



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

***Brassica juncea* var. P78 BİTKİSİNE BAZI AĞIR  
METALLERİN UYGULANMASIYLA ANLATIMI  
DEĞİŞEN GENLERİN TANIMLANMASI VE  
BELİRLENMESİ**

**Eda DALYAN**

**Biyoloji Anabilim Dalı  
Botanik Programı**

**Danışman  
Prof.Dr. Muammer ÜNAL**

**II. Danışman  
Dr. Bayram YÜKSEL**

**Mayıs, 2012**

**İSTANBUL**



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

***Brassica juncea* var. P78 BİTKİSİNE BAZI AĞIR  
METALLERİN UYGULANMASIYLA ANLATIMI  
DEĞİŞEN GENLERİN TANIMLANMASI VE  
BELİRLENMESİ**

**Eda DALYAN**

**Biyoloji Anabilim Dalı  
Botanik Programı**

**Danışman  
Prof.Dr. Muammer ÜNAL**


**II. Danışman  
Dr. Bayram YÜKSEL**

**Mayıs, 2012**

**İSTANBUL**

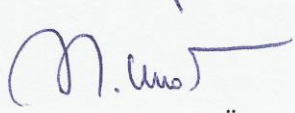
Bu çalışma 07/06/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Botanik programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

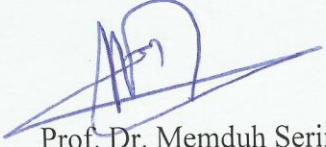
Tez Jürisi

  
Prof. Dr. Muammer Ünal (Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

  
Prof. Dr. Orhan Küçük  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

  
Prof. Dr. Gül Cevahir Öz  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

  
Prof. Dr. Meral Ünal  
Marmara Üniversitesi  
Fen-Edebiyat Fakültesi

  
Prof. Dr. Memduh Serin  
Marmara Üniversitesi  
Fen-Edebiyat Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 2192 numaralı projesi ve TOGTAG- COST 859 (104 O 211) numaralı “Sürdürülebilir Toprak Kullanımını Ve Gıda Güvenliğini Arttırmak İçin Fitoteknolojiler” başlıklı proje ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Doktora eğitimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım çok değerli hocam Biyoloji Bölüm Başkanı Prof.Dr. Muammer ÜNAL'a en içten dileklerle teşekkür ederim. Doktora tez çalışmamı vermiş olduğu desteği, fikirleri, bilgi ve deneyimleriyle katkılarını esirgemeyen ikinci danışmanım Dr. Bayram YÜKSEL'e en derin saygılarımı ve içten dileklerimi sunarım.

Tez çalışmamın deneysel aşamalarını Tübitak MAM-Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü (GMBE) Bitki Moleküler Biyolojisi Laboratuvar'ında, 5063301 MIS kodlu COST 859 projesi kapsamında tamamladım. Bana bu fırsatı sağlayan Prof.Dr. Abdulrezzak MEMON'a ve GMBE Müdürlüğü'ne, Bitki Moleküler Biyolojisi Laboratuvar çalışanları Yasemin YILDIZHAN, Dr. Birsen CEVHER KESKİN, Doç.Dr. Selma ONARICI, Ali DANACI ve Derya TEKEL'e

Tez izleme komitesindeki jüri üyelerim, Prof.Dr. Meral ÜNAL ve Prof.Dr. Orhan KÜÇÜKER'e,

Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen Botanik Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Gül CEVAHİR ÖZ'e,

Lisansüstü çalışmalarına beraber başladığım her türlü desteklerini benden esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Elif YÜZBAŞIOĞLU, Taylan KÖSESAKAL ve Çiğdem BARIŞ'a teşekkürü borç bilirim.

Sonsuz sevgi ve desteklerini her zaman hissettiğim, yolumu aydınlatan sevgili Eşim Cem DALYAN'a, bugünlere gelmemde büyük emeği olan başta annem Aysel KAPLAN ve babam Mahmut KAPLAN olmak üzere AİLEM'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

**Mayıs, 2012**

**Eda DALYAN**

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	I
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİL LİSTESİ .....	V
TABLO LİSTESİ .....	VIII
SEMBOL LİSTESİ .....	X
ÖZET .....	XI
SUMMARY .....	XII
GİRİŞ .....	1
<b>2. GENEL KISIMLAR.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1. BİTKİLER VE AĞIR METALLER .....</b>	<b>5</b>
2.1.1. Bitkilerde Ağır Metal Alımı ve Taşınması .....	7
2.1.2. Bitkilerde Ağır Metal Toleransı .....	9
<b>2.2. AĞIR METAL AKÜMÜLASYONU VE TOLERANSININ MOLEKÜLER         MEKANİZMASI .....</b>	<b>10</b>
2.2.1. Metal Alımı .....	10
2.2.2. Şelasyon.....	14
2.2.2.1. Fitokelatinler .....	15
2.2.2.2. Metalloproteinler .....	16
2.2.2.3. Organik Asitler ve Amino Asitler.....	18
2.2.3. Metal Alış Verişi .....	19
2.2.3.1. Hücre içi sekestrasyon .....	19
2.2.3.2. Şaperonlar .....	20
2.2.3.3. Taşıyıcılar.....	21

2.3. BİTKİLERDE AĞIR METAL METABOLİZMASI İLE İLİŞKİLİ GENLERİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER .....	27
2.4. FİTOREMEDİASYON .....	29
2.5. <i>BRASSICA JUNCEA</i> -METAL AKÜMÜLASYONUNDA MODEL BİTKİ. ....	31
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM.....</b>	<b>34</b>
3.1. BİTKİSEL MATERYAL.....	34
3.2. BİTKİLERİN YETİŞTİRİLMESİ .....	34
3.3. BİTKİLERE AĞIR METAL UYGULAMASI .....	35
3.4. BİTKİDE BİRİKEN AĞIR METAL MİKTARININ TAYİNİ.....	36
3.5. BİTKİDE ANLATIMI DEĞİŞEN GENLERİN TANIMLANMASI VE BELİRLENMESİ İÇİN KULLANILAN MOLEKÜLER YÖNTEMLER .	37
3.5.1. Total RNA İzolasyonu .....	37
3.5.2. Total RNA'dan Genomik DNA'nın Uzaklaştırılması .....	38
3.5.3. Total RNA Miktar Tayini.....	39
3.5.4. Total RNA'ların Formaldehitli Agaroz Jelde Ayrıştırılması.....	40
3.5.5. Komplementer (Tamamlayıcı) DNA Sentezi .....	40
3.5.6. Mikroarray Analizi Yapılan Örneklerin Hazırlanması .....	41
3.5.7. Mikroarray Analiz.....	42
3.5.7.1. Örnek Hazırlanması ve Etiketleme .....	42
3.5.7.2. Hibridizasyon .....	43
3.5.7.3. Tarama.....	43
3.5.8. Mikroarray Analizinden Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi .....	43
3.5.9. Türler Arası Gen Ekspresyon Profilleme Çalışmalarının Kullanılabilirliğinin, <i>Arabidopsis</i> ve <i>Brassica</i> Türleri Öznelinde Biyoinformatik Yaklaşımlarla İrdelenmesi .....	44
3.5.10. Primer Tasarımı .....	45
3.5.11. Yarı-Kantitatif Ters Yazılım Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ....	46
3.5.12. Kantitatif Ters Yazılım Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	48
3.5.13. İstatistiksel Analizler .....	50

<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>51</b>
<b>4.1. BİTKİDE BİRİKEN AĞIR METAL MİKTARI</b> .....	<b>51</b>
<b>4.2. AĞIR METAL UYGULAMASI YAPILAN BİTKİLERDE ANLATIMI DEĞİŞEN GENLERİN TANIMLANMASI VE BELİRLENMESİ</b> .....	<b>53</b>
<b>4.2.1. <i>Brassica juncea</i> var. P78 Bitkisinden Total RNA İzolasyonu</b> .....	<b>53</b>
<b>4.2.2. <i>Brassica juncea</i> var. P78 Bitkisinden Elde Edilen Total RNA'ların Saflaştırılması</b> .....	<b>54</b>
<b>4.2.3. Mikroarray Analizinden Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi</b> .....	<b>57</b>
<b>4.2.3.1. Verilerin Deney Kalitesi Bakımından Değerlendirilmesi</b> .....	<b>58</b>
<b>4.2.3.2. Verilerin Karşılaştırmalı Analizi</b> .....	<b>62</b>
<b>4.2.4. <i>Arabidopsis</i> Mikroarraylerinin <i>Brassica</i> Türlerinde Gen Ekspresyon Profillemesi Çalışmalarında Kullanılabilirliğinin Biyoinformatik Yaklaşımlarla İrdelenmesi</b> .....	<b>76</b>
<b>4.2.5. Primer Tasarımı</b> .....	<b>79</b>
<b>4.2.5. Yarı-Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)</b> .....	<b>85</b>
<b>4.2.6. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)</b> ...	<b>87</b>
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	<b>91</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>107</b>
<b>EKLER</b> .....	<b>139</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>155</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 3.1:** *Brassica juncea* var. P78 bitkisine hidroponik ortamda ağır metal uygulaması. .... 36
- Şekil 3.2:** Mikroarray analizi yapılan örneklerin gruplandırılması. .... 42
- Şekil 4.1:** 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin hidroponik ortamdaki genel görünümü..... 51
- Şekil 4.2:** 24 saat boyunca Cd uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin hidroponik ortamdaki genel görünümü..... 51
- Şekil 4.3:** 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yaprak dokularından izole edilen total RNA'ların %1'lik formaldehitli agaroz jel görüntüleri. .... 53
- Şekil 4.4:** 24 saat boyunca Cd uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yaprak dokularından izole edilen total RNA'ların %1'lik formaldehitli agaroz jel görüntüleri. .... 53
- Şekil 4.5:** 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yaprak dokularına ait total RNA'ların DNaz I muamelesinden sonra %1'lik formaldehitli agaroz jel görüntüleri. .... 54
- Şekil 4.6:** 24 saat boyunca Cd uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yaprak dokularına ait total RNA'ların DNaz I muamelesinden sonra %1'lik formaldehitli agaroz jel görüntüleri. .... 54
- Şekil 4.7:** 24 saat boyunca 50 µM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> çözeltisi uygulanan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök dokusundan elde edilen total RNA'ların DNazI muamelesini takiben Bioanalyzer Agilent 2100 cihazında okuma sonrası her bir biyolojik tekrarına ait jel görüntü ve miktarları. .... 55-56
- Şekil 4.8:** 24 saat boyunca Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> çözeltisi uygulanan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök dokusundan elde edilen total RNA'ların DNazI muamelesini takiben Bioanalyzer Agilent 2100 cihazında okuma sonrası her bir biyolojik tekrarına ait genel jel profili. .... 57

<b>Şekil 4.9:</b> 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. P78 bitkisinin kontrol ve deney gruplarına ait kök örneklerinin, gen çip üzerindeki prob hücrelerinin ışına şiddetlerinin logaritmik dağılımı. ....	<b>58</b>
<b>Şekil 4.10:</b> 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. P78 bitkisinin kontrol ve deney gruplarına ait kök örneklerinin, gen çip üzerindeki prob hücrelerinin ışına şiddetlerinin göreceli logaritmik dağılımı. ....	<b>59</b>
<b>Şekil 4.11:</b> 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. P78 bitkisinin kontrol ve deney gruplarına ait kök örneklerinin, gen çip üzerindeki prob hücrelerinin ışına şiddetlerinin RMA normalizasyonu sonrası logaritmik dağılımı. ....	<b>60</b>
<b>Şekil 4.12:</b> 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. P78 bitkisinin kontrol ve deney gruplarına ait kök örneklerinin, gen çip üzerindeki prob hücrelerinin ışına şiddetlerinin RMA normalizasyonu sonrası göreceli logaritmik dağılımı. ....	<b>60</b>
<b>Şekil 4.13:</b> 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. P78 bitkisinin kontrol ve deney gruplarına ait kök örneklerinin, gen çip üzerindeki prob hücrelerinin ışına şiddetlerinin normalize edildikten sonraki sinyal değerlerinin histogram grafiği. ....	<b>61</b>
<b>Şekil 4.14:</b> 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. P78 bitkisinin kontrol grubuna ait kök örneklerinin, A) 1. ve 2. biyolojik tekrarlarından B) 1. ve 3. biyolojik tekrarlarından C) 2. ve 3. biyolojik tekrarlarından elde edilen ifade sinyallerinin MA grafiği.....	<b>62</b>
<b>Şekil 4.15:</b> 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. P78 bitkisinin deney grubuna ait kök örneklerinin, A) 1. ve 2. biyolojik tekrarlarından B) 1. ve 3. biyolojik tekrarlarından C) 2. ve 3. biyolojik tekrarlarından elde edilen ifade sinyallerinin MA grafiği.....	<b>62</b>
<b>Şekil 4.16:</b> 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. P78 bitkisine ait kök örneklerinin, deney grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı fark gösteren genlerin, gen ontolojisine göre fonksiyonel kategorizasyonları.....	<b>73-74</b>
<b>Şekil 4.17:</b> <i>A. thaliana</i> ve <i>Brassica</i> türlerine ait gen dizilerinin karşılaştırılması.....	<b>76</b>
<b>Şekil 4.18:</b> <i>Brassica</i> türlerinin dizileri ile 25/25 benzerlik oranı gösteren <i>A. thaliana</i> problemlerinin gen ontolojisine göre fonksiyonel kategorizasyonları. ....	<b>78-79</b>
<b>Şekil 4.19:</b> Primerleri tasarlanan genlerin seçimi sırasında takip edilen yol. ....	<b>80</b>

- Şekil 4.20:** Primer tasarlamak üzere seçilen genlerin tüm *Brassica* türleri ile karşılaştırılması..... **81**
- Şekil 4.21:** 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yapraklarından elde edilen cDNA'ların  $\beta$ -aktin primer çiftiyle yapılan PCR'nin %2'lik agaroz jel görüntüsü..... **85**
- Şekil 4.22:** 24 saat boyunca Cd uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yapraklarından elde edilen cDNA'ların  $\beta$ -aktin primer çiftiyle yapılan PCR'nin %2'lik agaroz jel görüntüsü..... **86**
- Şekil 4.23:** 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kontrol grubuna ait kök örneklerinden elde edilen cDNA'ların tasarlanan primerler çiftleriyle farklı sıcaklıklarda yapılan PCR'nin %2'lik agaroz jel görüntüsü..... **86**
- Şekil 4.24:** 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yaprak kısımlarının deney grubunda kontrol grubuna oranla farklı eksprese olan hedef genlerin göreceli ekspresyon oranları..... **88**
- Şekil 4.25:** 24 saat boyunca Cd uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yaprak kısımlarının deney grubunda kontrol grubuna oranla farklı eksprese olan genlerin göreceli ekspresyon oranları . ..... **89**

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 3.1:</b> Hoagland çözeltisi.....	<b>35</b>
<b>Tablo 3.2:</b> DNaz I uygulamasında kullanılan bileşenler ve reaksiyon miktarları.....	<b>39</b>
<b>Tablo 3.3:</b> cDNA sentezi için PCR cihazında kurulan program.....	<b>41</b>
<b>Tablo 3.4:</b> Tasarlanan primerlere ait diziler ve ampikon uzunlukları.....	<b>46</b>
<b>Tablo 3.5:</b> PCR uygulamasında kullanılan bileşenler ve reaksiyon miktarları.....	<b>47</b>
<b>Tablo 3.6:</b> $\beta$ -aktin genine ait primer dizileri ve ampikon uzunluğu.....	<b>47</b>
<b>Tablo 3.7:</b> PCR uygulaması için PCR cihazında kurulan program.....	<b>47</b>
<b>Tablo 3.8:</b> RT-PCR uygulamasında kullanılan bileşenler ve reaksiyon miktarları.....	<b>49</b>
<b>Tablo 3.9:</b> RT-PCR uygulaması için PCR cihazında kurulan program.....	<b>49</b>
<b>Tablo 4.1:</b> 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda $Pb(NO_3)_2$ ve $CdSO_4$ çözeltileri uygulanan <i>B. juncea</i> var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yapraklarında akümüle edilen ağır metal miktarları ve total akümülyasyon oranları.....	<b>52</b>
<b>Tablo 4.2:</b> 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. P78 bitkisine ait kök örneklerinde, deney grubunda kontrol grubuna oranla “teşvik edilen” genlerin listesi.....	<b>63-68</b>
<b>Tablo 4.3:</b> 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. P78 bitkisine ait kök örneklerinde, deney grubunda kontrol grubuna oranla “baskılanan” genlerin listesi.....	<b>68-72</b>
<b>Tablo 4.4:</b> Mikroarray analiz sonucunda anlamlı fark gösteren ve moleküler fonksiyon bakımından “taşıyıcı aktivitesi”nde işlevsel olan genlerin gen ontolojileri.....	<b>75</b>
<b>Tablo 4.5:</b> Mikroarray analiz sonucunda anlamlı fark gösteren ve biyolojik süreç bakımından “taşıma süreci”nde işlevsel olan genlerin gen ontolojileri.....	<b>75</b>
<b>Tablo 4.6:</b> <i>A. thaliana</i> ile <i>Brassica</i> türleri arasında %100 benzerlik gösteren dizilerin oranlarının; prob sayıları ve yüzde (%) cinsinden değerleri.....	<b>77</b>
<b>Tablo 4.7:</b> <i>A. thaliana</i> 'ya ait prob dizileri ile <i>B. rapa</i> EST dizileri arasında BLASTN algoritmasına göre e-değeri, benzerlik oranı ve mikroarray analizine göre p-değeri.....	<b>82</b>

<b>Tablo 4.8:</b> <i>B. rapa</i> EST dizisi ile <i>Brassica</i> türleri arasında benzerlik gösteren genlerin benzerlik % 'si ve e-değeri.....	<b>82-84</b>
<b>Tablo 4.9:</b> Tasarlanan primerlerin <i>A. thaliana</i> ve <i>B. rapa</i> 'da karşılık geldiği genler, fonksiyonları, mikroarray analiz sonucunda elde edilen kat değişimleri ve p değerleri. ....	<b>84</b>
<b>Tablo 4.10:</b> 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> var. P78 bitkisinin kök kısımlarının deney grubunda kontrol grubuna oranla farklı eksprese olan hedef genlerin mRNA seviyesindeki değişimlerinin, RT-PCR ve mikroarray analiz sonucunda kat değişimi olarak ifadesi. ....	<b>87</b>
<b>Tablo 5.1:</b> Mikroarray analiz sonucunda tanımlanan taşıyıcı aktivitesine katılan ve taşıma sürecinde rol oynayan genler.....	<b>96</b>
<b>Tablo 5.2:</b> 24 saat boyunca Pb ve Cd uygulamaları yapılan <i>B. juncea</i> var. P78 bitkisinin farklı kısımlarında teşvik edilen ve baskılanan genler .....	<b>99</b>
<b>Tablo 5.3:</b> Tasarlanan primerlerin <i>A. thaliana</i> ve <i>B. rapa</i> 'da karşılık geldiği genler ve gen ontolojisine göre fonksiyonel kategorizasyonları. ....	<b>101</b>

## SEMBOL LİSTESİ

<b><math>\beta</math></b>	: Beta
<b>EST</b>	: Etiketlenmiş fonksiyonel gen segmentler
<b>Cd</b>	: Kadmiyum
<b>CdSO<sub>4</sub></b>	: Kadmiyum sülfat
<b>kg</b>	: Kilogram
<b>cDNA</b>	: Komplementer (tamamlayıcı) DNA
<b>Pb</b>	: Kurşun
<b>Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>	: Kurşun(II) nitrat
<b>RMA</b>	: Kuvvetli Çoklu Çip Analizi
<b>mRNA</b>	: Mesajcı RNA
<b><math>\mu</math>l</b>	: Mikrolitre
<b><math>\mu</math>M</b>	: Mikromolar
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mg</b>	: Miligram
<b>PCR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu

## ÖZET

### ***Brassica juncea* var. P78 BİTKİSİNE BAZI AĞIR METALLERİN UYGULANMASIYLA ANLATIMI DEĞİŞEN GENLERİN TANIMLANMASI VE BELİRLENMESİ**

*Brassica juncea* (kahverengi hardal), belli ağır metalleri hiperakümüle ettiği bilinen ve gelişmiş kök sistemine sahip bir kara bitkisidir. Bu çalışmada *B. juncea* var. P78 bitkisine, Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı tarafından açıklanan en tehlikeli 10 kirletici arasında bulunan kurşun (50 µM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) ya da kadmiyum (25 µM CdSO<sub>4</sub>) 24 saat boyunca uygulanmıştır. Pb uygulamasıyla anlatımı değişen genlerin tanımlanması ile ilgili çalışmaların çok sınırlı bulunması ve Pb'nin akümülyasyonunda bitkideki en önemli kısmın kökler olması nedeniyle bu metalin uygulandığı *B. juncea* bitkisinin köklerinde mikroarray analiz yapılmıştır. *B. juncea* bitkisinin mikroarray platformunda ticari temsilcisi bulunmadığı için yapılan analizde aynı familyaya üye *Arabidopsis* bitkisine ait gen çipler kullanılmış ve türler arası hibridizasyon (TAH) denenmiştir. Ayrıca, TAH'ın gen ekspresyon profillemesi çalışmalarında kullanılabilirliği, *Arabidopsis* ve *Brassica* türleri özneline yapılan biyoenformatik çalışmayla irdelenmiştir. Mikroarray analiz sonucunda ağır metal metabolizmasında etkin olduğu düşünülen bazı genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyeleri, Pb ya da Cd uygulamaları yapılan *B. juncea* bitkisinin kök, gövde ve yapraklarında RT-PCR yöntemiyle belirlenmiştir. Böylece bu genlerin metal homeostazisindeki rollerinin moleküler seviyede anlaşılması ve buna bağlı olarak türler arası hibridizasyonun kullanılabilirliğinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, *B. juncea* var. P78 bitkisinin farklı kısımlarında ağır metal içeriklerinin belirlenmesi sonucunda bu bitkinin iyi bir Pb akümülatörü ve Cd hiperakümülatörü olduğu tespit edilmiştir. Pb uygulanmış bitkilerin kök kısmında yapılan mikroarray analiz sonucunda çoğunlukla türler arası düzeyde korunmuş az sayıda gen tanımlanmış ve buna bağlı olarak türler arası hibridizasyonun geniş ölçekte gen ekspresyonu profillemesinde kullanılabilirliğinin başarılı olmadığı ortaya konmuştur. Bu sonuç ayrıca, *Arabidopsis* ve *Brassica* türleri özneline yapılan biyoenformatik çalışmayla desteklenmiştir. Mikroarray analiz verilerinin güvenilirliği, ağır metal metabolizmasında rol oynadığı düşünülen birbirinden bağımsız 6 adet genin RT-PCR'de çalışılmasıyla doğrulanmıştır. Ağır metal alımı ve taşınmasıyla ilişkili olarak bu genlerin, Pb ve Cd uygulamaları yapılan bitkilerin kök, gövde ve yapraklarında mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi ile her iki ağır metale özgü anlatım gösteren genler bulunmuştur.

## SUMMARY

### THE IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF HEAVY METAL STRESS RESPONSIVE GENES IN *Brassica juncea* var. P78

*Brassica juncea* (brown mustard) is a land plant that is known that it hyper-accumulates certain heavy metals and has a developed root system. In this study, lead ( $50 \mu\text{M Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) or cadmium ( $25 \mu\text{M CdSO}_4$ ), which are among 10 most hazardous pollutants that have been declared by United States of America Environmental Protection Agency, were administered to the plant of *B. juncea* var. P78 for 24 hours. Because the studies on identification of genes, whose expression has been changed through Pb administration, are very restricted and the most important part in plants in Pb accumulation is roots, microarray analysis was conducted on roots of *B. juncea* plant, which had been made expose to the metal. Because commercial representative of *B. juncea* plant is not available on microarray platform, gene chips of *Arabidopsis* plant, which is a member of the same family, were used in the conducted analysis and hybridization between species (TAH) was tested. Furthermore, usability of TAH in gene expression profiling studies was searched through the bioinformatics study conducted on the subject of *Arabidopsis* and *Brassica* species. mRNA expression levels of certain genes, which are believed to be effective in heavy metal metabolism, as a result of the microarray analysis, were identified in root, stem and leaves of *B. juncea* plant treated with Pb and Cd with the help of RT-PCR method. Thus, the objective has been to discover these genes' roles in metal homeostasis at molecular level and accordingly, to evidence usability of hybridization between species.

It was understood as a result of identification of heavy metal contents in different parts of *B. juncea* var. P78 in the present study that this plant is a good Pb accumulator and Cd hyper-accumulator. Genes, which had mostly been protected at interspecies level, were identified in low number as a result of the microarray analysis conducted on root section of Pb-treated plants and thus, it was evidenced that usability of hybridization between species has failed in wide scale gene expression profiling. This result was supported by a bioinformatics study conducted on subject of *Arabidopsis* and *Brassica* species. Reliability of data from microarray analysis was verified by studying 6 independent genes, which are believed that they have a role in heavy metal metabolism, in RT-PCR. Genes displaying expression specific to both of the heavy metals were identified upon identification of mRNA expression levels in root, stems and leaves of the plants treated with Pb and Cd with respect to heavy metal intake and carrying.



## 1. GİRİŞ

Çok düşük konsantrasyonlarda bile toksik etkiler gösterebilen ağır metaller önemli inorganik çevresel kirleticilerdir. Endüstri Devrimi'nin başlangıcından bu yana biyosfere ağır metal salınımı önemli derecede hız kazanmıştır. Kentsel atıklar, atık suların kullanımı, atık yakma ünitelerinin salınımları, fosil yakıtların kullanımı, metal madenleri ve eritme endüstrilerinin atıkları, endüstriyel atıkların uzaklaştırılması, toprak dolgu işlemleri, pestisit, herbisit ve gübre gibi tarımsal kimyasalların kullanımı gibi antropojenik uygulamaların artışıyla birlikte daha fazla ağır metal iyonu doğal çevreye eklenerek ekosisteme zarar vermektedir. Dünya çapındaki toprak kirliliğine, organik ve inorganik kirleticiler arasında en fazla ağır metaller neden olmaktadır (%37'den daha fazla) (Vamerali ve diğ., 2010). Bu metallerin toprakta yüksek konsantrasyonda bulunması, toprak kalitesinin bozulmasına, ürün veriminin azalmasına ve tarımsal ürünlerin kalitesinin düşmesine yol açmakta (Long ve diğ., 2002; Yang ve diğ., 2005); insan, hayvan ve ekosistem sağlığı açısından önemli tehlikeler ortaya çıkarmaktadır. Ağır metallerin insan ve hayvan sağlığı üzerindeki olumsuz etkisi, bu metallerin çevrede uzun süre kalmaları sonucunda giderek artmaktadır (Gisbert ve diğ., 2003). Örneğin, kurşun (Pb)'un 150 ile 5000 yıl arasında toprakta tutulma süresine sahip olduğu tahmin edilmekte ve toprakta arıtma çamuru uygulamasından sonra 150 yıl kadar uzun bir süre yüksek konsantrasyonda devamlılığını sürdürdüğü bildirilmektedir (Nanda ve diğ., 1995). Kadmiyum (Cd)'un biyolojik olarak yarılanma süresinin toprakta ortalama 18 yıl civarında, insan vücudunda da 10 yıl olduğu tahmin edilmektedir (Forstner, 1995; Jabeen ve diğ., 2009). Besin zinciri yoluyla hayvanların ve insanların vücuduna ulaşarak burada biriken toksik ağır metaller, mutajenik yetenekleri ile DNA yıkımına ve karsinojenik etkilere sebep olabilmektedir (Yang ve diğ., 2005).

Antropojenik aktivitelerin yanısıra dünyanın pek çok bölgesinde, özellikle büyük miktarlarda farklı ağır metalleri içeren doğal maden yatakları bulunmaktadır. Bu alanlarda genellikle metal bakımından zengin ortamlarda yaşayan karakteristik bitki türleri mevcuttur. Bu bitki türlerinin birçoğu ortamdaki ağır metali bünyelerine

almaktan kaçınmakta, buna karşın bazı bitki türleri biyolojik olarak fonksiyonu bilinmeyen bu metallerin yüksek konsantrasyonlarını akümüle etme ve toprak üstündeki organlarına taşıma yeteneği göstermektedir (Baker ve Brooks, 1989). Akümülatör bitkilerin belirlenmesi, toprak, su ya da havada bulunan kirleticilerin bitkiler tarafından ortadan kaldırılmasını sağlayan fitoremediasyon teknolojisinin gelişmesini sağlamıştır. Bu yöntem diğer remediasyon teknolojilerine kıyasla sürdürülebilir kalkınma sağlanması açısından daha fazla potansiyeli olan yenilikçi bir yöntem olarak ortaya çıkmaktadır. Bu remediasyon tekniği, toprağın biyolojik özelliklerini ve fiziksel yapısını korumaktadır (Khan ve diğ., 2000). Toprakta en derin bölgeye ulaşmak, yayılmak ve büyük bir alan kaplamak için geniş bir kök sistemine sahip olan bitkiler, toprakta ve suda bulunan elementleri ortadan kaldırma ve biriktirme işlemini yerine getirmektedir. Metalleri depo eden bitkiler hasat edilerek, toksik atıklar için ayrılmış alanlara gömülmekte ya da biriken metaller geri kazanılmaktadır. Fitoremediasyonun faydalarının pek çok alanda gösterilmesi, birçok çevresel kuruluş tarafından bu teknolojinin kullanılmasına yol açacaktır (Eapen ve D'Souza, 2005). Günümüzde klasik metodlar ya da transgenik teknolojiler kullanılarak bitkilerin fitoremediasyon uygulamaları için geliştirilmesi, birçok kuruluşun fitoremediasyon teknolojisine gösterdiği talebi arttıracaktır. Ancak bu yaklaşım, metal toleransı, akümüasyonu ve translokasyonu daha net bir şekilde anlaşıldıktan sonra tamamen kullanılabilir olacaktır. Bu nedenle bitkilerde ağır metal akümüasyonu ve toleransının moleküler mekanizması hakkındaki bilgilerin artması, mevcut remediasyon teknolojilerinin geliştirilmesi bakımından son derece önemlidir (Hassinen ve diğ., 2009). Bu anlamda, son zamanlarda kullanılan cDNA mikroarray tekniği ile önemli metabolik yolların moleküler temelini anlaşılması ve genlerin fonksiyonlarının başarıyla açıklanması sağlanabilecektir (Ma ve diğ., 2001). Aynı anda binlerce genin ekspresyon seviyelerinin çalışılmasını mümkün kılan yeni ve güçlü bu teknoloji sayesinde, hücre ve dokuların gen ekspresyon profillerindeki değişiklikler büyük ölçekte incelenmektedir.

Bu tez çalışmasında, ağır metal akümüasyonu ve toleransı ile ilişkili moleküler mekanizmada açıklanamamış noktalara katkıda bulunmak için mikroarray tekniği kullanılarak *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök kısımlarında Pb'nin gen ekspresyon profili üzerine etkisi araştırılmıştır. Ağır metal alımı ve taşınmasında görevli olduğunu düşündüğümüz bazı genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyeleri, Pb ve Cd

uygulanan bitkilerin kök, gövde ve yapraklarında belirlenerek, bu genlerin metal homeostazisindeki rollerinin moleküler seviyede anlaşılması ve buna bağlı olarak türler arası hibridizasyonun kullanılabilirliğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Tezin amacı kapsamında, uygulama yapmak üzere belli ağır metalleri hiperakümüle ettiği bilinen ve gelişmiş kök sistemine sahip bir kara bitkisi olan *Brassica juncea* (kahverengi hardal) kullanılmıştır. Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı tarafından açıklanan en tehlikeli 10 kirletici arasında bulunan (ATSDR, 2011) Pb ve Cd metalleri *B. juncea* var. P78 bitkisine uygulanmıştır. Ağır metal uygulamaları sonucunda *B. juncea* var. P78 bitkisinin iyi bir Pb akümülatörü ve Cd hiperakümülatörü olduğu tespit edilmiştir. Pb uygulamasıyla anlatımı değişen genlerin tanımlanması ile ilgili çalışmaların çok sınırlı bulunması ve Pb'nin akümülyasyonunda bitkideki en önemli kısmın kökler olması nedeniyle bu metalin uygulandığı *B. juncea* bitkisinin kök kısımlarında mikroarray analiz yapılmıştır. *B. juncea* bitkisinin mikroarray platformunda ticari temsilcisi bulunmadığı için yapılan analizde aynı familyaya üye *Arabidopsis* bitkisine ait gen çipler kullanılmış ve türler arası hibridizasyon (TAH) denenmiştir. Ayrıca, TAH'ın gen ekspresyon profillemesi çalışmalarında kullanılabilirliği, *Arabidopsis* ve *Brassica* türleri özneline yapılan biyoenformatik çalışmayla irdelenmiştir. Pb ve Cd uygulamaları yapılan *B. juncea* bitkisinin kök, gövde ve yapraklarında, mikroarray analize göre ağır metal metabolizmasıyla ilişkili olduğu düşünülen genlerin mRNA seviyesindeki kat değişimleri RT-PCR yöntemiyle belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında, Pb uygulanan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök kısmında ağır metal metabolizmasında rol oynayabilecek genlerin mikroarray tekniği kullanılarak taranmasıyla, çoğunlukla türler arası düzeyde korunmuş az sayıda gen tanımlanmış ve buna bağlı olarak TAH'ın geniş ölçekte gen ekspresyonu profillemesinde kullanılabilirliğinin başarılı olmadığı ortaya konmuştur. Bu sonuç *Arabidopsis* ve *Brassica* özneline yapılan biyoenformatik analizle desteklenmiştir. Mikroarray analize göre ağır metal akümülyasyonu ve toleransıyla ilişkili olduğu düşünülen genlerin ekspresyon seviyeleri, Pb ve Cd uygulamaları yapılan bitkilerin farklı kısımlarında RT-PCR yöntemiyle belirlenmiş ve her iki ağır metale özgü anlatım gösteren genler bulunmuştur.

Elde edilen bu özgün sonuçlar, ağır metal akümülayonu ve toleransıyla ilişkili moleküler mekanizmada aydınlatılmamış noktaların açıklanmasına ve fitoremediasyon sistemlerinin geliştirilmesi bakımından ağır metal stresine karşı dayanıklı transgenik bitkilerin geliştirilmesine yönelik çalışmalara önemli kaynak oluşturmuştur. Bu tür çalışmaların yapılması uzun vadede, ağır metal kirliliğinin bitkiler tarafından ortadan kaldırılmasının ekonomik ve verimli bir şekilde gerçekleştirilmesine katkıda bulunacaktır.

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. BİTKİLER VE AĞIR METALLER

Bitkilerin büyüme ve gelişmeleri için belli elementlerin mutlak gerekli olduğu belirlenmiştir. Bitkinin iz miktarda ihtiyaç duyduğu mikro elementler arasında yer alan bakır (Cu), çinko (Zn), mangan (Mn), demir (Fe), molibden (Mo) ve nikel (Ni) enzimatik reaksiyonlar için gerekli olan ağır metallerdir. Mutlak gerekli metallerin yanısıra bitki için gerekli olmayan ve biyolojik olarak fonksiyonu bilinmeyen ağır metallerde bitkiler tarafından alınmaktadır. Bu ağır metaller arasında en yaygın olarak bulunan kurşun (Pb) ve kadmiyum (Cd) (Lal, 2010), Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı tarafından açıklanan “tehlikeli kirletici maddeler” arasında ilk 10’da yer almaktadır (ATSDR, 2011). Yoğunluğu  $5 \text{ g/cm}^3$ ’ün üzerinde, atom numarası 40’dan büyük olan elementler ağır metal olarak tanımlanmaktadır (Duffus, 2002). Başlıca inorganik kirleticiler grubu olan ağır metaller, doğal süreçler ya da antropojenik uygulamalar aracılığıyla çevreye girmektedir. Yerkürede doğal olarak varolan 90 tane elementten 53 tanesi ağır metaldir (Weast, 1984). Hava şartlarının etkisiyle doğal kaya oluşumlarının aşınması sonucunda toprak, göl, nehir, deniz suyu ve deniz tabanındaki sedimentlerde partikül ya da çözülmüş formlarda yaygın olarak bulunmaktadırlar (Babula ve diğ., 2008). Doğal kirlenmenin yanısıra, kentsel atıklar, atık suların kullanımı, atık yakma ünitelerinin salınımları, fosil yakıtların kullanımı, metal madenleri ve eritme endüstrilerinin atıkları, endüstriyel atıkların uzaklaştırılması, toprak dolgu işlemleri, pestisit, herbisit ve gübre gibi tarımsal kimyasalların kullanımı vb. antropojenik uygulamaların artışıyla birlikte daha fazla ağır metal iyonu doğal çevreye eklenerek ekosisteme zarar vermektedir (Jabeen ve diğ., 2009).

Ağır metaller toprakta yüksek konsantrasyonlarda bulduklarında bitki metabolizması ve büyümesi üzerinde toksik etkiler göstermektedir (Shah ve Dubey, 1998; Agrawal ve Sharma, 2006; Shah ve Nongkynrnh, 2007). Ağır metallerin çözünürlükleri, absorbe edilebilirlikleri, taşınmaları ve kimyasal reaktivitelerindeki farklılıklar, canlı

organizmaların bünyesindeki toksisite üzerinde spesifik farklılıklara yol açmaktadır (Stohs ve Bagchi 1995; Lal, 2010). Ağır metallerin bitkiler üzerindeki toksik etkileri; a) Fe ve Cu gibi metaller için tipik olan, otoksidasyon ve Fenton reaksiyonu aracılığıyla reaktif oksijen türlerinin üretimi, b) Özellikle Cd ve Hg gibi redoks-reaktif olmayan ağır metallerde bildirilen, biyomoleküllerdeki temel fonksiyonel grupların engellenmesi, c) Farklı ağır metal türü oluşumuna yol açan, biyomoleküllerdeki esas metal iyonlarının yer değiştirmesi şeklinde karakterize edilmektedir (Schützendübel ve Polle, 2002; Gasic ve Korban, 2006). Hall (2002) ağır metallerin aşırı miktarlarına maruz kalan bitkilerde hücrese seviyede görülen toksisite semptomlarını rapor etmiştir. Toksik etkiler doğrudan ya da dolaylı olabilmektedir. Bu etkiler, enzim aktivitesi, protein yapısı, su dengesi, solunum ve ATP içeriği, fotosentez, büyüme ve morfogenez, reaktif oksijen türlerinin oluşumu açısından hücre metabolizmasında metallerin teşvik ettiği toksik etkiler olarak ortaya çıkmaktadır.

