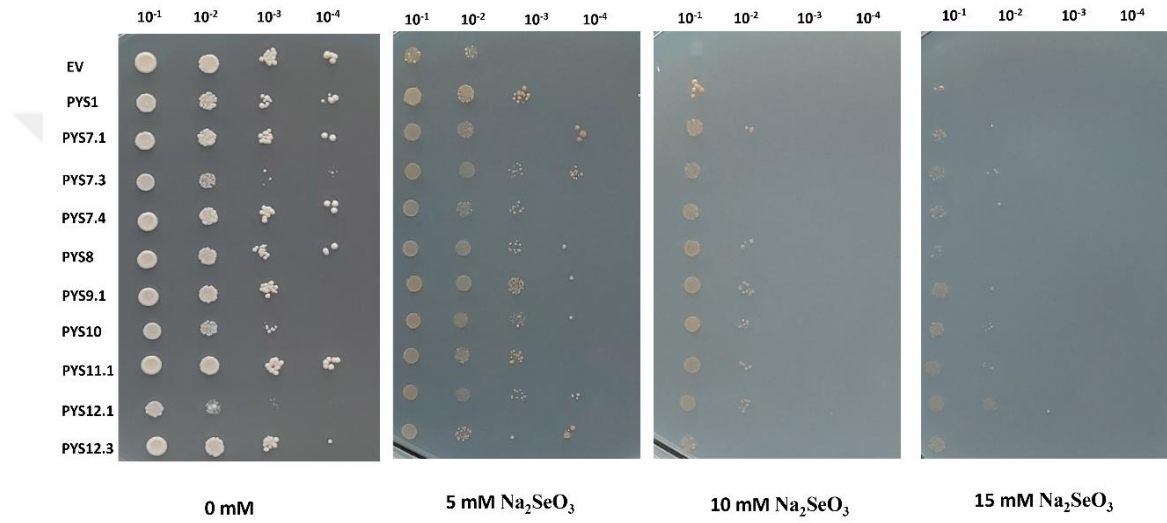
Şekil 4.7. Kök cDNA kütüphanesinde tolerans sağlayan kolonilerin taşıdıkları cDNA boyutlarına ait jel görüntüsü

4.6. Seri Dilüsyon Sonrası Hayatta Kalan Koloniler

Damlatma testine tabi tutulan aynı koloniler materyal metot kısmında “seri dilüsyon” başlığı altında anlatıldığı üzere gerçekleştirilmiştir. Bu test sonucunda hayatta kalan koloniler seçilerek plazmit izolasyonu yapılmış, diğer koloniler elenmiştir.

4.7. Yaprak Seri Dilüsyon

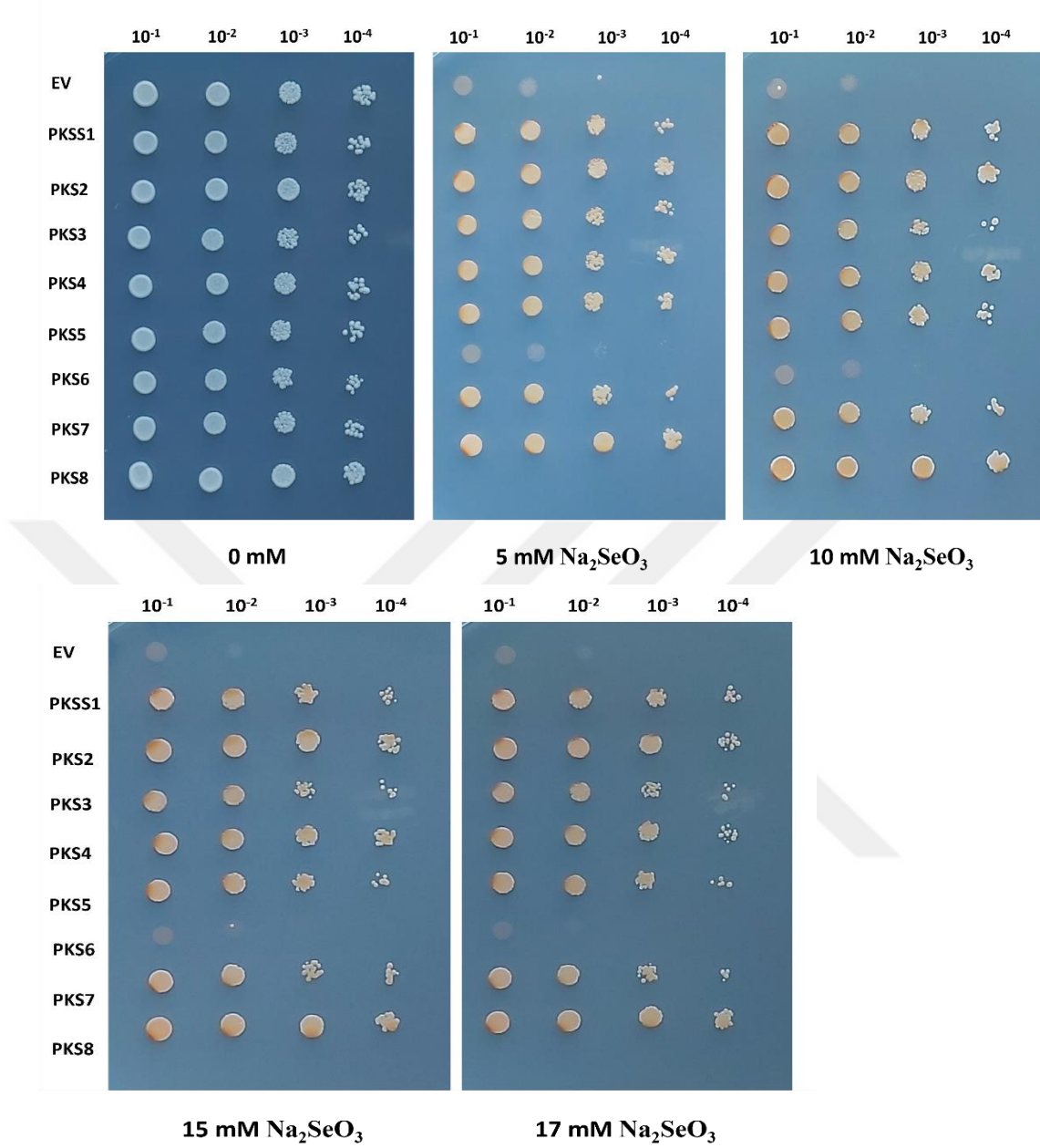
0 (kontrol), 5 mM 10 mM, 15 mM konsantrasyonlarında seri dilüsyon yapılan petrilerde koloniler aşağıdaki şekilde gelişim göstermiştir. 0 mM ‘da beklendiği üzere tüm kolonilerde gelişim görülmüştür. 10 mM’den itibaren EV’nin büyümesi tamamen durmuştur. EV’ye kıyasla PYS 12.3 gelişim göstermeyerek elenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Yaprak kütüphanesinden elde edilen ve tolerans sağladığı belirlenen kolonilerin farklı konsantrasyonlarda seri dilüsyonu; 0 mM (kontrol), 5 mM, 10 mM ve 15 mM

4.8. Kök Seri Dilüsyon

Kök için 0 (kontrol), 5 mM, 10 mM, 15 mM ve 17 mM olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda seri dilüsyon yapılmıştır. 0 mM YNB de beklendiği şekilde tüm kolonilerde gelişim görülmüştür. Diğer konsantrasyonlarda EV’nin her aşamada büyümesi baskılanarak, 15 mM’da hiç koloni görülmemektedir (Şekil 4.9). Ayrıca, yaprak kütüphanesine kıyasla kök kütüphanesinde bulunan koloniler toksik konsantrasyonda daha iyi gelişim göstermiştir.



Şekil 4.9. Kök kütüphanesinden elde edilen ve tolerans sağladığı belirlenen kolonilerin farklı konsantrasyonlarda seri dilüsyonu; 0 mM (kontrol), 5 mM, 10 mM, 15 mM, 17 mM

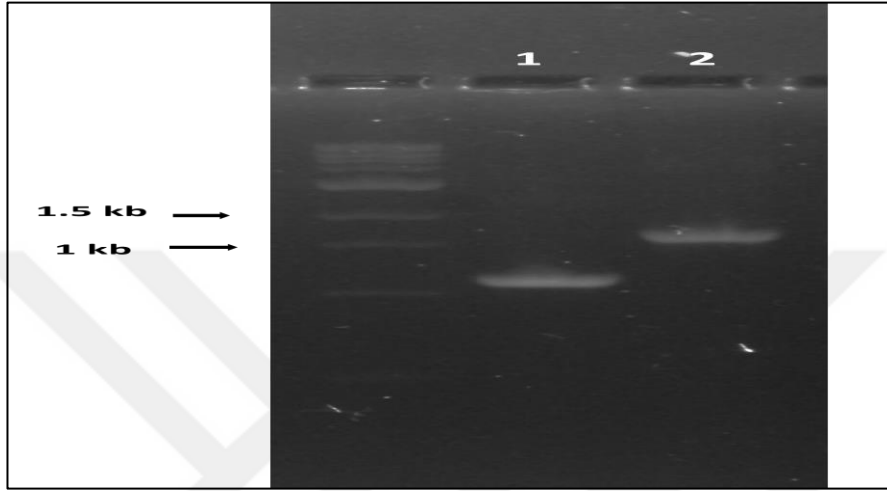
4.9. Plazmit Kurtarma

4.9.1. *P.distans* yaprak kütüphanesi plazmit kurtarma

Diğer kolonilerin taşıdıkları cDNA boyutları aynı olduğu için yaprak kütüphanesinden seçilen PYS9.1 maya hücrelerinden izole edilmiştir. Elde edilen plazmiti yeteri kadar çoğaltmak amacıyla DH5α *E. coli* hücrelerine transformasyonu yapılmıştır. Transformasyon sonrası gelişen kolonilerin taşıdığı cDNA'lar koloni PCR ile doğrulanmıştır.

4.9.3. *P.distans* kök kütüphanesi plazmit kurtarma

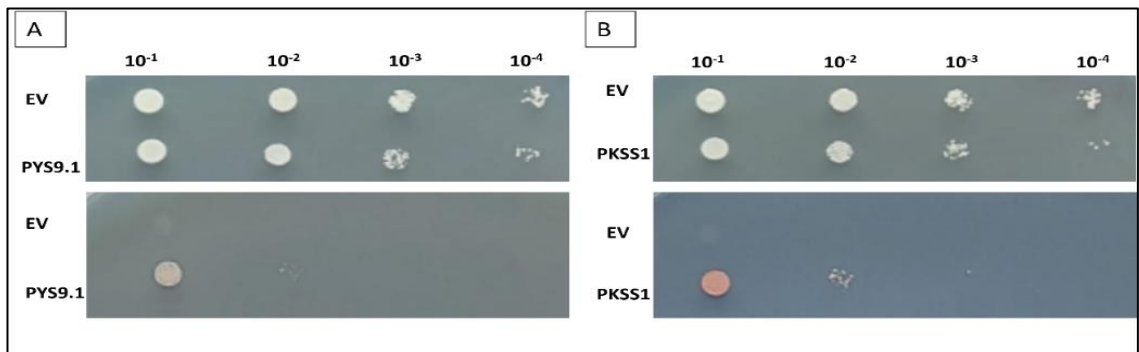
Aynı şekilde kök kütüphanesinden seçilen PKS1 kolonisi mayadan izole edildikten sonra *E. coli* hücrelerine transformasyonu yapılmıştır. Çıkan transforme kolonilerin taşıdıkları cDNA'ları kontrol etmek amacıyla *E. coli* koloni PCR'ı kurulmuştur. Çıkan bant boyutları PKS1 için yaklaşık 1 kb ve PYS9.1 için yaklaşık 1.5 kb olmak üzere en başta elde edilen bant boyutları ile tutarlı çıkmıştır (4.10).