Bitkiler ağır metallerle kirlenmiş topraklarda büyümek için 3 temel strateji geliştirmiştir. Bu stratejilere göre bitkiler metal alımıyla ilgili olarak 3 gruba ayrılmıştır: Metale toleranslı (metal excluder), metal indikatör ve metal akümülatör bitkiler (Baker, 1981; Hassinen, 2009).

1) Metale toleranslı bitkiler: Bu tür bitkilerde köklerden metal alımı ve/veya köklerden toprak üstü organlara metal taşınması sınırlanmaktadır. Bu nedenle, topraktaki metal konsantrasyonu yüksek olsa bile bitkinin toprak üstü organlarındaki metal konsantrasyonu düşüktür (Baker, 1981). Bu bitkiler membran permeabilitesini ya da hücre duvarına metal bağlama kapasitesini değiştirebilmekte ya da daha fazla şelatlayıcı madde (hücre içi metal bağlayıcı bileşikler) yaymaktadır (Cunningham, 1995; Ghosh ve Singh, 2005). *Silene vulgaris* bu stratejiyi izleyen bitki türlerinden biridir (Schat ve Ten Bookum, 1992; Hassinen, 2009).

2) Metal indikatör bitkiler: İndikatör bitkilerin toprak üstü organlarında bulunan metal miktarı, topraktaki metal miktarını yansıtmaktadır. Bu türler, toprakta varolan metal konsantrasyonlarını şelatlar üreterek tolere etmekte ya da vakuol gibi duyarlı olmayan kısımlarında depo ederek metallerin hücre içi bölümlendirilmesini değiştirmektedir

(Ghosh ve Singh, 2005). *Populus alba* toprakta metal kirliliğini takip etmek için kullanılan Cd/Zn indikatör bitkisidir (Madejon ve diğ., 2004; Hassinen, 2009).

3) Metal akümülatör bitkiler: Akümülatör bitki türleri toprak üstü organlarında, toprakta bulunan metal miktarından daha fazlasını konsantre edebilmektedir. Hiperakümülatörler olarak adlandırılan bu bitkiler, kirleticilerin çok yüksek seviyelerdeki konsantrasyonlarını kök, gövde ve/veya yapraklarında absorbe edebilmektedir (Baker ve diğ., 1994; Cunningham ve Ow, 1996; Raskin ve diğ., 1994; Ghosh ve Singh, 2005). Baker ve Brooks (1989) Cd için 100 µg/g KA; Ni, Cu, Co, Pb için 1,000 µg/g KA; Zn ve Mn için 10,000 µg/g KA olacak şekilde bitkilerde hiperakümüle edilen metal konsantrasyonlarını sınırlandırmıştır. Bu elementler için tanımlanan seviyeler, akümülatör olmayan türlerde bulunan miktarlardan daha fazladır (Salt ve Kramer 2000; Peer ve diğ., 2005). Dünya çapında 22 familyadan yaklaşık 400 tane hiperakümülatör bitki türü tanımlanmıştır. Tanımlanan hiperakümülatör bitkilerden 87 tanesi *Brassicaceae* familyasına üye 11 cinse aittir (Baker ve Brooks, 1989; Ghosh ve Singh, 2005).

### 2.1.1. Bitkilerde Ağır Metal Alımı ve Taşınması

Bitkiler tarafından ağır metal alımı ve taşınımı süreci, metal iyonlarının kökler tarafından tutulmasını, köklere girişini ve sonrasında kütle akışı ve difüzyon yoluyla toprak üstü organlara translokasyonunu kapsamaktadır (Jabeen ve diğ., 2009).

Birçok metal toprakta çözünmeyen formlarda bulunmaktadır. Bitkiler toprak matriksinden metalleri ayrıştırmak için 2 metod kullanmaktadır. Bunlar, plazma membranındaki proton pompalarının hareketiyle rizosferin asitleştirilmesi ve metalleri şelatlama yeteneğine sahip ligantların salgılanmasıdır (Peer ve diğ., 2005). Köklerden proton ekstrüzyonu ve metal şelatlayıcı moleküller (mugenik ve aveik asit)'in rizosfere salınması ile toprak parçacıklarına bağlı olan metaller harekete geçirilmektedir (Salt ve diğ., 1995). Bir başka eksudat tipi, Fe'yi bağlayan ve alımını kolaylaştıran fitosideroforlardır (Higuchi ve diğ., 1999; Jabeen ve diğ., 2009). Fitosideroforların şelasyonu ile metal iyonları, plazma membranından özel taşıyıcılar aracılığıyla metal-siderofor kompleksler halinde taşınmaktadır.

Metaller harekete geçirildikten sonra kök hücreleri tarafından tutulmaktadır. Metaller ilk önce düşük affinite ve seçicilik gösteren iyon değiştiriciler ile hücre duvarına bağlanmaktadır. Metallerin plazma membranından alımına, taşıma sistemleri ve hücre içi yüksek affiniteli bağlayıcı bölgeler aracılık etmektedir. Metal iyonlarının alımı muhtemelen, kanal proteinleri ve/veya  $H^+$ -birleşmiş taşıyıcı proteinler gibi sekonder taşıyıcılar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Sekonder taşıyıcılar aracılığıyla katyonların alınmasında, membran potansiyeli (kök epidermal hücrelerinde plazma membranının iç kısmı -200 mV'nin üzerinde) itici güç sağlamaktadır (Hirsch ve diğ., 1998; Ghosh ve Singh, 2005).

Metal iyonlarının bitkiye girişi, metal tipi ve bitki türüne bağlı olarak apoplastik ya da simplastik yolla gerçekleşmektedir. Kök epidermisi ve korteksinin apoplastik yolu, çözünen maddeler için oldukça geçirgendir. Apoplastik yol göreceli olarak düzensizdir. Çünkü su ve suda çözülmüş maddeler, plazma membranından geçmek zorunda kalmadan difüze olmaktadır. Endodermal tabakanın hücre duvarları, vaskular sisteme apoplastik difüzyonda bariyer olarak görev yapmaktadır (Ghosh ve Singh, 2005). Apoplastik taşıma, hücre duvarının yüksek katyon değişim kapasitesi ile sınırlanmaktadır (Raskin ve diğ., 1997). Simplastik taşıma, metal iyonlarının plazma membranından hareketini gerektirmektedir. Metal iyonları genellikle yaklaşık olarak 170 mV negatif potansiyele sahip olan plazma membranından taşınmaktadır. Birçok metal iyonu enerjiye bağımlı bir süreçle özel ya da genel metal iyon taşıyıcılar ya da kanallar aracılığıyla bitki hücrelerine girmektedir (Bubb ve Lester, 1991; Jabeen ve diğ., 2009). Suda çözülmüş maddelerin büyük bir kısmı endodermal tabakayı simplastik yolla geçerek ksileme ulaşmaktadır (Tester ve Leigh, 2001). Metal iyonlarının ksileme taşınması, genellikle membran taşıma proteinleri tarafından çok sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir (Gaymard ve diğ., 1998). Ksileme metal yüklemesine katılan metal taşıyıcılar henüz yeteri kadar tanımlanamamıştır. Ayrıca ağır metal iyonlarının ksileme apoplastik yolla taşınımı, kök ucunda gerçekleşebilmektedir (Clemens, 2002a).

Cd gibi toksik ağır metaller, mikro elementler tarafından kullanılan transmembran taşıyıcılar için etkin bir şekilde rekabet etmektedir. Yapılan çalışmalar  $Cu^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$ 'nin,  $Ni^{+2}$  ve  $Cd^{+2}$  ile aynı transmembran taşıyıcılar için rekabete girdiğini ortaya koymuştur (Crowley ve diğ., 1991). Fe-fitosiderofor taşınmasında olduğu gibi metal-şelat



kompleksler, özelleşmiş taşıyıcılar ile plazma membranından taşınabilmektedir (Cunningham ve Berti, 1993; Ghosh ve Singh, 2005). Ağır metal iyonları köklere girdikten sonra, köklerde depo edilmekte ya da ksilem yoluyla toprak üstü organlara iletilmektedir. Toprak üstü organlara metal translokasyonu oranı, köklerdeki metal konsantrasyonuna bağlı olabilmektedir (Hardiman ve diğ., 1984; Jabeen ve diğ., 2009). Prezemeck ve Haase (1991) metal translokasyonu için olası mekanizma olarak, ksilem özsuyundaki fitokelatin aracılı metal bağlayıcıları göstermiştir. *Alyssum lesbiacum*'da sitrat (Lee ve diğ., 1977) ve serbest histidin (Kramer ve diğ., 1996) gibi düşük moleküler ağırlıklı şelatörlerde bu süreçle ilişkilendirilmiştir. Malat, sitrat, histidin benzeri şelatlayıcı bileşikler, bitkilerde metal iyonlarının hareketinde bir role sahip olabilmektedir (Von Wiren ve diğ., 1999; Jabeen ve diğ., 2009). Metal iyonları, serbest iyonlar ya da metal-şelat kompleksler olarak vakuolar membrandan aktif olarak taşınmaktadır. Örneğin Cd, yulaf köklerinin tonoplastından Cd/H<sup>+</sup> antiport yoluyla serbest iyon olarak aktif bir şekilde taşınmaktadır (Dierberg ve diğ., 1987) Organik asitler ya da fitokelatinler tarafından şelatlanan metal iyonları vakuolde depolanmakta ve belirli koşullarda çözünmeyen çökeltiler oluşabilmektedir. Hücre içi bölümlendirme ve şelatlama, metallerin bitkiler üzerindeki yıkıcı etkilerine karşı gerçekleşen önemli olaylardır (Cunningham ve diğ., 1995; Ghosh ve Singh, 2005).

### **2.1.2. Bitkilerde Ağır Metal Toleransı**

Ağır metal toleransı gösteren bitkiler, diğer bitki türleri için toksik olan topraklarda yaşayabilme yeteneğine sahiptir (McNair ve diğ., 2000; Shah ve Nongkynruih, 2007). Bitkilerde ağır metallerin yüksek seviyelerine karşı gösterilen tolerans 2 mekanizmaya bağlıdır. Bu mekanizmalar, ağır metallerin alımının azalması ve bitki iç sekestrasyonunun artmasıdır.

Bitkiler ağır metal iyonlarını kök sistemleri aracılığıyla topraktan almaktadır. Ağır metal iyonları kök yüzeyinde, kök sistemini kaplayan müsilaj üronik asitin karboksil grubuna bağlanmaktadır. Ağır metallerin müsilaja bağlanma yetenekleri, çeşitli metaller arasında farklılık göstermektedir. Ağır metallerin topraktan alım oranı, toprak solüsyonunun pH'sına, organik madde içeriğine ve topraktaki diğer iyonların konsantrasyonlarına bağlıdır. Yüksek pH değerinde, toprak çözeltisindeki birçok metal tuzunun çözünürlüğü düşmektedir. Bu nedenle, ağır metallerin topraktaki biyolojik

kullanılabilirliği azalmaktadır. Bunlara ek olarak, toprakta diğer iyonların bulunması ağır metal alımını önemli ölçüde etkilemektedir. Toprakta bulunan diğer iyonların birbirleriyle etkileşimlerinin, ağır metal alımının ve topraktaki biyolojik kullanılabilirliğinin azalmasına yol açması ile ilgili belirli bir mekanizma bilinmemektedir. Bitkide iç sekestrasyon mekanizmasının artması, genotip ve çevre arasındaki etkileşim ile kendini göstermektedir (Hall, 2002). Bazı bitkiler hücrese seviyede detoksifikasyonda rol alan potansiyel mekanizmalar ile ağır metal stresine karşı tolerans göstermektedir. Ağır metal homeostazisi ve detoksifikasyon sistemlerinin başlıca öğelerini, membran-bazlı ağır metal taşıyıcıları (Williams ve diğ., 2000), az miktardaki mikro elementlerin etkili bir şekilde dağılımını sağlayan hücre içi metal şaperonları, şelasyon (Cobbett ve Goldsbrough, 2002) ve sekestrasyon süreçleri oluşturmaktadır. Bu kritik süreçlerin herhangi birinin hasara uğraması, ağır metal iyonlarına karşı aşırı duyarlılığa yol açmaktadır (Gasic ve Korban, 2006).

## **2.2. AĞIR METAL AKÜMÜLASYONU VE TOLERANSININ MOLEKÜLER MEKANİZMASI**

### **2.2.1. Metal Alımı**

Bitkiler toprakta çözünmeyen formlarda bulunan ağır metalleri harekete geçirmek için rizosfere bazı metal şelatlayıcı maddeler salmaktadır. Bu metal şelatörlerden biri olan nikotinamin (NA) yüksek bitkilerde yaygın olarak bulunmaktadır. Gramineae familyasında fitosideroforların biyosentetik prekürsörü olan NA, Fe alımı için önemli bir bileşendir. Pirinç bitkisinde *OsNAS1*, *OsNAS2* ve *OsNAS3* olmak üzere 3 tane nikotinamin sentez geni bulunmuştur. Bu genler, köklerden fitosiderofor salgılamadaki rollerine ek olarak Fe'nin uzun mesafe taşınımında da önemli rollere sahiptir (Inoue ve diğ., 2003). Mısır bitkisinde Fe(III)-fitosideroforlar, oligopeptid taşıyıcı ailesine ait YS1 taşıyıcılar aracılığıyla köklerden alınmaktadır (Curie ve diğ., 2001, Gasic ve Korban, 2006).

Bitki hücrelerinde ağır metallerin hareketini kapsayan süreçler moleküler düzeyde incelendiğinde, metal taşınımına katılan gen ailelerinin metal toleransında anahtar rol oynayabilecekleri ortaya konmuştur. Ağır metal ATPazlar, doğal dirençle ilişkili

makrofaj proteinler, çinko-demir permeazlar metal taşımaya katılan gen ailelerinden bazılarıdır (Hall ve Williams, 2003).

Ağır metal ATPazlar (HMA'lar), bakteriler, bitkiler ve insanlarda bulunan ağır metal pompalarıdır. Bu organizmalarda bulunan HMA'lar önemli derecede dizi benzerlikleri göstermekte ve P<sub>1B</sub> alt ailesi olarak kümelenmektedir (Palmgren ve Axelsen, 1998; Gasic ve Korban, 2006). Bu grup, membran içinde korunmuş sistein-prolin-sistein/histidin/serin dizisi içerdiği için CPx-ATPazlar olarak da tanımlanmaktadır (Solioz ve Vulpe, 1996; Hall ve Williams, 2003). P-tipi ATPaz üst ailesi içinde yer alan bu iyon pompaları, hücre zarından katyonların pompalanmasında fonksiyoneldir. HMA'lar, membrandan iyonların taşınması için ATP hidrolizinin gerçekleştiği ortak bir enzimatik mekanizmayı paylaşmaktadır. Enzimin katalitik döngüsü, fosforile edilmiş ara ürünler içerdiği için "P-tipi" tanımı yapılmaktadır (Pedersen ve Carafoli, 1987; Hall ve Williams, 2003; Gasic ve Korban, 2006). *Arabidopsis* genomu ve kendisinden 3 kat daha büyük pirinç genomu karşılaştırıldığında, her iki bitkideki P-tipi ATPaz genlerinin benzer sayılarda olduğu ortaya konmuştur (sırasıyla 43 ve 46) (Baxter ve diğ., 2003; Gasic ve Korban, 2006). Pirinç ve *Arabidopsis*'de P-tipi ATPazların 5 ana alt ailesi bulunmaktadır. Bu alt aileler, ağır metal ATPazlar (P<sub>1B</sub>), Ca<sup>+2</sup>-ATPazlar (endoplazmik retikulum-tip Ca<sup>+2</sup>-ATPaz ve otoinhibe Ca<sup>+2</sup>-ATPaz, P<sub>2A</sub> ve P<sub>2B</sub>), H<sup>+</sup>-ATPazlar (otoinhibe H<sup>+</sup>-ATPazlar, P<sub>3A</sub>), putativ aminofosfolipid ATPazlar (ALA, P<sub>4</sub>) ve bilinmeyen bir özellik gösteren bir dalı (P<sub>5</sub>) şeklindedir. P<sub>1B</sub> alt ailesinin filogenetik analizi, taşıma spesifitesiyle ilişkili olarak 2 ana grubun varlığını ortaya koymuştur. Bu gruplar, monovalent Cu<sup>+</sup>/Ag<sup>+</sup> katyonları ve divalent Zn<sup>+2</sup>/Co<sup>+2</sup>/Cd<sup>+2</sup>/Pb<sup>+2</sup> katyonlarından oluşmaktadır (Solioz ve Odermatt, 1995; Beard ve diğ., 1997; Axelsen ve Palmgren, 2001; Arnesano ve diğ., 2002; Hall ve Williams, 2003; Mills ve diğ., 2003).

Bakteriler, mantarlar, bitkiler ve hayvanları kapsayan organizmalarda metal iyonlarının taşınmasına katılan bir başka taşıyıcı grup doğal dirençle ilişkili makrofaj proteinler (Nramp'lar) dir (Cellier ve diğ., 1995; Lang ve diğ., 2011). Bu aile bitkilerde ilk olarak pirinçte tanımlanmış ve 3 tane Nramp geni (*OsNramp 1-3*) rapor edilmiştir (Belouchi ve diğ., 1995; 1997; Hall ve Williams, 2003). *Arabidopsis thaliana*'da metal taşımada farklı rolleri olan 6 adet Nramp geni bulunmuştur (Curie ve diğ., 2000; Williams ve diğ., 2000; Mäser ve diğ., 2001; Hall ve Williams, 2003; Lang ve diğ., 2011). A.

*thaliana*' da yapılan çalışmalarda Nramp'ların öncelikli olarak Fe taşınmasında görev aldıkları gösterilmiştir. Bitkilerde *AtNRAMP1* ve 2'nin aşırı ekspresyonu, Fe'ye karşı direncin artmasına neden olmaktadır (Curie ve diğ., 2000). *AtNRAMP3* ve *AtNRAMP4*, Fe eksikliğinde artış göstermektedir (Lanquar ve diğ. 2005; Lanquar ve diğ., 2010). Bazı Nramp'lar daha düşük affiniteyle Fe'den başka metallerin taşınmasında katılmaktadır (Thomine ve diğ., 2000; Thomine ve diğ., 2003). Son zamanlarda *AtNRAMP 1, 3* ve *4*'ün Mn homeostazisinde rol aldıkları ortaya konmuştur (Cailliatte ve diğ., 2010; Lanquar ve diğ., 2010). Bunun yanısıra *AtNRAMP4*, Zn taşınmasında da önemli bir role sahiptir (Oomen ve diğ., 2009). *AtNRAMP3* ve *6*'nın, Cd gibi bitki için gerekli olmayan metallerin homeostazisine katıldıkları gösterilmiştir (Hall ve Williams, 2003; Thomine ve diğ., 2003; Cailliatte ve diğ., 2009).

Nramp'lar hiperakümülatör bitkilerde daha az karakterize edilmiştir. NRAMP3 geninin ekspresyon seviyesinin, Zn hiperakümülatör *Arabidopsis halleri*'de hiperakümülatör olmayan *A. thaliana*'ya kıyasla arttığı bulunmuştur (Talke ve diğ., 2006). Zn, Cd ve Ni hiperakümülatör *Thlaspi caerulescens*'de de *AtNRAMP3* ve *4*'ün ortologları olan *TcNRAMP3* ve *4*'ün ekspresyon seviyeleri benzer şekilde artış göstermektedir (Milner ve Kochian 2008; Lang ve diğ., 2011).

Metal taşınmasına katılan çinko-demir permeaz (ZIP) gen ailesi üyeleri, Cd, Fe, Mn ve Zn'yi içeren katyon çeşitlerini taşıma yeteneğine sahiptir. ZIP ailesi, ZRT (Zn-düzenlenmiş taşıyıcı) ve IRT (demir-düzenlenmiş taşıyıcı)-benzeri proteinleri içine alan ilk tanımlanmış üyelerden türetilmiştir (Guerinot, 2000; Mäser ve diğ., 2001; Hall ve Williams, 2003; Gasic ve Korban, 2006). ZIP ailesine ait genlerin birçoğu Fe ve Zn yokluğunda artmakta, ekspresyonları kök ve nodüllerde çoğunlukla sınırlanmaktadır. ZIP ailesinin tanımlanan ilk üyesi *Arabidopsis*'den izole edilen *AtIRT1* genidir (Eide ve diğ., 1996; Hall ve Williams, 2003). Bu gen, topraktan yüksek affiniteyle Fe alımından sorumlu önemli bir taşıyıcıdır (Eide ve diğ., 1996; Connolly ve diğ., 2002; Vert ve diğ., 2002; Hall ve Williams, 2003; Gasic ve Korban, 2006). *IRT1*'in aşırı ekspresyonu, metal alımında baskın bir şekilde fonksiyon artışı sağlamamaktadır. *IRT1*'in transkript seviyesi Fe eksikliğinde artarken, Fe yeterliliğinde ve Zn ile Cd'nin yüksek seviyelerinde azalmaktadır (Connolly ve diğ., 2002). Bir başka ZIP ailesi üyesi olan *AtIRT2* ise, Fe eksikliğinde kök epidermal hücrelerinde eksprese olmaktadır. Ancak

*IRT1*'in kaybında yerini alamamakta (Grotz ve Guerinot, 2002; Hall ve Williams, 2003) ve ilgili substrastlara büyük spesifite göstermektedir. Yapılan çalışmalar, bu taşıyıcıların *Arabidopsis*'de farklı fonksiyonlara sahip olduğunu göstermektedir. *Arabidopsis*'de *AtIRT1* ve *AtIRT2*'nin aşırı ekspresyonu ile Cd akümülyasyonunun arttığı rapor edilmiştir (Connolly ve diğ., 2002; Vert ve diğ., 2009, Takahashi ve diğ., 2011). *Arabidopsis* *AtIRT1* geni ile yüksek oranda homoloji gösteren pirinç *OsIRT1* geni ağırlıklı olarak köklerde eksprese olmakta ve Fe ve Cu eksikliği tarafından teşvik edilmektedir (Buglio ve diğ., 2002; Hall ve Williams, 2003). Fe taşıyıcılar olan *OsIRT1* ve *OsIRT2*, Cd alımında da fonksiyoneldir. *OsIRT1*'in aşırı ekspresyonu ile Cd akümülyasyonunun arttığı gösterilmiştir (Lee ve An, 2009; Takahashi ve diğ., 2011).

Hiperakümülatör bitki *T. caerulescens*'in Ganges ekotipi ile yapılan çalışmalarda, Fe eksikliği nedeniyle Cd alımının büyük ölçüde artmasının kök dokularında *TcIRT1-G* mRNA'sının bol miktardaki artışıyla ilişkili olabileceği düşünülmüştür (Lombi ve diğ., 2002). Bunun yanısıra, *T. caerulescens*'de *ZIP* geni homoloğu olan *TcZNT1*'in, *Saccharomyces cerevisiae* (ekmek mayası)'de eksprese edilmesini takiben yüksek affiniteyle  $Zn^{+2}$  ve düşük affiniteyle  $Cd^{+2}$  alımına aracılık ettiği gözlenmiştir (Pence ve diğ., 2000; Hall ve Williams, 2003). Bu taşıyıcı, *T. caerulescens*'in kök ve gövdesinde yüksek seviyelerde eksprese edilmektedir. Zn'nin değişen durumuna bağlı olarak taşıyıcının aşırı ekspresyonu, köklerde hücre içine Zn akışının artmasına neden olmaktadır. Assunção ve diğ. (2001) *TcZNT1* ile *TcZNT2*'nin ağırlıklı olarak köklerde eksprese edildiklerini ve Zn konsantrasyonlarına düşük oranda yanıt verdiklerini rapor etmiştir. Buna karşılık hiperakümülatör olmayan *Thlaspi arvense*'de bu genler sadece Zn eksikliği koşullarında eksprese olmaktadır (Assunção ve diğ., 2001; Hall ve Williams, 2003).

*Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan negatif mutantları kurtarma çalışmalarına dayanarak, *ZIP* gen ailesi gibi metal taşıyıcıların fonksiyonel özellikleri hakkında daha fazla bilgi elde edilmiştir. Büyüme için ortamda artan Zn seviyesine ihtiyaç duyan *S. cerevisiae* mutantları *zrt1* ve *zrt2*'de, *Arabidopsis* *ZIP1-3* taşıyıcılarının  $Zn^{+2}$  alım aktivitesi görülmektedir (Grotz ve diğ., 1998; Guerinot, 2000; Hall ve Williams, 2003; Gasic ve Korban, 2006). *ZIP1* ve *ZIP3*, Zn eksikliğine cevaben köklerde eksprese olmakta ve bitkide Zn taşınmasında rol aldıkları düşünülmektedir. Oysa *ZIP4*, Zn'nin

sınırlı miktarda bulunduğu bitkilerin köklerinde ve gövdelerinde artarak bitki dokuları arasında ya da hücre içinde Zn taşınmasına katılmaktadır. Bununla birlikte ZIP2 geni, *S. cerevisiae*' de Fe ve Zn alım mutantlarını kurtarmakta ve Cd ya da Mn taşınmasına katılmamaktadır (Vert ve diğ., 2001; Hall ve Williams, 2003).

Ağır metallerin bitki hücrelerine alınmasında fonksiyonel olan gen aileleri arasında, *Arabidopsis* ve diğer bitkilerde tanımlanan putativ katyon taşıyıcılar ailesi de bulunmaktadır (Schuurink ve diğ., 1998; Arazi ve diğ., 1999; Kohler ve diğ., 1999). *Arabidopsis*'de tanımlanan protein, hayvanlardaki siklik nükleotid bağlayıcılarla örtüşen kalmodulin bağlayıcı bölge içermektedir (Mäser ve diğ., 2001; White ve diğ., 2002). Monovalent ve divalent katyonlar için geçirgen olan bu kanalların, plazma membranında yerleşmiş oldukları ve seçici olmadıkları görülmektedir (Schuurink ve diğ., 1998; Arazi ve diğ., 1999; White ve diğ., 2002). Tütün kalmodulin-bağlayıcı proteinin aşırı eksprese olduğu transgenik tütünler (NtCBP4)'de,  $Ni^{+2}$  akümülyasyonunun indirgenmesiyle  $Ni^{+2}$ 'ye karşı tolerans,  $Pb^{+2}$  akümülyasyonunun artmasıyla da  $Pb^{+2}$ 'ye karşı aşırı duyarlılık geliştiği gözlenmiştir (Arazi ve diğ., 1999; Sunkar ve diğ., 2000). Bunun yanısıra buğdaydan  $Ca^{+2}$  ve  $Cd^{+2}$  alımındaki potansiyel rolüyle ilgili olarak, bir başka taşıyıcı LCT1 (düşük-affiniteyle katyon taşıyıcı) geni klonlanmıştır (Schachtman ve diğ., 1997; Clemens ve diğ., 1998). *Arabidopsis* ya da diğer bitki türlerinin genomlarında *LCT1* homologları bulunamamıştır (Mäser ve diğ., 2001; Hall ve Williams, 2003).

Bitkilerde ağır metal iyonlarının alımı için çeşitli sistemlerin geliştiği çok açıktır. Elde edilen bulgular ışığında, her bir ağır metalin alımı için birbirinden farklı mekanizmalar olduğu düşünülmektedir.

### 2.2.2. Şelasyon

Metal iyonları hücre içine girdikten sonra şelatörler ve şaperonlar tarafından bağlanmaktadır. Şelatörler, sitosolik metal konsantrasyonlarını tamponlama yoluyla metal detoksifikasyonuna katkıda bulunmaktadır. Şaperonlar ise özellikle organellere ve metal-ihtiyacı duyan proteinlere metal iyonlarını dağıtmaktadır. Bitkilerde bilinen birçok metal-şelatör vardır. Bu şelatörler, fitokelatinler, metalotiyoninler, organik

asitler ve amino asitleri kapsamaktadır (Clemens, 2001; Gasic ve Korban, 2006). Fitokelatinler ve metallotiyoninler, bitkilerde ağır metal bağlayıcı ligantlar arasında en iyi karakterize edilmiş olanlardır.

#### 2.2.2.1. Fitokelatinler

Bitkilerde ağır metal akümüasyonu, fitokelatin (PC)'lerin üretimiyle teşvik edilmektedir. PC'ler, genel yapısı ( $\gamma$ -Glu-Cys)<sub>n</sub>-Gly olan tiyol-zengin peptid ailesidir (n, normal olarak 2 ile 5 arasında bir değerdir) (Steffens, 1990; Rauser, 1995). Cd ve As (arsenik) etkin bir şekilde PC sentezine neden olurken, Zn ve Ni elementleri aynı etkiye sahip değildir (Grill ve diğ., 1989). PC sentazın substratı olan glutatyon (GSH), amino asitlerden 2 aşamada sentezlenmektedir: İlk aşama  $\gamma$ -glutamil-sistein sentaz ( $\gamma$ -ECS), ikinci aşama ise glutatyon sentaz (GS) tarafından katalize edilmektedir.  $\gamma$ -ECS aktivitesi, glutatyon aracılığıyla geri bildirim düzenlenmesi yoluyla kontrol edilmektedir ve sistein mevcudiyetine bağlıdır (Mejare ve Billow, 2001). Bu enzimi kodlayan gen, *A. thaliana* (Clemens ve diğ., 1999; Ha ve diğ., 1999; Vatamaniuk ve diğ., 1999), *Triticum aestivum* (Clemens ve diğ., 1999) ve *Schizosaccharomyces pombe* (Clemens ve diğ., 1999; Ha ve diğ., 1999)'de bulunmuştur (Jabeen ve diğ., 2009).

GSH'ye bağımlı PC sentaz aktivitesi, *Silene cucubalis*'in kültüre alınmış hücrelerinde tanımlanmıştır (Grill ve diğ., 1989). Bu enzim sadece Cd, Cu, Zn, Ag (gümüş), Hg (civa) ve Pb'nin varlığında aktiftir. Domates ve bezelyede de benzer aktiviteler tanımlanmıştır (Howden ve diğ., 1995; Klapheck ve diğ., 1995). Vatamaniuk ve diğ. (1999) *AtPCS1* olarak adlandırılan bir *Arabidopsis* cDNA'sı tanımlamıştır. Cd akümüasyonuna *AtPCS1* proteinin ekspresyonunun aracılık etmesi, Cd şelasyonu ya da sekestrasyonunda *AtPCS1*'in olası rolü olduğunu göstermektedir. Clemens ve diğ. (1999) *TaPCS1* olarak adlandırılan ve yabani tip mayada eksprese edildiğinde Cd direncini artıran buğday cDNA'sı tanımlamıştır. Ayrıca, vakuol eksik mutantlarda *AtPCS1* ve *TaPCS1*'in aracılık ettiği toleransın oluşumuna bakıldığında, PC'lerin sitozolde lokalize olduğu ve tolerans mekanizmasında önemli rol oynadıkları görülmektedir. Bitkilerde Cd<sup>+2</sup> detoksifikasyonu için PC-Cd kompleksinin oluşumunun önemi, *Arabidopsis cad 1* mutanı ile gösterilmiştir. PC-eksik *cad 1* mutanı, yabani tipte bulunan seviyelerde GSH içermekte ve Cd<sup>+2</sup>'ye aşırı duyarlılık göstermektedir (Howden ve diğ., 1995). *AtPCS1* olarak adlandırılan CAD1 geninin ekspresyonu

*Escherichia coli*'de yapıldığında, GSH ve metale bağımlı PC sentezi saptanmıştır. Bu genin belirgin bir şekilde PC sentezini kodladığı ortaya konmuştur (Ha ve diğ., 1999). Cd<sup>2+</sup>'ye tolerans fenotipi gösteren *S. cerevisiae* hücrelerinde bu genlerin ekspresyonu, GSH-bağımlı ve PC senteziyle ilişkilidir. *Arabidopsis* ve *S. pombe*'den saflaştırılan rekombinant PC sentaz proteinleri, GSH'den PC'lerin oluşumunu katalize etmektedir (Clemens ve diğ., 1999; Vatamaniuk ve diğ., 1999). *Arabidopsis cad1-3* mutantları yabani tipe göre, Cd ve As'ye oldukça duyarlı iken, Cu, Hg, ve Ag'ye az duyarlılık göstermektedir (Ha ve diğ., 1999; Jabeen ve diğ., 2009). Gisbert ve diğ. (2003) tütünde PC sentazı kodlayan buğday TaPCS1 geninin aşırı ekspresyonunun, Pb ve Cd'ye toleransı büyük ölçüde artırdığını göstermiştir. 1,572 mg/kg Pb içeren maden bölgelerinde yetiştirilen bu transgenik fideler, yabani tipe göre Pb ve Cd'yi iki kat daha fazla miktarda akümüle etmiştir.

Ağır metal detoksifikasyon süreci, metal iyonlarının şelasyonu sınırlanmamaktadır. PC sentazın metal iyonları tarafından aktive edilmesinden sonra PC'lerin senteziyle metal şelasyonu gerçekleşmektedir. Metal-iyon kompleksi vakuole taşınmakta ve burada sülfidler ya da organik asitlerle kompleks oluşturarak stabilize edilmektedir (Rauser, 1990). PC'lerin sentez edilmesi ve aktivasyonu aracılığıyla metal şelasyonundan sonra PC-Cd komplekslerinin tonoplastta taşınması ve vakuolar bölümlendirilmesi, PC'lerin metal bağlama kapasitesini artırmaktadır (Vogel-Lange ve Wagner, 1989; Salt ve Rauser, 1995; Bae ve Mehra, 1998; Jabeen ve diğ., 2009).

#### 2.2.2.2. Metalloproteinler

Metalloprotein (MT)'ler, düşük moleküler ağırlıklı, sistein-zengini, metal bağlayıcı proteinlerin bir grubudur. MT'ler metal şelasyonu için tiyollerini sağlamaktadır. MT proteinler hayvanların yanısıra ökaryotik mikroorganizmalar ve bitkilerde de rapor edilmiştir. Bitkiler genellikle 60-80 amino asitten oluşan ve 9-16 sistein kalıntısı içeren peptidleri kodlayan MT genlerinin bir ailesine sahiptir (Chatthai ve diğ., 1997). MT-metal kompleksinin glutatyonlaşmış olması (Brouwer ve diğ., 1993), bu kompleksin uzun süreli sekestrasyon için vakuole taşınmış olabileceğini düşündürmektedir. MT sentezine neden olan faktörlerin çeşitliliği düşünüldüğünde, MT'lerin öncelikli rolünün metal detoksifikasyonu olmadığı fikri öne sürülmüştür (Karin, 1985). Hücrede metalleri



sekestere eden MT'ler, ihtiyacı olan apoenzimlere metal iyonlarını taşımaktadır. MT'ler aracılığıyla Zn iyonlarının taşınması ile, Zn'ye ihtiyaç duyan apoenzimlerin reaktivasyonu kanıtlanmıştır (Udom ve Brady, 1980). Benzer bir başka durum *Nuerospora crassa*'da MT'lerle Cu ihtiyacı olan apoenzimlere Cu taşınmasıdır (Beltramini ve Lerch, 1982; Jabeen ve diğ., 2009).

Bitki MT genlerinin ekspresyonu çok iyi çalışılmıştır. Bitkilerdeki MT'ler MT1, MT2, MT3, MT4 olmak üzere 4 alt aileye ayrılmaktadır. Bunların her biri, gelişme süresince bitki dokularında farklı ekspresyonlara ve fonksiyonlara sahiptir (Cobbett ve Goldsbrough, 2002). Cd, Cu ve Zn'ye maruz kalan *A. thaliana* ve kavak gibi akümülatör olmayan bitkilerde MT1a ve MT1b köklerde yüksek seviyelerde eksprese edilmektedir (García-Hernández ve diğ., 1988; Zhou ve Goldsbrough, 1994; Kohler ve diğ., 2004). Buna karşın Cu'ya maruz kalan hiperakümülatör *T. caerulea*'de MT1 mRNA seviyesi, köklerden daha fazla yapraklarda artış göstermektedir (Roosens ve diğ., 2005). *A. halleri* ve *T. caerulea*'de MT2 ekspresyonu, Cu'ya toleranslı bitkiler *Silene paradoxa* ve *Silene vulgaris*'deki gibi yüksektir (van Hoof ve diğ., 2001; Mengoni ve diğ., 2003; Roosens ve diğ., 2005; Chiang ve diğ., 2006; van de Mortel ve diğ., 2006). MT2b'nin aşırı ekspresyonu Cu toleransı ile ilişkilidir (Schat ve diğ., 1996). MT3 genlerinin ekspresyonu, Cu'ya maruz kalan akümülatör olmayan bitkilerde artmaktadır (Guo ve diğ., 2003; Kohler ve diğ., 2004; Roosens ve diğ., 2004). Cd uygulaması yapılan hiperakümülatör *T. caerulea*'de de, bu genin ekspresyonunda artış görülmüştür. *S. cerevisiae*'de yapılan fonksiyonel çalışmalar, *TcMT3*'ün Cd'den ziyade Cu'ya daha fazla tolerans gösterilmesine katıldığını işaret etmektedir. *TcMT3* sitoplazmada yüksek miktarda Cd ve Zn bulunması durumunda, normal Cu homeostazisinin korunmasında rol oynamaktadır. MT4, *A. thaliana* tohumlarında oldukça fazla eksprese edilmektedir (Guo ve diğ., 2003; Maestri ve diğ., 2010). Bu gen metal kontaminasyonundan ziyade tohum gelişimi ve çimlenmesi sürecinde metal homeostazisinin sağlanmasında görev almaktadır.

MT genlerinin eksprese edildiği transgenik bitkilerde genellikle metal toleransında artış görülmektedir (Zimeri ve diğ., 2005; Zhigang ve diğ., 2006). *S. vulgaris*'deki MThis geni transgenik tütünde eksprese edildiğinde, kökler ve gövdelerde Cd akümülyasyonunda artış rapor edilmiştir (Gorinova ve diğ., 2007; Maestri ve diğ., 2010).

Benzer olarak, *A. thaliana*'da bezelye MT geninin aşırı ekspresyonu ile Cu akümüülasyonunda artış tespit edilmiştir (Pan ve diğ., 1994; Jabeen ve diğ., 2009).

### 2.2.2.3. Organik Asitler ve Amino Asitler

Sitrat, malat ve histidin benzeri karboksilik asitler ve amino asitler ağır metaller için potansiyel liganlardır. Bu ligantlar, ağır metal toleransı ve detoksifikasyonunda rol oynamaktadır (Rauser, 1999; Clemens, 2001). Metale maruz kalma ve asit üretim miktarı arasındaki ilişki, ağır metal toleransına katıldıklarını açık bir şekilde göstermektedir. Örneğin, Ni'ye maruz kalan Ni hiperakümülatör bitki *Alyssum lesbiacum*'da ksilem özsuğunun histidin içeriğinin 36 kat arttığı rapor edilmiştir (Kramer ve diğ., 1996). Bununla birlikte histidin miktarı akümülatör olmayan türlerde büyük ölçüde Ni toleransını ve Ni'nin gövdeye taşınmasını artırmıştır. Ancak bir başka Ni hiperakümülatör olan *Thlaspi goesingense*'de yapılan çalışmalar histidin yanıtının, Ni tolerans mekanizmasında yaygın olmayabileceğini göstermektedir (Persans ve diğ., 1999; Hall, 2002).

Histidin (His), hiperakümüülasyonda yer alan serbest bir amino asit olarak önem taşımaktadır (Haydon ve Cobbett, 2007). Hiperakümülatörlerin köklerinde yüksek konsantrasyonda bulunan His, Ni, Zn ve Cd ile stabil kompleksler oluşturmaktadır. Hiperakümülatör *Alyssum lesbiacum*'da His konsantrasyonu Ni uygulamasıyla artmakta; fakat biyosentez yolundaki genler teşvik edilmemektedir (Persans ve diğ., 1999; Ingle ve diğ., 2005). His biyosentez yolunun ilk enzimi olan ATP-fosforiboziltransferazın ekspresyonu, *A. lesbiacum*'da akümülatör olmayan *Alyssum montanum*'a göre daha fazladır. Aynı genin transgenik *A. thaliana*'da aşırı ekspresyonu toleransı artırırken, akümüülasyonu değiştirmemiştir (Ingle ve diğ., 2005). Hiperakümülatör bitkilerde kökler şelasyon için büyük bir His havuzuna sahiptir. *T. caerulescens*'in köklerinde yüksek konsantrasyonda His bulunması, kök hücrelerinin sitoplazmasında oluşan Ni-His kompleksinin vakuolde Ni'nin sekestrasyonunu azalttığını ortaya koymaktadır. Akümülatör olmayan *T. arvense* kıyasla *T. caerulescens*'de ksilem özsuğuna yüksek oranda Ni yüklemesi bu şekilde açıklanabilmektedir (Richau ve diğ., 2009; Maestri ve diğ., 2010). Şimdiye kadar *Thlaspi* ve *A. halleri*'de His biyosentetik genlerinin artan ekspresyonu bulunamamıştır.

Organik asitler gibi küçük ligantlar, detoksifikasyon faktörleri olarak önemli bir role sahiptir. Bu ligantlar, sitoplazmada serbest iyonlar halinde bulunan ağır metallerin kalıcılığını önlemede yardımcı olabilmekte ve metal-organik asit şelatlarının öncelikle yerleştiği vakuollerde sekestrasyonu artırmaktadır. Örneğin sitrat, *T. goesingense*'nin yapraklarında başlıca Ni ligantı iken (Kramer ve diğ., 2000), *S. nigrum*'un yapraklarında Cd'yi bağlamaktadır (Sun ve diğ., 2006). Ayrıca *A. halleri*'de Zn'nin, *T. caerulescens*'de ise Cd'nin, en fazla malatla kompleks oluşturduğu tespit edilmiştir (Salt ve diğ., 1999; Sarret ve diğ., 2002; Rascio ve Izzo, 2011).

Protein olmayan amino asit nikotinamin (NA)'ın metal akümülyasyonundaki rolü üzerine yapılan çalışmalarda, *T. caerulescens* ve *A. halleri* ile *A. thaliana* ve *Zea mays* L. kullanılmıştır. Molekül ağırlığı küçük olan NA, 4 tane NA sentez geni (*NASI-4*) içeren bir yol aracılığıyla enzimatik olarak sentez edilmektedir. NA'nın Fe, Cu ve Zn'nin uzun mesafe taşınmasına katıldığı ortaya konmuştur (Stephan ve Scholz, 1993; Wintz ve diğ., 2003). NA'nın vaskular dokulardan yapraklara Fe yüklenmesiyle ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (Wintz ve diğ., 2003; Haydon ve Cobbett, 2007; Maestri ve diğ., 2010).

### 2.2.3. Metal Alış Verişi

Bitkilerde ağır metal detoksifikasyonu ve toleransı sürecinde, membran taşıma sistemleri merkezi rol oynamaktadır. Moleküler genetik tekniklerin uygulandığı çalışmalarda, metal taşınmasına katılan gen aileleri tanımlanmıştır. Bu gen aileleri, ağır metal ATPazlar, doğal dirençle ilişkili makrofaj proteinler, katyon difüzyon kolaylaştırıcılar, çinko-demir permeazlar ve katyon zıt-taşıyıcıları kapsamaktadır.

#### 2.2.3.1. Hücre içi sekestrasyon

Metal iyonları bitki hücrelerinde aşırı miktarda biriktiğinde, sitozolden uzaklaştırılmaları gerekmektedir. Sitozolden uzaklaştırma, genellikle dışa akış ya da bölümlendirme yoluyla gerçekleşmektedir. Bitki hücresindeki toksik bileşenler için ana depolama organeli vakuoldür. ATPaz (ATP tarafından desteklenen) ve PPaz (PPI tarafından desteklenen) olarak adlandırılan vakuolar proton pompaları, birçok çözünenin vakuolar alımı için enerji sağlamaktadır. Bu pompalar tarafından oluşturulan proton itici gücü, pH gradiyenti ve oldukça küçük bir tonoplast potansiyeli

yaratmaktadır (Walker ve diğ., 1996; Pottosin ve diğ., 2007). Proton itici gücü, şekerler ve aminoasitler gibi organik maddeler ile  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{+2}$  ve  $NO_3^-$  gibi mineralleri tonoplast boyunca taşıyan sekonder taşıyıcılar için enerji sağlamaktadır. Tüm bitki iyon kanalları arasında ilk ve en iyi karakterizasyon, tonoplast taşıyıcılar için yapılmıştır (Hedrich ve diğ., 1987; Barkla ve diğ., 1996; Isayenkov ve diğ., 2010). Yapılan çalışmalarda katyon kanallarının,  $K^+$ 'ya seçici,  $Ca^{+2}$ 'ye geçirgen ve seçicilik göstermeyen kanalları içerdiği bulunmuştur. Anyon kanallarıyla ilgili olarak da, malate,  $Cl^-$  ve  $NO_3^-$ 'e geçirgen oldukları ortaya konmuştur. Tonoplastta birçok iyon için birden fazla primer ya da sekonder taşıyıcı bulunmaktadır (Martinoia ve diğ., 2000; Gasic ve Korban, 2006).

Metallerin vakuolde bölümlendirilmesi üzerine birçok çalışma bulunmaktadır (Vazquez ve diğ., 1994; Kupper ve diğ., 1999; Jabeen, 2009). Cd ile kirlenmiş topraklarda büyüyen *Brassica napus*'da, Cd'nin öncelikli olarak vakuol ve hücre duvarında depolandığını ve böylece yapraklardaki Cd toksisitesinin azaldığını göstermiştir (Carrier ve diğ. 2003; Gasic ve Korban, 2006). Metal detoksifikasyonu ve bitki toleransı açısından önemli olan bu süreç, sitozoldeki serbest metal iyonları konsantrasyonunu engellemekte ve onları sınırlı bir alan içinde tutmaktadır (Tong ve diğ., 2004; Jabeen ve diğ., 2009).

#### 2.2.3.2. Şaperonlar

Çözünen metal reseptör proteinlerin bir ailesi olan metalloşaperonlar, hücre içi metal alışverişinde aktiftir. Bu metal reseptörler, "şaperon-benzeri" işlevde buldukları için detoksifikasyon proteinleri değildir. Metallerin uygun reseptörlere teslimatını yaptıkları için metal iyonlarına rehberlik ederek korunmasını sağlamaktadırlar.

Prokaryotik organizmalar ve mayalarda yapılan genetik çalışmalarla, Cu'nun hücrelerde ihracına ya da alımına aracılık eden membranla ilişkili proteinler tanımlanmıştır. Hücre içinde Cu şaperonlar olarak tanımlanan küçük sitozolik proteinler bulunmuştur. Bu şaperonlar Cu iyonlarını bağlamakta, özel hücresel bölümlere ve Cu'ya ihtiyaç duyan proteinlere ihraç etmektedir (Peña ve diğ., 1999; Gasic ve Korban, 2006).

Bitkilerde *Arabidopsis*'de CCH (Himmelblau ve diğ., 1998), CCS (Wintz ve Vulpe, 2002) ve AtCOX17'nin (Balandin ve Castresana, 2000), domateste CCS ve LYS7'nin (Zhu ve diğ., 2000; Gasic ve Korban, 2006) dahil olduğu Cu şaperon ailesinin farklı üyeleri tanımlanmıştır.

*A. thaliana*'da tanımlanan Cu şaperon (CCH) ve antagonist 1'e duyarlılık (RAN1), bitki hücrelerinde tanımlanan ilk Cu ihraç sistemidir (Himmelblau ve Amasino, 2000). CCH, senesense uğrayan dokularda artmakta (Himmelblau ve diğ., 1998) ve Cu'nun bu dokulardan floem aracılığıyla uzun mesafede taşınmasına katılmaktadır (Mira ve diğ., 2001; Gasic ve Korban, 2006). RAN1'de post-Golgi vesiküllerindeki etilen reseptörlerine Cu ihraç etmektedir (Hirayama ve diğ., 1999; Hall ve Williams, 2003). Wintz ve Vulpe (2002) CCS tarafından kodlanan proteinin bir kloroplast proteini olduğunu ve kloroplast Cu/Zn süperoksit dismutaz apoproteini olgunlaşmasına katıldığını rapor etmiştir. COX17'nin *Arabidopsis*'de AtCOX17-1 ve AtCOX17-2 olarak adlandırılan 2 homoloğu bulunmuştur. COX17 proteinleri ağırlıklı olarak köklerde eksprese olmaktadır. Bu nedenle, fonksiyonlarının Cu'nun mitokondriye ihracı ile sınırlandırıldığı, fakat köklerde Cu taşınmasına katılabilecekleri düşünülmektedir.

### 2.2.3.3. Taşıyıcılar

**ABC-Tipi Aile:** ATP bağlayıcı kaset (ABC) protein üst ailesi, mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanları kapsayan organizmalarda bilinen en büyük membran protein ailesidir (Rea ve diğ., 1998; Rea, 1999; Davies ve Coleman, 2000; Theodoulou, 2000; Martinoia ve diğ., 2002). ABC proteinlerinin birçoğu, ATP hidrolizi ile çalışan pompalardır. Bu proteinler iyonlar, şekerler, lipidler, peptidler, pigmentler, ksenobiyotikler ve antibiyotikleri içeren çok çeşitli maddeleri taşımaktadır. Bugüne kadar bitkilerde bu ailenin iki büyük alt sınıfı tanımlanmıştır. Bunlar çoklu ilaç direnciyle ilişkili proteinler (MRP'ler) ve çoklu ilaç direnç proteinleri (MDR'ler)'dir. İlk ABC taşıyıcı olarak *Arabidopsis*'den MDR-benzeri gen klonlanmış olsa da bitkilerde sadece belli MRP'ler fonksiyonel olarak tanımlanmıştır (Rea ve diğ., 1998; Theodoulou, 2000; Hall ve Williams, 2003). Özellikle vakuolde glutatyon S-konjugatlarının taşınmasında rol aldıkları çok iyi bilinmektedir. ABC taşıyıcıların, glutatyon S-konjugat pompası oldukları ortaya konmuştur.

*Arabidopsis* ABC taşıyıcıların alt ailesi olan AtMRP'ler, çoklu ilaç-direnci ile ilişkili proteinlerin bitkideki homologudur. Bitki hücrelerinin vakuollerine madde taşınmasında görevli oldukları düşünülmektedir (Rea ve diğ., 1998; Rea, 1999). Cd'nin vakuolar sekestrasyonunda AtMRP'lerin rolü araştırılmıştır. AtMRP'leri kodlayan eksprese olmuş putativ dizilerin, kök ve gövdelerde farklı seviyelerde olduğu gözlenmiştir (Bovet ve diğ., 2003; Gasic ve Korban, 2006). Glutasyon ve fitokelatin sentezi için mutantlarla yapılan çalışmalar da, *AtMRP3*'ün ağır metaller tarafından teşvik edildiğini göstermektedir.

Yüksek bitkilerin tonoplastlarında yerleşen bir başka ABC taşıyıcı sınıfı, ID17 ve ortologlarıdır. Fe eksikliği ile teşvik edilen *IDI7* cDNA'sı, arpa köklerinden izole edilmiştir (Yamaguchi ve diğ., 2002; Gasic ve Korban, 2006). *IDI7* mRNA akümülyasyonu, Fe eksikliği koşullarına göre ağır metallerin yüksek konsantrasyonlarında daha az olduğu için vakuollerde metal iyonlarının sekestrasyonuna katılımlarının olmadığı düşünülmektedir.

**Ağır metal ATPazlar:** Ağır metal taşıyıcı P-tipi ATPazların 5 ana alt ailesini içeren *A. thaliana* bitkisi, P<sub>1B</sub> ATPaz alt ailesinin 8 üyesini içermektedir (Hussain ve diğ., 2004). Bu 8 üyenin 4 tanesi bilinen Cu (I) taşıyıcılar ile ilişkilidir. Geriye kalan 4 üye prokaryotlarda olduğu bilinen divalent katyon taşıyıcılarla yakından ilişkilidir. Bunların içindeki 3 üye ise birbiriyle yakın ilişkili bir grup oluşturmakta ve Zn (II) taşıyıcılar oldukları düşünülmektedir (Cobbett ve diğ., 2003; Gasic ve Korban, 2006).

Bu taşıyıcılardan HMA2, HMA3 ve HMA4 birbirleriyle yakın ilişki göstermektedir. Prokaryotların divalent metal katyon taşıyıcıları ile yüksek oranda dizi benzerliğine sahip oldukları bilinmektedir. Bu taşıyıcıların herbiri için *Arabidopsis* mutantları tanımlanarak, metal homeostazisindeki rolleri belirlenmiştir. Mutantlar bireysel olarak hiçbir belirgin fenotip sergilemezken, *hma2 hma4* çift mutantları besin eksikliği fenotipi göstermektedir. Bu mutantlarda görülen fenotip, büyüme ortamında Zn seviyesi arttırıldığında kurtarılmıştır. Cu ya da Co seviyeleri değiştirildiğinde ise, aynı yanıt alınamamıştır. *hma2 hma4* çift mutantının gövdesinde Zn'nin seviyesi azalmıştır. Bu azalma, yabani tipe göre *hma4* tekli mutantında daha azdır. Bununla birlikte yapılan gözlemler, HMA2 ve HMA4'ün temel Zn homeostazisinde başlıca rolleri olduğunu

göstermektedir. *HMA2* ve *HMA4* genlerinin ağırlıklı olarak kökler, gövdeler ve yaprakların vaskular dokularında eksprese edildikleri ve *HMA2*'nin plazma membranında yerleştiği ortaya konmuştur. *hma2* ve *hma4* mutasyonları, PC-eksik mutantlarda Cd duyarlılığının artmasında rol aldığı için Cd detoksifikasyonunu etkileyebilecekleri düşünülmektedir.

Cd ve Zn'nin yüksek konsantrasyonlarına maruz kalan hiperakümülatör bitkiler *T. caerulea* ve *A. halleri*'nin kök ve gövdelerinde HMA4 ekspresyonu artmaktadır (Mills ve diğ., 2003; Papoyan ve Kochian, 2004; Talke ve diğ., 2006; Hanikenne ve diğ., 2008). Bu bitkilere akraba, hiperakümülatör olmayan türlerde ise aynı durumda HMA4 ekspresyonu azalmaktadır (Papoyan ve Kochian, 2004). HMA4'ün aşırı ekspresyonu, köklerden ksileme Cd ve Zn akışında HMA4 proteininin rolünü desteklemektedir. *A. halleri* ile yapılan çalışmada, HMA4 geninin Cd ve Zn toleransına katıldığı ortaya konmuştur (Courbot ve diğ., 2007; Willems ve diğ., 2007; Willems ve diğ., 2010). HMA4 aktivitesinin, hiperakümülatör için aday olan diğer genleri pozitif etkilediği ortaya konmuştur. HMA4'ün artan ekspresyonu, ağır metal alımından sorumlu ZIP ailesine ait genlerin ekspresyonunu artırmaktadır (Hanikenne ve diğ., 2008; Rascio ve Izzo, 2011).

**CDF–Tipi Aile:** Katyon difüzyon kolaylaştırıcı (CDF) proteinler, metal homeostazisi ve toleransında önemli roller oynayan katyon dışı akış taşıyıcılar ailesine aittir. CDF'lerin bakteriler (Nies, 1992), maya (Borrelly ve diğ., 2002; Clemens ve diğ., 2002b), bitkiler ve hayvanlarda (Blaudez ve diğ., 2003; Gasic ve Korban, 2006)  $Zn^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$  ya da  $Co^{+2}$  iyonlarına tolerans gösterilmesinde rol aldığı bildirilmiştir.

Bitki CDF taşıyıcı geni ilk olarak *Arabidopsis*'de *ZAT* olarak belirlenmiş ve karakterize edilmiştir (van der Zaal ve diğ., 1999; Hall ve Williams, 2003). *ZAT*, bitki genelinde temel olarak eksprese edilmekte ve artan Zn konsantrasyonu tarafından teşvik edilmektedir. *A. thaliana* genomu, 3 farklı gruba ayrılan 12 tane putativ katyon dışı akış proteinini kodlamaktadır (Blaudez ve diğ., 2003). Grup I (AtMTP8-AtMTP11 ve AtMTP6, AtMTP7) ve Grup II (AtMTP5 ve AtMTP12) proteinleri, katyon dışı akış taşıyıcılarının bir kısım özelliklerini, Grup III (AtMTP1-AtMTP4) ise tüm temel katyon dışı akış taşıyıcı özelliklerini göstermektedir (Paulsen ve Saier, 1997). Birçok katyon

dışa akış proteini metal toleransına katılmaktadır. Örneğin *Arabidopsis*'in ZAT geni aşırı eksprese edildiğinde  $Zn^{+2}$  toleransı görülmektedir (van der Zaal ve diğ., 1999). Artan toleransın,  $Zn^{+2}$ 'nin hücre içi sekestrasyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Kobae ve diğ., 2004; Desbrosses-Fonrouge ve diğ., 2005; Lang ve diğ., 2011).

Zn hipeakümülatör *Thlaspi caerulescens*'de ZAT geni olan *ZTP1* tanımlanmıştır (Assunção ve diğ., 2001). Özellikle yapraklarda eksprese olan bu genin ekspresyonu köklerde de görülmektedir. Zn, Cd ve Pb açısından zengin topraklardaki bitkiler, Ni açısından zengin topraklar ya da metalden yoksun topraklardaki bitkilere göre bu geni daha fazla eksprese etmektedir. Bu bitkilerin birçoğu Zn'ye karşı toleranslıdır. Bu nedenle, *ZTP1/ZAT*-benzeri taşıyıcıların Zn'nin hücre içi bölümlendirilmesi ve toleransında rol aldıkları düşünülmektedir (van der Zaal ve diğ., 1999; Assunção ve diğ., 2001). Persan ve diğ. (2001) bir başka hiperakümülatör *T. goesingense*'de gövde vakuollerine metal iyonlarının akümülyasyonundan sorumlu olan CDF taşıyıcı *TgMTP1*'i karakterize etmiştir. *TgMTP1*'in, *TgMTP1t1* ve *TgMTP1t2* olmak üzere iki farklı transkripti bulunmaktadır. Mayada yapılan ekspresyon çalışmaları, *TgMTP1t1*'in Cd, Co ve Zn'ye, *TgMTP1t2*'in ise Ni'ye tolerans sağladığını göstermektedir. *T. goesingense*'de akümülatör olmayan türe göre bu iki gen oldukça fazla eksprese olmaktadır (Persans ve diğ., 2001; Hall ve Williams, 2003).

CDF ailesinin bir üyesi olan *PtdMTP1*, hibrid kavak bitkisinde tanımlanmıştır (Blaudez ve diğ. 2003; Gasic ve Korban, 2006). *PtdMTP1* yapısal ve yaygın olarak düşük seviyelerde eksprese olmaktadır. *PtdMTP1*'in mayada eksprese edilmesiyle, Zn'ye aşırı duyarlı olan mutantı tamamlayıcı yeteneği gösterilmiştir. Maya ve bitki hücrelerinde, yeşil floresan protein (GFP) içine kaynaşmış *PtdMTP1* vakuolar membrana yerleşmiştir. Bu çalışma, *PtdMTP1*'in Zn sekestrasyonuna katıldığını desteklemiştir. *Arabidopsis*'de *PtdMTP1*'in aşırı ekspresyonu, Zn toleransında görülmektedir.

Yüksek oranda  $Mn^{+2}$  içeren asidik topraklarda büyüyen tropikal bitki *Stylosanthes hamata*'da bir başka CDF taşıyıcısı *ShMTP1* tanımlanmıştır (Delhaize ve diğ., 2003; Hall ve Williams, 2003). *ShMTP1* maya ve *Arabidopsis*'de eksprese edildiğinde,  $Mn^{+2}$ 'ye karşı tolerans sağlamakta ve muhtemelen proton/ $Mn^{+2}$  antiportör (zıttadır)



olarak işlev görmektedir (Delhaize ve diğ., 2003; Hall ve Williams, 2003; Gasic ve Korban, 2006). GFP içine kaynaşmış ShMTP1 proteininin *Arabidopsis* hücrelerinin tonoplastında, mayanın ise endoplazmik retikulumunda yerleştiği görülmektedir. Ayrıca katyon dışı akış proteinlerine (ShMTP8 ve AtMTP11) ait belli bir filogenetik grubun, sitoplazmadan Mn'nin ihracında işlevsel oldukları ortaya konmuştur (Delhaize ve diğ., 2003).

**Katyon/H<sup>+</sup> Antiportırlar:** Bitki tonoplastı bir dizi katyon/H<sup>+</sup> antiportır içermektedir. Bu taşıyıcılar, vakuole taşıma yoluyla özellikle sitozolik Ca<sup>+2</sup> ve Na<sup>+</sup> konsantrasyonlarının düzenlenmesine katılmaktadır (Hirschi, 2001; Maeshima, 2001; Gaxiola ve diğ., 2002). *Arabidopsis*'den CAX1 ve CAX2 adı verilen 2 adet gen klonlanmış ve sırasıyla yüksek ve düşük verimlilikte Ca<sup>+2</sup>/H<sup>+</sup> değiştiriciler oldukları gösterilmiştir (Hirschi ve diğ., 2000). Taşımayla ilgili yapılan ilk çalışmalarda, Cd<sup>+2</sup>/H<sup>+</sup> antiportırların vakuolde Cd<sup>+2</sup> akümülyasyonuna katılabilecekleri ve bunda CAX2'nin rol aldığı ortaya konmuştur (Salt ve Wagner, 1993, Hirschi ve diğ., 2000). Mayada CAX2'nin eksprese edilmesi, Ca<sup>+2</sup> ve Mn<sup>+2</sup>'den dolayı ortaya çıkan büyüme bozukluklarını bastırmaktadır. Ayrıca CAX2'nin tütün bitkilerinde ekspresyonu, daha fazla Ca<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup> ve Mn<sup>+2</sup> akümülyasyonunu, kök tonoplast veziküllerinde ise Cd<sup>+2</sup> ve Mn<sup>+2</sup> taşınımının artmasını sağlamaktadır (Hirschi ve diğ., 2000; Hall ve Williams, 2003).

**Diğer Taşıyıcılar:** Magnezyum taşıyıcılar, geçiş metal taşıyıcılarına dahil olabilmektedir. Shaul ve diğ. (1999) *A. thaliana*'dan AtMHX adını verdikleri taşıyıcıyı klonlamıştır. Bu taşıyıcı vakuolar membranda lokalize olmakta ve Mg<sup>+2</sup> ya da Zn<sup>+2</sup> ile H<sup>+</sup> yerdeğiştirici olarak işlev görmektedir. Li ve diğ. (2001), *Arabidopsis*'de bir başka Mg<sup>+2</sup> taşıyıcı gen ailesi tanımlanmıştır (Hall ve Williams, 2003). *AtMGT* gen ailesi putativ Mg<sup>+2</sup> taşıyıcıları kodlayan 10 üyeye sahiptir. Plazma membranında yerleşen bu proteinlerden biri olan AtMGT1 en yüksek affiniteyi Mg<sup>+2</sup> için göstermektedir. Fakat bazı veriler, Ni<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Fe<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup> ve Cu<sup>+2</sup>, nun yüksek konsantrasyonlarına gerek duyulmasına rağmen taşınabildiklerini ortaya koymuştur (Li ve diğ., 2001; Hall ve Williams, 2003).

Çoklu ilaç direnci dışı akış taşıyıcıları bakterilerde tanımlanmış ve MATE (çoklu ilaç ve toksik bileşikler ekstrüzyon) ailesi olarak isimlendirilmiştir (Brown ve diğ., 1999; Morita ve diğ., 2000). MATE ailesi, hiperakümülatör bitkilerde ağır metal translokasyonunda aktif olan taşıyıcı proteinlerin başka bir türüdür. Bu aile ile sınırlı bir homoloji gösteren bir klon *Arabidopsis*'de tanımlanmış ve bu protein AtDTX1 (*Arabidopsis thaliana* Detoksifikasyon 1) olarak adlandırılmıştır (Li ve diğ., 2002). MATE ailesi, diğer organizmalara göre *Arabidopsis*'de en az 56 üyesi olan büyük bir gruptur (Li ve diğ., 2002; Rogers ve Guerinot, 2002). Bakteri mutanti kullanılarak AtDTX1'in fonksiyonel analizi yapılmıştır. Plazma membranında yerleşik bu protein, toksik bileşiklerin bir dizisi için taşıyıcı olarak görev yapmakta ve  $Cd^{+2}$ 'yi detoksifiye etme yeteneği bulunmaktadır (Li ve diğ., 2002; Hall ve Williams, 2003). MATE ailesinin bir üyesini kodlayan gen FDR3, *T. caerulea* ve *A. halleri*'nin köklerinde aşırı eksprese edilmektedir (Talke ve diğ., 2006; van de Mortel, 2006). FDR3 proteini genellikle Fe homeostazisi ve taşınmasında ihtiyaç duyulan bir ligant olarak sitratın ksileme akışında görevlidir (Durrett ve diğ., 2007). Bu proteinin hiperakümülatörlerde aşırı ekspresyonu, FDR3'ün Zn gibi diğer metallerin translokasyonunda da rol alabileceğini düşündürmektedir (Krämer ve diğ., 2007; Rascio ve Izzo, 2011).

Putativ Cu taşıyıcılar ailesinin 5 üyesi (*COPT1-5*) *Arabidopsis*'de tanımlanmıştır (Hall ve Williams, 2003; Sancenon ve diğ., 2003; Guerra ve diğ., 2009). *COPT4* haricinde bu taşıyıcılar, genel olarak yapraklar ve gövdelerde köklere göre daha fazla eksprese edilmektedir. *COPT1*, 2, 3 ve 5 genleri Cu taşıması kusurlu negatif maya mutantında eksprese edildiğinde, tamamlama ve Cu taşıma aktivitesinde fonksiyonel olarak başarılıdır. Mayada *COPT1*'in ekspresyonu, Cu toksisitesine karşı duyarlılığın artması ile ilişkilidir (Kampfenkel ve diğ., 1995). Ayrıca *COPT1*, mayada düşük affiniteyle Cu taşıyıcısı olan *CTR2* ile yüksek bir dizi benzerliği göstermektedir. Her ikisinde ökaryotik bakır taşıyıcılar (CTR) ailesinin üyesidir (Eide, 1998; Van Ho ve diğ., 2002; Hall ve Williams, 2003).

Bir başka taşıyıcı olan YSL (Sarı Çizgi- Benzeri) ailesi üyeleri, nikotinamin-metal şelatlarının ksileme yüklenmesine ve boşaltılmasına aracılık etmektedir. Bu ailenin üyelerinin, ağır metal translokasyonuna katıldıklarına dair çalışmalar vardır (Colangelo ve Guerinot, 2006; Gendre ve diğ., 2007; Rascio ve Izzo, 2011).

### 2.3. BİTKİLERDE AĞIR METAL METABOLİZMASI İLE İLİŞKİLİ GENLERİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Geçmiş yıllardan bu yana gen ekspresyonu hakkında bilgi sahibi olmak için çeşitli teknikler kullanılmaktadır. RNA blot, nokta blot, yarı kantatif ve kantatif ters yazılım polimeraz zincir reaksiyon yöntemleriyle tek bir genin ekspresyonuna bakılırken, çıkarımlı hibridizasyon, farkımsal gösterim, seri gen ekspresyon analizleri, eksprese olan gen parçalarının DNA dizilerinin belirlenmesi gibi tekniklerle birçok genin aynı anda farklı koşullarda ekspresyonları incelenebilmektedir (Şahin-Çevik, 2005). Tüm bu yöntemlerin yanısıra, son zamanlarda kullanılan cDNA mikroarray tekniği, aynı anda binlerce genin ekspresyon seviyelerinin çalışılmasını sağlayan yeni ve güçlü bir teknolojidir. Mikroarray, DNA'ların çipler, küçük cam slayt ya da naylon membran üzerinde hibridizasyonu, genlerin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle, hücre ve dokuların gen ekspresyon profillerindeki değişiklikler incelenmektedir. Böylece önemli metabolik yolların moleküler temelini anlaşılması ve genlerin fonksiyonlarının başarıyla açıklanması sağlanabilecektir (Ma ve diğ., 2001). Örnek olarak, *Arabidopsis*'de kuraklık ve soğuk stresi (Seki ve diğ., 2001; Lee ve Lee, 2003), pirinçte tuz stresi çalışmaları bu tür araştırmalar arasındadır (Kawasaki ve diğ., 2001; Liu ve diğ., 2009).

Bitkide ağır metal metabolizmasında görevli moleküler mekanizmaların aydınlatılması için kullanılan *Brassica juncea* gibi pek çok bitki türünün, ticari olarak mikroarray platformunda temsilcisi bulunmamaktadır. Bu bitkilerde çalışılmak istenen diziler hakkında yeterli genomik veri bulunmadığı için aynı tür içindeki hibridizasyon (TİH) deneyleri mümkün olmamakta ve bu nedenle türler arası hibridizasyona başvurulmaktadır. Türler arası hibridizasyon (TAH), bir türün RNA'sının (hedef) mikroarray probu olarak kullanılan başka bir türle (referans) hibritleşmesidir. TİH verileri her zaman için geçerli biyolojik sonuçları desteklemese de (Draghici ve diğ., 2006; Shields, 2006), hala DNA mikroarray analizlerinde standart kullanım olarak kabul edilmektedir. TAH sonuçlarının TİH ile uyumluluğu ve TAH verilerinin güvenilirliği açısından bazı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan birinde, 8 tane *Solanum tuberosum* (patates) RNA örneği, *Lycopersicon esculentum* (domates) ve patates cDNA mikroarrayleri ile hibridize edilmiştir. Elde edilen mikroarray verilerinin

değerlendirilmesi sonucunda, TAH kullanımı yanlış sonuçlar verebilmesine rağmen, TİH sonuçlarını doğru yansıttığı için umut vaat eden bir yaklaşım olarak görülmektedir (Bar-Or ve diğ., 2007). TAH son zamanlarda birçok bitki türünün transkriptom analizinde kullanılan popüler bir araç olmuştur (Brodsky ve diğ., 2005; Grigoryev ve diğ., 2005; Bar-Or ve diğ., 2007). Örneğin, *Brassica napus* ile bitki patojeni *Sclerotinia sclerotiorum* arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalarda *Arabidopsis* mikroarrayleri kullanılmıştır (Liu ve diğ., 2005; Yang ve diğ., 2007).

TAH performansı, mikroarray analizinde kullanılan prob dizileri ile hedef dizileri arasındaki uyumluluk derecesine bağlıdır. Prob dizisi; 1) Hedef tür transkripti ile birebir uyum gösterebilir, 2) Hedef tür transkripti ile düşük seviyede uyum gösterebilir, 3) Hedef türün birden fazla transkripti ile uyum gösterebilir (çapraz hibridizasyon), 4) Hedef türün hiçbir transkripti ile uyum göstermeyebilir. Prob ve transkript arasındaki uyum varyasyonları, TAH süresince önemli bir role sahiptir ve biyolojik sonuçlarda sapmalar gözlenebilmektedir.

TAH'da problemler ve transkript dizileri arasındaki uyumun az olmasının olası sonuçlarından biri, belirli bir noktada hibridize olan transkript sayısının azalmasıdır. Bu nedenle, hibridizasyon sinyalinde de bir azalma beklenebilmektedir. Çeşitli çalışmalarla gen ekspresyon profillerindeki sinyal azalmasının TAH'dan kaynaklandığı gösterilmiştir (Renn ve diğ., 2004; Bar-Or, 2006). Buna ek olarak, önemli derecede düzenlenen genlerin sayılarındaki azalmaya yol açan sinyal düşüklüğü, standart istatistiksel testler yapılarak kanıtlanmıştır (Renn ve diğ., 2004; Gilad ve diğ., 2005; Moore ve diğ., 2005; Nowrousian ve diğ., 2005).

Çapraz hibridizasyonun, farklı mikroarray platformları arasında gen ekspresyonlarında görülen tutarsızlığın ana nedenlerinden birisi olduğu düşünülmektedir (Evertsz ve diğ., 2001; Xu ve diğ., 2001; Miller ve diğ., 2002; Draghici ve diğ., 2005). TAH'da problemler ve transkriptler arasındaki dizi benzerliğinin göreceli olarak düşük olması nedeniyle, birçok probun çapraz hibridizasyon gösterdiği düşünülmektedir. Örneğin Bar-Or ve diğ. (2007), tüm patates genleri ile domates mikroarray problemlerini BLAST algoritması kullanarak karşılaştırmış ve patates genlerinin sadece %16'sının domates problemleriyle

dizi benzerliği gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu durum, TAH sonuçlarında tutarsızlığa yol açmaktadır.

TAH'da sinyal azalması ve çapraz hibridizasyon, tekrar edilemeyen ve stabil olmayan sonuçlara yol açabilmektedir. Bunun yanısıra TAH sonuçlarının tekrarlanabilirliği açısından pek çok çalışma yapılmış ve sonuçların tekrarlanabilir olduğu bulunmuştur (Bar-Or ve diğ., 2006; Bar-Or ve diğ., 2007).

## 2.4. FİTOREMEDİASYON

Günümüzde antropojenik uygulamaların artmasıyla birlikte ağır metaller gibi kirleticiler evre kirliliğine yol açmaktadır. Bu kirleticilerin ekoloji ve insan sağlığı açısından oluşturduğu tehlikelerin önlenmesi için birçok remediasyon (iyileştirme) teknolojisi geliştirilmiştir. Ancak, geliştirilen teknolojilerin maliyet açısından yüksek olması ve arıtma sonucunda oluşan diğer kirletici formların tamamen giderilememesi, fitoremediasyon gibi alternatif teknolojilerin ortaya çıkmasına neden olmuştur.

Fitoremediasyon, toprak, su ya da havada bulunan kirleticilerin bitkiler kullanılarak ortadan kaldırılmasıdır. Biyolojik bazlı, düşük maliyetli, umut vaat eden, evre dostu bu teknoloji son zamanlarda oldukça önem kazanmıştır. Fitoremediasyon; fitoekstraksiyon, fitostabilizasyon, rizofiltrasyon ve fitovolatilizasyon gibi alt başlıklar içermektedir (Eapen ve D'Souza, 2005). Fitoekstraksiyon, topraktaki metalleri toprak üşü kısımlarına taşıyabilen ve biriktirebilen metal akümüle edici bitkilerin kullanılmasıdır. Rizofiltrasyon, kirlenmiş bölgelerdeki toksik metallerin absorplanması, birikimi ve/veya çökmesi için bitki köklerinin kullanılmasını amaçlamaktadır. Fitostabilizasyonda, bitkiler topraktaki kirleticileri zararsız hale getirerek stabilize etmektedir. Fitovolatilizasyon ise, civa vb. uçucu metallerin topraktan kaldırılması ve yapraktan buharlaşmasını kapsamaktadır. Kontamine olmuş toprakların bitkilerle temizlenmesi sırasında çevreye verilen zarar minimum düzeydedir. Bu remediasyon tekniği, toprağın biyolojik özelliklerini ve fiziksel yapısını korumaktadır (Khan ve diğ., 2000). Toprakta en derin bölgeye ulaşmak, yayılmak ve büyük bir alan kaplamak için geniş bir kök sistemine sahip olan bitkiler, toprakta ve suda bulunan elementleri ortadan kaldırma ve biriktirme işlemini yerine getirmektedir. Metalleri depo eden bitkiler hasat edilerek,

toksik atıklar için ayrılmış alanlara gömülmekte ya da biriken metaller geri kazanılmaktadır. Fitoremediasyonun faydalarının pek çok alanda gösterilmesi, birçok çevresel kuruluş tarafından bu teknolojinin kullanılmasına yol açacaktır (Eapen ve D'Souza, 2005). Günümüzde klasik metodlar ya da transgenik teknolojiler kullanılarak bitkilerin fitoremediasyon uygulamaları için geliştirilmesi, birçok kuruluşun fitoremediasyon teknolojisine gösterdiği talebi arttıracaktır.