Şekil 4.10. Sırasıyla; PKS.1 ve PYS9.1 Koloni PCR ile doğrulanması

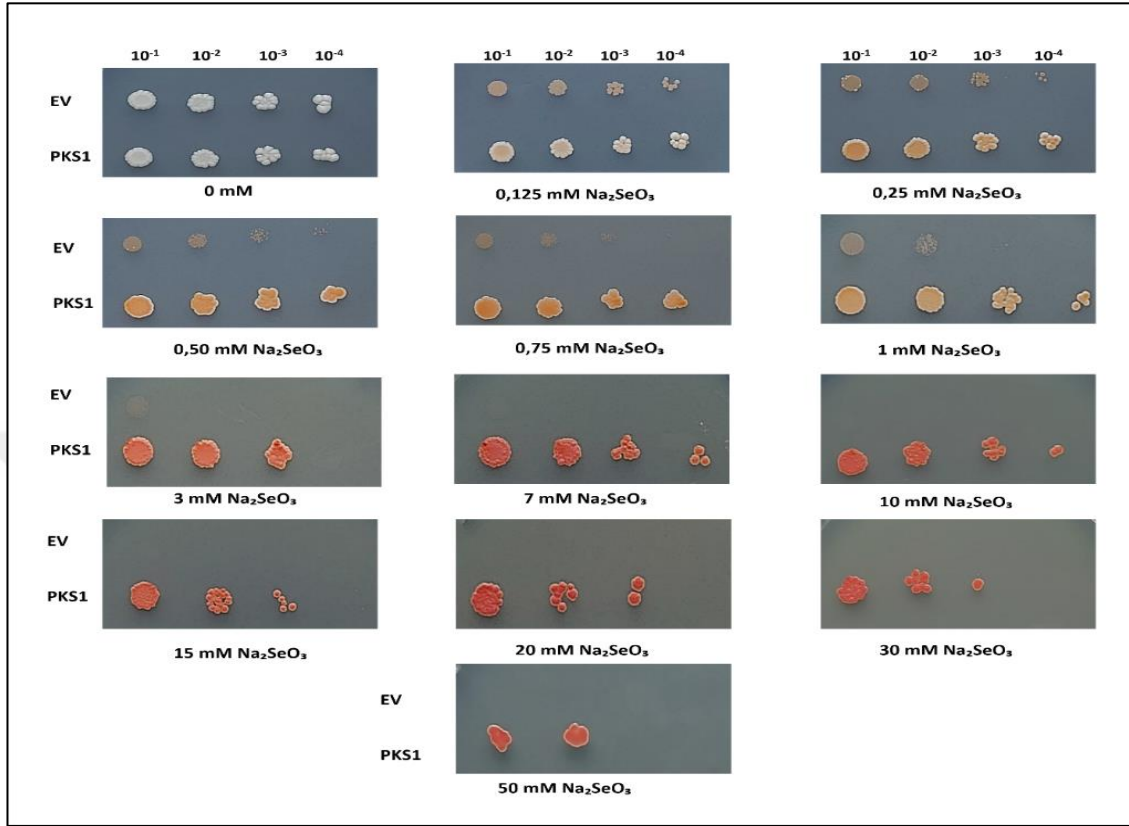
4.10. Re-Transformasyon Sonrası Seri dilüsyon

Tekrar transformasyon sonrası PKS1 ve PYS9.1 kolonilerine seri dilüsyon Şekil 4.11'deki gibidir. PKS1 ve PYS1'in, EV'nin gelişmediği besiyerlerinde (10 ve 15 mM) gelişerek tolerans gösterdiği görülmüştür.



Şekil 4.11. Yaprak kütüphanesinden seçilen PYS9.1 ve kök kütüphanesinden PKS1 kolonilerinin tekrar transformasyonu, ardından seri dilüsyon testinin uygulanması; **a)** 0 mM ve 15 mM'da EV ve PYS9.1; **b)** 0 mM ve 15 mM'da EV ve PKS1

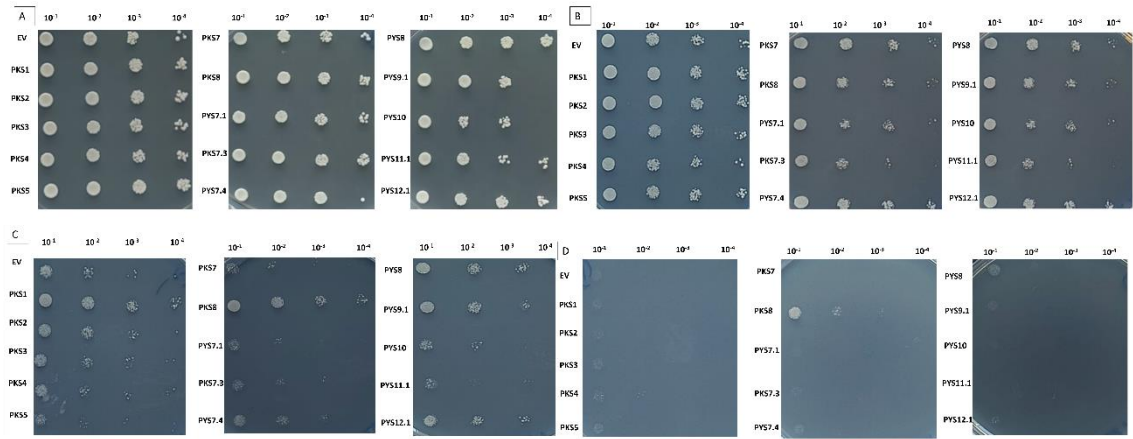
PKS1 için daha üst dozlara çıkılarak 50 mM sodyum selenit içeren besiyerlerde seri dilüsyon testi yapılmıştır. Hücre miktarları azalsa da hayatta kaldığı görülmüştür (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. EV (kontrol) ve PKS1'in farklı konsantrasyonlarda sodyum selenit içeren besiyerlerinde seri dilüsyonu

4.11. Tuz Stresi Denemesi

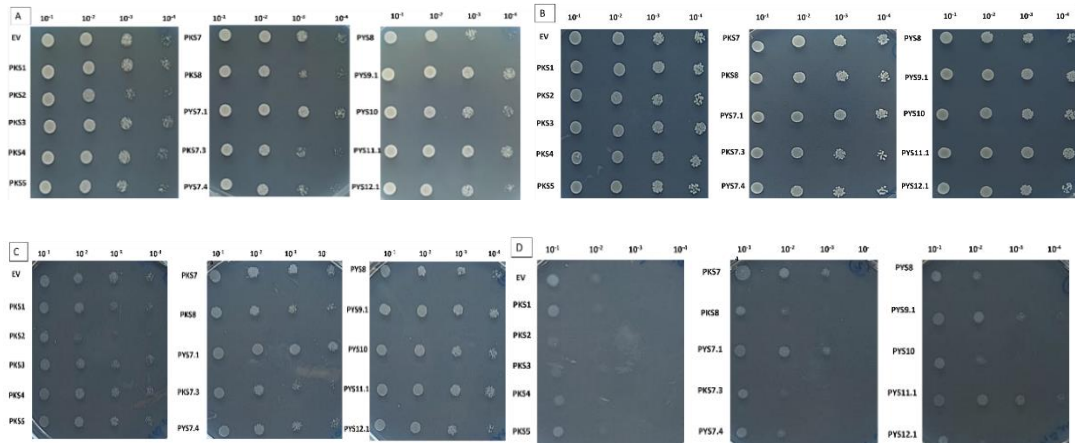
Sodyum selenit stresi sonrası tolerans sağladığı gözlemlenen koloniler, belirlenen konsantrasyonlarda tuz (NaCl) ve kuraklık (sorbitol) içeren besiyerlerinde test edilmiştir. Tuz denemesi için 0 M (kontrol), 1.5 M, 2 M ve 2.3 M konsantrasyonlar kullanılmıştır. 0 M kontrol petrisinde tüm koloniler beklediği üzere gelişim göstermiştir ve kolonilerin canlılığı test edilmiştir. 1.5 M NaCl içeren petrilere 0 mM'a göre kolonilerin gelişimleri beklediği şekilde azalmıştır. Ancak EV gelişim göstermiştir. 2 M NaCl içeren petrilere EV dahil olmak üzere birçok koloninin gelişiminin azaldığı görülmüştür. Özellikle PKS 7, PKS 7.1 ve PYS 11.1'in gelişimleri EV'ye kıyasla daha az olduğu görülmüştür. 2.3 M NaCl toksik konsantrasyon olarak belirlenmiştir ve EV'nin gelişimi tamamen durmuştur. Ancak PKS4, PKS8, PYS8 ve PYS 9.1 kolonilerinin gelişim gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren besiyerlerinde kök ve yaprak kütüphanesinden elde edilen kolonilerin test edilmesi; **a)** 0 M (kontrol); **b)** 1.5 M NaCl; **c)** 2 M NaCl; **d)** 2.3 M NaCl

4.12. Kuraklık Stresi Denemesi

Kuraklık stresi (sorbitol) denemesinde 0 mM kontrol petrisinde beklendiği üzere tüm kolonilerde gelişim görülerek, hücrelerin canlılığı kontrol edilmiştir. 2 M sorbitol içeren besi ortamında EV dahil olmak üzere tüm koloniler gelişim göstermiştir. 3M'da EV'nin gelişiminin baskılandığı görülmüştür, ancak gelişimi tamamen durmamıştır. Bununla birlikte diğer kolonilerde gelişimlerine devam etmiştir. 3.5 M toksik konsantrasyon kabul edilmiştir. Buna kıyasla diğer kolonilerin gelişimleri karşılaştırılmıştır. PKS7, PKS7.1, PYS 9.1 ve PYS 11.1 kolonilerinin sorbitol içeren ortamda daha toleranslı olduğu görülmüştür (Şekil 4.14).

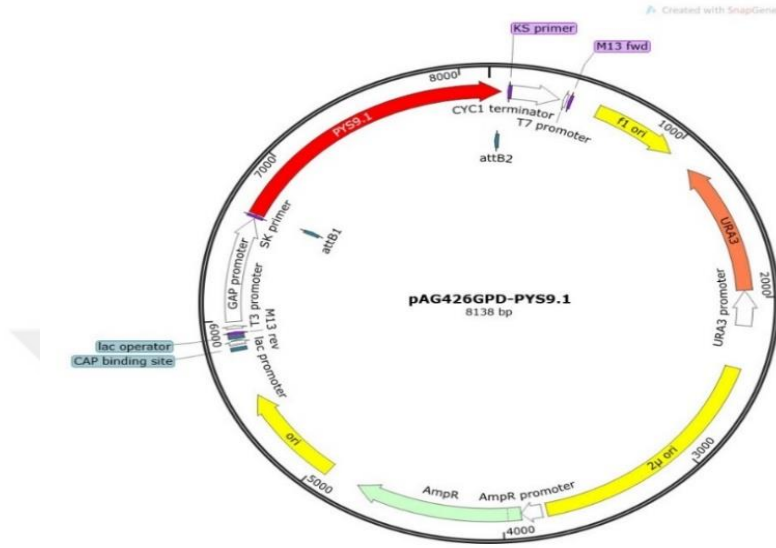


Şekil 4.14. Farklı konsantrasyonlarda sorbitol içeren besiyerlerinde kök ve yaprak kütüphanesinden elde edilen kolonilerin test edilmesi; **a)** 0 M (kontrol); **b)** 2 M sorbitol; **c)** 3 M sorbitol; **d)** 3.5 M sorbitol

4.13. Sekanslama ve Filogenetik Analizler

4.13.1. PKS1 için sekanslama ve filogenetik analizler

Sekanslama işlemi için hizmet alımı yapılmıştır. Kök kütüphanesinden PKS1 plazmit sekansı için çizilen SnapGene vektörü Şekil 4.15'te verilmiştir.