Bitkiler rizosferlerindeki yüksek kirletici konsantrasyonlarını akümüle ya da tolere eden temel mekanizmalara sahiptir. Yüksek konsantrasyonda metal içeren topraklar, farklı bitki türleri üzerinde değişik etkiler göstermektedir. Brassicaceae familyası (*Brassica juncea* gibi), Violaceae familyası (*Viola calaminaria* gibi) ve Leguminosae familyasına (*Astragalus racemosus* gibi) ait olan bazı bitki türlerinin, ağır metallerin yüksek konsantrasyonlarını bünyelerine alabildikleri bilinmektedir (Eapen ve D'Souza, 2005). Bununla birlikte bitkilerin birçoğunun remediasyon potansiyeli, yavaş büyümelerinden ve düşük biyokütlelerinden dolayı sınırlanmaktadır. Fitoremediasyon için kullanılan ideal bitkiler, yüksek biyokütle, derin kök sistemi, hızlı büyüyebilme özellikleri ile toprak üstü hasat edilebilen kısımlarında ağır metalleri akümüle ve tolere edebilme yeteneğine sahip olmalıdır (Lang ve diğ., 2005b). Buradan yola çıkarak, hızlı büyüyen ve yüksek biyokütleyle sahip akümülatör olmayan bitkilerin, genetik mühendisliği aracılığıyla akümülatör bitkilerin bazı özelliklerini taşımaları tasarlanabilir (Clemens ve diğ., 2002b). Bu amaca ulaşmak için, metal akümülasyonu ve toleransının moleküler mekanizmasındaki anahtar noktaların tanımlanması gerekmektedir.

Fitoremediasyon birçok farklı alanda araştırmaların geliştirilmesinde yarar sağlayacak disiplinler arası teknolojidir. Bitkilerdeki detoksifikasyon ve akümülasyon mekanizmaları hakkındaki bilgilerin artması, remediasyon için uygun transgenik ya da transgenik olmayan bitkilerin geliştirilmesine yol açmaktadır (Hassinen ve diğ., 2009). Transgenik bitkiler metallerin şelasyonu, asimilasyonu ve membrandan taşınmasında rol oynayabilecek rekombinant proteinlerin aşırı üretimi için tasarlanmaktadır. Sitrat, fitokelatinler, metalotiyoninler, fitosideroforlar gibi metal şelatlayıcı maddelerin aşırı üretimi ya da metal taşıyıcı proteinlerin aşırı ekspresyonu ile metal toleransı ve akümülasyonunun artırılması sağlanmaktadır.

## 2.5. *BRASSICA JUNCEA*-METAL AKÜMÜLASYONUNDA MODEL BİTKİ

Brassicaceae familyası birçok metal akümüle eden türe sahiptir (Broadley ve diğ., 2001). Bu türlerden biri olan *Brassica juncea* (kahverengi hardal) belli ağır metalleri hiperakümüle ettiği bilinen, gelişmiş kök sistemine sahip bir kara bitkisidir. Bu bitki Pb, Cd, Cr, Cu, Zn ve U (uranyum) gibi ağır metalleri akümüle etme ve toprak üstündeki organlarına taşıma yeteneği göstermektedir (Duquene ve diğ., 2009; Das ve diğ., 2011). Hızlı büyüme ve yüksek biyokütle üretme özellikleri nedeniyle, fitoremediasyon uygulamalarında *Thlaspi* gibi ‘model’ hiperakümülatörlere kıyasla daha fazla kullanılmaktadır (Blaylock ve Huang 1999; Wu ve diğ., 2004; Chang ve diğ., 2005; Milner ve Kochian, 2008; Das ve diğ., 2011; Seth ve diğ., 2011).

*Brassica juncea* çeşitli deneysel koşullarda Pb ve Cd’nin önemli miktarlarını bünyesine alabilmektedir (Dushenkov ve diğ., 1995; Kumar ve diğ., 1995; Salt ve diğ., 1997; Vassil ve diğ., 1998; Jiang ve diğ., 2000). Pb gibi toksik metalleri tercihen kök sisteminde akümüle etmesine karşın Cd gibi metal türlerini gövde ve yapraklarına taşımaktadır (Meyers ve diğ., 2008). *Brassica juncea* (L.) Czern ile yapılan çalışmalarda, bu bitkinin toprak ve su ortamında Pb’yi akümüle ettiği ve gövdeye taşınan Pb miktarının 10,000 mg/kg KA’yı aştığı görülmüştür (Sıkka ve diğ., 2010). 400 mg/kg KA’dan daha fazla Cd’yi gövdesinde biriktiren *B. juncea*, fitoremediasyon çalışmaları için en fazla umut vaad eden model bitki olarak gösterilmektedir (Minglin ve diğ., 2005; Meyers ve diğ., 2008; Zaier ve diğ., 2010).

Ağır metallerin bitkiler üzerindeki etkileri, bitki türleri ve toksisite konsantrasyonlarına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Pb ve Cd’nin çok küçük miktarları bile, bitkilerde hücresel yıkıma yol açabilmektedir. Bitkinin farklı kısımlarındaki Pb akümüülasyonu klorofil, protein, karbohidrat, serbest amino asitler ve RNA sentezi gibi çeşitli metabolik süreçleri olumsuz yönde etkilemektedir (Greger ve diğ., 1991; Sıkka ve diğ., 2010). Pb, sülfidril gruplarına bağlanarak çeşitli proteinlerde aktivitenin inhibisyonuna ya da yapısının bozulmasına yol açmakta ve bazı durumlarda mutlak gerekli elementlerle yer değiştirerek besin eksikliği etkilerinin görülmesine sebep olmaktadır (Van Assche ve Clijsters; 1990). Bunun yanısıra, oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerin oluşumunu uyararak oksidatif yıkıma yol

açabilmektedir (Schutzendubel ve Polle, 2002; Sıkka ve diğ., 2010). Bitkilerde Cd stresi de, kök ve gövde büyümesini inhibe ederek, besin alımı ve homeostazisini negatif yönde etkilemektedir (Metwally ve diğ., 2005). Buna ek olarak, Pb gibi fotosentez sürecini etkilemekte, protein sentezini değiştirmekte, enzim aktivitesini inhibe etmekte, stoma fonksiyonunu inhibe etmekte, oksidatif stres oluşumuna neden olmaktadır (Shah ve diğ., 1995; Perfus-Barbeoch ve diğ., 2002; Zhang ve diğ., 2011).

Bitkilerde Pb ve Cd stresinin, fizyolojik ve hücrel detoksifikasyon mekanizmaları üzerine etkisi birçok çalışmada gösterilmiştir (Qiu ve diğ., 2008; Wang ve diğ., 2008; Brunet ve diğ., 2009). Ancak Pb ve Cd etkisinin moleküler mekanizması hakkındaki mevcut bilgi çok yetersizdir. Cd'nin bitkilerin gen ekspresyon profillerini etkileyebileceği bazı çalışmalarda sunulmuştur (Lang ve diğ., 2005b; Jonak ve diğ., 2004; Fusco ve diğ., 2005; Zhang ve diğ., 2011). Cd'nin gövdede akümüasyonu ve kök hücrelerinde inaktivasyonunun, hücre duvarına bağlanma, vakuolde bölümlendirilme ve metal bağlayan protein ve peptidlerle (özellikle fitokelatin ve metalloproteinler) kompleksleşme ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Gupta ve Goldsbrough, 1991; John ve diğ., 2009). Pb toksisitesinin gen ekspresyonuna etkisi tam olarak anlaşılammıştır (Liu ve diğ., 2009). Pb'nin hücre içine alımından sorumlu membran taşıma mekanizmasının tanımlanması, fitoremediasyon sistemlerinin geliştirilmesi açısından da oldukça önemlidir (Meyers ve diğ., 2008).

Ağır metal akümüasyonu ve toleransının moleküler mekanizmasıyla ilişkili olarak *B. juncea* ile yapılan bir çalışmada,  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ya da  $Zn^{+2}$  uygulamasını takiben BjMTP1 adı verilen genin mRNA'sındaki artışla katyon difüzyon kolaylaştırıcı gen ailesi ilk olarak ortaya konmuştur (Muthukumar ve diğ., 2007). Bir başka çalışmayla Cd uygulanan *B. juncea* fidelerinde 4 yeni katyon difüzyon kolaylaştırıcı taşıyıcı (*BjCET1–BjCET4*) klonlanmış (Lang ve diğ., 2005a) ve *BjCET2*'nin bazı fonksiyonel özellikleri rapor edilmiştir (Xu ve diğ., 2009; Lang ve diğ., 2011). Birbirlerine yüksek oranda yakınlık gösteren dizilere sahip olan *BjCET3* ve *BjCET4*'ün, metal iyon homeostazisinde (özellikle  $Zn^{+2}$  için) benzer işlevleri yerine getirdikleri gösterilmiştir. *B. juncea*'da diğer metal taşıyıcı Nramp ve YSL gen ailelerinin üyeleri de tanımlanmıştır. Das ve diğ. (2011) *B. juncea*'dan 23 tane NRAMP ve 27 tane YSL geni klonlamıştır. Pb ve Cd uygulaması yapılan *B. juncea* bitkisinin köklerinde sırasıyla



*BjYSL5.8* ve *BjYSL6.1*'in ekspresyon seviyelerinin arttığını ortaya konmuştur. Ayrıca, metal taşıyıcı ABC gen ailesinin üyesi olan çoklu ilaç direnci proteinlerinden maya kadmiyumfaktör 1 (YCF1)'in *B. juncea*'da aşırı eksprese edilmesi, Pb ve Cd stresine karşı tolerans artışına neden olmuştur (Bhuiyan ve diğ., 2011).

*B. juncea* metalle kirlenmiş toprakların fitoremediasyonu için uygun bitki türlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalarda da kullanılmaktadır (Xu ve diğ., 2008, Xu ve diğ., 2009). *Escherichia coli* geni *gshI*'in *B. juncea*'ya transferi ve aşırı ekspresyonu ile  $\gamma$ -ECS ve GS aktivitesi 5 kat artmış, Cd akümüasyonu %40-90 daha fazla yapılmıştır (Zhu ve diğ., 1999). *B. juncea*'da sitozolde GS'yi kodlayan *gshII* geni aşırı eksprese edildiğinde, transgenik bitkilerde yabani tip bitkilere göre Cd akümüasyonunda artış tespit edilmiştir (Liang ve diğ., 1999; Basu ve diğ., 2010). Bennett ve diğ. (2003) mikrobiyal  $\gamma$ -ECS ya da GS'yi kullanarak geliştirdikleri transgenik *B. juncea* hatlarında yabani tiplere göre, Zn ve Cd alımında 1,5 kat artış saptamıştır. Topraktaki Cd oranı %25 artırıldığında, her iki gende de aşırı ekspresyon bildirilmiştir. Bu çalışma ile transgenik hatların fitoremediasyon potansiyelinin yabani tiplere göre 1,5-3 kat fazla olması beklenmektedir. Bir başka çalışmada, transgenik *B. juncea* (L.) Czern'de  $\gamma$ -ECS ya da GS'nin aşırı ekspresyonu, Cd, Cr ve As gibi çeşitli metallere karşı toleransın ve akümüasyonun artmasına neden olmuştur (Reisinger ve diğ., 2008; Vamerali ve diğ., 2010).

Bu tez çalışmasında, ağır metal akümüasyonu ve toleransı ile ilişkili moleküler mekanizmada açıklanamamış noktalara katkıda bulunmak için mikroarray tekniği kullanılarak *B. juncea* bitkisinin kök kısımlarında Pb'nin gen ekspresyon profili üzerine etkisi araştırılmıştır. Ağır metal alımı ve taşınmasında görevli olduğunu düşündüğümüz bazı genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyeleri, Pb ve Cd uygulanan bitkilerin kök, gövde ve yapraklarında belirlenerek, bu genlerin metal homeostazisindeki rollerinin moleküler seviyede anlaşılması ve buna bağlı olarak türler arası hibridizasyonun kullanılabilirliğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. BİTKİSEL MATERYAL

Bu çalışmada, Brassicaceae familyasına ait bir tür olan *Brassica juncea* (kahverengi hardal) bitkisinin P78 kodlu varyetesi kullanılmıştır. Tohumlar Tübitak MAM-Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Bitki Moleküler Biyolojisi Laboratuvar'ından temin edilmiştir. *Brassica juncea* bitkisi, yüksek oranda biyokütle üretimi (hiperakümülatör türlerin biyokütlelerinden en az 10 kat daha fazla), hızlı büyüme oranı, toprak üstü hasat edilebilen kısımlarında ağır metalleri akümüle ve tolere edebilme yeteneği göstermesi nedeniyle tercih edilmiştir.

#### 3.2. BİTKİLERİN YETİŞTİRİLMESİ

*Brassica juncea* var. P78 tohumları Tween-20 içeren %5'lik sodyum hipoklorit çözeltisi ile 15 dakika boyunca yüzey sterilizasyonuna tabi tutulduktan sonra deiyonize su altında yıkanmıştır. İmbibisyonu sağlamak amacıyla 2 saat boyunca deiyonize suda bekletilen tohumlar, çimlenme ve fide gelişimi için saksı başına 12 tohum olacak şekilde 20 cm çapındaki plastik saksılarda nemli perlit ortamına ekilmiştir. 4. günde çimlenen tohumlar, gün aşırı olmak üzere haftada üç gün ½ oranında seyreltilen Hoagland besi çözeltisi (Hoagland ve Arnon, 1938) (Tablo 3.1) ile sulanmıştır. Çimlenmeden sonra 23 gün boyunca perlit ortamında büyütülen *B. juncea* fideleri akabinde hidroponik ortama transfer edilmiştir. ½ Hoagland besi çözeltisi içeren ve akvaryum motoru ile havalandırılan 6 lt'lik polietilen su kültürü kaplarına 10'ar adet bitki aktarılmıştır. 8 gün boyunca hidroponik ortamda büyütülen bitkiler içinden eşit büyüklükte olanlar uygulama yapılmak üzere seçilmiştir. Bitkiler %60 nem ve 16 sa ışık (25±2 °C) / 8 sa karanlık (20±2 °C) fotoperiyodunda 150 µmol/m<sup>2</sup>s ışık şiddeti altında bitki büyüme odasında yetiştirilerek uygulamaya alınmıştır.

Tablo 3.1: Hoagland çözeltisi: Tabloda görülen mineral tuzların, deiyonize su ile hazırlanan stok çözeltilerinden belirtilen miktarlarda alınarak, konsantrasyonu 5 M olacak şekilde son hacim deiyonize su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

Mineral tuzlar	Konsantrasyon (M)	1 litre için alınacak miktar (ml)
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1	20
KNO <sub>3</sub>	1	30
MgSO <sub>4</sub>	1	10
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	5
FeEDTA	0,1	1
Mikro elementler	1 <sup>(*)</sup>	5

<sup>(\*)</sup> Mikro elementleri içeren stok çözeltinin 1 litresinde bulunan mineral tuzlarının miktarları: 1,43 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,905 g MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,11 g ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,04 g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,025 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O.

### 3.3. BİTKİLERE AĞIR METAL UYGULAMASI

Bu çalışmada *B. juncea* var. P78 bitkisine uygulanmak üzere, Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı tarafından açıklanan “tehlikeli kirletici maddeler” listesinde ilk 10’da yer alan (ATSDR, 2011) Pb ve Cd metalleri seçilmiştir. Bitkilere Pb uygulaması için kurşun(II) nitrat, Cd uygulamasında ise kadmiyum sülfat çözeltisi kullanılmıştır. Uygulanan konsantrasyonlar, literatür taramaları ve ön denemeler sonucunda seçilmiştir. Uygulama süresince bitkide gözle görülebilir herhangi bir morfolojik değişikliğe sebep olmayan konsantrasyonlar tercih edilmiştir.

31 günlük *B. juncea* var. P78 bitkisine ağır metal uygulaması, her 1 lt’lik polietilen kaba bir bitki olacak şekilde yapılmıştır (Şekil 3.1). Toplam hacmi 1 lt olacak şekilde hazırlanan ½ Hoagland besi çözeltisine, stok kurşun(II) nitrat (Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) (Merck) (0,5 M) ya da kadmiyum sülfat (CdSO<sub>4</sub>.8/3H<sub>2</sub>O) (Ridel-de Haën) (0,1 M) çözeltisinden hesaplanan miktarda metal ilavesi yapılarak uygulama ortamı hazırlanmıştır. Yapılan denemelerde 31 günlük bitkilere kurşun(II) nitrat çözeltisi 50 µM, kadmiyum sülfat çözeltisi ise 25 µM olacak şekilde uygulanmıştır. Ağır metal uygulanmayan kontrol bitkileri için ½ Hoagland besi çözeltisi uygulama ortamı olarak kullanılmıştır. 24 saat sonunda ağır metal uygulanmayan (kontrol) ve ağır metal uygulanan bitkilerin kök, gövde ve yaprak kısımları, bitkinin farklı organlarında biriken ağır metal miktarını tayin etmek ve moleküler genetik çalışmalarda kullanmak üzere hasat edilmiştir. Hasat edilecek bitkilerin kökleri 3 dakika boyunca deiyonize su ile yıkanmıştır. Ağır metal

miktarı tayininde kullanılacak örnekler kurutulmak üzere 75 °C'lik etüve konulmuştur. Moleküler genetik çalışmalar yapılacak örnekler ise, sıvı azota alındıktan sonra -86 °C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Her deney kendi içinde, kontrol ve ağır metal uygulanan deney gruplarına ait 3'er adet biyolojik tekrar içermektedir. Biyolojik tekrarların her birinde, 3 farklı bitki bulunmaktadır. Hasat işlemi sırasında, her biyolojik tekrara ait 3 farklı bitkiden alınan kök, gövde ve yaprak örnekleri kendi grubu dahilinde biraraya getirilerek harmanlanmıştır.



Şekil 3.1: *Brassica juncea* var. P78 bitkisine hidroponik ortamda ağır metal uygulaması.

#### 3.4. BİTKİDE BİRİKEN AĞIR METAL MİKTARININ TAYİNİ

*B. juncea* var. P78 bitkisine ağır metal uygulamasından sonra kök, gövde ve yapraklarda biriken ağır metal miktarının tayini için hasat edilen örneklere asit ile yaş yakma yöntemi uygulanmıştır (Miller, 1998). Hasatı yapılan örneklerin taze ağırlıkları belirlendikten sonra 75 °C'ye ayarlanmış etüve 72 saat boyunca bırakılarak kurutulmuştur. Kurutulmuş bitki örneklerinin tartımları alınmış ve 100 ml'lik erlenmayerlere konmuştur. Örneklerin üzerine 1 g kuru ağırlık başına ilk önce 5 ml nitrik asit daha sonra 2 ml perklorik asit ilave edilmiştir. Nitrik asit ilave edilen örneklerin asitle tamamen ıslanmasını sağlamak için, üzerlerine küçük huni konulan erlenmayerler çeker ocak içerisinde 2 saat boyunca bırakılmıştır. 2 saat sonunda örnekler sıcaklığı yavaşça 80 °C'den 100 °C'ye yükseltilecek şekilde ısıtıcı tablaya alınarak ortamdaki nitrik asitin büyük bir kısmı uzaklaştırılmış ve bitki çözeltileri açık sarı bir

renk almıştır. Bu aşamada ısıtıcı tabla üzerinden alınan örnekler oda sıcaklığına getirilerek belirtilen oranda perklorik asit eklenmiştir. Sıcaklığı yavaşça 100 °C'den 200 °C'ye yükseltilen ısıtıcı tablaya tekrar alınan örnekler içinde kalan nitrik asit miktarı azaldıkça çözeltide sıcaklık yükselmeye devam etmiş ve en sonunda perklorik asitin parçalanmamış organik materyali oksitlemesiyle çözeltinin rengi berraklaşmıştır. Perklorik asitin yoğun beyaz dumanları erlenmayerin içini tamamen kapladıktan sonra yakmaya en az 30 dakika daha devam edilmiştir. Erlenmayer içinde yaklaşık 1 ml perklorik asit kalacak ve bitki çözeltisi berraklaşınca yakma işlemine son verilmiştir. Yeterince soğuduktan sonra erlenmayerlere bir miktar deiyonize su ilave edilmiş ve 50 ml'lik falkon tüplere alınmıştır. Oda sıcaklığına ulaşan örneklerin üzerine deiyonize su ilave edilerek 10 ml'ye tamamlanmıştır. Ağır metal miktarının belirlenmesi için yaş yakma yöntemine tabi tutulan bitki örneklerinin analizleri, İndüktif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektrometre-Optima 7000 DV (ICP-OES) (Perkin Elmer)'de yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre, *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yaprak kısımlarında akümüle edilen ağır metal miktarı mg/kgKA (kilogram kuru ağırlık başına miligram), total akümülyasyon oranı (TAR) ise mg/kg gün olacak şekilde hesaplanmıştır.

### **3.5. BİTKİDE ANLATIMI DEĞİŞEN GENLERİN TANIMLANMASI VE BELİRLENMESİ İÇİN KULLANILAN MOLEKÜLER YÖNTEMLER**

#### **3.5.1. Total RNA İzolasyonu**

*B. juncea* var. P78 bitkisinin ağır metal miktar tayini yapılan kök, gövde ve yaprak örneklerinden total RNA elde etmek için içerisinde 2 farklı kolon (homojenizasyon kolonu ve RNA izolasyon kolonu) bulunan RNA izolasyon kiti (RNeasy Plant Mini Kit-Qiagen) kullanılmıştır. RNA izolasyon kitinde açıklanan yöntemine göre;

1. -86 °C'de muhafaza edilen bitki materyalinin çözünmesi önlenerek tartımı yapılmış ve homojenizasyon safhasına kadar sıvı azot içerisinde bekletilmiştir.
2. İzolasyona başlamadan önce guanidyum izotiyosiyanat (GITC) içeren RLT tamponunun içerisinde ml başına 10 µl olacak şekilde β-merkaptöanol ilave edilmiştir.
3. Bitki materyali, steril havan ve havan eli kullanılarak sıvı azot yardımıyla toz haline gelinceye kadar ezilmiş ve steril ependorf (1,5 ml) tüpe aktarılmıştır.
4. Örnek üzerine 100 mg bitki materyaline 450 µl olacak şekilde RLT (tamponun içeriği kitte belirtilmemiştir) tamponu ilave edilerek vorteks yapılmıştır.

5. Vortekslenen örnek 2 ml'lik homojenizasyon (QIAshredder) kolonuna aktarılarak 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
6. Kolondan geçen lizat steril tüpe aktarılmış ve aktarılan miktarın yarısı hacimde %96'lık etanol ilave edilen lizat pipet yardımıyla karıştırılmıştır.
7. Etanol eklenen lizat RNA izolasyon (RNeasy spin) kolonuna aktarılarak 13.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
8. Kolondan geçen sıvı atıldıktan sonra kolonda kalan örneği yıkamak için 700 µl RW1 (tamponun içeriği kitte belirtilmemiştir) tamponu ilave edilmiş ve 13.000 rpm'de 15 saniye santrifüj yapılmıştır.
9. Kolondan geçen sıvı tekrar atılarak, kolonda kalan örneği yıkamak amacıyla 500 µl RPE (tamponun içeriği kitte belirtilmemiştir) tamponu ilave edilmiş ve 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır.
10. Kolondan geçen sıvı tekrar atılmış ve ikinci kez 500 µl RPE ilave edilerek 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılmıştır. Böylece yıkama safhası tamamlanmıştır.
11. Kolon, kapakları kesilmiş RNaz içermeyen steril ependorf tüpe (1,5 ml) yerleştirilerek üzerine 40 µl dietilpirokarbonat (DEPC)'lı saf su ilave edilmiş ve 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonucunda kolon membranında toplanan RNA'lar ependorfa geçmiş ve total RNA izolasyonu tamamlanmıştır. Elde edilen örnekler kullanılmak üzere -20 °C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

### **3.5.2. Total RNA'dan Genomik DNA'nın Uzaklaştırılması**

Mikroarray analiz ve yarı-kantitatif ters yazılım polimeraz zincir reaksiyonu denemelerinde kullanılmak üzere elde edilen total RNA örneklerinden genomik DNA'yı uzaklaştırmak için uygulanan yöntem, total RNA'nın DNaz I enzimi etkisinde bırakıldıktan sonra tekrar çöktürülmesi ve sulandırılması basamaklarını içermektedir. Elde edilen total RNA örneklerinden genomik DNA'yı uzaklaştırmak için RNaz içermeyen DNaz I enzimi (Roche) kullanılmıştır. Kitte açıklanan yöntem göre, total RNA (10 µg/µl) örneği üzerine, son hacim 50 µl olacak şekilde 10X inkübasyon tamponu (her 1 ml için 100mM Tris-HCL pH: 8,4, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, %0,01 jelatin) ve DNaz I (10U/µl) enzimi ilave edilmiştir (Tablo 3.2).

Tablo 3.2: DNaz I uygulamasında kullanılan bileşenler ve reaksiyon miktarları.

Bileşenler	Son Konsantrasyon
Total RNA	10-50 µg
10X İnkübasyon tamponu	5 µl
DNaz I (10U/µl)	2,5-10 ünite
DEPC'li saf su	Toplam hacmi 50 µl'ye tamamlayan miktar.

Karışması sağlanan örnekler 37 °C'de 20 dakika bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında mevcut protein ve DNaz I kontaminasyonunu önlemek amacıyla 1:1 oranında fenol:kloroform (3:1) uygulaması yapılmıştır. Örnekler 30 saniye vortekslendikten sonra 10 dakika buz üzerinde bekletilmiş ve 13.000 rpm'de 5 dakika +4 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan iki fazdan üstteki kısım alınmıştır. Üst faz üzerine 8 µl 3 M sodyum asetat (ph:5,2) ve 300 µl saf etanol eklenerek en az 1 sa -80 °C'de bekletilmiştir. -80 °C'de bekletilen örnekler daha sonra 13.000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edilerek RNA'nın çökmesi sağlanmıştır. RNA çökeltisi % 70 etanol ile 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Steril kabinde kapakları açık bir şekilde etanolü uçurulan örneklerdeki RNA çökeltisi 20 µl DEPC'li saf suda çözülmüştür. Elde edilen örnekler kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

### 3.5.3. Total RNA Miktar Tayini

Elde edilen total RNA'ların (genomik DNA içeren ve içermeyen) saflığını ve miktarını belirlemek üzere NanoDrop spektrofotometresinde (Thermo) 260 nm ve 280 nm dalga boylarında okumalar yapılmıştır. DEPC'li saf su ile 1/20 oranında sulandırılan total RNA örneklerinin konsantrasyonları ng/µl cinsinden belirlenmiştir. Saflık oranları (OD260/OD280) 1,80-2,00 arasında olan örneklerin, konsantrasyon miktarları ve sağlamlıkları %1'lik formaldehitli agaroz jelde ayrıştırılarak kontrol edilmiştir.

Ayrıca mikroarray analiz yapılan kök örneklerinden elde edilen genomik DNA içermeyen total RNA'ların saflığını ve miktarını kontrol etmek için Bioanalyzer 2100 (Agilent)'de 260 nm ve 280 nm dalga boylarında okumalar yapılmıştır. Bu cihaz, daha az miktarda örnek kullanımı sağlaması, hassasiyetinin oldukça yüksek olması ve jel elektroforez profilini vermesi nedeniyle tercih edilmiştir. Bu çalışmada, total RNA miktar okumaları için RNA Nano 6000 çipleri kullanılmıştır.

#### 3.5.4. Total RNA'ların Formaldehitli Agaroz Jelde Ayırıştırılması

Spektrofotometrik okuma sonrasında miktarları belirlenen RNA'ların sağlamlıklarını kontrol etmek amacıyla, elde edilen total RNA örnekleri %1'lik formaldehitli agaroz jelde ayırıştırılmıştır. Formaldehitli agaroz jelin hazırlanması ve elektroforez işlemleri Sambrook ve diğ. (1989)'ne göre yapılmıştır. Kullanılan jel; 100 ml'de 1 g agaroz, 10 ml 5X MOPS (morfolino-propan sülfonik asit), 83 ml DEPC'li saf su ve 7 ml formaldehit içermektedir. Agaroz, DEPC'li saf su içinde mikrodalga fırında eritildikten sonra 5X MOPS ve formaldehit belirtilen miktarlarda ilave edilmiştir. Hazırlanan karışım çeker ocak içerisinde mini jel elektroforez kasetine dökülmüştür. Polimerize olan jel, örnekler yüklenmeden önce 1X MOPS ve formaldehit içeren yürütme tamponunun bulunduğu tanka alınarak 15 dakika ön yürütme işlemine tabi tutulmuştur. Bu esnada RNA örnekleri üzerine 1:1 oranında etidyumbromür (EtBr) içeren yükleme tamponu ilave edilerek, 65 °C'de 10 dakika denatüre edilmiştir. Denatürasyon sonrası doğrudan buza alınan örneklerin tamamı kuyulara yüklenmiştir. Yüklenen örneklerin 70 V'da 45 dakika ayrışması sağlanmıştır.

#### 3.5.5. Komplementer (Tamamlayıcı) DNA Sentezi

Saf hale getirilmiş olan total RNA'lardan komplementer DNA (cDNA) sentezi RNA'ya yönelik bir DNA polimeraz olan Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV)-ters transkriptaz enzimi kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen total RNA'lardan cDNA sentezi için RevertAid™ First Strand cDNA Sentez Kit (Fermentas)'i içerisinde bulunan tampon ve enzimler kullanılmıştır. Kit içinde açıklanan yöntem, birbirini takip eden 2 aşamadan oluşmaktadır:

##### 1. Aşama:

Total RNA	1 µg/ µl
oligo (dT)18 primer	1 µl

olacak şekilde DEPC'li saf su ile hacim 12 µl'ye tamamlanmıştır. RNA ve primer karışımı 65 °C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra 2. aşamada verilen karışımdan toplam hacim 20 µl olacak şekilde herbir tüpe dağıtılmıştır.



**2. Aşama:**

5X Reaksiyon Tamponu	4 µl
RNaz İnhibitor (20 u/µl)	1 µl
10 mM dNTP Karışımı (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	2 µl
MMLV-Ters Transkriptaz (200 u/µl)	1 µl

olacak şekilde hazırlanan karışım, 1. aşama sonrasında ilk karışımın üzerine eklenmiştir. Toplam hacmi 20 µl olan örnekler 42 °C’de 60 dakika inkübe edildikten sonra enzimi inhibe etmek için 70 °C’de 5 dakika daha inkübasyon yapılmış ve reaksiyon +4 °C’de sonlandırılmıştır.

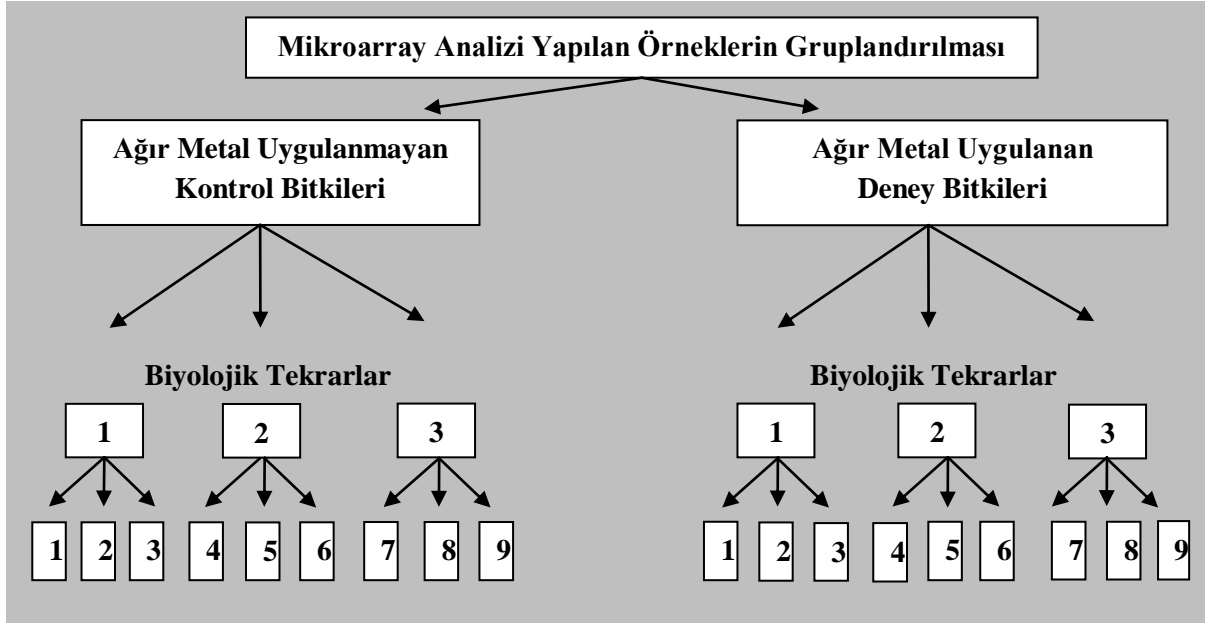
Saf haldeki RNA’dan cDNA sentezini gerçekleştirmek için gerekli inkübasyon sıcaklıkları ve süreleri, gradiyent polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) (Applied Biosystems) cihazında kurulan program ile sağlanmıştır (Tablo 3.3).

Tablo 3.3: cDNA sentezi için PCR cihazında kurulan program.

Sıcaklık	İnkübasyon süresi
65 °C	5 dakika
42 °C	60 dakika
70 °C	5 dakika
+4 °C	∞

**3.5.6. Mikroarray Analizi Yapılan Örneklerin Hazırlanması**

Mikroarray analizi yapılan örnekler, kontrol ve ağır metal uygulanan deney serilerini içermektedir. Her grup kendi içinde 3’er biyolojik tekrara sahiptir. Biyolojik tekrarların her birinde, 3 farklı bitki bulunmaktadır. Hasat işlemi sırasında, her biyolojik tekrara ait 3 farklı bitkiden alınan kök örnekleri kendi grubu dahilinde biraraya getirilerek harmanlanmıştır (Şekil 3.2). Elde edilen biyolojik tekrarların her birinin total RNA izolasyonları ve DNaz I uygulamaları tamamlandıktan sonra analiz yapılmak üzere ilgili firmaya gönderilmiştir.



Şekil 3.2: Mikroarray analizi yapılan örneklerin gruplandırılması.

### 3.5.7. Mikroarray Analiz

Bitkilerde gen ekspresyon analizi için son zamanlarda kullanılan mikroarray analiz, birkaç basamakta gerçekleşmektedir.

#### 3.5.7.1. Örnek Hazırlanması ve Etiketleme

cDNA mikroarraylerinde ilk olarak örnekten izole edilen RNA, ters transkriptaz ile hedef cDNA'ya çevrilmekte ve radyoaktif ya da floresen markörler ile işaretlenmektedir. Cyanin boyalarından olan cy3 ve cy5 eksitasyon ve emisyon spektrumlarındaki geniş ayırım ile yüksek fotostabiliteye sahip oldukları için en çok kullanılan floresen markörlerdir (Hegde ve diğ., 2000; Pirrung, 2002; Kumar ve diğ., 2005). Bu floroforlar, farklı dalga boylarında ışık yaymakta ve uygun lazerle eksitasyon sonrası kırmızı (cy5) ve yeşil (cy3) olarak görünmektedir. Antisens RNA hazırlığında, RNA cDNA'ya çevrilmekte ve bu cDNA'nın ikinci ipliği antisens RNA ya da cDNA'ya transkript edilmektedir. Hedef moleküllerin etiketlenmesi, raportör boyaların çoğaltılmış ürüne direkt katılımı ile amplifikasyon esnasında taşınabilmektedir. Etiketleme metodları simultane amplifikasyon ve cDNA ya da cRNA (aRNA, amplifiye RNA) etiketlenmesinden biyotin-streptavidin konjugatları ile sekonder etiketlemeye kadar çeşitlendirilebilmektedir.

### 3.5.7.2. Hibridizasyon

Etiketlenmiş hedef, hibridizasyonun sağlanması için bir array ile inkübe edilmektedir. Eğer hedefte prob ile komplementer diziler bulunuyorsa, hedef array ile hibridize olmaktadır.

### 3.5.7.3. Tarama

Çip, işaretlenmiş hedef DNA ve problemlerin hibridizasyonu sonucu oluşan floresan sinyalleri toplayan kimyasal işlemcilerle bağlantılı olan komponentler, diyotlar ve transistörlerden oluşan bir tarama cihazı ile okunmaktadır. Mikroarray tarayıcılar örneğin floresans yoğunluğunu gösteren bir piksel matriksinden oluşan görüntüler oluşturmaktadır. Tarayıcılar ile birleşik olan yazılım programı, bireysel spotların ve ölçülen spotun yoğunluğunun belirlenmesini sağlamaktadır (Yoltaş ve Karaboz, 2010).

Bu çalışmada yapılan mikroarray analiz, gerekli laboratuvar ekipmanları ve enstrümanları sağlanamadığı için Affymetrix firmasının Türkiye temsilcisi olan Ay-Ka Ltd. Şti.'ye yaptırılmıştır. Mikroarray analizinde Affymetrix firmasından sağlanan gen çipler (The GeneChip® Arabidopsis ATH1 Genome Array) kullanılmıştır. Bu çiplerde yer alan oligonükleotid problemler 25 baz uzunlukta olup, 22,810 prob seti 24,000 geni tanımaya yönelik olarak hazırlanmıştır. Affymetrix metodunda kısa nükleotid problemler (25 baz çifti) *in situ* sentezlenmekte ve gen çip prob arrayler oluşturulmaktadır. Mikroarray analizinde GeneChip-3' IVT Express Kit kullanılmıştır.

### 3.5.8. Mikroarray Analizinden Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi

Mikroarray çalışmaları, gen ekspresyon modelleri üzerine genom genişliğinde veriler sağlamaktadır. Verilerin miktarı ve kompleksliği, biyoenformatik ve biyoistatistiksel analizlerin de dahil olduğu birçok hesaba dayalı genomik yaklaşıma ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle mikroarray analiz sonucunda Ay-Ka Ltd. Şti.'den alınan ham veriler, gen ekspresyon analizi için gerekli çeşitli programlarda işlenmiştir. Mikroarray analiz sonucunda prob hücrelerinin yoğunluğunu gösteren .CEL dosyası formatında elde edilen ham veriler, "Expression Console" (<http://www.affymetrix.com>) ve "MultiExperiment Viewer" (<http://www.tm4.org>) programlarına aktarılarak değerlendirilmiştir. Kullanılan programlar ile mikroarray deney koşullarının ve verilerinin yönetimi, taranmış slayt görüntülerinin sayısal verilere dönüştürülmesi,

verilerin normalize edilmesi ve normalize edilmiş verilerin analizi için gerekli işlevler yerine getirilmiştir.

Bu programlar dahilinde, mikroarray analizi sonucunda elde edilen ham veriler kullanılarak her bir bağımsız deney (biyolojik tekrarlar) ayrı ayrı normalize edilmiştir. Normalizasyondan sonra farklı ekspresyon edilen genlerin tanımlanması için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanarak gen listeleri oluşturulmuştur. 1,3 kat ve daha fazla ekspresyon sinyali olan prob grupları “teşvik edilen”, -1,3 kat ve daha az ekspresyon sinyali olan prob grupları ise “baskılanan” genler olarak ifade edilmiştir. Oluşturulan gen listesinde yer alan problemler, veri tabanları (<http://www.arabidopsis.org/>) kullanılarak tanımlanmıştır.