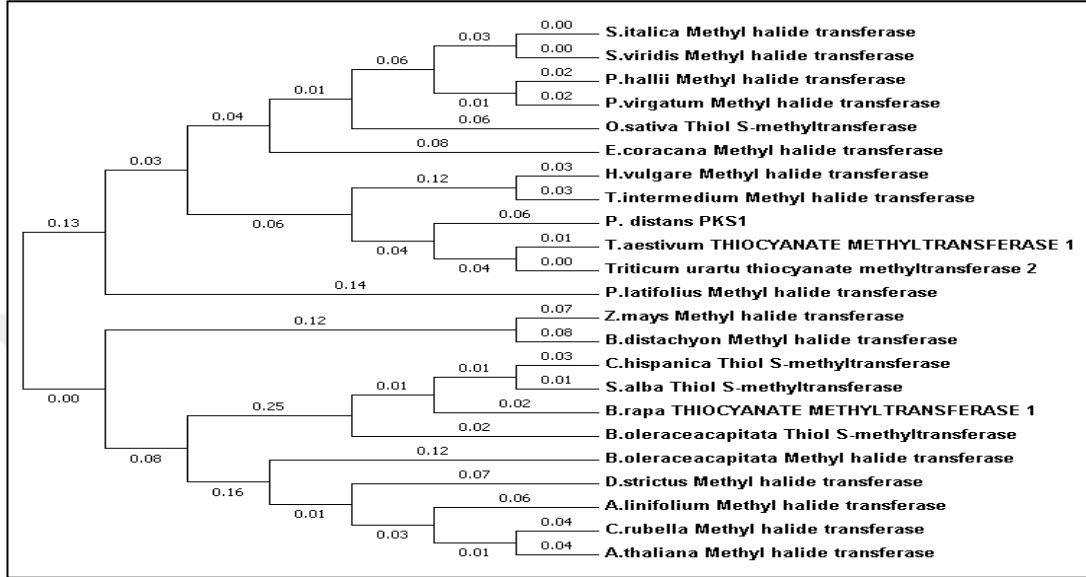
Şekil 4.15. PKS1 plazmine ait sekansdan SnapGene proramı ile vektör haritasının oluşturulması

Elde edilen insert sekans NCBI-BLAST kullanılarak diğer genlerle benzerliği araştırılmıştır. BLAST sonucunda göre elde edilen PKS1 geni *Triticum urartu* "Tiyosiyanat metiltransferaz 2" geni ile %88,45 oranında benzerlik göstermiştir (Şekil 4.16).

Sequences producing significant alignments		Download	Select columns	Show	100	?			
☒ Select all 13 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer				
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	PREDICTED: <i>Triticum urartu</i> probable thiocyanate methyltransferase 2 (LOC125554369). mRNA	Triticum urartu	909	909	85%	0.0	88.45%	1100	XM_048717943.1
☒	PREDICTED: <i>Triticum urartu</i> probable thiocyanate methyltransferase 2 (LOC125530421). mRNA	Triticum urartu	909	909	85%	0.0	88.45%	1100	XM_048694823.1
☒	PREDICTED: <i>Triticum dicoccoides</i> probable thiocyanate methyltransferase 2 (LOC119289420). mRNA	Triticum dicoccoides ...	909	909	85%	0.0	88.45%	1084	XM_037568751.1
☒	PREDICTED: <i>Triticum aestivum</i> probable thiocyanate methyltransferase 2 (LOC123084102). mRNA	Triticum aestivum	824	824	75%	0.0	89.02%	1110	XM_044505880.1
☒	PREDICTED: <i>Lolium rigidum</i> probable thiol methyltransferase 2 (LOC124682038). mRNA	Lolium rigidum	531	531	73%	1e-145	81.78%	972	XM_047216803.1
☒	PREDICTED: <i>Lolium perenne</i> probable thiol methyltransferase 2 (LOC127321346). mRNA	Lolium perenne	520	520	73%	2e-142	81.50%	1038	XM_051350370.1
☒	PREDICTED: <i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> probable thiol methyltransferase 2 (LOC123395049). mRNA	Hordeum vulgare ...	488	488	73%	7e-133	80.34%	1182	XM_045089969.1
☒	PREDICTED: <i>Oryza brachyantha</i> probable thiol methyltransferase 2 (LOC102704970). mRNA	Oryza brachyantha	479	479	73%	4e-130	80.06%	1071	XM_006651951.3
☒	PREDICTED: <i>Triticum aestivum</i> probable thiol methyltransferase 2 (LOC123114275). mRNA	Triticum aestivum	462	462	73%	4e-125	79.88%	1061	XM_044535693.1
☒	<i>Triticum aestivum</i> cDNA clone SET2_D01 cultivar Chinese Spring	Triticum aestivum	462	462	73%	4e-125	79.88%	1010	AK333891.1
☒	PREDICTED: <i>Triticum dicoccoides</i> probable thiol methyltransferase 2 (LOC119312799). mRNA	Triticum dicoccoides ...	435	435	73%	9e-117	79.26%	1035	XM_037588564.1
☒	PREDICTED: <i>Sorghum bicolor</i> pentatricopeptide repeat-containing protein At2g27610 (LOC8080161). trans...	Sorghum bicolor	58.4	58.4	5%	0.002	88.00%	2740	XM_021451819.1
☒	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein complete cds clone NIAshv2011L14	Hordeum vulgare ...	54.7	54.7	6%	0.029	83.93%	922	AK362962.1

Şekil 4.16. PKS1 plazmitindeki cDNA bölgesinin NCBI BLAST programı ile benzerlik gösteren gen grupları

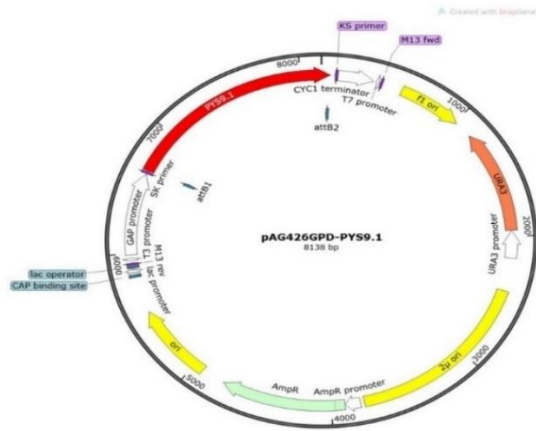
Elde edilen cDNA sekansı NCBI-ORF finder programı kullanılarak açık okuma çerçevesi belirlenerek protein sekansına çevrilmiştir. Protein sekansları ile MEGA 7.0 programında filogenetik ağaç (NJ) çizilmiştir (Şekil 36). Filogenetik ağaç incelendiğinde PKS1 olarak isimlendirilen genin *T. aestivum* ve *T.urartu* ile yakın olduğu görülmektedir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Elde edilen PKS1'e ait cDNA sekansı kullanılarak MEGA 7.0 programında filogenetik ağaç çizilmesi

4.13.2. PYS9.1 için sekanslama ve filogenetik analizler

Yaprak kütüphanesinden sekanslanması üzere seçilen PYS9.1'e ait sekanstan SnapGene programı kullanılarak vektör oluşturulmuştur (Şekil 4.18).



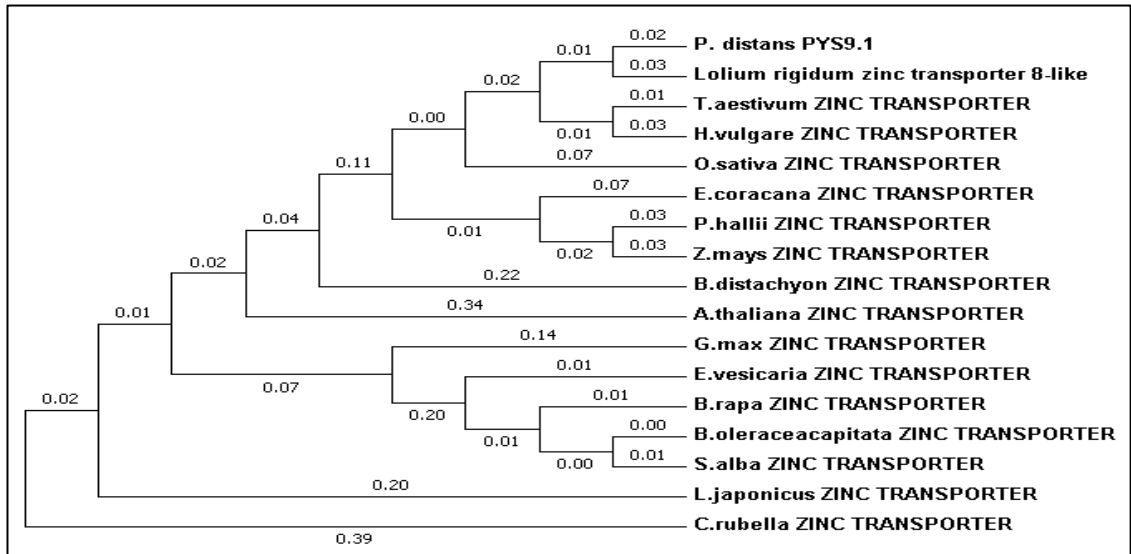
Şekil 4.18. PYS 9.1 plazidine ait sekansdan SnapGene proramı ile vektör haritasının oluşturulması

Kırmızı (Şekil 4.18) ile işaretlenmiş bölge attB1 ve attB2 arasında kalan cDNA inserti (PYS9.1)'dir. Elde edilen insert sekans aynı şekilde NCBI-BLAST kullanılarak diğer genlerle benzerliği araştırılmıştır. BLAST sonucunda göre *Poaceae* familyasına ait bir çim türü olan "*Lolium rigidum*" ile %89,27 oranında "Çinko Transporter like-8" geni ile benzerlik göstermiştir (Şekil 4.19).