### **3.5.9. Türler Arası Gen Ekspresyon Profilleme Çalışmalarının Kullanılabilirliğinin, *Arabidopsis* ve *Brassica* Türleri Üzerinde Biyoinformatik Yaklaşımlarla İrdelenmesi**

Mikroarray analizinde problemleri kullanılan *Arabidopsis thaliana* bitkisi ile mRNA düzeyinde gen ekspresyon farklılıkları incelenecek olan *Brassica juncea* bitkisi aynı familyaya üyedir. *Arabidopsis* gen çiplerinin *Brassica* türlerinde yapmış olduğumuz gen ekspresyon profilleme çalışmalarında kullanılabilirliğini anlamak amacıyla NCBI (The National Center for Biotechnology Information) (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) ve diğer veri tabanlarında bulunan bütün *Brassica* alt türlerinin etiketlenmiş fonksiyonel gen segmentleri (ESTler) ve transkript dizileri yüklenerek yerel veritabanları oluşturulmuştur. *Brassica* alt türlerinin veritabanı ve *Arabidopsis thaliana*'ya ait Affymetrix “GeneChip-*Arabidopsis* ATH1 Genome Array” 'de bulunan bütün prob dizileri ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)) BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool) (Blast-2.2.18+) algoritması kullanılarak karşılaştırılmıştır. Böylece *A. thaliana* ve *Brassica* türlerine ait gen dizilerindeki nükleotidler arasındaki benzerlikler hesaplanmıştır. BLASTN algoritması kullanılarak elde edilen sonuçlar, Blast Parser uygulaması ile Microsoft Excel dosyasına aktarılmış ve gen dizileri benzerliklerine ve e-değerlerine göre ayrıştırılarak analiz edilmiştir.

### 3.5.10. Primer Tasarımı

Mikroarray analiz sonucunda ağır metal alımı ve taşınmasında rol aldığı düşünülen genlerin ekspresyonlarının, kantitatif ters yazılım polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle doğrulanması için, bu genlere ait primerler kullanılmaktadır. Mikroarray analizinde *Arabidopsis*'e ait prob dizileri kullanıldığından, primerler direkt olarak bu problardan tasarlanamamıştır. Tasarlanan primerlerin *B. juncea* (AABB) bitkisine uygun olması ve düzgün çalışması için, *Arabidopsis* bitkisine ait gen dizilerinin tümü ile *Brassica juncea* ve bu türe yakınlık gösteren *Brassica rapa* (AA) ve *Brassica nigra* (BB) bitkilerinin EST dizileri karşılaştırılmıştır. *Arabidopsis* bitkisine ait gen dizilerinin tümü Affymetrix ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)), *B. juncea*, *B. rapa* ve *B. nigra*'nın EST dizileri ise NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) veri tabanlarından alınmıştır. *Arabidopsis* bitkisine ait gen dizileri ile *B. juncea*, *B. rapa* ve *B. nigra*'nın EST dizileri BLASTN (blast-2.2.18+) algoritması kullanılarak karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, Blast Parser kullanılarak Microsoft Excel dosyasına aktarılarak, gen dizilerinin benzerlikleri ve e-değerlerine göre ayrımı yapılmıştır. Karşılaştırmalar sonucunda her 3 türde de %100 uyum gösteren *Arabidopsis*'e ait gen dizileri belirlenmiştir. Belirlenen genler ile mikroarray analiz sonucunda bulunan proplar Microsoft Access'de karşılaştırılarak ortak olan genlerden bir veritabanı oluşturulmuştur. Bu veritabanında 25 baz çiftinde %100 uyum gösteren (25/25) proplar belirlenmiştir. Bu proplarla ilgili literatür bilgileri ve gen ontolojileri, TAIR (The Arabidopsis Information Resource) ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) ve diğer gen bankalarının veri tabanlarında taranmıştır. Yapılan tarama sonucunda, metal alımı ve taşınması mekanizmasıyla ilgili olabileceği düşünülen proplar seçilmiştir. Seçilen proplara karşılık gelen, *Brassica* türüne (özellikle *Brassica rapa*) ait EST dizileri NCBI veritabanından yararlanarak bulunmuştur. Elde edilen EST dizileri, tüm *Brassica* türlerine ait EST dizileri ile BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) algoritması kullanılarak karşılaştırılmıştır. Böylece *Brassica* türleri arasında en çok korunan bölgeler bulunarak daha düzgün primer tasarlanması amaçlanmıştır. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda, her gen için *Brassica* türleri arasında maksimum benzerlik gösteren diziler seçilmiştir. Seçilen bu diziler arasında en çok benzerlik gösteren bölgeler Clustal X2 programı kullanılarak ayırt edilmiştir. Benzerlik gösteren bölgelerden tasarlanan 6 adet primer çiftinin (ileri=F ve geri=R) baz uzunluğu 19-22 arasında değişmektedir (Tablo 3.4).

Tablo 3.4: Tasarlanan primerlere ait diziler ve amplikon uzunlukları.

Primer Adı:	Primer Dizisi:	Amplikon Uzunluğu:
BJMInd1-F	5'-TGGACATTGCCTCCTAATCAAC-3'	84
BJMInd1-R	5'-GTGAAGCAAGTGAAGCAGC-3'	
BJMInd2-F	5'-GATAATGGACACACTTGGAGCA-3'	86
BJMInd2-R	5'-CTTTCCTTCCCCTGGTGT-3'	
BJMInd3-F	5'-GCCAGTCTTGCGAATCTTG-3'	97
BJMInd3-R	5'-TAGGTCTTGGTTCATCGGA-3'	
BJMInd4-F	5'-GGAAAGGGCTCAAGATTGAAGA-3'	99
BJMInd4-R	5'-GCACAGTGTATGGAGATGTGT-3'	
BJMRep1-F	5'-CTTACCTTCGTCTCTGGGC-3'	84
BJMRep1-R	5'-CCCAGGCAAGAAGAAGAACT-3'	
BJMRep2-F	5'-TGGTCTGCTGGATTAAAGGC-3'	84
BJMRep2-R	5'-CATACGAAAGTGGACATCCCAT-3'	

Primerler tasarlanırken amplikon uzunluğunun 80-100 baz içermesine, GC içeriğinin %50-60 arasında olmasına ve erime sıcaklığı (55 °C)'nin primer çiftleri arasında farklılık göstermemesine dikkat edilmiştir. Tasarlanan primerlerin kriterlere uygunluğunu kontrol etmek için Fast PCR (<http://primerdigital.com>) ve Beacon Designer (<http://www.premierbiosoft.com>) programları kullanılmıştır.

### 3.5.11. Yarı-Kantitatif Ters Yazılım Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için yarı-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu uygulanmaktadır. Bu çalışmada elde edilen cDNA'lar ve tasarlanan primerlerin kontrolü, PCR uygulamasıyla gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.5). Öncelikli olarak *Brassica juncea* var. tumida'ya ait aktin mRNA dizisinden tasarlanan ve iç kontrol olarak kullanılan  $\beta$ -aktin (referans gen, house keeping gen) primer çiftine (Tablo 3.6) gradiyent PCR cihazında PCR uygulaması yapılmıştır. Gradiyent PCR cihazında farklı sıcaklıklarda (50, 55, 60, 65 °C) (Tablo 3.7) PCR'ı yapılan  $\beta$ -aktin primer çiftinin PCR ürününün %1'lik formaldehitli jelde yürütülmesi ile 55 °C'de iyi çalıştığı ortaya konmuştur. Referans gen olarak çalışan  $\beta$ -aktine ait primer çifti kontrol edildikten sonra, elde edilen cDNA'ların kontrolü PCR uygulaması ile tamamlanmıştır. Tasarlanan

primerler (hedef genler)'in kontrolü de, gradiyent PCR cihazında farklı sıcaklıklarda (50, 55, 60, 65 °C) kurulan PCR ile yapılmıştır.

Tablo 3.5: PCR uygulamasında kullanılan bileşenler ve reaksiyon miktarları (µl).

<b>Bileşenler</b>	<b>Hacim (µl) / Reaksiyon</b>
cDNA (100 ng/µl)	2
10X Taq polimeraz tamponu	2,5
10 mM dNTP Karışımı (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	1
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5
Primer-F (10 pmol)	0,5
Primer-R (10 pmol)	0,5
Taq DNA polimeraz (5 u/µl)	0,125
Steril Saf Su	16,87
<b>Toplam Hacim</b>	<b>25</b>

Tablo 3.6: β-aktin genine ait primer dizileri ve amplicon uzunluğu.

<b>Primer Adı:</b>	<b>Primer Dizisi:</b>	<b>Amplicon Uzunluğu:</b>
β-aktin-F	5'-GCATGAAGATCAAGGTGGTG-3'	<b>98</b>
β-aktin-R	5'-CCACATCTGTTGGAAAGTGC-3'	-

Tablo 3.7: PCR uygulaması için PCR cihazında kurulan program.

<b>Basamak</b>	<b>İşlem</b>	<b>Süre</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Döngü</b>
I.	Denatürasyon	3 dk	94 °C	1
II.	Denatürasyon	30 sn	94 °C	} 30
	Bağlanma	30 sn	50-65 °C	
	Uzama	30 sn	72 °C	
III.	Son Uzama	10 dk	72 °C	1

PCR uygulamaları sonucunda elde edilen ürünler, EtBr içeren %2'lik agaroz jelde ayrıştırılarak kontrol edilmiştir. Agaroz jel, 1 g agaroz, 5 ml 10X TBE (Tris-Baz Borik asit-EDTA) tamponu ve 45 ml steril saf su içermektedir. Hazırlanan karışım, agaroz tamamen eriyinceye kadar mikrodalga fırında kaynatılmıştır. Agaroz yaklaşık 50 °C'ye

soğutulduktan sonra 2,5 µl EtBr (stok konsantrasyon: 10 µg/µl) eklenmiş ve mini jel elektroforez kasetine dökülmüştür. Polimerize olan jel, içerisinde 1X TBE yürütme tamponu bulunan elektroforez tankına alınmıştır. 6X DNA yükleme boyası ile 5:1 oranında karıştırılan örneklerin tamamı kuyulara yüklendikten sonra 70 V'da 30 dakika ayrışması sağlanmıştır.

### 3.5.12. Kantitatif Ters Yazılım Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

RT-PCR, bir tek genin ekspresyonu hakkında bilgi veren ve kantitatif analizde kullanılan en güvenilir yöntemdir. Bu yöntemle, mikroarray analizle gen ekspresyon seviyesinde tespit edilen değişiklikler teyit edilmektedir (González-Fernández ve diğ., 2008).

RT-PCR, floresan tekniklerle gerçek zamanlı olarak DNA'nın çoğaltım, saptama ve miktar tayinini yapmayı sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntem, reaksiyon bitiminde miktar saptaması yapan diğer tekniklerden farklı olarak, reaksiyon gerçekleşirken çoğaltım ürünlerinin yaydığı floresanın eş zamanlı olarak görüntülenmesini sağlamaktadır (Higuchi ve diğ., 1992). RT-PCR'de oluşan ürün miktarı, reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boyanın verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılmaktadır.

RT-PCR çalışmalarında amaca uygun olarak değişik floresans boyalar kullanılmaktadır. "SYBR-Green I" floresan boya en sık kullanılan metotlardan biridir. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak RT-PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artmaktadır. "SYBR Green I" floresan boya, 497 nm dalga boyunda yükseltgenmekte ve 520 nm dalga boyunda indirgenmektedir (Kubista ve diğ., 2006).

Bu çalışmada, Pb ve Cd uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yapraklarından elde edilen cDNA'lar ile metal alımı ve taşınması mekanizmasında fonksiyonel olduğu düşünülen genlerden tasarlanan primerler kullanılarak, RT-PCR yöntemiyle (Tablo 3.8) hedef genlerin referans gene göre mRNA seviyesindeki değişimleri kat farkı olarak belirlenmiştir. Floresan boya olarak SYBR-Green I (SYBR-



green I master karışım, Roche) kullanılmıştır. RT-PCR denemeleri, Light Cycler 480 (Roche) cihazında gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.9).

Tablo 3.8: RT-PCR uygulamasında kullanılan bileşenler ve reaksiyon miktarları.

Bileşenler	Hacim (µl) / Reaksiyon
cDNA (100 ng/µl)	2,5
β-aktin-F (10 pmol)	0,5
β-aktin-R (10 pmol)	0,5
SYBR-Green Master Karışım (5 u/µl)	5
Steri Saf Su	1,5
<b>Toplam Hacim</b>	<b>10</b>

Tablo 3.9: RT-PCR uygulaması için PCR cihazında kurulan program.

Basamak	İşlem	Süre	Sıcaklık	Döngü
I.	Denatürasyon	3 dk	94 °C	1
II.	Denatürasyon	30 sn	94 °C	} 45
	Bağlanma	30 sn	55 °C	
	Uzama	30 sn	72 °C	
III.	Son Uzama	10 dk	72 °C	1
IV.	Erime	5 dk	95 °C	1
		1 dk	65 °C	1
			97 °C	1
V.	Soğuma	10 sn	40 °C	∞

Gen ekspresyonu düzeyindeki fizyolojik değişiklikleri araştıran birçok deneyde kullanılan göreceli miktar ölçümü (relative quantification), bir referans gen karşısındaki hedef genin ekspresyon seviyesinin belirlenmesine dayalı bir yöntemdir. Referans genle ilişkili olarak hedef gen ekspresyonunun hesaplanması için kullanılan çeşitli matematiksel modeller bulunmaktadır. Hesaplamalar çeşitli metotlarla tanımlanan farklı döngünün karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Matematiksel algoritmaları kurmak için sabit floresan düzeyindeki geçiş noktaları (Cp) ya da eşik değerleri (Ct) kullanılmaktadır. Günümüzde göreceli ekspresyon oranını hesaplamak için birçok matematiksel hesaplama modeli geliştirilmiştir (Pfaffl, 2001).

Bu çalışmada, herbir bir örnek ve hedef gen için kendi içinde 3 paraleli olan 2 farklı reaksiyon kurulmuştur. Bu denemelerden elde edilen Cp değerlerinin ortalamaları alınarak, hedef gen referans gene göre normalize edilmiştir. Göreceli ekspresyon oranını hesaplamak için “Delta-delta metodu” kullanılmış ve aşağıdaki denklemden yararlanılmıştır:

$$R=2^{-(\Delta CP \text{ örnek} - \Delta CP \text{ kontrol})}$$

$$R=2^{-\Delta\Delta CP}$$

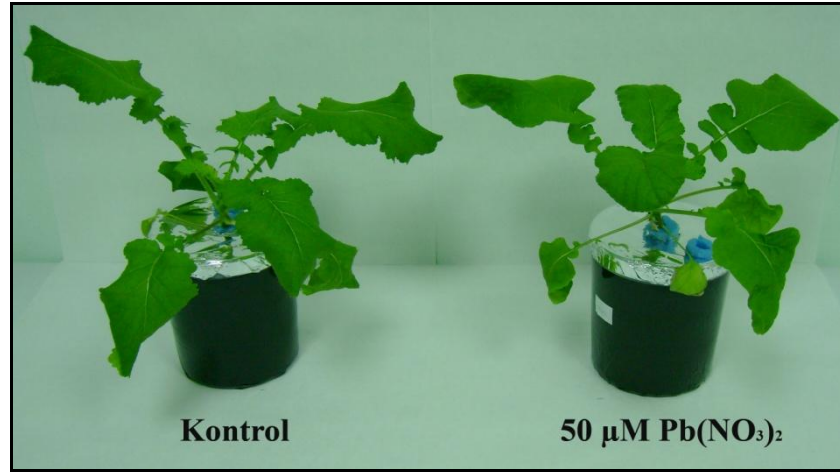
### 3.5.13. İstatistiksel Analizler

Bu çalışmada yapılan tüm denemelerde, her örnek için kendi içinde 3 tekrarı olan 3 farklı deney kurulmuştur. Elde edilen tüm ölçümleri istatistiksel olarak anlamlandırmak üzere Student's t-testi uygulanmıştır.  $P<0,0001$  ve  $P<0,05$  düzeyindeki farklılıklar anlamlı kabul edilmiştir.

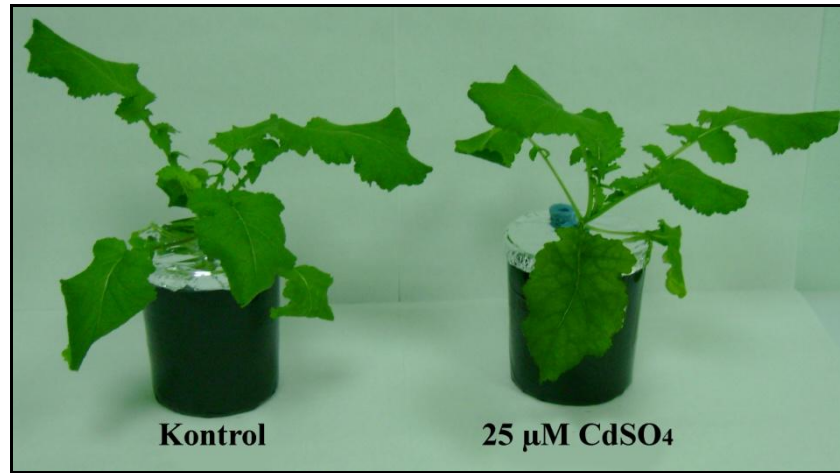
## 4. BULGULAR

### 4.1. BİTKİDE BİRİKEN AĞIR METAL MİKTARI

31 günlük *Brassica juncea* var. P78 bitkisine 50  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  ve 25  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$  çözeltileri hidroponik ortamda 24 saat boyunca uygulanmıştır. Bu süre sonunda her iki ağır metal uygulamasında da, kontrol bitkileri ile ağır metal uygulanan deney bitkileri arasında morfolojik olarak herhangi bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2).



Şekil 4.1: 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin hidroponik ortamdaki genel görünümü.



Şekil 4.2: 24 saat boyunca Cd uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin hidroponik ortamdaki genel görünümü.

24 saat boyunca Pb ve Cd uygulamalarına tabi tutulan *B. juncea* bitkisinin, kontrol ve ağır metal uygulanan deney gruplarına ait kök, gövde ve yaprak kısımlarında akümüle edilen ağır metal miktarları (mg/kgKA) ve total akümülyasyon oranları (mg/kg gün) Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1: 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ve CdSO<sub>4</sub> çözeltileri uygulanan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yapraklarında akümüle edilen ağır metal miktarları (mg/kgKA) ve total akümülyasyon oranları (mg/kg gün). (± değerler, standart sapmayı göstermektedir).

	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Uygulaması		CdSO <sub>4</sub> Uygulaması	
	Kontrol	50µM	Kontrol	25 µM
<b>Kök</b>	25,15 ± 6,30	26984,47±1679,35 <sup>a</sup>	1,88 ± 0,68	1763,51 ± 167,21 <sup>a</sup>
<b>Gövde</b>	7,67 ± 3,62	378,22 ± 109,91 <sup>b</sup>	1,15 ± 0,32	231,29 ± 27,09 <sup>a</sup>
<b>Yaprak</b>	1,56 ± 0,15	1,85 ± 0,85	0,48 ± 0,03	131,76 ± 6,84 <sup>a</sup>
<b>TAR</b>	40,44 ± 6,39	35766,10 ± 6424,05 <sup>b</sup>	1,59 ± 0,34	549,00 ± 3,65 <sup>a</sup>

Not: a: P<0,0001 ve b: P<0,05 değerleri, kontrol örneklerine göre anlamlı farklılık gösteren deney örneklerini işaret etmektedir.

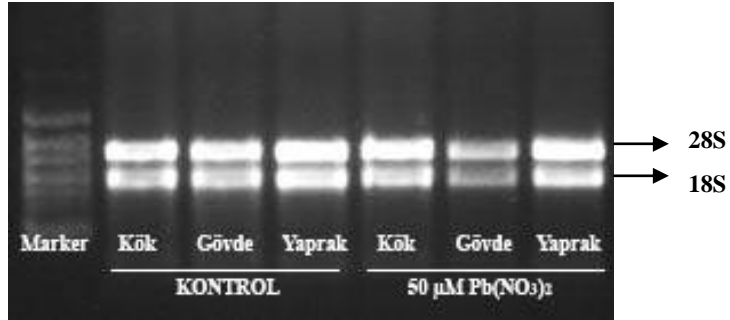
Tablo 4.1’de görüldüğü üzere, her iki ağır metal uygulamasında da kontrol bitkilerinin kök, gövde ve yapraklarında iz miktarda Pb ve Cd saptanmıştır. 50 µM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> çözeltisi uygulanan bitkilerin kök (26984,47 mg/kgKA) (p<0,0001) ve gövde (378,22 mg/kgKA) (p<0,05) kısımlarında akümüle edilen ağır metal miktarı, kontrol bitkilerinin kök ve gövdelerinde bulunan miktara göre belirgin bir farkla artış göstermiştir. Bunun yanısıra Pb uygulaması yapılan bitkilerin yapraklarında biriken Pb miktarı ile kontrol bitkilerinin yapraklarında saptanan miktar arasında herhangi bir fark yoktur (p>0,05). 25 µM CdSO<sub>4</sub> çözeltisi uygulanan bitkilerde de Pb uygulaması yapılan bitkilerde olduğu gibi, kök (1763,51 mg/kgKA) ve gövde (231,29 mg/kgKA)’de akümüle edilen metal miktarı kontrol bitkilerine kıyasla belirgin bir şekilde artmıştır (p<0,0001). Ancak, Cd uygulaması yapılan bitkilerde Pb uygulanan bitkilerden farklı olarak, yapraklarda biriken metal miktarı kontrol bitkilerinin yapraklarına göre önemli derecede artış göstermiştir (p<0,0001). Her iki uygulamada da bitkinin farklı kısımlarında akümüle edilen metal miktarlarına bakıldığında, en fazla miktarın kökte saptandığı, bunu sırasıyla gövde ve yaprakların takip ettiği görülmektedir. Eşit sürede 50 µM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ve 25 µM CdSO<sub>4</sub> uygulamaları yapılan bitkilerin total akümülyasyon oranları

karşılaştırıldığında, Pb uygulanan bitkilerin Cd uygulanan bitkilere kıyasla daha fazla miktarda metali (%98 oranında) bünyelerinde biriktirdikleri gözlenmiştir.

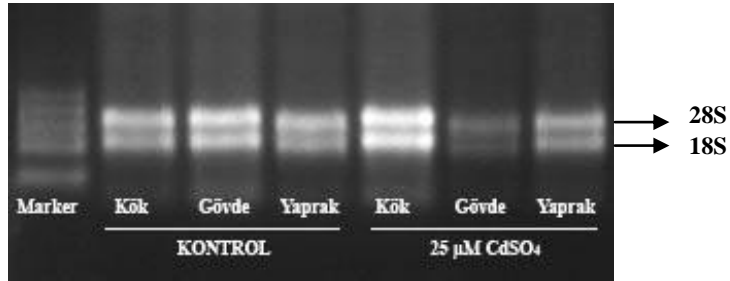
## 4.2. AĞIR METAL UYGULAMASI YAPILAN BİTKİLERDE ANLATIMI DEĞİŞEN GENLERİN TANIMLANMASI VE BELİRLENMESİ

### 4.2.1. *Brassica juncea* var. P78 Bitkisinden Total RNA İzolasyonu

24 saat boyunca  $50 \mu\text{M Pb}(\text{NO}_3)_2$  ya da  $25 \mu\text{M CdSO}_4$  çözeltisi uygulanan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yaprak dokularından, RNA izolasyon kiti kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu takiben NanoDrop spektrofotometresinde yapılan ölçümler sonucunda, elde edilen total RNA'ların saflık dereceleri (OD260/OD280) 1,80 ile 2,00 arasında saptanmıştır. *B. juncea* bitkisinin kök, gövde ve yaprak dokularından elde edilen total RNA'ların konsantrasyon miktarları ve sağlımlıkları, %1'lik formaldehitli agaroz jelde ayrıştırılarak teyit edilmiştir (Şekil 4.3, Şekil 4.4).



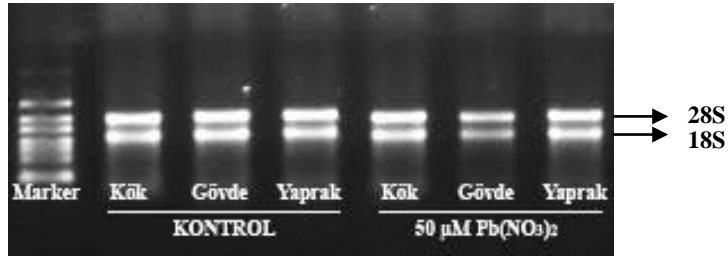
Şekil 4.3: 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yaprak dokularından izole edilen total RNA'ların %1'lik formaldehitli agaroz jel görüntüleri. (Marker: RiboRuler-High Range RNA Ladder, 200-6000baz).



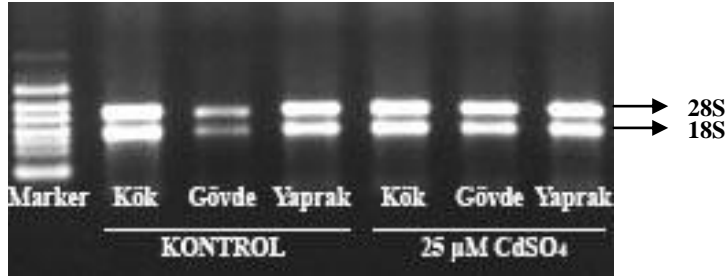
Şekil 4.4: 24 saat boyunca Cd uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yaprak dokularından izole edilen total RNA'ların %1'lik formaldehitli agaroz jel görüntüleri. (Marker: RiboRuler-High Range RNA Ladder, 200-6000baz).

#### 4.2.2. *Brassica juncea* var. P78 Bitkisinden Elde Edilen Total RNA'ların Saflaştırılması

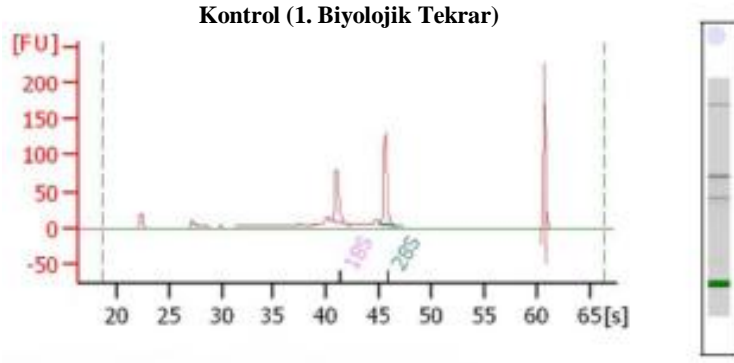
24 saat boyunca Pb ve Cd uygulamaları yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yaprak dokularından elde edilen total RNA'lara DNaz I enzimi uygulanarak, genomik DNA'nın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Saf hale getirilen RNA'ların konsantrasyon miktarları ve sağlımlıkları, %1'lik formaldehitli agaroz jelde ayrıştırılarak teyit edilmiştir (Şekil 4.5, Şekil 4.6). Ayrıca mikroarray analizi yapılan, 50  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  çözeltisi uygulanmış, 3'er adet biyolojik tekrarı bulunan kontrol ve ağır metal uygulanan deney bitkilerinin kök örneklerine ait total RNA'ların konsantrasyon miktarları, sağlımlıkları (Şekil 4.7) ve genel jel profili (Şekil 4.8) Bioanalyzer 2100 (Agilent) kullanılarak kontrol edilmiştir.



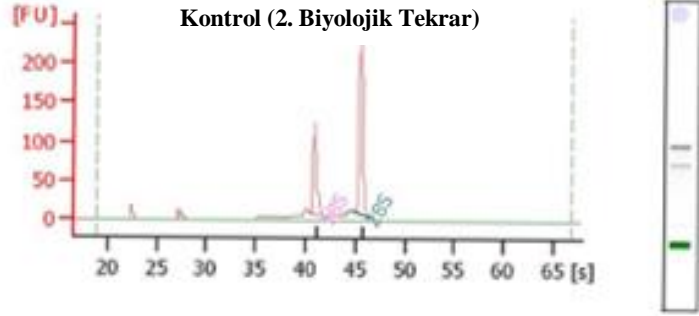
Şekil 4.5: 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yaprak dokularına ait total RNA'ların DNaz I muamelesinden sonra %1'lik formaldehitli agaroz jel görüntüleri. (Marker: RiboRuler-High Range RNA Ladder, 200-6000baz).



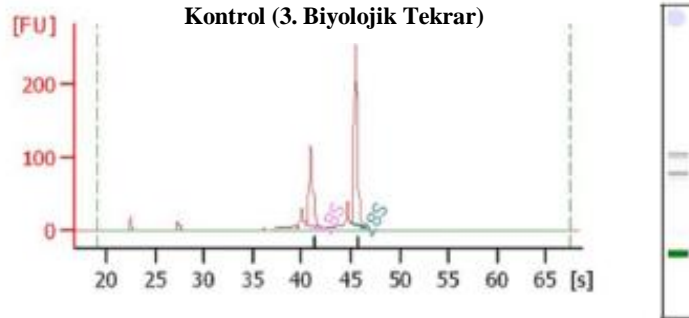
Şekil 4.6: 24 saat boyunca Cd uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yaprak dokularına ait total RNA'ların DNaz I muamelesinden sonra %1'lik formaldehitli agaroz jel görüntüleri. (Marker: RiboRuler-High Range RNA Ladder, 200-6000baz).



RNA Alanı: 456.9  
 RNA Konsantrasyonu: 136 ng/µl  
 rRNA Oranı (28S/18S): 1.5  
 RNA bütünlük numarası (RIN): 8.4 (8.02.07)

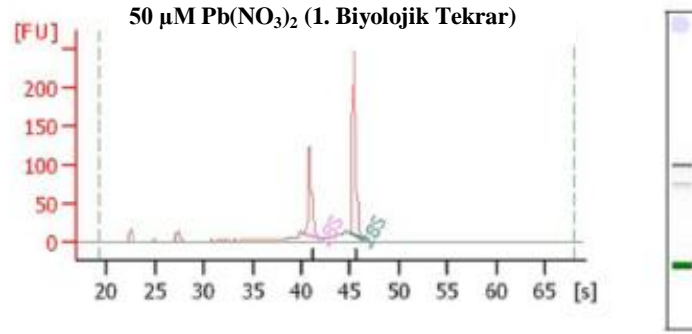


RNA Alanı: 560.1  
 RNA Konsantrasyonu: 169 ng/µl  
 rRNA Oranı (28S/18S): 1.7  
 RNA bütünlük numarası (RIN): 8.8 (8.02.07)

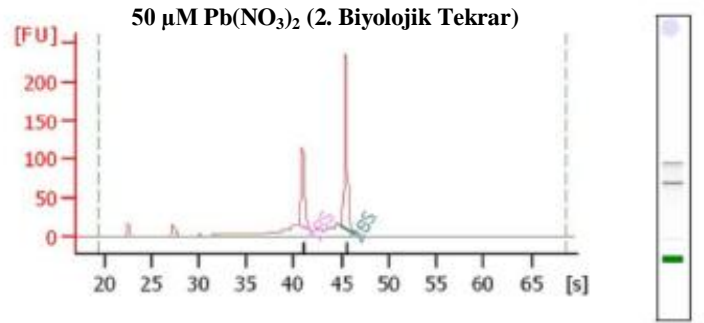


RNA Alanı: 570.7  
 RNA Konsantrasyonu: 170 ng/µl  
 rRNA Oranı (28S/18S): 1.8  
 RNA bütünlük numarası (RIN): 8.7 (8.02.07)

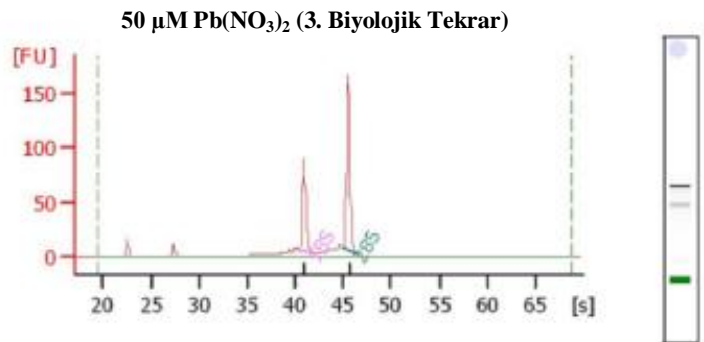
Şekil 4.7: 24 saat boyunca 50 µM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> çözeltisi uygulanan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök dokusundan elde edilen total RNA'ların DNazI muamelesini takiben Bioanalyzer Agilent 2100 cihazında okuma sonrası her bir biyolojik tekrarına ait jel görüntü ve miktarları.



RNA Alanı: 548.8  
 RNA Konsantrasyonu: 163 ng/ $\mu\text{l}$   
 rRNA Oranı (28S/18S): 1.7  
 RNA bütünlük numarası (RIN): 9 (B.02.07)



RNA Alanı: 610.0  
 RNA Konsantrasyonu: 181 ng/ $\mu\text{l}$   
 rRNA Oranı (28S/18S): 1.7  
 RNA bütünlük numarası (RIN): 8.5 (B.02.07)

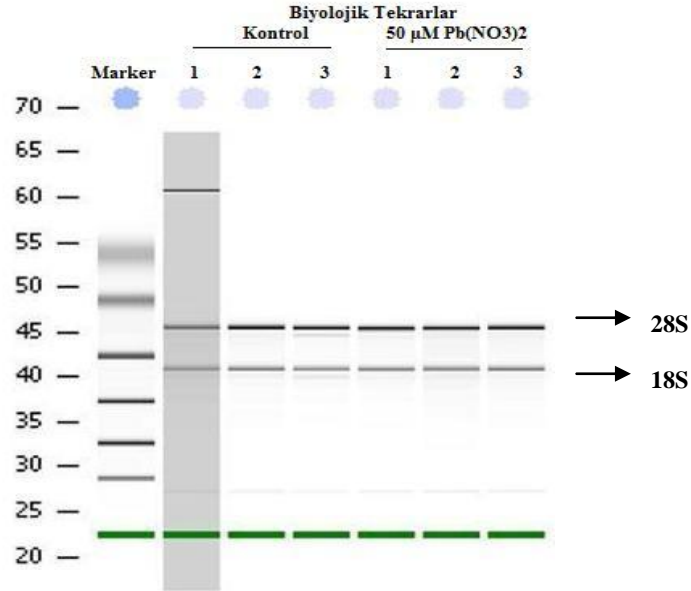


RNA Alanı: 403.7  
 RNA Konsantrasyonu: 120 ng/ $\mu\text{l}$   
 rRNA Oranı (28S/18S): 1.6  
 RNA bütünlük numarası (RIN): 9 (B.02.07)

Şekil 4.7: Devamı.



Şekil 4.7’de görüldüğü üzere, 50  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  çözeltisi uygulanan ve 3’er adet biyolojik tekrarı bulunan kontrol ve ağır metal uygulanan deney bitkilerinin kök örneklerine ait total RNA’ların oranları (28S/18S) 2 civarında, RNA bütünlük numaraları (RIN) da 8-10 arasındadır. Bu sonuçlar, mikroarray analizi yapılan kök örneklerine ait RNA’ların sağlam olduklarını göstermektedir.



Şekil 4.8: 24 saat boyunca  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  çözeltisi uygulanan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök dokusundan elde edilen total RNA’ların DNazI muamelesini takiben Bioanalyzer Agilent 2100 cihazında okuma sonrası her bir biyolojik tekrarına ait genel jel profili.

#### 4.2.3. Mikroarray Analizinden Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi

Bu çalışmada 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan ve 3 biyolojik tekrardan oluşan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök kısımlarında mikroarray analiz yapılmıştır. Mikroarray analiz tekniği, ağır metal stresine karşı bitki düzenleyici mekanizmalarının anlaşılması için kullanılan faydalı bir araçtır. Bu yöntem, binlerce genin ekspresyon seviyelerinin aynı anda çalışmasını sağlayan güçlü ve yüksek verimli bir teknolojidir (Liu ve diğ., 2009). *B. juncea* bitkisinin mikroarray platformunda ticari temsilcisi bulunmadığı için yapılan analizde aynı familyaya üye *Arabidopsis* bitkisine ait gen çipler (The GeneChip® *Arabidopsis* ATH1 Genome Array) kullanılmıştır.

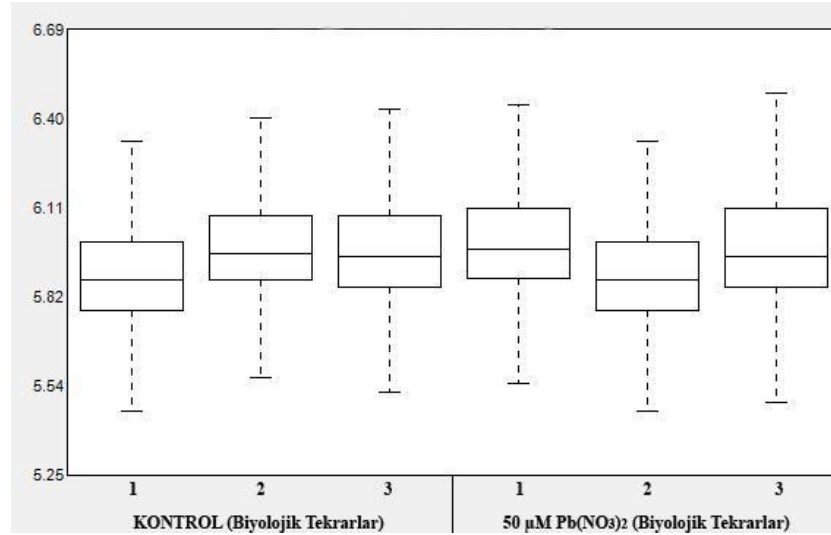
Mikroarray analiz sonucunda Ay-Ka Ltd. Şti.’den alınan ham veriler, gen ekspresyon analizi için gerekli çeşitli programlarda işlenmiştir. Mikroarray analiz sonucunda prob hücrelerinin yoğunluğunu gösteren .CEL dosyası formatında elde edilen ham veriler,

“Expression Console” (<http://www.affymetrix.com>) ve “MultiExperiment Viewer” (<http://www.tm4.org>) programlarına aktarılarak değerlendirilmiştir.