select all 100 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer				
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	PREDICTED: <i>Lolium rigidum</i> zinc transporter 8-like (LOC124701945) mRNA	Lolium rigidum	1546	1546	83%	0.0	89.27%	1441	XM_047234047.1
✓	PREDICTED: <i>Lolium perenne</i> zinc transporter 8-like (LOC127296159) mRNA	Lolium perenne	1535	1535	81%	0.0	89.56%	1494	XM_051326104.1
✓	PREDICTED: <i>Lolium rigidum</i> zinc transporter 8-like (LOC124701989) mRNA	Lolium rigidum	1531	1531	83%	0.0	89.03%	1520	XM_047234087.1
✓	PREDICTED: <i>Triticum urartu</i> zinc transporter 8-like (LOC125539987) mRNA	Triticum urartu	1297	1297	78%	0.0	86.74%	1541	XM_048703543.1
✓	PREDICTED: <i>Triticum aestivum</i> zinc transporter 8-like (LOC123190718) mRNA	Triticum aestivum	1291	1291	78%	0.0	86.66%	1819	XM_044603425.1
✓	PREDICTED: <i>Triticum dicoccoides</i> zinc transporter 8-like (LOC119356781) mRNA	Triticum dicocc...	1280	1280	78%	0.0	86.49%	1588	XM_037623767.1
✓	PREDICTED: <i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> zinc transporter 8-like (LOC123429587) mRNA	Hordeum vulgar...	1279	1279	78%	0.0	86.61%	1548	XM_045113615.1
✓	<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> mRNA for predicted protein complete cds clone: NIAHV3115C18	Hordeum vulgar...	1279	1279	78%	0.0	86.61%	1433	AK376120.1
✓	<i>Triticum aestivum</i> Zn-transporter ZIP13-A (ZIP13-A) mRNA complete cds	Triticum aestivum	1271	1271	74%	0.0	87.40%	1149	MT362735.1
✓	PREDICTED: <i>Triticum aestivum</i> zinc transporter 8-like (LOC123042376) mRNA	Triticum aestivum	1264	1264	78%	0.0	86.24%	1660	XM_044464846.1
✓	PREDICTED: <i>Triticum dicoccoides</i> zinc transporter 8-like (LOC119368562) mRNA	Triticum dicocc...	1264	1264	78%	0.0	86.24%	1420	XM_037633788.1
✓	PREDICTED: <i>Triticum aestivum</i> zinc transporter 8 (LOC101669851) mRNA	Triticum aestivum	1253	1253	80%	0.0	85.68%	1678	XM_044471907.1
✓	PREDICTED: <i>Triticum aestivum</i> zinc transporter 8-like (LOC123054879) mRNA	Triticum aestivum	1251	1251	78%	0.0	86.18%	1590	XM_044478753.1
✓	PREDICTED: <i>Triticum dicoccoides</i> zinc transporter 8-like (LOC119362752) mRNA	Triticum dicocc...	1249	1249	80%	0.0	85.63%	1454	XM_037628005.1
✓	PREDICTED: <i>Aegilops tauschii</i> subsp. <i>strangulata</i> zinc transporter 8 (LOC109772245) transcript variant 1	Aegilops tausch...	1245	1245	78%	0.0	86.10%	1337	XM_020330930.3
✓	PREDICTED: <i>Triticum aestivum</i> zinc transporter 8-like (LOC123040877) mRNA	Triticum aestivum	1243	1243	80%	0.0	85.55%	1651	XM_044463608.1

Şekil 4.19. PYS9.1 plazmitindeki cDNA bölgesinin NCBI BLAST programı ile bakılması sonucunda benzerlik gösteren gen grupları

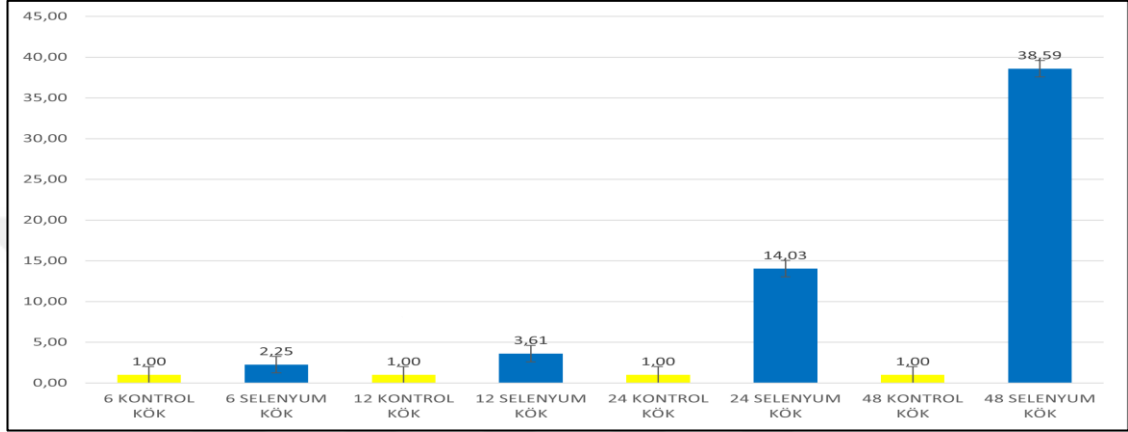
Elde edilen PYS9.1'e ait cDNA sekansı ile MEGA 7 programı kullanılarak NJ filogenetik ağaç çizilmiştir. Elde edilen PYS9.1'in filogenetik ağaca göre en çok bir çim türü ve buğdaygiller familyasının üyesi olan *Lolium rigidum*, *T. aestivum*, *H. vulgare* çinko transporterlar ile yakın olduğu gözlemlenmektedir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Elde edilen PYS9.1'e ait cDNA sekansı kullanılarak MEGA 7.0 programında filogenetik ağaç çizilmesi

4.14. *P. distans* PKS1 için RT-qPCR

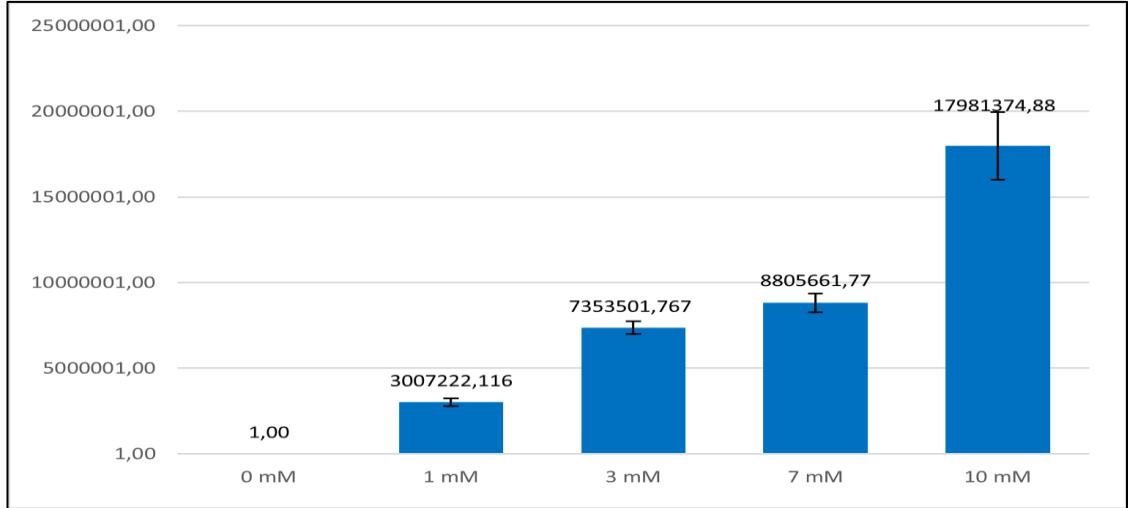
P. distans'a 80 μ M sodyum selenit stresi verilmesi sonucunda farklı saat aralıklarında örnekler hasat edilmiştir. PKS1 geni *P. distans* kök cDNA kütüphanesinin taranması sonucunda bulunmasından dolayı RT-qPCR analizinde kök dokuları kullanılmıştır. 48. saatte en yüksek ifade seviyesine ulaşarak kontrol örneğine kıyasla 38,59 kat ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. *P. distans* kök dokularından elde edilen RNA'lardan PKS1'e spesifik primerler kullanılarak farklı saatlerde stres sonrası RT-qPCR ile gen ifadelerine bakılması

4.15. Maya PKS1 için RT-qPCR

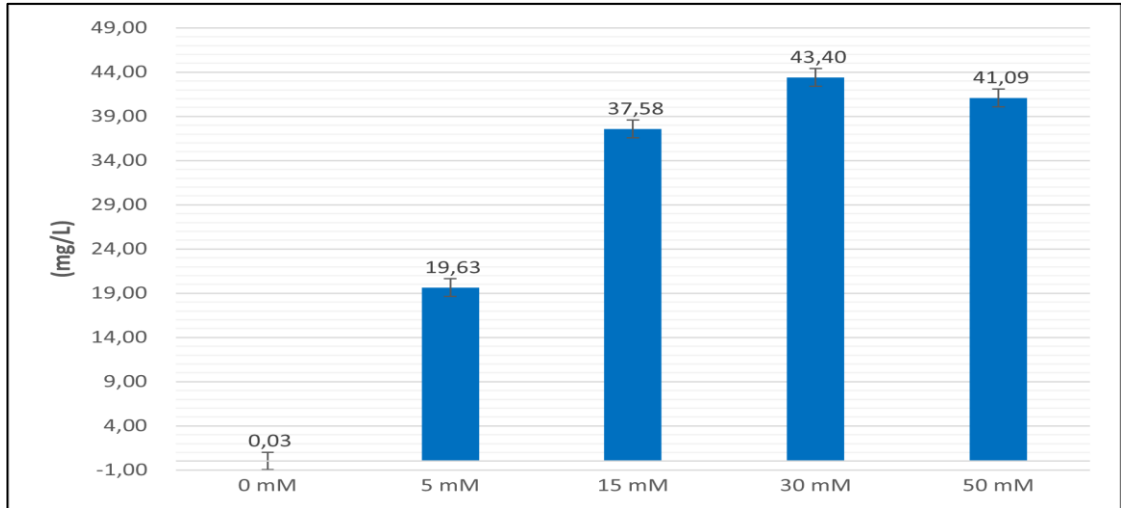
PKS1 plazmitini içeren maya hücrelerine materyal metotda tarif edildiği üzere farklı dozlarda sodyum selenit stresi verilmiştir. Ardından maya hücrelerinden RNA izolasyonu yapılmıştır. PKS1 cDNA'sına spesifik primerler ile kurulan RT-qPCR sonucunda 10 mM'a kadar gen ifadesinin artarak devam ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. PKS1 cDNA'sı içeren maya hücrelerine farklı konsantrasyonlarda stres uygulanması sonucunda gen ifadesinin değişimlerine bakılması

4.16. Hücre İçi Selenyum Miktarının Belirlenmesi (ICP-MS)

PKS1 plazmitini taşıyan maya hücrelerine farklı konsantrasyonlarda sodyum selenit stresi verilerek hücre içi Se birikimi ICP-MS ile belirlenmiştir. Hücrelerin Se birikimi mg/L cinsinden verilmiştir. En yüksek birikimin 30 mM sodyum selenit verilen hücrelerde olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 50). 50 mM'da Se birikiminde azalma görülmüştür (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. PKS1 içeren maya hücrelerine farklı konsantrasyonlarda sodyum selenit verilmesi sonucunda hücre içi Se birikiminin ICP-MS ile belirlenmesi

5. TARTIŞMA

Dünya genelinde metal/metaloit toksisitesi büyük bir sorundur. Bu elementlerin çevrede kalıcı olması ve kolaylıkla besin zincirine dahil olması nedeniyle birçok canlının yaşamını tehdit etmektedir (Hasanuzzaman vd. 2018). Ayrıca topraklarda yüksek konsantrasyonlarda metal/metaloit birikimi, tarımsal üretimdeki verimi düşürmekle birlikte, ileriki aşamalarda bitkilerin ölümüne sebep olmaktadır (Angulo-Bejarano vd. 2021).

Bitkiler aracılığıyla toprak ve sulardaki kontaminasyona sebep olan metal/metaloitlerin uzaklaştırılması yöntemine dayanan fitoremediasyon teknikleri, yaygın olarak kullanılan çevre dostu bir yöntemdir (Hasanuzzaman vd. 2018). Bu açıdan metal metaloit toksitesine karşı toleranslı bitki türlerinin, bahsedilen ortamlarda yetiştirilmesi önem arz etmektedir.

Bahsedilen metaloitlerden birisi de selenyumdur. Selenyumun (Se) dünyada dağılışı bölgelere ve coğrafyalara göre farklılık göstermektedir. Belirli bölgelerde eksikliği görülürken, bazı bölgelerde yüksek konsantrasyonuna bağlı olarak Se toksisitesi görülmektedir. Bitkiler için eser element olan selenyum, insanlar ve hayvanlar için mutlak gerekli elementlerden birisidir. Ayrıca selenyumun mutlak gerekli olduğu canlılar için bitkiler, temel selenyum kaynağıdır (Gupta ve Gupta 2017). Bu sebeple bitkilerdeki selenyum biriktirme kapasitesinin artırılmasını ve bu mekanizmaların aydınlatılması hem Se eksikliği hem de toksisitesi açısından avantaj olarak görülmektedir (Hasanuzzaman vd. 2020). Ancak doğada her bitki metal/metaloit toksisitesine karşı elverişli değildir. Güncel moleküler ve biyoteknolojik yaklaşımlar, hiperakümülatör bitkilerdeki moleküler mekanizmaları ve bu mekanizmalarda rol alan gen/genlerin belirlenmesine yardımcı olmaktadır (Hasanuzzaman vd. 2018).

Yapmış olduğumuz çalışmada seçilen *P. distans* bitkisi bor hiperakümülatör ve selenyum akümülatör bir bitkidir. Bunun yanı sıra tuz ve kuraklık streslerine karşı tolerans gösterdiği de belirlenmiştir (Stiles vd. 2010). Ancak bu stres faktörlerinde rol oynayan genler net bir şekilde belirlenmemiş olup, yalnızca transkriptomik çalışmalar ile sınırlı kalmıştır (Kök vd. 2020).

Bu nedenle bor stresi uygulanarak kurulmuş olan *P. distans* cDNA kütüphanesi taranarak Se toksisitesine karşı tolerans sağlayan gen/genler araştırılmıştır. Bunun sonucunda selenyum stresine karşı tolerans sağladığı belirlenen PKS1 ve PYS9.1 olarak isimlendirilen cDNA'lar sekanslanmıştır. Elde edilen sekanslara ait NCBI-BLAST sonuçlarına göre PKS1 *Triticum urartu*'da "Tiyosiyanat metiltransferaz 2" ile %88,45 oranında benzerlik gösterirken, PYS9.1 aynı şekilde "*Lolium rigidum*" da bulunan "Zinc Transporter like-8 ile %89,27 oranında benzerlik göstermiştir. *P. distans* bitkisinin *Poacea* (buğdaygiller) familyasına ait bir bitki türü olması sebebiyle, belirlenen genlerin en çok buğdaygiller ile benzerlik gösterdiği görülmüştür. *P. distans*'a ait literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, bulunan genlerin tuz ve kuraklık stresine de tolerans sağlama ihtimali üzerinde durularak kurulan bu hipotez çalışmamızda maya hücreleri ile test edilmiştir.

Tiyosiyanat Metiltransferaz (TMT) geninin transgenik tütün (Abida 2011) domates (Ritika 2013) ve *Diploaxis tenuifolia* L. (yabani roka)'da tuz stresine karşı

hafifletici etkisinin olduğu bildirilmiştir (Cocetta vd. 2018). Bu da çalışmamızda bulunan PKS1 (Tiyosiyanat metiltransferaz 2) genini taşıyan maya hücrelerinin tuz (NaCl) içeren besiyerlerinde test edilmesi sonucunda bir miktar tolerans göstermesini destekler niteliktedir.

Se stresi açısından kıyaslandıklarında damlatma testinde PKS1'i taşıyan maya kolonilerinin PYS9.1'e göre daha fazla gelişim gösterdiği görülmüştür. Bu durum Se stresine karşı toleransta farklı derecede etkili olduklarını düşündürmektedir. Ancak bildiğimiz kadarıyla literatürde, bahsedilen iki genin veya bu genlerin homologlarının Se toksisitesindeki rollerini kıyaslayan çalışmalara rastlanmamıştır.

Ayrıca, Tiyosiyanat metiltransferaz 2 (TMT2) geninin literatürde doğrudan selenyum toksisitesine karşı toleransta rol aldığını gösteren çalışmaya rastlanmamıştır. Literatürde *Brassica oleracea*'dan klonlanan TMT1 ve TMT2 genlerinin glukosinolat metabolizmasında yer aldığı tespit edilmiştir (Attieh vd. 2002).

Glukosinolatlar, bitkilerde doku hasarı vb. durumlarda mirosinaz veya tiyosiyanat S-metiltransferaz (TMT) enzimleriyle hidrolize edilerek; izotiyosiyanatlar, tiyosiyanatlar ve nitriller gibi yan ürünleri oluştururlar (Burow vd. 2007; Spadafora vd. 2019). Glukosinolatlar, bitkilerde S (kükürt) içeren sekonder metabolitlerden birisidir (Pongrac vd. 2010). Ayrıca patojenlere karşı savunma bileşikleri olarak da tanımlanmıştır (Walker vd. 1937; Sotelo vd. 2015). Se içeriği bakımından zengin olan *Brassicaceae* familyasındaki bitkilerin (Yawata vd. 2010) karakteristik acı tat ve kokularından sorumlu olan glukosinolat bileşikleri çok fonksiyonludur (Wieczorek vd. 2018).

Kök cDNA kütüphanesinde bulunan TMT2 geninin glukosinolat bileşikleri ile ilişkili olarak Se'a tolerans sağladığı düşünülmekle birlikte, glukosinolatlar birçok reaksiyonda doğrudan veya dolaylı olarak yer almaktadır.

Bir metiltransferaz enzimi olan Tiyosiyanat metiltransferazın doğal ürün metiltransferazlar sınıfına ait olduğu bilinmektedir. Doğal ürün metiltransferazlar metilledikleri küçük moleküllere veya atom gruplarına (O, N, C, S veya Se) göre isimlendirilmektedir. S- metiltransferazlar (SMT'ler) genellikle tiyosiyanatın yanı sıra uçucu halojen ve kükürt bileşiklerinin üretiminde yer almaktadır (Lashley vd. 2022).

Metiyonin halid/bisülfid metiltransferaz enzimlerinin halojenürlerin; iyodür, bromür ve klorürün metilasyonuna katılarak halometanlara ve bisülfürün metantiyole katalize ettiği bildirilmiştir (Attieh vd. 1995). *Brassica oleracea*'da yapılan çalışmada ise elde edilen tiol metiltransferaz geninin metil alıcı donör olarak güçlü şekilde tiyosiyanatı tercih ettiği belirlenmekle birlikte, glukosinolatların hidrolizi sonucunda üretilen reaktif tiyollerin detoksifikasyonunda yer alabileceği bildirilmiştir. Bu sebeple ilk olarak glukosinolat içeren bitkilerle ilişkilendirilmiştir (Attieh vd. 2000).

Se, S ve glukosinolat ilişkisini incelemek üzere *Brassica oleracea* ve *Arabidopsis*'te çalışılmıştır. Se ve S uygulaması sonucunda Glukosinolat (GS) ve izotiyosiyanat (ITC) konsantrasyonlarında ciddi derecede düşüş görülürken, yapraklarında Se ve S konsantrasyonları artmıştır (Barickman vd. 2013).

Raphanus sativus (Daikon turpu)'dan klonlanan halojenür/tiyol metiltransferaz geninin, yalnızca *Brassicaceae* familyasında değil buğday *Triticum aestivum*, çeltik *Oryza sativa* da dahil olmak üzere buğdaygiller *Poaceae* familyasında halojenür/tiyol metiltransferaz geni CH₃I emisyonu ile ilişkilendirilmiştir. *Triticum aestivum*, *Oryza sativa* ve *R. sativus* yapraklarında CH₃I emisyonunun arttığı belirlenmiştir (Itoh vd. 2009).

HOL genlerinin *A. thaliana*'da yapılan çalışmada benzer şekilde tuz toleransına veya glikozinolatların hidroliz ürünleri olan tiyol ve tiyosiyanat oluşumuna katıldığı düşünülmektedir. *A. thaliana*'dan klonlanan AtHOL1 geninin metil klorür, metil bromür ve metil iyodür gibi metilhalojenürlerin sentezinde rol oynadığı bildirilmiştir. Arabidopsiste homologları olan AtHOL2 ve AtHOL3 belirlenmiş olmakla birlikte diğer iki genin de benzer işlevde rol aldığı belirlenmiştir (Nagatoshi ve Nakamura 2007).

Metal stresi ve GS etkileşimleri arasında bir ilişki olduğu düşünülürken birlikte bu durum literatürde farklı çalışmalar ile incelenmiştir. Ancak bu ilişki bitki türlerine, çalışılan metal elemente ve birçok faktöre göre farklılık göstermektedir. Ayrıca glukosinolatların bitkilerdeki savunma tepkilerinde aldıkları roller düşünüldüğünden de karışık olabileceği ileri sürülmüştür (Pongrac vd. 2010).

Literatürde görüldüğü üzere; *Brassicaceae* ve *Poaceae* familyalarına ait bitkilerde birçok halojenür/tiyol metiltransferaz geninin fonksiyonuna ve yer aldığı yollara ilişkin çalışmalar gerçekleştirilmiştir ve farklı hipotezler öne sürülmüştür. Kök vd. (2020)'nin *P. distans*'da yaptıkları çalışmada Se stresi sonrasında; S-adenosil methiyonin bağımlı metiltransferazın ifadesinin arttığı belirlenmekle birlikte RT-qPCR ile doğrulanamamıştır. Çalışma ayrıca, Se dayanıklılığın *P. distans*'da jasmonik asit sinyal yolu ile ilişkili olduğunu öne sürmektedir.

Se ve Glukosinolat ilişkisi arasında ters rekabet olduğuna dair çalışmalar da literatürde mevcuttur. Bitkilerde stres sonrasında Tiyosiyanat metiltransferazın glukolizinolatların hidrolizinde rol oynayarak tiyosiyanat gibi bileşikleri açığa çıkarması, Se ve Glukosinolatlar arasında ters ilişkinin olduğunu destekler niteliktedir. Ancak TMT2 geninin Se stresindeki rolü ve rol aldığı yollar ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

PKS1 ile yapılan seri dilüsyon testinde 50 mM'a kadar sodyum selenit içeren YNB besiyerinde maya hücrelerinin hayatta kaldığı görülmektedir. Ancak PYS9.1'i taşıyan maya hücreleri yalnızca 15 mM'a kadar sodyum selenit içeren YNB besiyerinde hayatta kalabilmiştir. Bu durumun, içerdikleri genlerin Se stresine karşı toleransta farklı roller oynamalarından kaynaklı olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle, tez kapsamında Se stresine karşı tolerans sağlayan genlerin fonksiyonun belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda PKS1 genine yoğunlaşılarak devam edilmiştir.

Damlatma testinde ve seri dilüsyon testinde sodyum selenit içeren YNB besiyerlerinde hayatta kalan maya kolonilerinin kırmızı renkte olduğu görülmüştür. Bu durum sodyum selenit ile yapılan farklı çalışmalarda da bildirilmiştir. Aynı zamanda, artan sodyum selenit konsantrasyonu ile birlikte hidrojen sülfür kokusunun oluştuğu rapor edilmiştir (Suhajda vd. 2000; Mota vd. 2021). Selenyumun sodyum selenit kimyasal formu, şeffaf bir renktedir, ancak saf selenyum elementinin kırmızı renkte olduğu

bilinmektedir. Bu durumun, maya hücrelerinin sodyum selenit (Na_2SeO_3) bileşiğinin selenyuma indirgemesinden kaynaklı olabileceği bildirilmiştir. Bu indirgenme sonucunda, kolonilerde Se birikimine bağlı olarak kırmızı, pembe ve kahverengiye doğru renk oluşumu meydana gelmektedir (Kieliszek vd. 2015).