#### 4.2.3.1. Verilerin Deney Kalitesi Bakımından Değerlendirilmesi

Pb uygulaması yapılan *B. juncea* bitkisinin kontrol ve ağır metal uygulanan deney gruplarına ait kök örneklerinden elde edilen mikroarray sonuçları, “Expression Console” (<http://www.affymetrix.com>) programı kullanılarak deney kalitesi bakımından değerlendirilmiştir. Elde edilen ham verilerin bu programda işlenmesi ile oluşturulan kutu grafiği, sinyal histogram grafiği ve ısı haritaları, arrayler arasındaki korelasyonu göstermektedir.

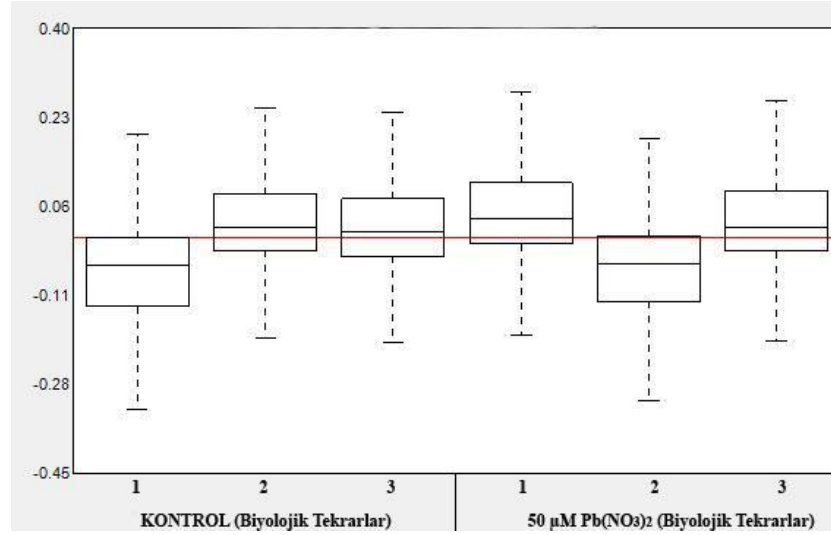
Şekil 4.9’da 24 saat boyunca 50  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  çözeltisi uygulanan *B. juncea* var. P78 bitkisine ait kök örneklerinin, gen çip üzerindeki prob hücrelerinin ışımaya şiddetlerinin logaritmik dağılımı verilmiştir. Şekil 4.9’daki kutu grafiği, her array için prob hücrelerinin ışımaya şiddeti değerlerini göstermektedir. Dağılımlar arasında görülen farklılıklar, kutu grafiğini oluşturan ham verilerin normalize edilmemiş olmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.9: 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kontrol ve deney gruplarına ait kök örneklerinin, gen çip üzerindeki prob hücrelerinin ışımaya şiddetlerinin logaritmik dağılımı.

Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisine ait kök örneklerinin, gen çip üzerindeki prob hücrelerinin ışımaya şiddetlerinin göreceli logaritmik dağılımı Şekil

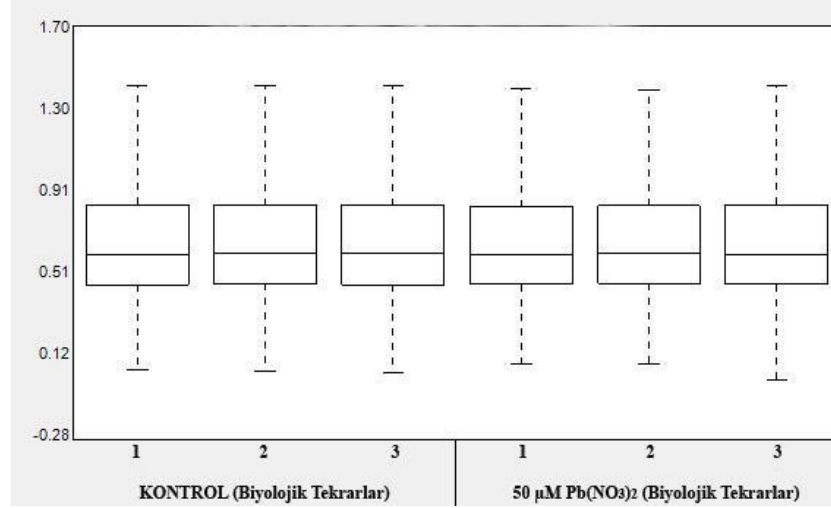
4.10'da gösterilmiştir. Şekildeki kutu grafiğinde, her prob ışına şiddetinin tüm arraylerin medyan prob ışına şiddetine oranının dağılımı verilmekte ve farklı prob ışına şiddeti gösteren arrayler tanımlanmaktadır. Kutu grafiğinde kullanılan ham veriler normalize edilmediği için, prob ışına şiddetlerinin dağılımları arasındaki farklılık görülmektedir.



Şekil 4.10: 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kontrol ve deney gruplarına ait kök örneklerinin, gen çip üzerindeki prob hücrelerinin ışına şiddetlerinin göreceli logaritmik dağılımı.

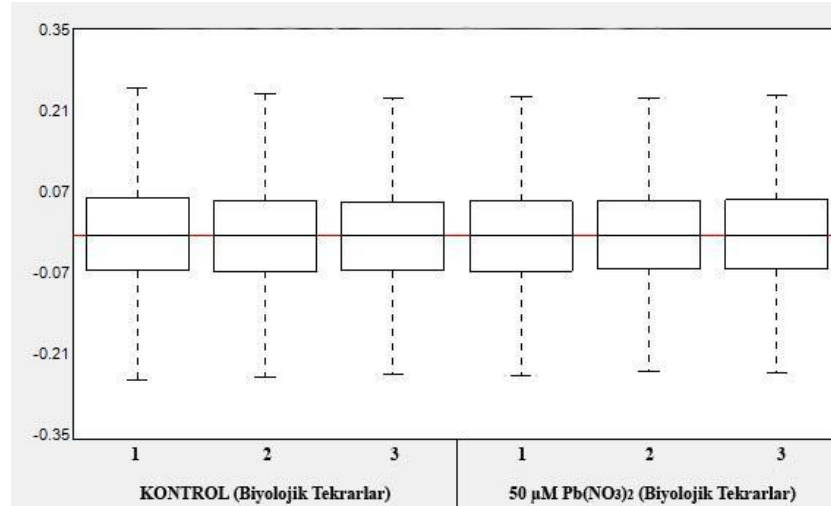
Mikroarray çalışmalarında mRNA seviyelerinin ölçümlerini etkileyerek direkt karşılaştırma yapmayı zorlaştıran slayt heterojenitesi, spotlama varyasyonları, arka plan sinyalleri gibi pek çok değişkeni minimize ederek ortak bir baz oluşturmak için mikroarray analiz sonucunda elde edilen veriler normalize edilmiştir. Verilerin normalizasyonu için RMA (Kuvvetli Çoklu Çip Analizi-Robust Multichip Analyses) algoritması kullanılmıştır. Bu yöntem, kontrol ve deney grupları arasındaki en küçük farklılıklara duyarlılığı artırmaktadır. Ayrıca değişkenler arasındaki varyansı minimize etmektedir.

Şekil 4.11'de 24 saat boyunca 50 µM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> çözeltisi uygulanan *B. juncea* var. P78 bitkisine ait kök örneklerinin, gen çip üzerindeki prob hücrelerinin ışına sinyallerinin normalize edildikten sonraki logaritmik dağılımı verilmiştir. Şekil 4.11'de verilen sinyal kutu grafiği, prob set sinyal değerlerini göstermektedir.



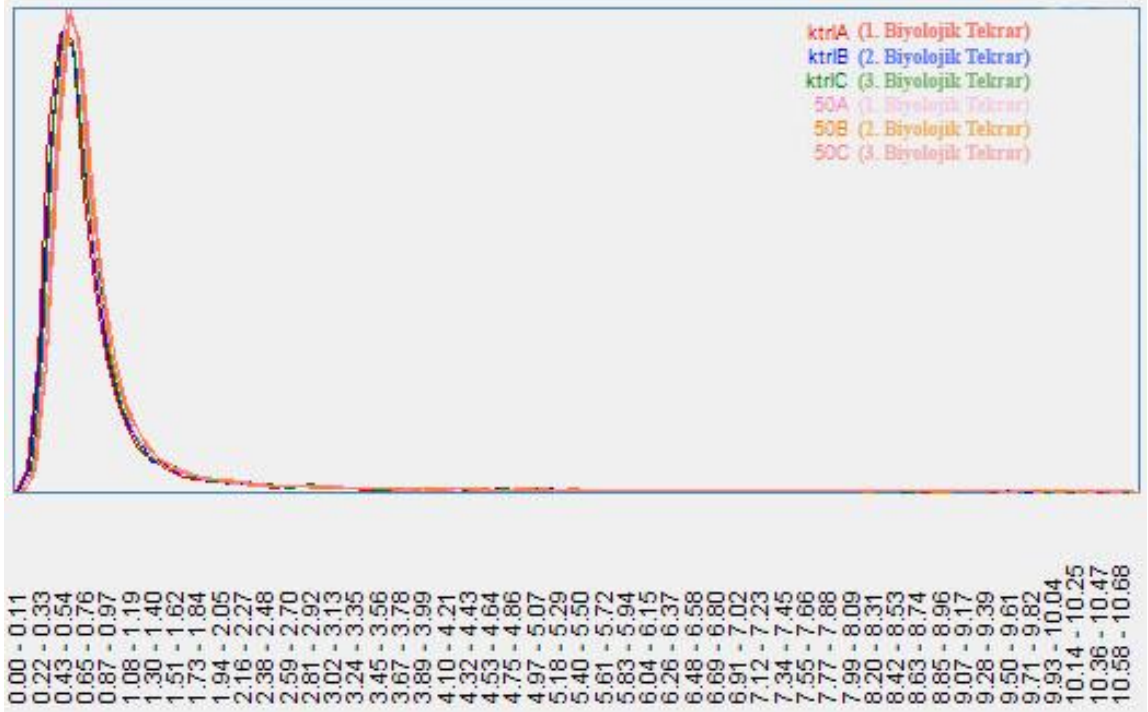
Şekil 4.11: 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kontrol ve deney gruplarına ait kök örneklerinin, gen çip üzerindeki prob hücrelerinin ışına şiddetlerinin RMA normalizasyonu sonrası logaritmik dağılımı.

24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisine ait kök örneklerinin, gen çip üzerindeki prob hücrelerinin ışına sinyallerinin normalize edildikten sonraki göreceli logaritmik dağılımı Şekil 4.12’de gösterilmiştir. Şekildeki göreceli sinyal kutu grafiğinde, her prob set sinyalinin tüm arraylerin medyan prob set sinyaline oran dağılımı verilmekte ve farklı sinyal dağılımı gösteren arrayler tanımlanmaktadır. Kutu grafiğini oluşturan ham veriler normalize edildikten sonra, arrayler arasında farklı sinyal dağılımı gösteren bulunmamaktadır.



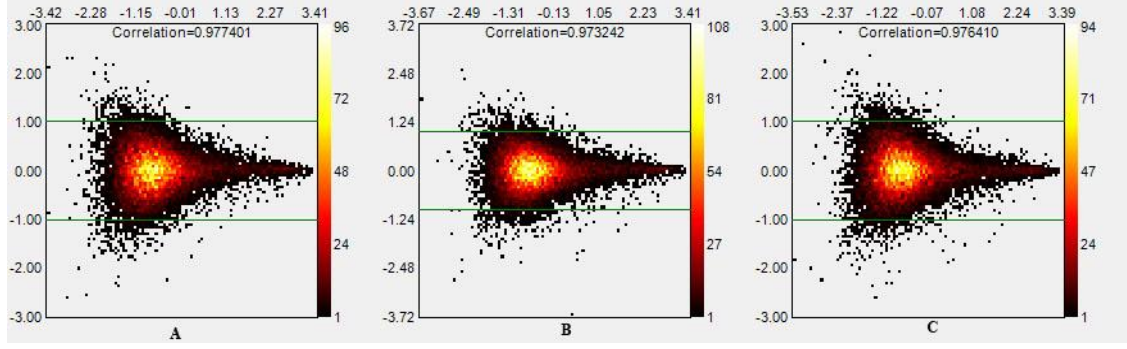
Şekil 4.12: 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kontrol ve deney gruplarına ait kök örneklerinin, gen çip üzerindeki prob hücrelerinin ışına şiddetlerinin RMA normalizasyonu sonrası göreceli logaritmik dağılımı.

Şekil 4.13’de 24 saat boyunca 50  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  çözeltisi uygulanan *B. juncea* var. P78 bitkisine ait kök örneklerinin, gen çip üzerindeki prob hücrelerinin ışımaya şiddetlerinin normalize edildikten sonraki sinyal değerlerinin histogram grafiği bulunmaktadır.

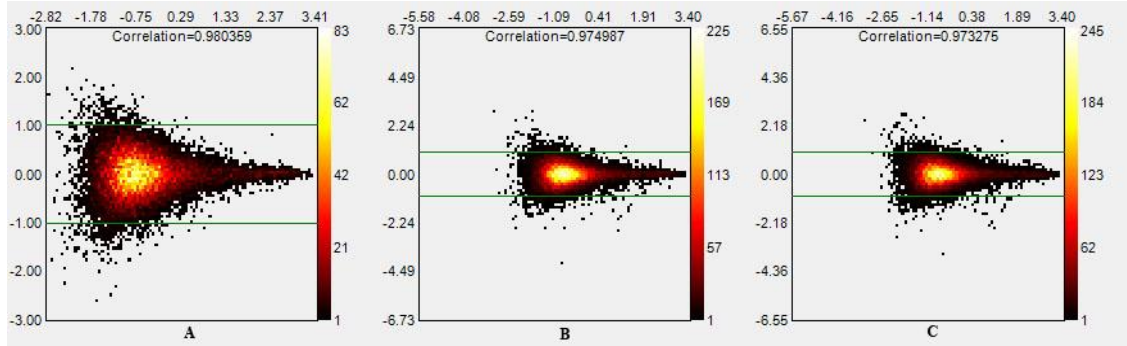


Şekil 4.13: 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kontrol ve deney gruplarına ait kök örneklerinin, gen çip üzerindeki prob hücrelerinin ışımaya şiddetlerinin normalize edildikten sonraki sinyal değerlerinin histogram grafiği.

Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kontrol ve deney gruplarına ait kök örneklerinden elde edilen ham verilerin işlenmesi ile oluşturulan ısı haritaları (MA grafikleri) Şekil 4.14 ve Şekil 4.15’de verilmiştir. MA grafiklerinde, Y eksenindeki M (değişikliğin büyüklüğü) [ $M = (\log(\text{Signal array1}) - \log(\text{Signal array2}))$ ], X eksenindeki A (ortalama  $\log(\text{Signal})$ ) ile kıyaslanmaktadır. Y ekseninde,  $\pm 2$  kat değişikliği arasındaki eşik değerleri  $\log 2$  tabanında yeşil bir hatla gösterilmiştir. Renk değişikliği, veri noktaları tarafından temsil edilen problemlerin yoğunluğunu ortaya koymaktadır. 50  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  çözeltisi uygulanan *B. juncea* var. P78 bitkisine ait kök örneklerinin kontrol grubunun biyolojik tekrarlarından elde edilen ifade sinyallerinin MA grafikleri Şekil 4.14’de, ağır metal uygulanan deney grubunun biyolojik tekrarlarından elde edilen ifade sinyallerinin MA grafikleri de Şekil 4.15’de görülmektedir. Her iki şekilde de, gruplara ait biyolojik tekrarların karşılaştırılması sonucu ortaya çıkan korelasyon değerleri arasında herhangi bir fark bulunmamaktadır.



Şekil 4.14: 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kontrol grubuna ait kök örneklerinin, A) 1. ve 2. biyolojik tekrarlarından B) 1. ve 3. biyolojik tekrarlarından C) 2. ve 3. biyolojik tekrarlarından elde edilen ifade sinyallerinin MA grafiği.  $M = \log_2(\text{Sinyal1}/\text{Sinyal2})$  ve  $A = \frac{1}{2} (\log_2(\text{Sinyal1} + \text{Sinyal2}))$ .



Şekil 4.15: 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin deney grubuna ait kök örneklerinin, A) 1. ve 2. biyolojik tekrarlarından B) 1. ve 3. biyolojik tekrarlarından C) 2. ve 3. biyolojik tekrarlarından elde edilen ifade sinyallerinin MA grafiği.  $M = \log_2(\text{Sinyal1}/\text{Sinyal2})$  ve  $A = \frac{1}{2} (\log_2(\text{Sinyal1} + \text{Sinyal2}))$ .

Sonuç olarak, bu bölümde verilen kutu grafikleri, sinyal histogram grafiği ve ısı haritaları, 24 saat boyunca  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  çözeltisi uygulanan *B. juncea* var. P78 bitkisine ait kök örnekleriyle yapılan mikroarray analizinin deney kalitesi bakımından başarılı olduğunu göstermektedir.

#### 4.2.3.2. Verilerin Karşılaştırmalı Analizi

24 saat boyunca 50  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  çözeltisi uygulanan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kontrol ve ağır metal uygulanan deney gruplarına ait kök örneklerinden elde edilen mikroarray sonuçları, “MultiExperiment Viewer“ (<http://www.tm4.org>) programında işlenerek, taranmış slayt görüntülerinin sayısal verilere dönüştürülmesi, verilerin normalize edilmesi ve normalize edilmiş verilerin analizi sağlanmıştır. Her bir bağımsız deney ayrı ayrı normalize edildikten sonra kontrol ve deney grupları arasında farklı

eksprese edilen genlerin tanımlanması için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanarak gen listeleri oluşturulmuştur. 1,3 kat ve daha fazla ekspresyon sinyali olan prob grupları “teşvik edilen” (Tablo 4.2), -1,3 kat ve daha az ekspresyon sinyali olan prob grupları ise “baskılanan” (Tablo 4.3) genler olarak ifade edilmiştir ( $p < 0,05$ ). Her bir prob için hesaplanan kat değişimi, deney örneğinin sinyal yoğunluğunun kontrol örneğinin sinyal yoğunluğuna bölünmesiyle elde edilmiştir. Oluşturulan gen listesinde yer alan problemler, veri tabanları (<http://www.arabidopsis.org/>) kullanılarak tanımlanmıştır.

Tablo 4.2: 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisine ait kök örneklerinde, deney grubunda kontrol grubuna oranla “teşvik edilen” genlerin listesi.

	Prob No	Lokus Tanımlayıcı	Baz Dizilerinin Genetik Yapısı İle İlgili Bilgi	p değeri	Kat Değişimi
1	260294_at	AT1G63660	GMP synthase (glutamine-hydrolyzing), putative / glutamine amidotransferase, putative	0,08	1,30
2	250136_at	AT5G15380	DRM1 (DOMAINS REARRANGED METHYLASE 1)	0,01	1,30
3	256862_at	AT3G23940	dehydratase family	0,10	1,30
4	253793_at	AT4G28710	XIH (Myosin-like protein XIH)	0,02	1,31
5	266765_at	AT2G46860	ATPPA3 (ARABIDOPSIS THALIANA PYROPHOSPHORYLASE 3); inorganic diphosphatase/ pyrophosphatase	0,07	1,31
6	259008_at	AT3G09390	MT2A (METALLOTHIONEIN 2A)	0,08	1,31
7	258074_at	AT3G25890	AP2 domain-containing transcription factor, putative	0,28	1,31
8	265056_at	AT1G51980	mitochondrial processing peptidase alpha subunit, putative	0,10	1,31
9	245015_at	ATCG00490	large subunit of RUBISCO.	0,37	1,31
10	248178_at	AT5G54370	late embryogenesis abundant protein-related / LEA protein-related	0,44	1,31
11	264847_at	AT2G17380	AP19 (associated protein 19); ATP binding / protein binding / protein kinase	0,11	1,31
12	260926_at	AT1G21360	GLTP2 (GLYCOLIPID TRANSFER PROTEIN 2); glycolipid binding / glycolipid transporter	0,11	1,32
13	260879_at	AT1G21480	exostosin family protein	0,13	1,32
14	249679_at	AT5G35980	protein kinase family protein	0,27	1,32

Tablo 4.2: Devamı.

	Prob No	Lokus Tanımlayıcı	Baz Dizilerinin Genetik Yapısı İle İlgili Bilgi	p değeri	Kat Değişimi
15	249652_at	AT5G37070	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G08890.1); similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G08890.2); similar to hypothetical protein [Vitis vinifera] (GB:CAN63135.1); contains InterPro domain Protein of unknown funct	0,17	1,32
16	260950_s_at	AT1G06120	[AT1G06120, fatty acid desaturase family protein];[AT1G06090, fatty acid desaturase family protein]	0,05	1,32
17	257193_at	AT3G13160	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	0,16	1,32
18	260233_at	AT1G74550	CYP98A9 (cytochrome P450, family 98, subfamily A, polypeptide 9); oxygen binding	0,02	1,32
19	262880_at	AT1G64880	ribosomal protein S5 family protein	0,02	1,32
20	248580_at	AT5G49890	CLC-C (chloride channel C); anion channel/ voltage-gated chloride channel	0,10	1,32
21	264559_at	AT1G09610	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G09990.1); similar to hypothetical protein [Vitis vinifera] (GB:CAN78768.1); contains InterPro domain Protein of unknown function DUF579, plant (InterPro:IPR006514)	0,71	1,32
22	249627_at	AT5G37510	EMB1467 (EMBRYO DEFECTIVE 1467); NADH dehydrogenase	0,22	1,32
23	247991_at	AT5G56320	ATEXPA14 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A14)	0,12	1,32
24	251687_at	AT3G56460	oxidoreductase, zinc-binding dehydrogenase family protein	0,13	1,33
25	247338_at	AT5G63680	pyruvate kinase, putative	0,02	1,33
26	246511_at	AT5G15490	UDP-glucose 6-dehydrogenase, putative	0,08	1,33
27	262832_s_at	AT1G14870	[AT1G14870, Identical to Uncharacterized protein At1g14870 [Arabidopsis Thaliana] (GB:Q9LQU4); similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT5G35525.1); similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO42338.1); contains InterPro dom	0,64	1,33
28	256711_at	AT3G30390	amino acid transporter family protein	0,01	1,33
29	252332_at	AT3G48810	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	0,04	1,33
30	247638_at	AT5G60490	FLA12 (fasciclin-like arabinogalactan-protein 12)	0,50	1,33
31	246991_at	AT5G67400	peroxidase 73 (PER73) (P73) (PRXR11)	0,04	1,33
32	247900_at	AT5G57290	60S acidic ribosomal protein P3 (RPP3B)	0,11	1,33
33	266123_at	AT2G45180	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	0,60	1,34
34	264611_at	AT1G04680	pectate lyase family protein	0,60	1,34
35	246055_at	AT5G08380	ATAGAL1 (ARABIDOPSIS THALIANA ALPHA-GALACTOSIDASE 1); alpha-galactosidase	0,17	1,34



Tablo 4.2: Devamı.

	Prob No	Lokus Tanımlayıcı	Baz Dizilerinin Genetik Yapısı İle İlgili Bilgi	p değeri	Kat Değişimi
36	246880_s_at	AT5G26000	[AT5G26000, TGG1 (THIOGLUCOSIDE GLUCOHYDROLASE 1); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds];[AT5G25980, TGG2 (GLUCOSIDE GLUCOHYDROLASE 2); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds]	0,77	1,34
37	252929_at	AT4G38970	fructose-bisphosphate aldolase, putative	0,11	1,35
38	263498_at	AT2G42610	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G07090.1); similar to hypothetical protein [Vitis vinifera] (GB:CAN66524.1); contains InterPro domain Protein of unknown function DUF640 (InterPro:IPR006936)	0,81	1,35
39	255775_at	AT1G18600	rhomboid family protein	0,18	1,35
40	262154_at	AT1G52700	phospholipase/carboxylesterase family protein	0,02	1,35
41	253877_at	AT4G27435	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G15480.1); similar to fiber protein Fb34 [Gossypium barbadense] (GB:AAR07596.1); contains InterPro domain Protein of unknown function DUF1218 (InterPro:IPR009606)	0,77	1,35
42	252513_at	AT3G46220	similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO21736.1)	0,02	1,35
43	258987_at	AT3G08950	electron transport SCO1/SenC family protein	0,11	1,35
44	260780_at	AT1G14610	TWN2 (TWIN 2); ATP binding / aminoacyl-tRNA ligase	0,03	1,35
45	252943_at	AT4G39330	mannitol dehydrogenase, putative	0,07	1,35
46	265042_at	AT1G04040	acid phosphatase class B family protein	0,19	1,36
47	253270_at	AT4G34160	CYCD3/CYCD3;1/D3 (CYCLIN D3;1); cyclin-dependent protein kinase regulator/ protein binding	0,30	1,36
48	260126_at	AT1G36370	SHM7 (serine hydroxymethyltransferase 7); glycine hydroxymethyltransferase	0,03	1,36
49	265943_at	AT2G19570	CDA1 (CYTIDINE DEAMINASE 1)	0,11	1,36
50	266608_at	AT2G35500	shikimate kinase-related	0,01	1,36
51	263590_at	AT2G01820	leucine-rich repeat protein kinase, putative	0,33	1,36
52	265381_at	AT2G16680	transposable element gene	0,02	1,37
53	245660_at	AT1G28240	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G53040.1); similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G53040.2); similar to hypothetical protein [Vitis vinifera] (GB:CAN81089.1); contains InterPro domain Protein of unknown funct	0,05	1,37
54	255824_at	AT2G40530	unknown protein	0,04	1,37
55	250928_at	AT5G03280	EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE 2); transporter	0,03	1,37

Tablo 4.2: Devamı.

	<b>Prob No</b>	<b>Lokus Tanımlayıcı</b>	<b>Baz Dizilerinin Genetik Yapısı İle İlgili Bilgi</b>	<b>p değeri</b>	<b>Kat Değişimi</b>
<b>56</b>	257066_at	AT3G18280	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	0,33	1,37
<b>57</b>	259525_at	AT1G12560	ATEXPA7 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A7)	0,09	1,37
<b>58</b>	255517_at	AT4G02290	ATGH9B13 (ARABIDOPSIS THALIANA GLYCOSYL HYDROLASE 9B13); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	0,18	1,37
<b>59</b>	258641_at	AT3G08030	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT2G41800.1); similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO40802.1); contains InterPro domain Protein of unknown function DUF642 (InterPro:IPR006946)	0,36	1,38
<b>60</b>	261944_at	AT1G64650	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G27720.1); similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G49310.1); similar to unknown [Populus trichocarpa] (GB:ABK93582.1); similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:C	0,13	1,38
<b>61</b>	252479_at	AT3G46560	TIM9 (EMBRYO DEFECTIVE 2474); P-P-bond-hydrolysis-driven protein transmembrane transporter	0,04	1,38
<b>62</b>	253998_at	AT4G26010	peroxidase, putative	0,19	1,39
<b>63</b>	251735_at	AT3G56090	ATFER3 (FERRITIN 3); ferric iron binding	0,28	1,39
<b>64</b>	254119_at	AT4G24780	pectate lyase family protein	0,52	1,39
<b>65</b>	264203_at	AT1G22780	PFL (POINTED FIRST LEAVES); structural constituent of ribosome	0,00	1,39
<b>66</b>	252337_at	AT3G48750	CDC2/CDC2A/CDC2AAT/CDK2/CDKA1/CDKA;1 (CELL DIVISION CONTROL 2); cyclin-dependent protein kinase/ kinase/ protein binding / protein kinase	0,10	1,40
<b>67</b>	257823_at	AT3G25190	nodulin, putative	0,26	1,40
<b>68</b>	264092_at	AT1G79040	PSBR (photosystem II subunit R)	0,66	1,41
<b>69</b>	261650_at	AT1G27770	ACA1 (autoinhibited Ca <sup>2+</sup> -ATPase 1); calcium-transporting ATPase/ calmodulin binding	0,15	1,42
<b>70</b>	248765_at	AT5G47650	ATNUDT2 (Arabidopsis thaliana Nudix hydrolase homolog 2); ADP-ribose diphosphatase/ NAD binding / hydrolase	0,25	1,42
<b>71</b>	266694_at	AT2G19790	clathrin adaptor complex small chain family protein	0,14	1,42

Tablo 4.2: Devamı.

	<b>Prob No</b>	<b>Lokus Tanımlayıcı</b>	<b>Baz Dizilerinin Genetik Yapısı İle İlgili Bilgi</b>	<b>p değeri</b>	<b>Kat Değişimi</b>
72	250683_x_at	AT5G06640	proline-rich extensin-like family protein	0,25	1,42
73	263375_s_at	AT2G20530	[AT2G20530, ATPHB6 (PROHIBITIN 6)];[AT4G28510, ATPHB1 (PROHIBITIN 1)]	0,19	1,43
74	255997_s_at	AT1G29910	[AT1G29910, CAB3 (CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 3); chlorophyll binding];[AT1G29920, CAB2 (Chlorophyll a/b-binding protein 2); chlorophyll binding];[AT1G29930, CAB1 (CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 1); chlorophyll binding]	0,54	1,43
75	247692_s_at	AT5G59970	[AT5G59970, histone H4];[AT5G59690, histone H4]	0,10	1,44
76	267053_s_at	AT2G38380	[AT2G38380, peroxidase 22 (PER22) (P22) (PRXEA) / basic peroxidase E];[AT2G38390, peroxidase, putative]	0,08	1,45
77	266700_at	AT2G19740	60S ribosomal protein L31 (RPL31A)	0,04	1,47
78	257339_s_at	ATMG00040	[ATMG00040, hypothetical protein];[AT2G07671, H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase, C subunit family protein];[ATMG01080, subunit 9 of mitochondrial F <sub>0</sub> -ATPase]	0,17	1,47
79	250778_at	AT5G05500	pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	0,14	1,49
80	250798_at	AT5G05340	peroxidase, putative	0,23	1,52
81	254341_at	AT4G22130	SRF8 (STRUBBELIG-RECEPTOR FAMILY 8); kinase	0,13	1,52
82	245019_at	ATCG00530	hypothetical protein	0,20	1,54
83	260181_at	AT1G70710	AtGH9B1 (ARABIDOPSIS THALIANA GLYCOSYL HYDROLASE 9B1); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	0,59	1,54
84	253890_s_at	AT4G27585	[AT4G27585, band 7 family protein];[AT5G54100, band 7 family protein]	0,05	1,55
85	251325_s_at	AT3G61470	[AT3G61470, LHCA2 (Photosystem I light harvesting complex gene 2); chlorophyll binding];[AT5G28450, chlorophyll A-B binding protein, chloroplast, putative / LHCI type II CAB, putative]	0,67	1,56
86	249490_s_at	AT5G39110	[AT5G39110, germin-like protein, putative];[AT5G39150, germin-like protein, putative];[AT5G39120, germin-like protein, putative];[AT5G39180, germin-like protein, putative]	0,27	1,59
87	258183_at	AT3G21550	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G21520.1); similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO71058.1); contains InterPro domain Protein of unknown function DUF679 (InterPro:IPR007770)	0,18	1,61
88	251843_x_at	AT3G54590	ATHRGPI1; structural constituent of cell wall	0,10	1,62
89	260147_at	AT1G52790	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	0,32	1,68

Tablo 4.2: Devamı.

	Prob No	Lokus Tanımlayıcı	Baz Dizilerinin Genetik Yapısı İle İlgili Bilgi	p değeri	Kat Değişimi
90	254559_at	AT4G19200	proline-rich family protein	0,01	1,74
91	249073_at	AT5G44020	acid phosphatase class B family protein	0,09	1,74
92	262632_at	AT1G06680	PSBP-1 (OXYGEN-EVOLVING ENHANCER PROTEIN 2); poly(U) binding	0,63	1,75
93	248967_at	AT5G45350	proline-rich family protein	0,13	1,76
94	254970_at	AT4G10340	LHCB5 (LIGHT HARVESTING COMPLEX OF PHOTOSYSTEM II 5); chlorophyll binding	0,51	1,82

Not: Gri renkli satırlar mikroarray analiz sonucunda istatistiksel olarak anlamlı fark gösteren genleri işaret etmektedir (p<0,05).

Tablo 4.2’de görüldüğü üzere, Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök kısımlarında, kontrol grubuna oranla deney grubunda 94 adet gen teşvik edilmiştir. Mikroarray analiz sonucunda, teşvik edilen genler içinden 20 tanesi istatistiksel olarak anlamlı fark göstermektedir (p<0,05).

Tablo 4.3: 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisine ait kök örneklerinde, deney grubunda kontrol grubuna oranla “baskılanan” genlerin listesi.

	Prob No	Lokus Tanımlayıcı	Baz Dizilerinin Genetik Yapısı İle İlgili Bilgi	p değeri	Kat Değişimi
1	245226_at	AT3G29970	germination protein-related	0,34	-2,58
2	266965_at	AT2G39510	nodulin MtN21 family protein	0,18	-2,06
3	260847_s_at	AT1G17290	[AT1G17290, ALAAT1 (ALANINE AMINOTRANSFERAS); alanine transaminase];[AT1G72330, ALAAT2 (ALANINE AMINOTRANSFERASE 2); alanine transaminase]	0,29	-1,85
4	249266_at	AT5G41670	6-phosphogluconate dehydrogenase family protein	0,24	-1,69
5	250738_at	AT5G05730	ASA1 (ANTHRANILATE SYNTHASE ALPHA SUBUNIT 1); anthranilate synthase	0,07	-1,66
6	244988_s_at	ATCG00840	[ATCG00840, One of two chloroplast genes that encode chloroplast ribosomal protein L23, a constituent of the large subunit of the ribosomal complex];[ATCG01300, One of two chloroplast genes that encode chloroplast ribosomal protein L23, a constituent of t	0,07	-1,62
7	261806_at	AT1G30510	ATRFNR2 (ROOT FNR 2); oxidoreductase	0,32	-1,62
8	245977_at	AT5G13110	G6PD2 (GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE 2); glucose-6-phosphate dehydrogenase	0,26	-1,61
9	253534_at	AT4G31500	CYP83B1 (CYTOCHROME P450 MONOOXYGENASE 83B1); oxygen binding	0,06	-1,60

Tablo 4.3: Devamı.

	Prob No	Lokus Tanımlayıcı	Baz Dizilerinin Genetik Yapısı İle İlgili Bilgi	p değeri	Kat Değişimi
10	253874_at	AT4G27450	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G15450.1); similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO39242.1); contains domain G3DSA:3.60.20.10 (G3DSA:3.60.20.10); contains domain SSF56235 (SSF56235)	0,41	-1,59
11	263608_at	AT2G16260	pseudogene of glycine-rich RNA-binding protein	0,03	-1,57
12	254200_at	AT4G24110	similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO62924.1)	0,45	-1,55
13	261459_at	AT1G21100	O-methyltransferase, putative	0,06	-1,54
14	265475_at	AT2G15620	NIR1 (NITRITE REDUCTASE); ferredoxin-nitrate reductase	0,37	-1,53
15	249818_at	AT5G23860	TUB8 (tubulin beta-8)	0,18	-1,53
16	254496_at	AT4G20070	ATAAH (ARABIDOPSIS THALIANA ALLANTOATE AMIDOHYDROLASE); allantoate deiminase/ metallopeptidase	0,37	-1,52
17	253629_at	AT4G30450	glycine-rich protein	0,06	-1,51
18	263096_at	AT2G16060	AHB1 (ARABIDOPSIS HEMOGLOBIN 1)	0,48	-1,49
19	255940_at	AT1G20380	prolyl oligopeptidase, putative / prolyl endopeptidase, putative / post-proline cleaving enzyme, putative	0,35	-1,48
20	260556_at	AT2G43620	chitinase, putative	0,29	-1,48
21	250234_at	AT5G13420	transaldolase, putative	0,32	-1,48
22	244992_s_at	ATCG00900	[ATCG00900, encodes a chloroplast ribosomal protein S7, a constituent of the small subunit of the ribosomal complex];[ATCG01240, 30S chloroplast ribosomal protein S7]	0,19	-1,48
23	262325_at	AT1G64160	disease resistance-responsive family protein / dirigent family protein	0,04	-1,47
24	244940_at	ATCG01230	[ATCG01230, chloroplast gene encoding ribosomal protein s12. The gene is located in three distinct loci on the chloroplast genome and is transcribed to make one transcript.];[ATCG00905, chloroplast gene encoding ribosomal protein s12. The gene is located	0,17	-1,46
25	261729_s_at	AT1G47860	[AT1G47860, transposable element gene];[AT1G47840, hexokinase, putative]	0,41	-1,46
26	253215_at	AT4G34950	nodulin family protein	0,30	-1,44
27	258293_at	AT3G23430	PHO1 (PHOSPHATE 1)	0,37	-1,43
28	264953_at	AT1G77120	ADH1 (ALCOHOL DEHYDROGENASE 1)	0,56	-1,42

Tablo 4.3: Devamı.