Kök vd. (2020)'nin yaptığı çalışmada belirtildiği üzere hidroponik ortamda yetiştirilen *P. distans* bitkilerine 80 μM sodyum selenit stresi verilmiştir. Farklı saat aralıklarında hasat edilen kontrol bitkileri ve sodyum selenit stresi verilen bitkilerden PKS1 genine spesifik primerler ile RT-qPCR yapılmıştır. PKS1 geninin sodyum selenit stresi verilmesi ile birlikte artan saat aralıklarında gen ifadesinin arttığı görülmüştür. 48. saatte ifade seviyesi en yüksek olan saat aralığı olmak ile birlikte gen ifadesinin kontrole kıyasla 38,59 kat arttığı belirlenmiştir. Aynı şekilde maya RT-qPCR reaksiyonu sonucunda 10 mM'a kadar sıvı YNB besiyerinde 3 saat sodyum selenit stresi verilerek PKS1 genin ifadesine bakılmıştır. Bunun sonucunda bitki RT-qPCR reaksiyonları ile tutarlı olarak genin ifadesinin artan sodyum selenit konsantrasyonları ile birlikte arttığı görülmüştür.

PKS1 genini taşıyan maya hücrelerinin farklı sodyum selenit içeren besiyerlerine hücre içi selenyum biriktirme miktarlarına ICP-MS ile bakılmıştır. 30 mM'a kadar hücre içi selenyum birikiminin arttığı görülmüştür. Ancak 50 mM'da azalmaya başlamıştır. Bu durumun seri dilüsyon testinde de görüldüğü üzere sodyum selenit konsantrasyonu arttıkça canlı koloni sayısının azalmaya başlamasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Yaprak kütüphanesinin taranması sonucunda belirlenen PYS 9.1 genin sekanslanması sonucunda "Zinc Transporter 8-like" geni ile bezerlik göstermiştir. ZIP gen ailesine mensup Zinc Transporter 8'in temel fonksiyonu çinko (Zn)'nun bitkilere alınarak çeşitli dokulara taşınmasıdır. Ancak ZIP gen ailesi aynı zamanda Fe, Zn, Cd, Co, Cu ve Ni gibi metallerin taşınmasında ve metal toksisitesine toleransta rol oynamaktadır (Jain vd. 2018).

ZIP gen ailesinin üyeleri ve fonksiyonları *A. thaliana*, çeltik ve mısır gibi bitkilerde tanımlanmıştır. Ancak birçok Zn taşıyıcı genlerin karakterizasyonu hala eksiktir (Ajeesh vd. 2020). *P. distans*'da daha önce ZIP 8 geninin Se stresinde rol aldığına dair çalışmalar mevcut değildir.

Arpada (*HvZIP3*, *HvZIP5*, *HvZIP8*) (Tiong vd. 2015), çeltikte (*OsZIP3*, *OsZIP3*, *OsZIP4*, *OsZIP5*, *OsZIP7* ve *OsZIP8*) (Bashir vd. 2012) ve mısırdaki (*ZmZIP5* ve *ZIP8*) (Li vd. 2013) bir grup ZIP genleri ile ZIP8'in çinko eksikliğinde çinkonun kökten sürgünlere alınmasında rol oynadığı belirlenmiştir (Ajeesh vd. 2020) *sZIP7a* esas olarak Fe eksikliği olan köklerde indüklenirken, *OsZIP8* Zn eksikliği olan sürgünler ve köklerde uyarıldığı belirlenmiştir.

Ayrıca, çeltikte *OsZIP5* ve *OsZIP8*'in aşırı ekspresyonu, transgenik bitkilerde sürgünlerde ve olgun tohumlarda azalmasına rağmen, köklerde Zn seviyesinin artmasına yol açmıştır (Li vd. 2013). Bitkilerde ZIP gen ailesinin üyeleri tanımlanmaya başlamıştır ancak bahsedilen genlerin Se taşınmasında ve stresindeki rolüne ilişkin bitkilerde henüz bir çalışmaya rastlanmamıştır.

ZIP gen ailesinin yalnızca bitkilerde değil insanlar, hayvanlar ve diğer organizmalarda da ortologları tanımlanmıştır. Yapılan bir çalışmada bikarbonat bağımlı ZIP8'in memeli hücrelerine selenit alınmasında ve taşınmasında rol oynadığı belirlenmiştir (McDermott vd. 2016). Benzer şekilde, insanlarda, kanser hastalıklarındaki rolü nedeni ile sıkça çalışılan Se'un ZIP8 proteini tarafından taşınabileceği ileri sürülmüştür. Crispr Cas9 sistemi kullanılarak Hela olarak adlandırılan hücrelerde ZIP8 geninin susturulması sonucunda, mikro besinlerden Cd ve Se'un hücrelere alımının azaldığı tespit edilmiştir. ZIP8 geni aşırı ifade edildiğinde ise hücrelere Se alımının arttığı belirlenmiştir (Liang vd. 2021).

Bitkilerde her ne kadar ZIP8 ve selenyum ilişkisi çalışılmasa da ZIP8 geninin insanlardaki ortoloğu Se'a tolerans sağladığı fikri, bitkilerde de Se stresi durumunda benzer rolü üstlenebileceğini düşündürmektedir.

ZTP29' un (Zinc Transporter 29) yapılan çalışmada Tuz stresine yanıtta rol oynadığı belirlenmiş olmakla birlikte, ZIP 8'in henüz bu konudaki etkisine yönelik çalışma mevcut değildir. Ancak bulduğumuz yaprak kütüphanesine ait kolonileri tuz içeren ortamda tolerans göstermesi, ZIP 8'in Tuz stresine karşı toleransda rol alabileceğini düşündürmektedir (Wang vd. 2010).

İyon taşıyıcılar (İon transporters) bitki büyüme ve yaşamsal faaliyetlerinin korunmasında değil, aynı zamanda terleme yolu ile su kaybını düzenlemek, stoma açıklığının hızlı ayarlanması sebebiyle ani kuraklık tepkilerinin düzenlenmesi içinde önemlidirler. Transkriptom analizi yapılan çalışmada çinko taşıyıcıların (ZIP5, ZIP6) ve potasyum taşıyıcıların (POT1,2 ve HAK 25) ifade olduğu genotiplerin daha toleranslı olduğu belirtilmiştir. Transkripsiyon faktörleri incelendiğinde bZIP 19 ve bZIP 23'ün toleranslı genotiplerde daha yüksek ifade olduğu ve abiyotik stres sinyalleri için önemli olduğu bildirilmiştir (Parmar vd. 2019).

Her ne kadar ZIP8 geninin bu konudaki rolüne ilişkin çalışma yapılmasada, farklı ZIP genlerinin kuraklık ve tuzluluk stresinde rol aldığına dair çalışmalar görülmektedir. ZIP 8 'in de benzer rol oynadığı görülmektedir.

Yaprak ve kök kütüphanelerinden elde edilen genlerin, (Kök vd. 2020) *P. distans*'da bulunduğu ve diğer Se hiperakümülatör bitkilerde bulunduğu üzere S taşıyıcı genleri ile doğrudan ilişkili değildir (Freeman vd. 2010; Cabannes vd. 2011). Bu durumun kütüphane kurulurken bor stresi uygulanması ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Bir diğer sebebi kütüphane taranırken Se stresi sodyum selenit ile verilmiştir. *Arabidopsis thaliana* ve *Brassica juncea*'da selenosistein metiltransferazı (SMT') kodlayan genin aşırı ifade edilmesi sonucunda, bitkilere selenit (SeO_3^{2-}) verildiğinde artan Se toleransına ve birikimine yol açtığını, ancak selenat verildiğinde aynı durumun gerçekleşmediği görülmüştür (Freeman vd. 2010). Bitkilerin selenat ve selenit formuna göre ifade edilen genlerde farklılık olabileceği düşünülmektedir (Zhang vd. 2006). Ancak çalışmamızda ki yaklaşımlarla, bulduğumuz iki genin Se stresine karşı tolerans da rol oynadığı bildiğimiz kadarı ile literatürde daha önceden bildirilmemiştir.

Çalışma sonucunda, bir akümülatör bitki olan *P. distans*'ta yüksek konsantrasyonlardaki selenyuma karşı toleranslığı sağlayan iki farklı gen belirlenmiştir.

Akümülatör ve hiperakümülatör bitkiler, metal/metalooidlerin topraktan veya yeraltı sularından arındırılmasında kullanılan çevre dostu bir yöntem olan fitoremediasyon kapsamında kullanılmaktadır. Bu nedenle de akümülatör ve hiperakümülatör bitkilerdeki metal/metolooid stresine karşı toleranslıkla ilişkili mekanizma ve bu mekanizmalara ilişkin genlerin tanımlanması oldukça önemlidir. Yapılan tez çalışması sonucunda, PKS1 (tiyosiyanat metiltransferaz 2) geninin, PYS9.1 (Zinc Transporter 8) genine göre daha yüksek Se konsantrasyonlarını tolere edebildiği belirlenmiştir. Belirlenen bu genler, gelecekte selenifer topraklardan, yüksek miktarlardaki Se'nin arındırılmasına yönelik fitoremediasyon çalışmalarına katkı sunabilir. Ayrıca belirlenen bu genler, *A. thaliana* gibi model bitkilere aktarılarak, genlerin daha iyi karakterize edilmesi sağlanabilir.

Çalışmamız kapsamında bulunan genlerin, gelecekte biyoteknolojik yaklaşımlar ile metal/metolooid stresini tolere edebilen kültür bitkileri geliştirilmesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.



6. SONUÇLAR

Metal /metaloid toksisitesi günümüzde yaygın bir problemdir. Bitkiler dahil olmak üzere birçok canlıda problemlere sebep olmaktadır. Se toksisitesi dünyada birçok bölge için önemli bir problem olmakla birlikte tuzluluk ve kuraklık yaygın görülen ve tarımsal üretimi sınırlandıran abiyotik stresler arasında yer almaktadır. Günümüzde tarımsal üretimde bitkiler bahsedilen stres faktörleri de dahil olmak üzere, birçok farklı strese aynı anda maruz kalmaktadır. Bu stresler ile başa çıkabilmek için bitkilerin birden çok strese karşı toleransda rol oynayan ilgili genlerin belirlenmesi önem arz etmektedir.

Çalışmamızda seçilen *P. distans* bitkisi selenyum (Se), bor (B) gibi toksisiteye neden olan elementlere karşı tolerans göstermesinin yanında tuz ve kuraklık gibi streslere karşı da tolerans gösterdiği bildirilmiştir. Bu sebeple *P. distans* bitkisinden elde edilen cDNA kütüphanesi sodyum selenit stresine maruz bırakılan maya hücreleri kullanılarak taranmıştır. Bunun sonucunda Se stresine karşı tolerans da rol oynadığı düşünülen “Tiyosiyanat Metiltransferaz 2” ve “Çinko Transporter 8” olmak üzere 2 adet gen tespit edilmiştir.

Literatürde “Tiyosiyanat Metiltransferaz 2” geninin glukosinolat metabolizmasında yer alan bir gen olduğu ve bitkilerin hasar alması durumunda glukosinolat bileşiklerinin hidrolizinde yer aldığı bildirilmiştir.