	Prob No	Lokus Tanımlayıcı	Baz Dizilerinin Genetik Yapısı İle İlgili Bilgi	p değeri	Kat Değişimi
29	253344_at	AT4G33550	lipid binding	0,28	-1,41
30	255451_at	AT4G02860	catalytic	0,03	-1,41
31	254035_at	AT4G25970	PSD3 (PHOSPHATIDYLSERINE DECARBOXYLASE 3); calcium ion binding / phosphatidylserine decarboxylase	0,00	-1,41
32	264313_at	AT1G70410	carbonic anhydrase, putative / carbonate dehydratase, putative	0,19	-1,40
33	253522_at	AT4G31290	ChaC-like family protein	0,41	-1,40
34	252022_at	AT3G52930	fructose-bisphosphate aldolase, putative	0,20	-1,39
35	254364_at	AT4G22020	pseudogene, hypothetical protein, similar to uncharacterized glycine-rich protein (GI:7269047) {Arabidopsis thaliana}	0,01	-1,39
36	249327_at	AT5G40890	ATCLC-A (CHLORIDE CHANNEL A); anion channel/ voltage-gated chloride channel	0,03	-1,39
37	253898_s_at	AT5G54810	[AT5G54810, TSB1 (TRYPTOPHAN SYNTHASE BETA-SUBUNIT)];[AT4G27070, TSB2 (TRYPTOPHAN SYNTHASE BETA-SUBUNIT); tryptophan synthase]	0,08	-1,39
38	251053_at	AT5G01490	CAX4 (cation exchanger 4); cation:cation antiporter	0,24	-1,38
39	264424_at	AT1G61740	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G11540.1); similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO38814.1); contains InterPro domain Protein of unknown function DUF81; (InterPro:IPR002781)	0,02	-1,38
40	251802_at	AT3G55380	UBC14 (ubiquitin-conjugating enzyme 14); ubiquitin-protein ligase	0,06	-1,38
41	263298_at	AT2G15290	ATTIC21/CIA5/PIC1/TIC21 (CHLOROPLAST IMPORT APPARATUS 5); copper uptake transmembrane transporter/ iron ion transmembrane transporter/ protein homodimerization	0,03	-1,38
42	253879_s_at	AT4G27560	[AT4G27560, glycosyltransferase family protein];[AT4G27570, glycosyltransferase family protein]	0,06	-1,38
43	256824_at	AT3G22121	other RNA	0,17	-1,37
44	256879_at	AT3G26370	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT5G65470.1); similar to hypothetical protein OsJ_005296 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)] (GB:EAZ21813.1); similar to hypothetical protein OsI_023381 [Oryza sativa (indica cultivar-group)] (G	0,15	-1,37
45	249862_at	AT5G22920	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	0,26	-1,37
46	250723_at	AT5G06300	carboxy-lyase	0,24	-1,37

Tablo 4.3: Devamı.

	Prob No	Lokus Tanımlayıcı	Baz Dizilerinin Genetik Yapısı İle İlgili Bilgi	p değeri	Kat Değişimi
47	255595_at	AT4G01700	chitinase, putative	0,03	-1,36
48	245399_at	AT4G17340	DELTA-TIP2/TIP2;2 (tonoplast intrinsic protein 2;2); water channel	0,48	-1,36
49	248252_at	AT5G53250	AGP22/ATAGP22 (ARABINOGALACTAN PROTEINS 22)	0,37	-1,36
50	261956_at	AT1G64590	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	0,09	-1,35
51	264649_at	AT1G09060	transcription factor jumonji (jmc) domain-containing protein	0,05	-1,35
52	258791_at	AT3G04720	PR4 (PATHOGENESIS-RELATED 4)	0,05	-1,35
53	255752_at	AT1G32050	secretory carrier membrane protein (SCAMP) family protein	0,01	-1,35
54	259688_at	AT1G63120	ATRBL2 (ARABIDOPSIS THALIANA RHOMBOID-LIKE 2); serine-type endopeptidase	0,40	-1,34
55	262323_at	AT1G64190	6-phosphogluconate dehydrogenase family protein	0,32	-1,34
56	261567_at	AT1G33055	unknown protein	0,50	-1,34
57	245668_at	AT1G28330	DRM1 (DORMANCY-ASSOCIATED PROTEIN 1)	0,29	-1,34
58	252198_x_at	AT3G50250	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT4G19270.1)	0,13	-1,34
59	252256_at	AT3G49430	SRP34A (SER/ARG-RICH PROTEIN 34A); RNA binding	0,14	-1,34
60	263285_at	AT2G36120	pseudogene, glycine-rich protein	0,30	-1,33
61	247261_at	AT5G64460	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT1G58280.1); similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO67833.1); contains InterPro domain Phosphoglycerate mutase (InterPro:IPR013078)	0,18	-1,33
62	260637_at	AT1G62380	ACO2 (ACC OXIDASE 2)	0,12	-1,33
63	251649_at	AT3G57330	ACA11 (AUTOINHIBITED CA <sup>2+</sup> -ATPASE 11); calcium-transporting ATPase/ calmodulin binding	0,07	-1,33
64	249335_at	AT5G41010	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III 7 kDa subunit, putative	0,16	-1,32
65	248779_at	AT5G47720	acetyl-CoA C-acyltransferase, putative / 3-ketoacyl-CoA thiolase, putative	0,49	-1,32
66	250950_at	no_match	no_match	0,16	-1,32
67	256153_at	AT1G55060	UBQ12 (UBIQUITIN 12)	0,17	-1,32

Tablo 4.3: Devamı.

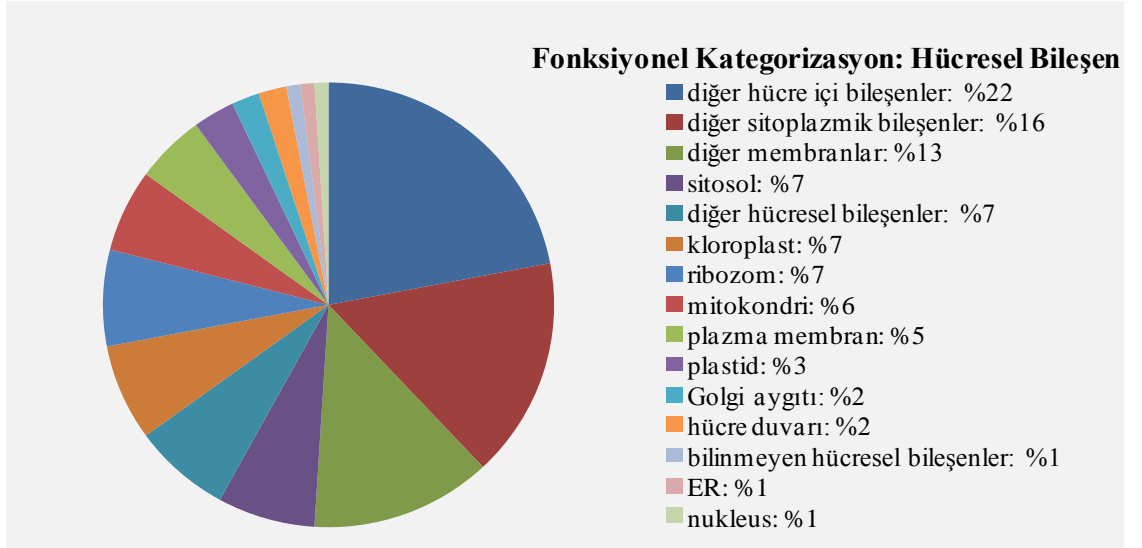
	Prob No	Lokus Tanımlayıcı	Baz Dizilerinin Genetik Yapısı İle İlgili Bilgi	p değeri	Kat Değişimi
68	261036_at	AT1G17470	ATDRG1 (ARABIDOPSIS THALIANA DEVELOPMENTALLY REGULATED G-PROTEIN 1); GTP binding	0,02	-1,32
69	253249_at	AT4G34680	GATA transcription factor 3, putative (GATA-3)	0,22	-1,32
70	247696_at	AT5G59780	MYB59 (myb domain protein 59); DNA binding / transcription factor	0,04	-1,32
71	262474_at	AT1G50240	armadillo/beta-catenin repeat family protein	0,00	-1,32
72	259680_at	AT1G77690	amino acid permease, putative	0,10	-1,32
73	264262_at	AT1G09200	histone H3	0,19	-1,32
74	264080_at	AT2G28520	VHA-A1 (VACUOLAR PROTON ATPASE A 1); ATPase	0,12	-1,31
75	266363_at	AT2G41250	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	0,11	-1,31
76	245988_at	AT5G20610	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT5G26160.1); similar to hypothetical protein [Vitis vinifera] (GB:CAN67684.1)	0,10	-1,31
77	256852_at	AT3G18610	ATRANGAP1 (RAN GTPASE-ACTIVATING PROTEIN 1); nucleic acid binding	0,11	-1,31
78	245254_at	AT4G14680	APS3 (ATP sulfurylase 2); sulfate adenylyltransferase (ATP)	0,23	-1,31
79	260689_at	AT1G32290	unknown protein	0,05	-1,31
80	245699_at	AT5G04250	OTU-like cysteine protease family protein	0,30	-1,31
81	262896_at	AT1G59820	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	0,13	-1,31
82	252067_at	AT3G51370	protein phosphatase 2C, putative / PP2C, putative	0,04	-1,31
83	255012_at	AT4G10030	hydrolase, alpha/beta fold family protein	0,41	-1,31
84	258604_at	AT3G02980	GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family protein	0,03	-1,31
85	245486_x_at	AT4G16240	unknown protein	0,37	-1,31
86	264445_at	AT1G27290	similar to unknown [Populus trichocarpa] (GB:ABK95086.1)	0,02	-1,30
87	256751_at	AT3G27170	CLC-B (chloride channel protein B); anion channel/voltage-gated chloride channel	0,02	-1,30
88	251039_at	AT5G02020	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT3G55646.1); similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (TAIR:AT5G59080.1); similar to unnamed protein product [Vitis vinifera] (GB:CAO15731.1)	0,11	-1,30
89	261396_at	AT1G79800	plastocyanin-like domain-containing protein	0,01	-1,30

Not: Gri renkli satırlar mikroarray analiz sonucunda istatistiksel olarak anlamlı fark gösteren genleri işaret etmektedir (p<0,05).

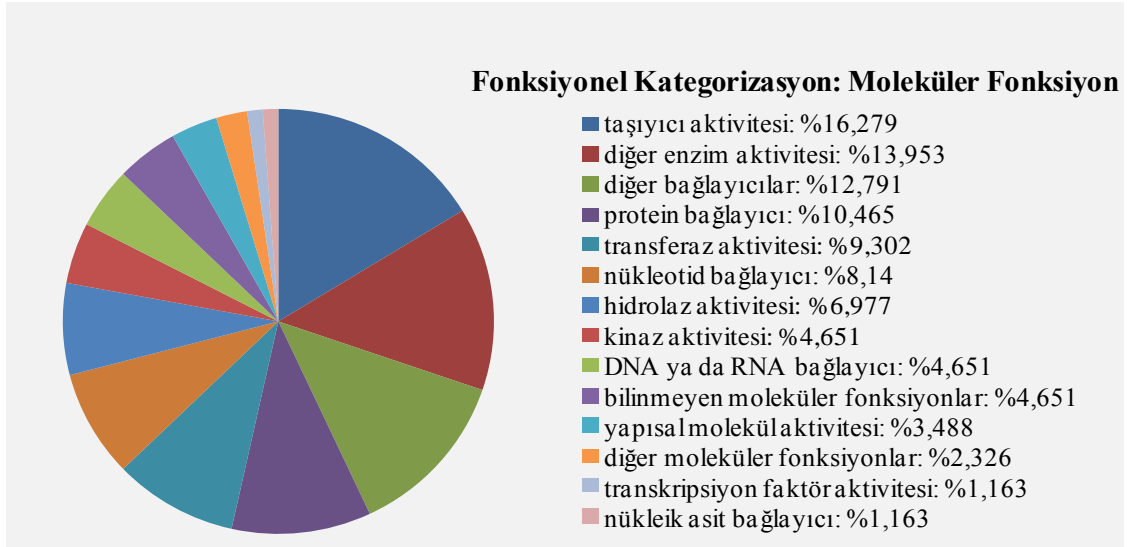
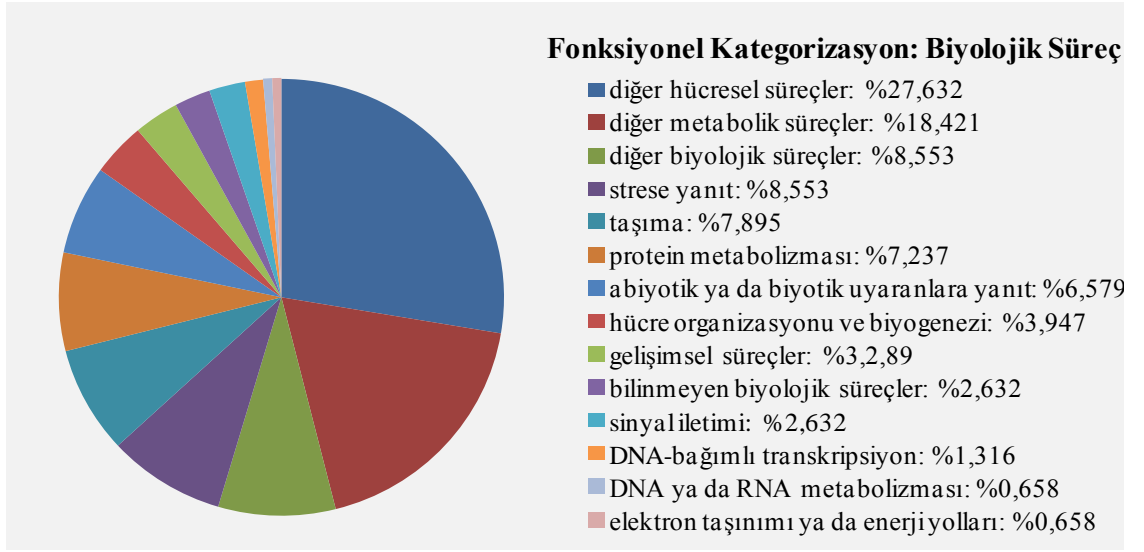


Tablo 4.3'deki gen listesinde, Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök kısımlarında, kontrol grubuna oranla deney grubunda 89 adet baskılanan gen olduğu görülmektedir. Yapılan istatistiksel analizlere göre, baskılanan genler arasından 18 tanesinin anlamlı fark gösterdiği bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).

Şekil 4.16'da *B. juncea* var. P78 bitkisinin deney kök örneklerinde kontrol kök örneklerine oranla anlamlı fark gösteren genlerin, gen ontolojisine göre fonksiyonel kategorizasyonları verilmiştir (<http://www.arabidopsis.org/>). Tüm organizmalarda genlerin rollerini ve gen ürünlerini tanımlamak amacıyla kullanılan gen ontolojisi; hücresel bileşen, biyolojik süreç ve moleküler fonksiyon olarak 3 temel prensip altında organize olmaktadır.



Şekil 4.16: 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisine ait kök örneklerinin, deney grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı fark gösteren genlerin, gen ontolojisine göre fonksiyonel kategorizasyonları.



Şekil 4.16: Devamı.

Şekil 4.16'da görüldüğü üzere, anlamlı fark gösteren 38 tane genin büyük çoğunluğu, hücreyel bileşen bakımından "hücre içi bileşenler"de, biyolojik süreçler açısından "hücreyel süreçler"de ve moleküler fonksiyon bakımından da "taşıyıcı aktivitesi"nde işlevseldir. Bunun yanısıra biyolojik süreçler açısından taşıma sürecine katılan genlerin oranı da dikkat çekicidir (%7,895).

Ağır metal alımı ve taşınması ile ilişkili olarak, taşıyıcı aktivitesinde işlevsel olan genler ve taşıma sürecine katılan genlerin "gen ontoloji"leri sırasıyla Tablo 4.4 ve Tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.4: Mikroarray analiz sonucunda anlamlı fark gösteren ve moleküler fonksiyon bakımından “taşıyıcı aktivitesi”nde işlevsel olan genlerin gen ontolojileri.

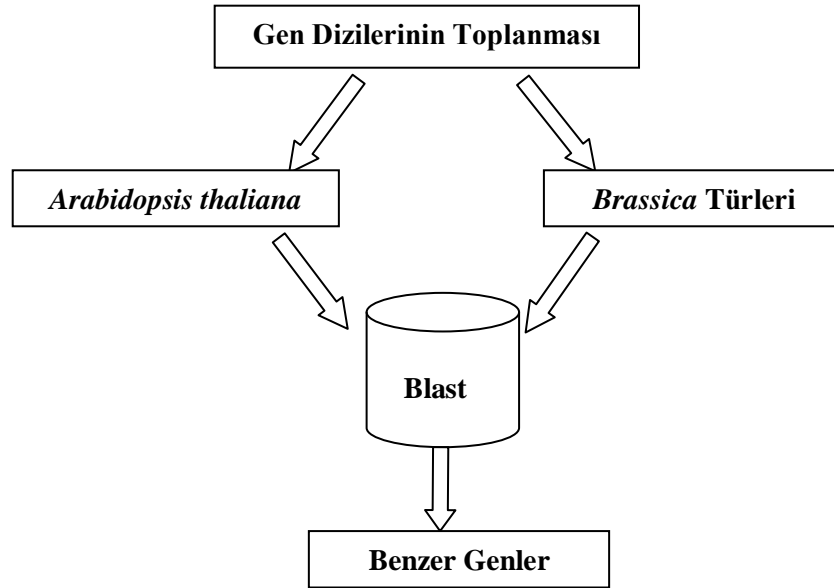
<b>Lokus Tanımlayıcı</b>	<b>Gen Ontolojisi</b>
<b>AT3G30390</b>	aminoasit transmembran taşıyıcı aktivitesi
<b>AT1G32050</b>	transmembran taşıyıcı aktivitesi
<b>AT3G27170</b>	nitrat:hidrojen simporter aktivitesi voltaj-kapılı klorid kanal aktivitesi anyon kanal aktivitesi
<b>AT5G03280</b>	taşıyıcı aktivitesi
<b>AT2G15290</b>	bakır alım transmembran taşıyıcı aktivitesi demir iyon transmembran taşıyıcı aktivitesi
<b>AT5G40890</b>	voltaj-kapılı klorid kanal aktivitesi nitrat transmembran taşıyıcı aktivitesi anyon kanal aktivitesi
<b>AT3G46560</b>	protein transmembran taşıyıcı aktivitesi

Tablo 4.5: Mikroarray analiz sonucunda anlamlı fark gösteren ve biyolojik süreç bakımından “taşıma süreci”nde işlevsel olan genlerin gen ontolojileri.

<b>Lokus Tanımlayıcı</b>	<b>Gen Ontolojisi</b>
<b>AT3G30390</b>	aminoasit transmembran taşıma aminoasit taşıma
<b>AT1G32050</b>	protein taşıma transmembran taşıma
<b>AT3G27170</b>	klorür taşıma nitrat taşıma iyon transmembran taşıma transmembran taşıma anyon taşımalarının düzenlenmesi proton taşıma iyon transmembran taşımalarının düzenlenmesi
<b>AT5G03280</b>	taşıma oksin polar taşıma
<b>AT2G15290</b>	kloroplast stromasına protein taşıma demir iyon transmembran taşıma bakır iyon transmembran taşıma
<b>AT5G40890</b>	klorür taşıma iyon transmembran taşımalarının düzenlenmesi iyon transmembran taşıma anyon taşımalarının düzenlenmesi nitrat taşıma
<b>AT3G46560</b>	protein taşıma transmembran taşıma

#### 4.2.4. *Arabidopsis* Mikroarraylerinin *Brassica* Türlerinde Gen Ekspresyon Profillemesi Çalışmalarında Kullanılabilirliğinin Biyoinformatik Yaklaşımlarla İrdelenmesi

Mikroarray analizinde kullanılan *Arabidopsis* gen çiplerinin *Brassica* türlerinde yapmış olduğumuz gen ekspresyonu profillemeye çalışmalarında kullanılabilirliğini anlamak amacıyla NCBI ve diğer veri tabanlarında bulunan bütün *Brassica* türlerine ait veritabanındaki gen dizileri ile *Arabidopsis thaliana*'ya ait "GeneChip *Arabidopsis* ATH1 Genome Array"de bulunan bütün prob dizileri BLASTN algoritması ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Blast Parser kullanılarak Microsoft Excel dosyasına aktarılmıştır. İki türe ait benzerlikler ve e-değerleri ayrıştırılarak analiz edilmiştir (Şekil 4.17). Böylece *Brassica* transkriptlerinin *Arabidopsis* gen çipleri üzerindeki problemleri tanıma ve iyi bir hibridizasyon sinyali üretme olasılıkları değerlendirilmiştir.



Şekil 4.17: *A. thaliana* ve *Brassica* türlerine ait gen dizilerinin karşılaştırılması.

Mikroarray hibridizasyonda kullanılan gen çiplerde yer alan oligonükleotid problemler 25 baz uzunluğundadır. *A. thaliana*'ya ait problemler ile *Brassica* türlerine ait 1 milyona yakın dizi (çoğunlukla EST) benzerlik bakımından BLASTN algoritması kullanılarak karşılaştırıldıklarında, *Arabidopsis* arraylerinde bulunan her bir probun %100 benzerlik

gösterdiği dizilerin oranları, prob sayısı ve yüzde cinsinden değerleri Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4.6: *A. thaliana* ile *Brassica* türleri arasında %100 benzerlik gösteren dizilerin oranlarının; prob sayıları ve yüzde (%) cinsinden değerleri.

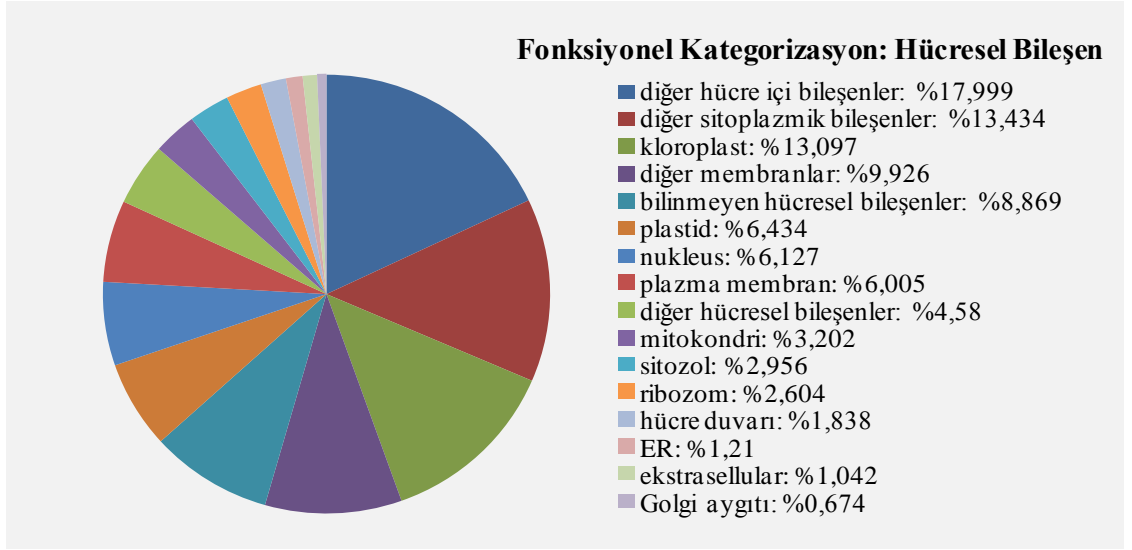
<b>%100 Benzerlik Gösteren Dizilerin Oranları</b>	<b>Prob sayısı</b>	<b>% Prob sayısı</b>
<b>25/25</b>	5327	5
<b>24/25</b>	922	1
<b>23/25</b>	1276	1
<b>22/25</b>	1306	1
<b>21/25</b>	1578	2
<b>20/25</b>	1444	1
<b>19/25</b>	1773	2
<b>18/25</b>	4201	4
<b>17/25</b>	11586	11
<b>16/25</b>	22862	22
<b>15/25</b>	23812	23

Tablo 4.6'ya göre, *A. thaliana* arraylerinde bulunan problardan sadece % 5'lik bir dilim *Brassica* türlerine ait dizilerle 25/25 benzerlik oranına sahiptir. 922 tane *Arabidopsis* probunda ise 24/25 benzerlik bulmuştur. Yapılan bu analizle, *Arabidopsis* arraylerinin *Brassica* türleri için kullanılabilirliğinin çok iyi olmadığını söylemek mümkündür. Çünkü 1 milyona yakın EST dizisi ile çok az sayıda prob %100 benzerlik göstermiştir. Mikroarray analizinde hibridizasyon koşullarına bağlı olarak 1 baz farklılığın bile proba hedef nükleotid zinciri arasındaki melezlemeyi engelleyebileceği düşünülürse, yapılan gen ekspresyonu profillemeye analizlerinden az sinyal alınması olasıdır. Dolayısıyla, türler arası düzeyde yapılan gen ekspresyonu profillemeye analizleri tür içindeki hibridizasyonlara göre daha zor olabilmektedir. Bu nedenle, analizler sonucunda doğru farklılık gösteren genlerin bulunma şansı daha düşük olabilmektedir.

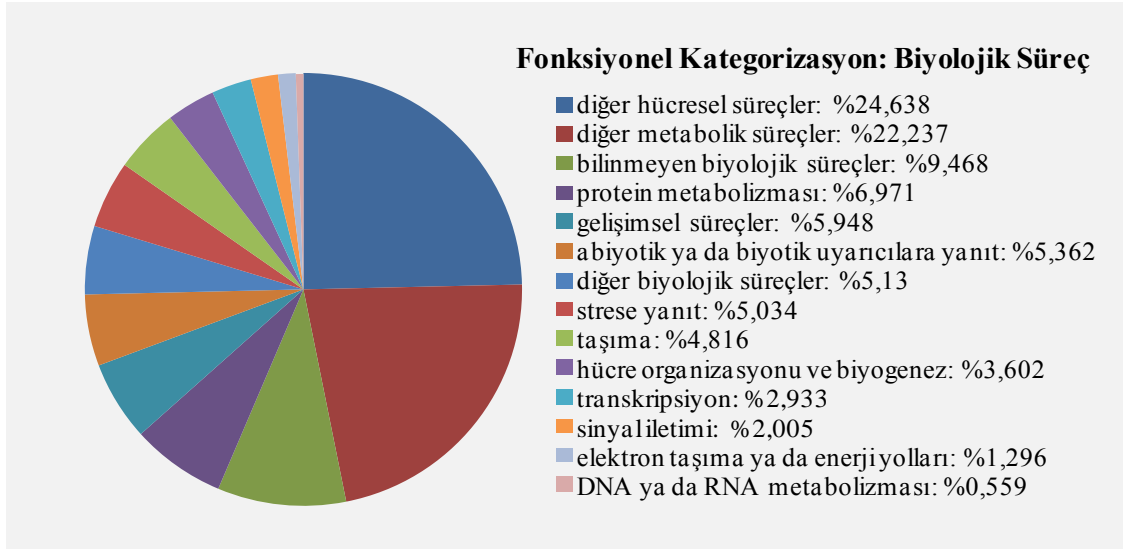
*A. thaliana* probları ile *Brassica* türlerine ait nükleotid dizilerinin (çoğunlukla EST) gösterdikleri benzerlik bakımından değerlendirilmesinin ardından, baz uzunluğuna göre 25/25 benzerlik oranı gösteren problemlerin gen ontolojisine göre fonksiyonel kategorizasyonları incelenmiştir. Burada amaç, *Brassica* gen ekspresyon profillemeleri sonucunda farklılık gösterecek genlerin, çok iyi korunmuş genler olup olmayacağını ve

bu genlerin metal metabolizmasıyla ilişkilendirilip ilişkilendirilemeyeceğinin anlaşılmasıdır. Bu genlerin büyük çoğunlukla türler arasında çok iyi korunmuş referans (housekeeping) genler olması, türler arası gen ekspresyonu profillemeye analizlerinde anlamlı sonuçlar yakalama şansını azaltmaktadır.

Şekil 4.18’de *Brassica* türlerine ait EST dizileri ile 25/25 benzerlik oranı gösteren *A. thaliana* problemlerinin gen ontolojisine göre fonksiyonel kategorizasyonları verilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere, dizi benzerlikleri iyi korunmuş problemlerin çoğunluğu temel biyolojik fonksiyonu olan genlerden dizayn edilmiştir. Bu genlerin büyük çoğunluğu, hücresel bileşen bakımından “hücre içi bileşenler”de, biyolojik süreçler açısından “hücresel süreçler”de ve moleküler fonksiyon bakımından da “enzim aktivitesi”nde işlevseldir.



Şekil 4.18: *Brassica* türlerinin dizileri ile 25/25 benzerlik oranı gösteren *A. thaliana* problemlerinin gen ontolojisine göre fonksiyonel kategorizasyonları.

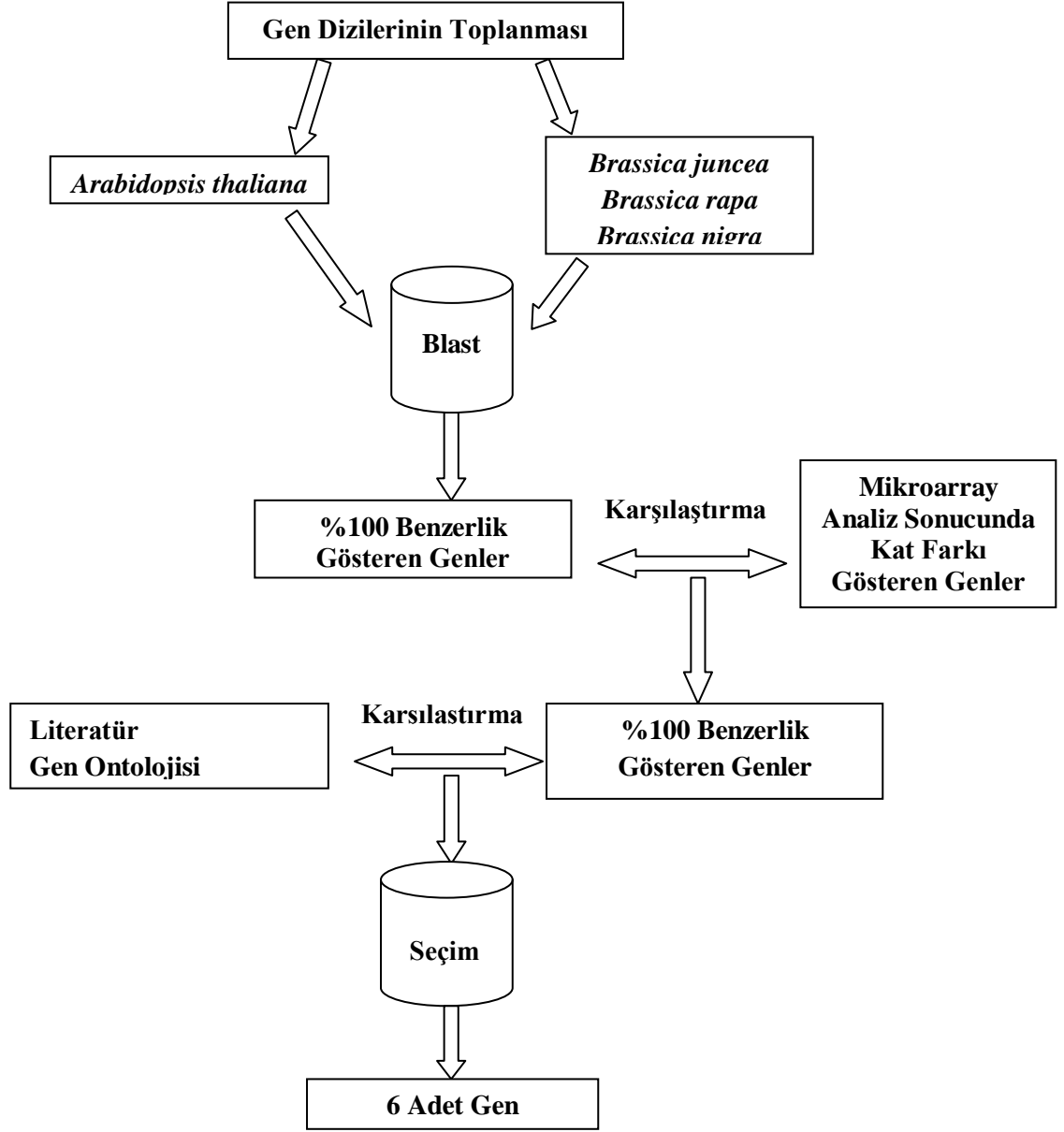


Şekil 4.18: Devamı.

#### 4.2.5. Primer Tasarımı

Mikroarray analizde eksprese olan genleri tanımlamak üzere *Arabidopsis*'e ait prob dizileri kullanıldığı için, analiz sonucunda elde edilen verileri doğrulamak amacıyla kullanılacak primerler direkt olarak bu problemlerden tasarlanamamıştır. Kullanılacak primerlerin *B. juncea* bitkisine uygun olması ve düzgün çalışması için, türler arasında iyi korunmuş gen dizileri belirlenmiştir. Bu nedenle ilk olarak, *Arabidopsis* bitkisine ait gen dizileri ile *Brassica juncea*, *Brassica rapa* ve *Brassica nigra* bitkilerine ait EST dizileri BLASTN algoritması ile karşılaştırılmıştır. *B. juncea*, *B. rapa* ve *B. nigra*'nın kendiliğinden hibritleşmesiyle oluşan bir bitki olduğu için karşılaştırmada bu türlerde kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, Blast Parser kullanılarak Microsoft Excel dosyasına

aktarılmış, benzerlikleri ve e-değerlerine göre ayırım yapılmıştır (Şekil 4.19).

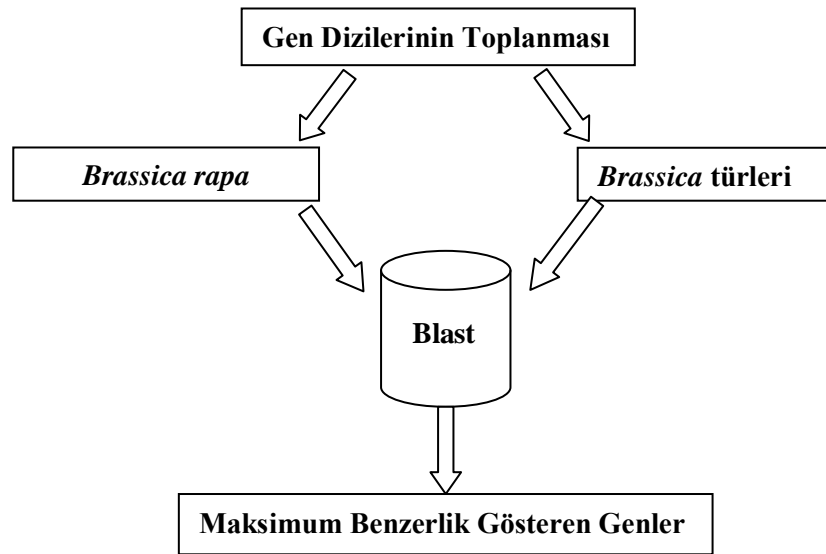


Şekil 4.19: Primerleri tasarlanan genlerin seçimi sırasında takip edilen yol.

Karşılaştırmalar sonucunda her 3 türde de *Arabidopsis*'e ait gen dizileri ile %100 uyum gösteren genler belirlenmiştir. Daha sonra, belirlenen genler ile mikroarray analiz sonucunda kat değişimi gösteren tüm proplar Microsoft Access'de karşılaştırılarak ortak olan genlerden bir veritabanı oluşturulmuştur. Türler arası hibridizasyon sonucunda doğru farklılık gösteren genlerin bulunma şansı düşük olduğu için yapılan karşılaştırmada, istatistiksel fark gözetmeden mikroarray analiz sonucunda bulunan bütün proplar (183 adet) kullanılmıştır. Bu veritabanında 25 baz çiftinde %100 uyum



gösteren (25/25) problemler belirlenmiştir. *Arabidopsis* problemleri ile *B. juncea*'ya ait 24, *B. rapa*'ya ait 259 ve *B. nigra*'ya ait 17 tane gen arasında %100 uyum bulunmuştur. Uyum gösteren genlerden sadece *B. rapa*'ya ait 22 gen ve *B. nigra*'ya ait 2 adet gen mikroarray analiz sonucunda istatistiksel olarak anlamlı kat değişimi göstermektedir. Bu problemlerle ilgili literatür bilgileri ve gen ontolojilerinin taranması sonucunda, metal akümülyasyon mekanizmasıyla ilgili olabileceği düşünülen 6 adet gen seçilmiştir (Şekil 4.19). Seçilen problemler *Arabidopsis* ile en fazla ortak gene sahip olan *B. rapa* bitkisine aittir ve sadece 1 tanesi mikroarray analiz sonucunda istatistiksel olarak anlamlıdır (Tablo 4.7). Bu problemlere karşılık gelen *B. rapa* bitkisine ait EST dizileri, NCBI veritabanından bulunduktan sonra, BLASTN algoritması kullanılarak tüm *Brassica* türlerine ait EST dizileri ile karşılaştırılmıştır. Böylece *Brassica* türleri arasında en çok korunan bölgeler bulunarak daha düzgün primerler tasarlanmıştır. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda, her gen için *Brassica* türleri arasında maksimum benzerlik gösteren diziler seçilmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: Primer tasarlamak üzere seçilen genlerin tüm *Brassica* türleri ile karşılaştırılması.

Seçilen bu diziler arasında en çok benzerlik gösteren bölgeler Clustal X2 programı kullanılarak ayırt edilmiştir (Tablo 4.8). Benzerlik gösteren bölgelerden 6 adet primer çifti (ileri=F ve geri=R) tasarlanmıştır (Tablo 4.9) (Ek-A). Tasarlanan primerlerin kalitesi, Fast PCR (<http://primerdigital.com>) ve Beacon Designer (<http://www.premierbiosoft.com>) programları kullanılarak teyit edilmiştir.

Tablo 4.7: *A. thaliana*'ya ait prob dizileri ile *B. rapa* EST dizileri arasında BLASTN algoritmasına göre e-değeri, benzerlik oranı ve mikroarray analizine göre p-değeri.

<i>A. thaliana</i> Prob Dizileri	<i>B. rapa</i> EST Dizileri	e-değeri	Benzerlik	p-değeri
ATH1-121501:258183_at:304:689; Interrogation_Position=205;	>gb EX048159.1 EX048159 BR032803 floral buds cDNA library KBFS <i>Brassica rapa subsp. Pekinensis</i>	5,00E-06	25/25	1,61
ATH1-121501:261650_at:656:673; Interrogation_Position=2274;	>gb BG543518.1 BG543518 E1056 Chinese cabbage etiolated seedling library <i>Brassica rapa</i>	5,00E-06	25/25	1,42
ATH1-121501:252943_at:27:131; Interrogation_Position=1012;	>gb EX053171.1 EX053171 BR037815 floral buds cDNA library KBFS <i>Brassica rapa subsp. Pekinensis</i>	5,00E-06	25/25	1,35
ATH1-121501:248580_at:435:129; Interrogation_Position=2253;	>gb EX105221.1 EX105221 BR091511 seed and seedling cDNA library KFSD <i>Brassica rapa subsp.</i>	5,00E-06	25/25	1,32
ATH1-121501:264080_at:520:57; Interrogation_Position=2064;	>gb EX106898.1 EX106898 BR093188 whole plant cDNA library KFYP <i>Brassica rapa subsp. Pekinensis</i>	5,00E-06	25/25	-1,31
ATH1-121501:255752_at:511:445; Interrogation_Position=573;	>gb EX044485.1 EX044485 BR029129 floral bud cDNA library KBFL <i>Brassica rapa subsp. Pekinensis</i>	5,00E-06	25/25	-1,35*

\*: Mikroarray analiz sonucunda istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ).