Belirlenen diğer gen olan Zinc Transporter-8 ZIP gen ailesine mensup çinko alımından sorumlu bir gendir. ZIP gen ailesi metal toksisitesinde taşıyıcı rol aldığı Cd, Fe, Ni gibi elementlerde gösterilmiş olsada, Se stresine karşı tolerans gösterdiğine dair çalışma bildiğimiz kadarı ile yoktur.

Çalışmamızda bahsedilen genlerin hem *P. distans* bitkisinde tanımlanması, hem de Se stresine karşı tolerans’da rol oynayabileceği yönünden literatüre yeni bir katkı sağlamaktadır. Tespit edilen genlerin Se stresi başta olmak üzere, tuz ve kuraklık gibi streslere dayanıklı çeşitler geliştirilmesine yönelik ıslah çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ancak bu konuda bahsedilen genlerinin rollerinin Se, tuz, kuraklık gibi streslerde rol aldığı yolların ve fonksiyonların daha ayrıntılı şekilde açığa çıkarılmasına ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

- Abida, F. 2011. Impact of inserting a thiol methyltransferase gene on the competition between halide methylation and ethylene production in tobacco. Master Thesis, University of Waterloo, Canada, 76 s.
- Ajeesh Krishna, T.P., Maharajan, T., Victor Roch, G., Ignacimuthu, S., and Antony-Cesar, S. 2020. Structure, Function, Regulation and Phylogenetic Relationship of ZIP Family Transporters of Plants. *Frontiers in plant science*, 11, 662.
- Angulo-Bejarano, P.I., Puente-Rivera, J., and Cruz-Ortega, R. 2021. Metal and Metalloid Toxicity in Plants: An Overview on Molecular Aspects. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(4), 635.
- Assunção, A.G.L., Schat, H., and Aarts, M.G.M. 2003. *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *The New phytologist*, 159(2), 351–360.
- Attieh, J., Kleppinger-Sparace, K.F., Nunes, C., Sparace, S.A., and Saini, H.S. 2000. Evidence implicating a novel thiol methyltransferase in the detoxification of glucosinolate hydrolysis products in *Brassica oleracea* L. *Plant, Cell & Environment*, 23(2), 165-174.
- Attieh, J., Djiana, R., Koonjul, P., Étienne, C., Sparace, S.A., and Saini, H.S. 2002. Cloning and functional expression of two plant thiol methyltransferases: a new class of enzymes involved in the biosynthesis of sulfur volatiles. *Plant Molecular Biology*, 50(3), 511-521.
- Attieh, J.M., Hanson, A.D., and Saini, H.S. 1995. Purification and characterization of a novel methyltransferase responsible for biosynthesis of halomethanes and methanethiol in *Brassica oleracea*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(16), 9250-9257.
- Ávila, F.W., Yang, Y., Faquin, V., Ramos, S.J., Guilherme, L.R.G., Thannhauser, T.W., and Li, L. 2014. Impact of selenium supply on Se-methylselenocysteine and glucosinolate accumulation in selenium-biofortified *Brassica* sprouts. *Food Chemistry*, 165, 578-586.
- Babaoğlu, M., Gezgin, S., Topal, A., Sade, B., and Dural, H. 2004. *Gypsophila sphaerocephala* Fenzl ex Tchihat.: a boron hyperaccumulator plant species that may phytoremediate soils with toxic B levels. *Turkish Journal of Botany*, 28(3), 273-278.
- Bañuelos, G.S., Roche, J.D., and Robinson, J. 2010. Developing selenium-enriched animal feed and biofuel from canola planted for managing Se-laden drainage waters in the Westside of Central California. *International journal of phytoremediation*, 12(3), 243-254.
- Barickman, T.C., Kopsell, D.A., and Sams, C.E. 2013. Selenium influences glucosinolate and isothiocyanates and increases sulfur uptake in *Arabidopsis thaliana* and rapid-cycling *Brassica oleracea*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(1), 202-209.
- Bashir, K., Ishimaru, Y., and Nishizawa, N.K. 2012. Molecular mechanisms of zinc uptake and translocation in rice. *Plant and Soil*, 361(1), 189-201.
- Benatuil, L., Perez, J.M., Belk, J., and Hsieh, C.M. 2010. An improved yeast transformation method for the generation of very large human antibody libraries. *Protein Engineering, Design and Selection*, 23(4), 155-159.
- Bhatia, P., Aureli, F., D'Amato, M., Prakash, R., Cameotra, S.S., Nagaraja, T.P., and Cubadda, F. 2013. Selenium bioaccessibility and speciation in biofortified *Pleurotus* mushrooms grown on selenium-rich agricultural residues. *Food chemistry*, 140(1-2), 225-230.

- Burow, M., Bergner, A., Gershenzon, J., and Wittstock, U. 2007. Glucosinolate hydrolysis in *Lepidium sativum*—identification of the thiocyanate-forming protein. *Plant molecular biology*, 63(1), 49-61.
- Cabannes, E., Buchner, P., Broadley, M.R., and Hawkesford, M.J. 2011. A comparison of sulfate and selenium accumulation in relation to the expression of sulfate transporter genes in *Astragalus* species. *Plant Physiology*, 157(4), 2227-2239.
- Chen, Y., Chen, C., Tan, Z., Liu, J., Zhuang, L., Yang, Z., and Huang, B. 2016. Functional identification and characterization of genes cloned from halophyte seashore paspalum conferring salinity and cadmium tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 7, 102.
- Chiu, Y. C., Matak, K., and Ku, K.M. 2020. Methyl jasmonate treatment of broccoli enhanced glucosinolate concentration, which was retained after boiling, steaming, or microwaving. *Foods*, 9(6), 758..
- Cocetta, G., Mishra, S., Raffaelli, A., and Ferrante, A. 2018. Effect of heat root stress and high salinity on glucosinolates metabolism in wild rocket. *Journal of plant physiology*, 231, 261-270.
- Corso, M., and de la Torre, V.S.G. 2020. Biomolecular approaches to understanding metal tolerance and hyperaccumulation in plants. *Metallomics*, 12(6), 840-859.
- Dai, Z., Yuan, Y., Huang, H., Hossain, M.M., Xiong, S., Cao, M., Ma, L.Q., and Tu, S. 2021. Methyl jasmonate mitigates high selenium damage of rice via altering antioxidant capacity, selenium transportation and gene expression. *The Science of the total environment*, 756, 143848.
- Dashtebani, F., Hajiboland, R., and Aliasgharzad, N. 2014. Characterization of salt-tolerance mechanisms in mycorrhizal (*Claroideoglossum etunicatum*) halophytic grass, *P. distans*. *Acta physiologiae plantarum*, 36(7), 1713-1726.
- Duina, A.A., Miller, M.E., and Keeney, J.B. 2014. Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics*, 197(1), 33-48.
- El-Mehdawi, A.F., and Pilon-Smits, E.A.H. 2012. Ecological aspects of plant selenium hyperaccumulation. *Plant Biology*, 14(1), 1-10.
- El-Mehdawi, A.F., Quinn, C.F., and Pilon-Smits, E. A. 2011. Selenium hyperaccumulators facilitate selenium-tolerant neighbors via phytoenrichment and reduced herbivory. *Current Biology*, 21(17), 1440-1449.
- Franke, K.W. 1934. "A New Toxicant Occurring Naturally in Certain Samples of Plant FoodstuffsI. Results Obtained in Preliminary Feeding Trials: Eight Figures." *The Journal of Nutrition* 8(5): 597–608.
- Freeman, J.L., Tamaoki, M., Stushnoff, C., Quinn, C.F., Cappa, J.J., Devonshire, J., Fakra, S.C., Marcus, M.A., McGrath, S.P., Van Hoewyk, D., and Pilon-Smits, E.A. 2010. Molecular mechanisms of selenium tolerance and hyperaccumulation in *Stanleya pinnata*. *Plant physiology*, 153(4), 1630–1652.
- Gebreeyessus, G.D., and Zewge, F. 2019. A review on environmental selenium issues. *SN Applied Sciences*, 1(1), 1-19.

- Gomes-Junior, R.A., Gratão, P.L., Gaziola, S.A., Mazzafera, P., Lea, P.J., and Azevedo, R.A. 2007. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. *Functional Plant Biology*, 34(5), 449-456.
- Green, M. R., and Sambrook, J. 2021. Total RNA Extraction from *Saccharomyces cerevisiae* Using Hot Acid Phenol. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2021(12).
- Gupta, M., and Gupta, S. 2017. An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. *Frontiers in plant science*, 7, 2074.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.B., Raza, A., Hawrylak-Nowak, B., Matraszek-Gawron, R., Nahar, K., and Fujita, M. 2020. Selenium toxicity in plants and environment: biogeochemistry and remediation possibilities. *Plants*, 9(12), 1711.
- Hasanuzzaman, Mirza, Kamrun Nahar, and Masayuki Fujita. 2018. "Plants under Metal and Metalloid Stress: Responses, Tolerance and Remediation." *Plants Under Metal and Metalloid Stress: Responses, Tolerance and Remediation*: 1–424.
- Hossain, A., Skalicky, M., Brestic, M., Maitra, S., Sarkar, S., Ahmad, Z., Vemuri, H., Garai, S., Mondal, M., Bhatt, R., Kumar, P., Banerjee, P., Saha, S., Islam, T., and Laing, A.M. 2021. Selenium Biofortification: Roles, Mechanisms, Responses and Prospects. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(4), 881.
- Itoh, N., Toda, H., Matsuda, M., Negishi, T., Taniguchi, T., and Ohsawa, N. 2009. Involvement of S-adenosylmethionine-dependent halide/thiol methyltransferase (HTMT) in methyl halide emissions from agricultural plants: isolation and characterization of an HTMT-coding gene from *Raphanus sativus* (daikon radish). *BMC Plant Biology*, 9(1), 1-10.
- Jain, S., Muneer, S., Guerriero, G., Liu, S., Vishwakarma, K., Chauhan, D.K., Dubey, N.K., Tripathi, D.K., and Sharma, S. 2018. Tracing the role of plant proteins in the response to metal toxicity: A comprehensive review. *Plant Signaling and Behavior*, 13(9), 1–11.
- Jakovljević, T., Cvjetko, M., Sedak, M., Đokić, M., Bilandžić, N., Vorkapić-Furač, J., and Redovniković, I.R. 2013. Balance of glucosinolates content under Cd stress in two Brassica species. *Plant physiology and biochemistry*, 63, 99-106.
- Keeran, N.S., Balasundaram, U., Govindan, G., and Parida, A.K. 2019. *Prosopis juliflora*: a potential plant for mining of genes for genetic engineering to enhance phytoremediation of metals. In *Transgenic plant technology for remediation of toxic metals and metalloids* (pp. 381-393). Academic Press.
- Kieliszek, M., Błażej, S., Gientka, I., & Bzducha-Wróbel, A. 2015. Accumulation and metabolism of selenium by yeast cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(13), 5373–5382.
- Kieliszek, M., Błażej, S., Bzducha-Wróbel, A., and Kurcz, A. 2016. Effects of selenium on morphological changes in *Candida utilis* ATCC 9950 yeast cells. *Biological trace element research*, 169(2), 387-393.
- Kim, H.S., and Juvik, J.A. 2011. Effect of selenium fertilization and methyl jasmonate treatment on glucosinolate accumulation in broccoli florets. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 136(4), 239-246.
- Kök, A.B., Mungan, M.D., Doğanlar, S., and Frary, A. 2020. Transcriptomic analysis of selenium accumulation in *P. distans* (Jacq.) Parl., a boron hyperaccumulator. *Chemosphere*, 245, 125665.

- Kolbert, Z., Molnár, Á., Feigl, G., and Van Hoewyk, D. 2019. Plant selenium toxicity: Proteome in the crosshairs. *Journal of plant physiology*, 232, 291-300.
- Lashley, A., Miller, R., Provenzano, S., Jarecki, S.-A., Erba, P., & Salim, V. (2022). Functional Diversification and Structural Origins of Plant Natural Product Methyltransferases. *Molecules*, 28(1), 43.
- Leitenmaier, B., and Küpper, H. 2013. Compartmentation and complexation of metals in hyperaccumulator plants. *Frontiers in plant science*, 4, 374.
- Li, S., Zhou, X., Huang, Y., Zhu, L., Zhang, S., Zhao, Y., Guo, J., Chen, J., and Chen, R. 2013. Identification and characterization of the zinc-regulated transporters, iron-regulated transporter-like protein (ZIP) gene family in maize. *BMC Plant Biology*, 13(1), 1-14.
- Liang, Z.L., Tan, H.W., Wu, J.Y., Chen, X.L., Wang, X.Y., Xu, Y.M., and Lau, A.T. 2021. The Impact of ZIP8 Disease-Associated Variants G38R, C113S, G204C, and S335T on Selenium and Cadmium Accumulations: The First Characterization. *International journal of molecular sciences*, 22(21), 11399.
- Liu, H. 2002. Constructing yeast libraries. In *Methods in enzymology* (Vol. 350, pp. 72-86). Academic Press.
- McDermott, J.R., Geng, X., Jiang, L., Gálvez-Peralta, M., Chen, F., Nebert, D.W., and Liu, Z. 2016. Zinc-and bicarbonate-dependent ZIP8 transporter mediates selenite uptake. *Oncotarget*, 7(23), 35327.
- Mehdi, Y., Hornick, J.L., Istasse, L., and Dufrasne, I. 2013. Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules*, 18(3), 3292-3311.
- Mirza, H., Hossain, M.A., and Fujita, M. 2010. Selenium in higher plants: physiological role, antioxidant metabolism and abiotic stress tolerance. *Journal of Plant Sciences*, 5(4), 354-375.
- Mota, L.A., Silva, A.M., Silva, E.A., Leite, G.M., Calegari, R.P., & Baptista, A.S. 2021. Ability of The *Saccharomyces Cerevisiae* Y904 to Tolerate and Adapt to High Concentrations of Selenium.
- Nagatoshi, Y., and Nakamura, T. 2007. Characterization of three halide methyltransferases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant biotechnology*, 24(5), 503-506.
- Öztürk, S.E., Göktay, M., Has, C., Babaoğlu, M., Allmer, J., Doğanlar, S., and Frary, A. 2017. Boron Hyperaccumulation Mechanisms in *P. distans* as Revealed by Transcriptomic Analysis. *bioRxiv*, 110403.
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A.S., and Hatziloukas, E. 2020. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiol* 6 (1): 1–31.
- Parmar, R., Seth, R., Singh, P., Singh, G., Kumar, S., and Sharma, R.K. 2019. Transcriptional profiling of contrasting genotypes revealed key candidates and nucleotide variations for drought dissection in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.
- Pilon-Smits, E.A., Hwang, S., Mel-Lytle, C., Zhu, Y., Tai, J.C., Bravo, R.C., Chen, Y., Leustek, T., and Terry, N. 1999. Overexpression of ATP sulfurylase in Indian mustard leads to increased selenate uptake, reduction, and tolerance. *Plant Physiology*, 119(1), 123-132.
- Pilon-Smits, E. A. 2019. On the ecology of selenium accumulation in plants. *Plants*, 8(7), 197.

- Pongrac, P., Tolrà, R., Vogel-Mikuš, K., Poschenrieder, C., Barceló, J., and Regvar, M. 2010. At the crossroads of metal hyperaccumulation and glucosinolates: is there anything out there? In *Soil heavy metals* (pp. 139-161). Springer, Berlin, Heidelberg.
- 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(2), 169-181.
- Reynolds, R.J.B., and Pilon-Smits, E.A. 2018. Plant selenium hyperaccumulation-Ecological effects and potential implications for selenium cycling and community structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1862(11), 2372-2382.
- Ritika, R. 2013. *The Impact of Engineering Halide/Thiol Methyltransferase-Mediated Cl-Volatilization on Salt Tolerance of Tomato Plants*. University of Toronto (Canada).
- Schiavon, M., and Pilon-Smits, E.A. 2017. The fascinating facets of plant selenium accumulation–biochemistry, physiology, evolution and ecology. *New Phytologist*, 213(4), 1582-1596.
- Schild, F., Kieffer-Jaquinod, S., Palencia, A., Cobessi, D., Sarret, G., Zubieta, C., Jourdain, A., Dumas, R., Forge, V., Testemale, D., Bourguignon, J., and Hugouvieux, V. 2014. Biochemical and biophysical characterization of the selenium-binding and reducing site in *Arabidopsis thaliana* homologue to mammals selenium-binding protein 1. *The Journal of biological chemistry*, 289(46), 31765–31776
- Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.J., Lee, Y.H., Lee, Y.W., Hwang, I., Lee, J. S., and Choi, Y. D. 2001. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8), 4788–4793.
- Sotelo, T., Lema, M., Soengas, P., Cartea, M.E., and Velasco, P. 2015. In vitro activity of glucosinolates and their degradation products against brassica-pathogenic bacteria and fungi. *Applied and environmental microbiology*, 81(1), 432–440.
- Suhajda, A., Hegóczki, J., Janzsó, B., Pais, I., & Vereczkey, G. 2000. Preparation of selenium yeasts I. Preparation of selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 14(1), 43–47.
- Spadafora, N.D., Cocetta, G., Ferrante, A., Herbert, R.J., Dimitrova, S., Davoli, D., Fernández, M., Patterson, V., Vozel, T., Amarysti, C., Rogers, H.J., and Müller, C.T. 2019. Short-Term Post-Harvest Stress that Affects Profiles of Volatile Organic Compounds and Gene Expression in Rocket Salad During Early Post-Harvest Senescence. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(1), 4.
- Stiles, A. R., Bautista, D., Atalay, E., Babaoglu, M., and Terry, N. 2010. Mechanisms of boron tolerance and accumulation in plants: a physiological comparison of the extremely boron-tolerant plant species, *P. distans*, with the moderately boron-tolerant *Gypsophila arrostil*. *Environmental science & technology*, 44(18), 7089-7095.
- Teste, M.A., Duquenne, M., François, J.M., and Parrou, J.L. 2009. Validation of reference genes for quantitative expression analysis by real-time RT-PCR in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC molecular biology*, 10(1), 1-15.

- Tian, M., Yang, Y., Ávila, F. W., Fish, T., Yuan, H., Hui, M., Pan, S., Thannhauser, T.W., and Li, L. 2018. Effects of Selenium Supplementation on Glucosinolate Biosynthesis in Broccoli. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(30), 8036–8044.
- Tiong, J., McDonald, G., Genc, Y., Shirley, N., Langridge, P., and Huang, C.Y. 2015. Increased expression of six ZIP family genes by zinc (Zn) deficiency is associated with enhanced uptake and root-to-shoot translocation of Zn in barley (*Hordeum vulgare*). *The New phytologist*, 207(4), 1097–1109.
- Tolrà, R. P., Poschenrieder, C., Alonso, R., Barceló, D., and Barceló, J. 2001. Influence of zinc hyperaccumulation on glucosinolates in *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, 151(3), 621-626.
- Trippe, R.C., and Pilon-Smits, E.A. 2021. Selenium transport and metabolism in plants: Phytoremediation and biofortification implications. *Journal of Hazardous Materials*, 404, 124178.
- Variyar, P.S., Banerjee, A., Akkarakaran, J.J., and Suprasanna, P. 2014. Role of glucosinolates in plant stress tolerance. In *Emerging technologies and management of crop stress tolerance* (pp. 271-291). Academic Press.
- Vinceti, M., Wei, E.T., Malagoli, C., Bergomi, M., and Vivoli, G. 2001. Adverse health effects of selenium in humans. *Reviews on environmental health*, 16(4), 233-252.
- Walker, J.C., Morell, S., and Foster, H.H. 1937. Toxicity of mustard oils and related sulfur compounds to certain fungi. *American Journal of Botany*, 536-541.
- Wang, J., Mao, X., Wang, R., Li, A., Zhao, G., Zhao, J., and Jing, R. 2019. Identification of wheat stress-responding genes and TaPR-1-1 function by screening a cDNA yeast library prepared following abiotic stress. *Scientific reports*, 9(1), 1-12.
- Wang, M., Xu, Q., Yu, J., and Yuan, M. 2010. The putative Arabidopsis zinc transporter ZTP29 is involved in the response to salt stress. *Plant molecular biology*, 73(4), 467-479.
- Wieczorek, M.N., Walczak, M., Skrzypczak-Zielińska, M., and Jeleń, H.H. 2018. Bitter taste of Brassica vegetables: The role of genetic factors, receptors, isothiocyanates, glucosinolates, and flavor context. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(18), 3130-3140.
- Yan, A., Wang, Y., Tan, S.N., Mohd Yusof, M.L., Ghosh, S., and Chen, Z. 2020. Phytoremediation: a promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. *Frontiers in Plant Science*, 11, 359
- Yawata, A., Oishi, Y., Anan, Y., and Ogra, Y. 2010. Comparison of selenium metabolism in three Brassicaceae plants. *Journal of Health Science*, 56(6), 699-704.
- Yu, G., Li, J., Sun, X., Liu, Y., Wang, X., Zhang, H., and Pan, H. 2017. Exploration for the salinity tolerance-related genes from xero-halophyte *Atriplex canescens* exploiting yeast functional screening system. *International journal of molecular sciences*, 18(11), 2444.
- Zhang, L.H., Abdel-Ghany, S.E., Freeman, J.L., Ackley, A.R., Schiavon, M., and Pilon-Smits, E.A. 2006. Investigation of selenium tolerance mechanisms in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, 128(2), 212-223.
- Zhao, F.J., and McGrath, S.P. 2009. Biofortification and phytoremediation. *Current opinion in plant biology*, 12(3), 373-380.

- Zhu, Y.G., Pilon-Smits, E.A., Zhao, F.J., Williams, P.N., and Meharg, A.A. 2009. Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. *Trends in plant science*, 14(8), 436-442.



ÖZGEÇMİŞ

KÜBRA BUDAK

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2019-2023	Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
2015-2019	Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Çanakkale

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Stajyer	Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü
2018-2018	Doku Kültürü Merkez Laboratuvarı

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- 1-Budak, K., Aktaş, H. & Çevik, S. (2022). Morphological and physiological variation in drought tolerance of wheat landraces originated from southeast Türkiye. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 35 (2), 91-95.
- 2-Budak, K., and Akbudak, M. A. (2022). Yeast Functional Screen to Determine cDNAs of European Alkali Grass (*Puccinellia distans*) Conferring Selenium (Se) Toxicity. *ISPEC Journal of Agricultural Sciences*, 6(4), 698–707.
- 3- Tek, M. I., and Budak, K. (2022). A New Approach to Develop Resistant Cultivars Against the Plant Pathogens: CRISPR Drives. *Frontiers in plant science*, 13, 889497.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1- Budak, K., and Akbudak, M.A. 2021. Determination of Toxic Selenium Concentration Restricting The Development Of *Saccharomyces cerevisiae* BY47412. 7th INTERNATIONAL ARTUKLU SCIENTIFIC RESEARCHES CONFERENCE BOOK 2021