Tablo 4.8: *B. rapa* EST dizisi ile *Brassica* türleri arasında benzerlik gösteren genlerin benzerlik % 'si ve e-değeri.

Gen ID No	Gen Acces. No	Benzerlik Gösteren Genler	e değeri	Benzerlik
gi 156821905	gb EX048159.1	*BR032803 floral buds cDNA library KBFS <i>Brassica rapa subsp. pekinensis</i> cDNA clone KBFS-028E12 5'	0.0	100%
		BN24DYSC_UP_026_G02_4FEB2008_004 BN24DYSC <i>Brassica napus</i> cDNA 5'	0.0	100%
		BN45.041M06F011207 BN45 <i>Brassica napus</i> cDNA clone BN45041M06	0.0	99%
		AM061487 AAFC_WHRI_BoE01a <i>Brassica oleracea</i> var. alboglabra cDNA clone AFC_WHRI_BoE01a018P11_SP6	0.0	98%
		DK569321 full-length kale cDNA library (flowers) <i>Brassica oleracea</i> var. acephala cDNA clone KALE-141M04 3'	8,00E-146	93%
		BR097139 whole plant cDNA library KFYP <i>Brassica rapa subsp. pekinensis</i> cDNA clone KFYP-067C06 5'	1,00E-48	98%

Tablo 4.8: Devami.

Gen ID No	Gen Acces. No	Benzerlik Gösteren Genler	e değeri	Benzerlik
gi 20374498	gb BG543518.1	E1056 Chinese cabbage etiolated seedling library <i>Brassica rapa subsp. pekinensis</i> cDNA clone E1056	0.0	100%
		*BR081249 infected leaf cDNA library KFPC <i>Brassica rapa subsp. pekinensis</i> cDNA clone KFPC-008D08 5'	1,00E-166	99%
		BR108548 mature green leaf cDNA library KHLM <i>Brassica rapa subsp. pekinensis</i> cDNA clone KHLM-43D02 5'	1,00E-178	98%
		BNAOV1GH_T3_068_E04_14SEPT2007_024 BNAOV1GH <i>Brassica napus</i> cDNA 5'	5,00E-171	95%
		AM389953 AAFC_WHRI_BoE02a <i>Brassica oleracea</i> var. alboglabra cDNA clone AAFC_WHRI_BoE02a009P09_T7	0.0	94%
		DK547867 full-length kale cDNA library (seedlings) <i>Brassica oleracea</i> var. acephala cDNA clone KALE-085J17 3'	4,00E-153	93%
		MLN1_2202 <i>Brassica rapa</i> mature lateral nectary	0.0	93%
		BNSCS2CT_UP_208_D03_27APR2007_025 <i>Brassica napus</i> BNSCS2CT <i>Brassica napus</i> cDNA 5'	5,00E-114	92%
		BNSCS3CT_UP_056_B07_05MAY2007_061 <i>Brassica napus</i> BNSCS3CT <i>Brassica napus</i> cDNA 5'	7,00E-87	91%
gi 156826917	gb EX053171.1	*BR111763 etiolated mature leaf cDNA library KHLW <i>Brassica rapa subsp. pekinensis</i> cDNA clone KHLW-31F03 5'	6,00E-135	99%
		53COT2_T3_010_H07_03SEP2004_049 <i>Brassica napus</i> 36hr germinating seed library 53COT2 <i>Brassica napus</i> cDNA 5'	6,00E-40	98%
		DK490449 full-length kale cDNA library (flowers) <i>Brassica oleracea</i> var. acephala cDNA clone KALE-091E04 5'	3,00E-12	95%
		BR088470 seed and seedling cDNA library KFSD <i>Brassica rapa subsp. pekinensis</i> cDNA clone KFSD-006E05 5'	2,00E-39	94%
gi 156904006	gb EX105221.1	DK536545 full-length kale cDNA library (capsules) <i>Brassica oleracea</i> var. acephala cDNA clone KALE-055P17 3'	0.0	99%
		BNSCS2CT_UP_099_G02_20APR2007_004 <i>Brassica napus</i> BNSCS2CT <i>Brassica napus</i> cDNA 5'	0.0	98%
		DK538367 full-length kale cDNA library (leaves) <i>Brassica oleracea</i> var. acephala cDNA clone KALE-060M01 3'	0.0	98%
		DK523319 full-length kale cDNA library (seedlings) <i>Brassica oleracea</i> var. acephala cDNA clone KALE-021F08 3'	0.0	98%
		0163900 <i>Brassica napus</i> Late bud <i>Brassica napus</i> cDNA	6,00E-154	98%
		*MLN1_1586 <i>Brassica rapa</i> mature lateral nectary	0.0	97%
gi 156905918	gb EX106898.1	*BR093188 whole plant cDNA library KFYP <i>Brassica rapa subsp. pekinensis</i> cDNA clone KFYP-007F06 5'	0.0	100%
		72ETGS24_UP_011_H06_20MAY2005_034 72ETGS24 <i>Brassica napus</i> cDNA 5'	2,00E-141	99%
		DK523700 full-length kale cDNA library (seedlings) <i>Brassica oleracea</i> var. acephala cDNA clone KALE-022F06 3'	0.0	97%
		DK516647 full-length kale cDNA library (flowers) <i>Brassica oleracea</i> var. acephala cDNA clone KALE-003M21 3'	0.0	96%
		DK533499 full-length kale cDNA library (capsules) <i>Brassica oleracea</i> var. acephala cDNA clone KALE-047P11 3'	2,00E-146	91%

Tablo 4.8: Devamı.

Gen ID No	Gen Acces. No	Benzerlik Gösteren Genler	e değeri	Benzerlik
gi 156818231	gb EX044485.1	*BR083233 infected leaf cDNA library KFPC <i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i> cDNA clone KFPC-038D07 5'	0.0	99%
		BR074571 flower cDNA library KFFB <i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i> cDNA clone KFFB-044C09 5'	0.0	99%
		MLN1_12 <i>Brassica rapa</i> mature lateral nectary	0.0	99%
		DK468165 full-length kale cDNA library (flowers) <i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i> cDNA clone KALE-033A06 5'	0.0	98%
		AM388079 AAFC_WHRI_BoE02a <i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i> cDNA clone AFC_WHRI_BoE02a001B16_T7	0.0	98%
		BNSCS2CT_UP_010_H08_05JAN2005_050 <i>Brassica napus</i> seed coat BNSCS2CT <i>Brassica napus</i> cDNA 5'	0.0	97%
		OL446R <i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i> leaf cDNA library <i>Brassica oleracea</i> var. <i>alboglabra</i> cDNA clone OL446	0.0	97%
		36RDBRG_UP_081_A04_19JAN2006_032 <i>Brassica rapa</i> 36RDBRG <i>Brassica rapa</i> cDNA 5'	0.0	94%
		DK459783 full-length kale cDNA library (seedlings) <i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i> cDNA clone KALE-011B02 5'	0.0	94%
		DK508159 full-length kale cDNA library (leaves) <i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i> cDNA clone KALE-137J04 5'	0.0	93%

\*: Primer çiftlerinin tasarlandığı gen dizileri.

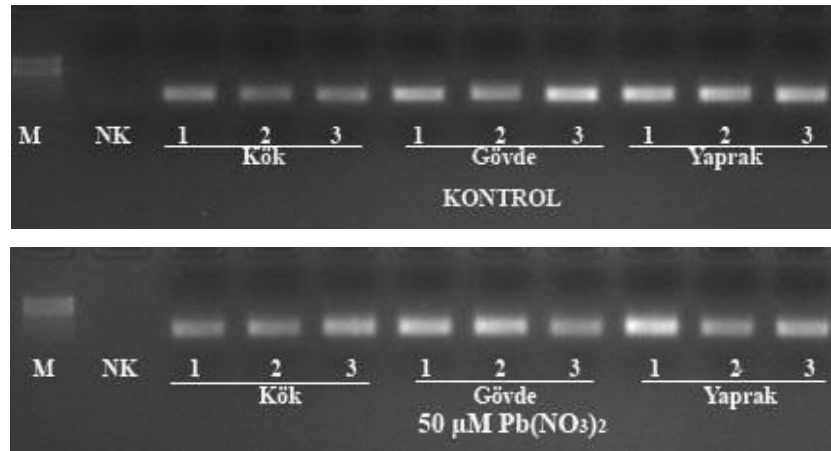
Tablo 4.9: Tasarlanan primerlerin *A. thaliana* ve *B. rapa*'da karşılık geldiği genler, fonksiyonları, mikroarray analiz sonucunda elde edilen kat değişimleri ve p değerleri.

Primer Adı	<i>B. rapa</i> Gen Acces. No	Fonksiyon	<i>A. thaliana</i> Gen ID No	Kat Değişimi	p değeri
BJMInd-1	gb EX048159	Hipotetik protein	AT3G21550	1,61	0,18
BJMInd-2	gb EX094959	ACA1 (Oto-inhibe CA <sup>+2</sup> ATPaz 1); kalsiyum kanal/ kalsiyum taşıyıcı ATPaz/ kalmodulin bağlayıcı	AT1G27770	1,42	0,15
BJMInd-3	gb EX127933	CAD9 (Sinnamil Alkol Dehidrogenaz 9); bağlayıcı / katalitik/ oksidoredüktaz/ çinko iyon bağlayıcı	AT4G39330.1	1,35	0,07
BJMInd-4	gb GR718752	CLC-C (Klorür kanal C); anyon kanal/ voltaj kapılı klorür kanal	AT5G49890.1	1,32	0,10
BJMRep-1	gb EX106898	VHA-A1 (Vakuolar Proton ATPaz A 1); ATPaz	AT2G28520	-1,31	0,12
BJMRep-2	gb EX096943	Salgı taşıyıcı membran protein (SCAMP) ailesi protein	AT1G32050.1	-1,35*	0,01

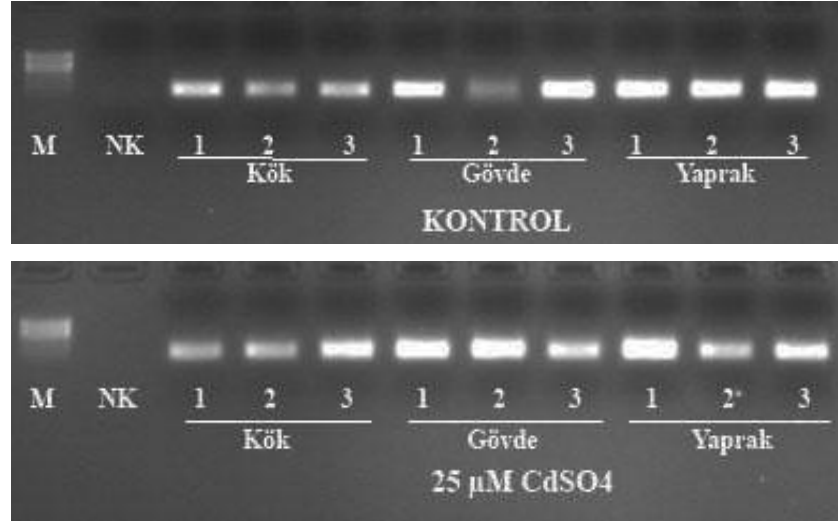
\*: Mikroarray analiz sonucunda istatistiksel olarak anlamlı (p<0,05).

#### 4.2.5. Yarı-Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

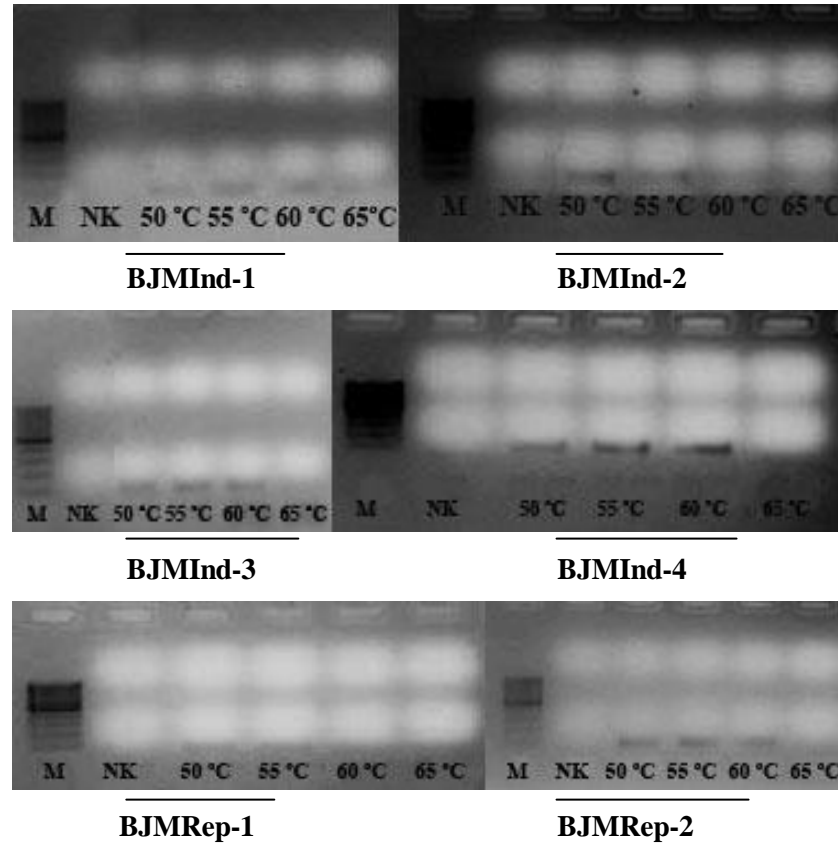
Bu çalışmada elde edilen cDNA'lar ve tasarlanan primerlerin kontrolü PCR uygulamasıyla gerçekleştirilmiştir. Öncelikli olarak *Brassica juncea* var. tumida'ya ait aktin mRNA dizisinden tasarlanan (Ek-B) ve iç kontrol olarak kullanılan  $\beta$ -aktin primer çiftine gradiyent PCR cihazında PCR uygulaması yapılmıştır. Gradiyent PCR cihazında farklı sıcaklıklarda (50, 55, 60, 65 °C) PCR'ı yapılan  $\beta$ -aktin primer çiftinin 55 °C'de iyi çalıştığı, PCR ürününün formaldehitli jelde yürütülmesi ile ortaya konmuştur.  $\beta$ -aktin genine ait primer çifti kontrol edildikten sonra, Pb ve Cd uygulamaları yapılan *Brassica juncea* var. P78'den elde edilen cDNA'ların kontrolü için PCR uygulaması tamamlanmıştır (Şekil 4.21, Şekil 4.22). Tasarlanan primerler (hedef genler)'in kontrolü de, gradiyent PCR cihazında farklı sıcaklıklarda (50, 55, 60, 65 °C) yapılan PCR ile yapılmış ve tüm primer çiftlerinin kök kısmına ait kontrol örneklerinde 55 °C'de iyi çalıştığı PCR ürününün %1'lik formaldehitli jelde yürütülmesi ile gösterilmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.21: 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yapraklarından elde edilen cDNA'ların  $\beta$ -aktin primer çiftiyle yapılan PCR'ının %2'lik agaroz jel görüntüsü. (M=Marker, NK=Negatif Kontrol).



Şekil 4.22: 24 saat boyunca Cd uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yapraklarından elde edilen cDNA'ların  $\beta$ -aktin primer çiftiyle yapılan PCR'nın %2'lik agaroz jel görüntüsü. (M=Marker, NK=Negatif Kontrol).



Şekil 4.23: 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kontrol grubuna ait kök örneklerinden elde edilen cDNA'ların tasarlanan primerler çiftleriyle farklı sıcaklıklarda (50, 55, 60, 65 °C) yapılan PCR'nın %2'lik agaroz jel görüntüsü. (M=Marker, NK=Negatif Kontrol).

#### 4.2.6. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Mikroarray analizi ile 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök kısmında, kontrol grubuna kıyasla deney grubunda gen ekspresyon seviyesinde tespit edilen değişiklikler, RT-PCR yöntemi kullanılarak kontrol edilmiştir. Bu nedenle, Pb uygulaması yapılan *B. juncea* bitkisinin köklerinden elde edilen cDNA'ların metal akümülyasyon mekanizmasında fonksiyonel olduğu düşünülen genlerden tasarlanan primerler (hedef genler)'in her biri ile RT-PCR'si yapılmıştır. Bu reaksiyonda iç kontrol olarak  $\beta$ -aktin (referans gen, house keeping gen) primerleri kullanılmıştır. Hedef genlerin referans gene göre göreceli ekspresyon oranları, "delta-delta metodu" yoluyla kat farkı olarak belirlenmiştir.

24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök kısımlarının deney grubunda kontrol grubuna oranla farklı ekspresyon olan hedef genlerin, RT-PCR ile mRNA seviyesinde belirlenen değişimleri ve mikroarray analiz sonucunda bulunan kat değişimleri Tablo 4.10'da verilmiştir.

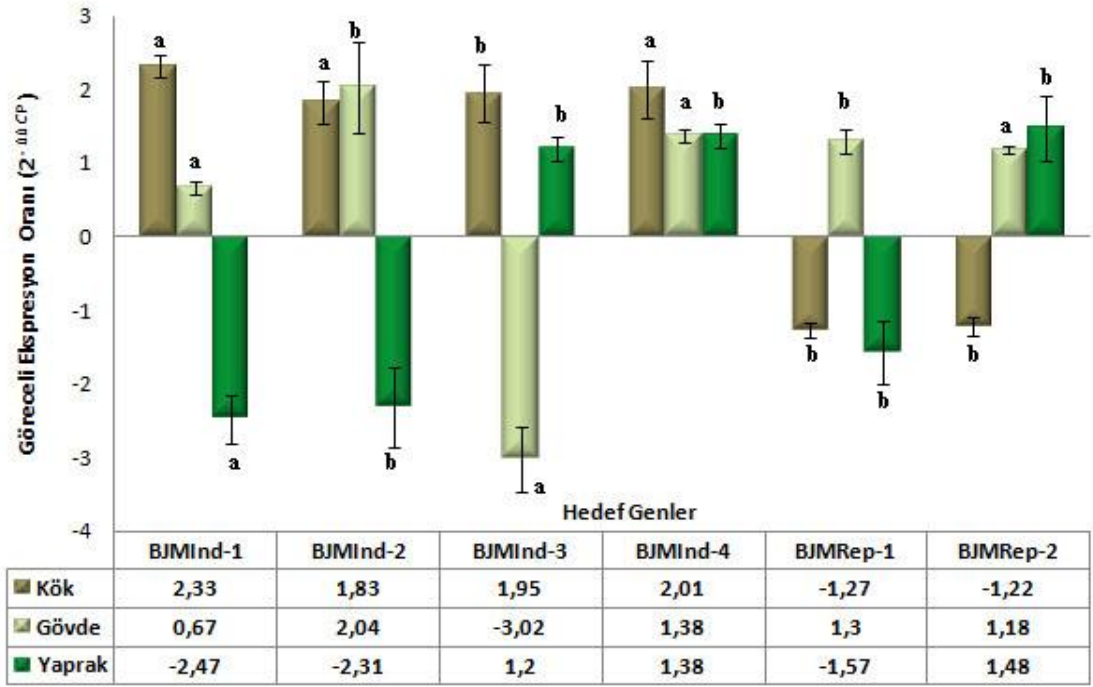
Tablo 4.10: 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök kısımlarının deney grubunda kontrol grubuna oranla farklı ekspresyon olan hedef genlerin mRNA seviyesindeki değişimlerinin, RT-PCR ve mikroarray analiz sonucunda kat değişimi olarak ifadesi.

Primer Adı:	RT-PCR	Mikroarray Analiz	
	$2^{-\Delta\Delta CP}$	Kat Değişimi	p-değeri
BJMInd-1	2,33 <sup>a</sup>	1,61	0,18
BJMInd-2	1,83 <sup>a</sup>	1,42	0,15
BJMInd-3	1,95 <sup>b</sup>	1,35	0,07
BJMInd-4	2,01 <sup>a</sup>	1,32	0,10
BJMRep-1	-1,27 <sup>b</sup>	-1,31	0,12
BJMRep-2	-1,22 <sup>b</sup>	-1,35	0,01 <sup>b</sup>

Not: a:  $P < 0,0001$  ve b :  $P < 0,05$  değerleri, deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gösteren hedef genleri işaret etmektedir.

Tablo 4.10'da görüldüğü üzere, RT-PCR ve mikroarray analiz sonucunda hedef genlerin mRNA düzeyindeki kat değişimleri birbirleriyle uyumlu olmasına karşın istatistiksel olarak farklılık göstermektedir. Deney grubunda kontrol grubuna kıyasla mikroarray analiz sonucunda sadece tek bir genin, RT-PCR yönteminde ise bütün genlerin kat değişimleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Şekil 4.24’de 24 saat boyunca 50  $\mu\text{M}$   $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  çözeltisi uygulanan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yaprak kısımlarının deney grubunda kontrol grubuna oranla farklı eksprese olan hedef genlerin göreceli ekspresyon oranları verilmiştir. Şekil 4.24’e göre, *B. juncea* bitkisinin kök kısmında hedef genlerden 4 tanesi teşvik edilmiş, 2 tanesi ise baskılanmıştır. Kontrol grubuna oranla deney grubunda teşvik edilen genler arasında BJMInd-1, baskılananlar içinde ise BJMRep-1 en fazla kat değişimi gösteren genlerdir.

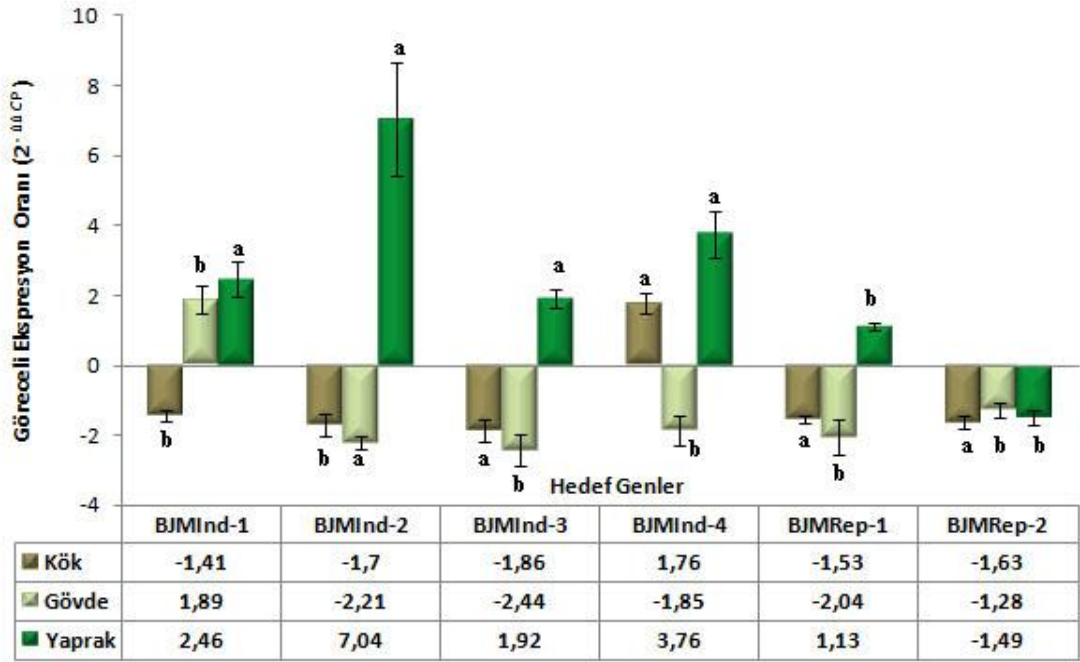


Şekil 4.24: 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yaprak kısımlarının deney grubunda kontrol grubuna oranla farklı eksprese olan hedef genlerin göreceli ekspresyon oranları ( $2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$ ). (a:  $P < 0,0001$  ve b :  $P < 0,05$  değerleri, deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gösteren hedef genleri işaret etmektedir.)

24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök kısmında farklı eksprese olan genlerin, metal alımı ve taşınması ile ilişkili olarak gövde ve yapraklardaki değişimini belirlemek üzere RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Şekil 4.24’de görüldüğü üzere, *B. juncea* bitkisinin gövdesinde hedef genlerin 5 tanesi teşvik edilmiş ve 1 tanesi baskılanmıştır. Bu genler arasında kontrol grubuna kıyasla deney grubunda en fazla artış gösteren gen BJMInd-2’dir. Yaprak kısımlarında ise, hedef genlerin 3’er tanesi teşvik edilmiş ve baskılanmıştır. Deney grubunda kontrol grubuna oranla en fazla artış BJMRep-2, azalış BJMInd-1 genlerinde görülmüştür.



Pb uygulaması yapılan *B. juncea* bitkisinde metal metabolizmasıyla ilişkili olduğu düşünülen hedef genler, Cd uygulaması yapılan bitkilerin kök, gövde ve yapraklarında da çalışılmış ve bu genlerin aynı bitkide farklı bir metale karşı mRNA seviyesindeki ekspresyonlarına bakılmıştır. Şekil 4.25’ de 24 saat boyunca 25  $\mu\text{M}$   $\text{CdSO}_4$  çözeltisi uygulanan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yaprak kısımlarının deney grubunda kontrol grubuna oranla farklı eksprese edilen hedef genlerin göreceli ekspresyon oranları verilmiştir. Şekil 4.25’e göre, *B. juncea* bitkisinin kök kısmında hedef genlerin 1 tanesi teşvik edilmiş, 5 tanesi ise baskılanmıştır. Deney grubunda kontrol grubuna kıyasla baskılanan genler arasında en fazla kat değişimi BJMInd-3’ de görülmektedir.



Şekil 4.25: 24 saat boyunca Cd uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök, gövde ve yaprak kısımlarının deney grubunda kontrol grubuna oranla farklı eksprese olan genlerin göreceli ekspresyon oranları ( $2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$ ). (a:  $P < 0,0001$  ve b:  $P < 0,05$  değerleri, deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gösteren hedef genleri işaret etmektedir.)

24 saat boyunca Cd uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin gövdesinde hedef genlerin 1 tanesinin teşvik edildiği, 5 tanesinin de baskılandığı görölmektedir. Kontrol grubuna kıyasla deney grubunda baskılanan genler arasında BJMInd-3 en fazla kat değişimi gösteren gen dir. Yaprak kısımlarına bakıldığında ise, hedef genlerin 5 tanesi artış, 1 tanesi azalış göstermiştir. Teşvik edilen genler içinde en fazla kat değişimi BJMInd-2’de görölmektedir (Şekil 4.25).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı tarafından açıklanan “tehlikeli kirletici maddeler” arasında ilk 10’da yer alan Pb ve Cd (ATSDR, 2011), antropojenik uygulamaların artışıyla birlikte doğal çevreye eklenerek ekosisteme zarar vermektedir. *Brassica juncea* gibi akümülatör bitki türleri, bitki metabolizması ve büyümesi üzerine toksik etkiler gösteren bu metallerin önemli miktarlarını bünyelerinde biriktirmektedir. Bu tür akümülatör bitkilerin belirlenmesi, toprak, su ya da havada bulunan kirleticilerin bitkiler tarafından ortadan kaldırılmasını sağlayan fitoremediasyon teknolojisinin gelişmesini sağlamıştır. Mevcut remediasyon teknolojilerinin geliştirilmesi bakımından, bitkilerde ağır metal akümülasyonu ve toleransının moleküler mekanizması hakkındaki bilgilerin artması son derece önemlidir (Hassinen ve diğ., 2009). Bitkilerde fizyolojik ve hücrel detoksifikasyon mekanizmaları üzerine Pb ve Cd stresinin etkisi birçok çalışmada gösterilmiştir (Qiu ve diğ., 2008; Wang ve diğ., 2008; Brunet ve diğ., 2009). Ancak Pb ve Cd etkisinin moleküler mekanizması hakkındaki mevcut bilgi çok yetersizdir. Cd’nin bitkilerin gen ekspresyon profillerini etkileyebileceği bazı çalışmalarda sunulmuştur (Jonak ve diğ., 2004; Fusco ve diğ., 2005; Lang ve diğ., 2005b; Zhang ve diğ., 2011). Pb toksisitesinin gen ekspresyonuna etkisi ise tam olarak anlaşılammıştır (Liu ve diğ., 2009). Pb’nin hücre içine alımından sorumlu membran taşıma mekanizmasının tanımlanması, fitoremediasyon sistemlerinin geliştirilmesi bakımından oldukça önemlidir (Meyers ve diğ., 2008).

Bu çalışmada, ağır metal akümülasyonu ve toleransı ile ilişkili moleküler mekanizmada açıklanamamış noktalara katkı sağlamak için, türler arası hibridizasyonun kullanıldığı mikroarray tekniği ile Pb’nin *Brassica juncea* var. P78 bitkisinin kök kısımlarında gen ekspresyon profili üzerine etkisi araştırılmıştır. Elde edilen veriler dahilinde ağır metal alımı ve taşınmasında etkin olduğu düşünülen bazı genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyon seviyeleri, Pb ve Cd uygulanan bitkilerin kök, gövde ve yapraklarında belirlenerek, bu genlerin metal homeostazisindeki rollerinin moleküler seviyede

anlaşılması ve buna bağlı olarak türler arası hibridizasyonun kullanılabilirliğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

*Brassica juncea* ağır metalleri akümüle etme ve toprak üstündeki organlarına taşıma yeteneği göstermektedir (Duquene ve diğ., 2009; Das ve diğ., 2011). Çeşitli deneysel koşullarda Pb ve Cd'nin önemli miktarlarını bünyesine alan *B. juncea* (Meyers ve diğ., 2009), Pb gibi toksik metalleri büyük oranda kök sisteminde akümüle etmesine karşın (Begonia ve diğ., 1998; Jiang ve diğ., 2000; Liua ve diğ., 2000; Meyers ve diğ., 2008 Zaier ve diğ., 2010) Cd gibi metal türlerini gövde ve yapraklarına taşımaktadır (Meyers ve diğ., 2008; 2009). Malecka ve diğ. (2008) hidroponik ortamda Pb uygulaması yapılan *Pisum sativum* bitkisinde Pb'nin ilk 10-24 saat arasında etkili bir şekilde alındığını ve total Pb alımının yaklaşık olarak %93'ünün köklerde gerçekleştiğini bildirmiştir. Pb akümüasyonu için bitkinin en önemli kısmının kökler olduğu yapılan birçok araştırmayla teyit edilmiştir (Wierzbicka 1999; Liu ve diğ., 2000; Piechalak ve diğ., 2002). Huang ve Cunningham (1996) hidroponik ortamda 14 gün boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* bitkisinin 7 farklı çeşidi içinde en fazla akümüasyon yapan *B. juncea* (531268)'nin, köklerinde 19,500 mg/kgKA ve toprak üstü organlarında 241 mg/kgKA Pb'yi biriktirdiğini göstermiştir. Ayrıca *Brassica juncea* (L.) Czern. çeşitlerine Pb uygulaması sonucunda, toprak üstü organlarında yüksek miktarda (%1,5 kadar) Pb birikimi tespit edilmiştir (Kumar ve diğ., 1995). Bu çalışmada *B. juncea* var. P78 bitkisine 24 saat boyunca 50  $\mu$ M Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> çözeltisi uygulandıktan sonra, Pb birikiminin en fazla köklerde (%98,6) gerçekleştiği görülmüştür. Pb uygulanan deney bitkilerinin köklerinde 26984,47 mg/kgKA, toprak üstü organları (gövde+yapraklar)'nda ise 380,07 mg/kgKA Pb'nin akümüle edildiği bulunmuştur (Tablo 4.1).

*B. juncea* bitkisine Cd uygulamasına başladıktan sonra, en fazla Cd alımının 24 ile 48 saat arasında gerçekleştiği ve daha sonra oranın sabit kaldığı gözlenmiştir (Haag-Kerwer ve diğ., 1999). Sun ve diğ. (2007) *Sedum alfredii*'de Cd'nin uygulamadan sonraki 12 saat içinde hızla köklerden toprak üstü organlara taşındığını ve çalışılan iki popülasyondan birinde Cd akümüasyonunun kök>gövde>yaprak sırasını izlediğini rapor etmiştir. Cd uygulaması yapılan *Arabidopsis*, mısır, erguvan, buğday, sorgum ve salatalık bitkilerinin köklerinde toprak üstü organlara kıyasla daha fazla miktarda Cd

biriktiği bildirilmiştir (Castillo-Michel ve diğ., 2009). Seth ve diğ. (2008) hidroponik ortamda 28 günlük uygulama süresinin ardından *B. juncea* bitkisinde Cd akümülyasyonunun köklerde 1925 mg/kgKA, toprak üstü organlarda 977 mg/kgKA olduğunu göstermiştir. Yapılan denemeler sonucunda, 24 saat boyunca 25 µM CdSO<sub>4</sub> çözeltisi uygulanan *B. juncea* var. P78 bitkisinin farklı kısımlarında biriken metal miktarlarının kök>gövde>yaprak sırasını takip ettiği bulunmuştur. *B. juncea* bitkisinin köklerinde toprak üstü organlara kıyasla daha fazla Cd akümülyasyonu yapıldığı belirlenmiştir. Cd uygulanan deney bitkilerinin köklerinde 1763,51 mg/kgKA Cd, toprak üstü organları (gövde+yapraklar)'nda ise 363,05 mg/kgKA Cd'nin akümüle edildiği saptanmıştır (Tablo 4.1).

Yapılan çalışmalarda Pb ve Cd için *Brassica* türleri arasındaki en iyi hiperakümülatörün *Brassica juncea* olduğu rapor edilmiştir (Ebbs ve diğ., 1997; Rio ve diğ., 2000; 2004; Indoria ve Poonia, 2006). *Brassica juncea* (L.) Czern'in, toprak ya da su ortamından Pb'yi akümüle ettiği ve toprak üstü organlara taşınan Pb miktarının 10,000 mg/kgKA'yı aştığı görülmüştür (Blaylock ve diğ., 1997; Sıkka ve diğ., 2010). *B. juncea* L. bitkisinin aynı zamanda toprak üstü organlarında 400 µg/gKA Cd'den daha fazlasını biriktirebildiği bilinmektedir (Haag-Kerwer ve diğ., 1999). Buna karşın Pb hiperakümülatör *Thlaspi rotundifolium* (L.) Gaud.-Beaup'un, toprak üstü organlarında 8500 µg/gKA Pb'yi akümüle ettiği, Cd hiperakümülatör *Thlaspi caerulescens* (French A)'in de toprak üstü organlarında 14,187 mg/kgKA Cd'yi biriktirdiği tespit edilmiştir (Lombi ve diğ., 2000). "Hiperakümülatör bitki" tanımlamasında belirlenen metal miktarları (Baker ve Brooks, 1989) ve bu konuda yapılan çalışmalar göz önüne alındığında, elde edilen verilere göre *B. juncea* var. P78 bitkisinin iyi bir Pb akümülatörü ve Cd hiperakümülatörü olduğunu söylemek mümkündür (Tablo 4.1).

*B. juncea* bitkisinin farklı kısımlarında biriken ağır metal miktarları belirlendikten sonra, metal akümülyasyonu ve toleransının moleküler mekanizmasının açıklanmasına yönelik moleküler çalışmalara geçilmiştir. Pb'nin bitki gen ekspresyonuna etkisi sonucunda anlatımı değişen genlerin tanımlanması ile ilgili çalışmaların çok sınırlı bulunması ve Pb akümülyasyonunda bitkideki en önemli kısmın kökler olması nedeniyle 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* bitkisinin kök örneklerinde mikroarray analiz yapılmıştır. *B. juncea* bitkisinin mikroarray platformunda ticari

temsilcisi bulunmadığı için yapılan analizde aynı familyaya üye *Arabidopsis* bitkisine ait gen çipler kullanılmış ve türler arası hibridizasyon (TAH) denenmiştir.

Bir türün RNA'sının (hedef) mikroarray probu olarak kullanılan başka bir türle (referans) hibritleşmesini sağlayan TAH yanlış sonuçlar verebilmesine rağmen, aynı tür içindeki hibridizasyon (TİH) sonuçlarını doğru yansıttığı için umut vaat eden bir yaklaşım olarak görülmekte ve son zamanlarda birçok bitki türünün gen ekspresyon analizinde kullanılmaktadır (Brodsky ve diğ., 2005; Grigoryev ve diğ., 2005; Bar-Or ve diğ., 2007). *B. juncea* bitkisinin üyesi olduğu *Brassica* türleri ve *Arabidopsis* ortak bir atadan 14,5-20,4 milyon yıl önce ayrılmıştır (Bowers ve diğ., 2003). *Brassica* türlerinin genomları *Arabidopsis* genomu ile homolog segmentler göstermektedir (O'Neill ve diğ., 2000; Rana ve diğ., 2004). *Brassica* türlerinin genomu (diplodiler için 529-696 Mb, poliploidler için 1068-1284 Mb) (Johnston ve diğ., 2005) *Arabidopsis*'den (125 Mb) daha büyük olduğu için *Brassica*'da ortaya çıkan bazı yeni gen etkileşimlerinin, paralog genlerin alt-işlev kazanması ve/veya yeni-işlev kazanmasıyla ilişkili olduğu öne sürülmektedir (Lynch ve Force, 2000; He ve Zhang, 2005; Roth ve diğ., 2007; Kushwaha ve diğ., 2011). DNA dizileri temelinde yapılan filogenetik analizler, *Brassica* türleri ile *A. thaliana* arasında yakın ilişki olduğuna işaret etmektedir (Yang ve diğ., 1999; Koch ve diğ., 2001). Nükleik asit ve amino asit dizi seviyelerinde, gen içeriği, gen düzeni ve homoloji bakımından *B. oleracea* ve *Arabidopsis* arasındaki ilişkinin yakın olduğu açıkça gösterilmiştir (Quiros ve diğ., 2001; Hudson ve diğ., 2007). *A. thaliana* ile *B. napus*'un ekzon dizileri de yüksek korunma düzeyi (nükleotid seviyesinde yaklaşık %85) göstermektedir (Cavell ve diğ., 1998). Bu nedenle, *A. thaliana* kullanarak tasarlanan mikroarray tipleri, *Brassica* türlerine ait genlerin analizinde kullanılabilir.

Bu çalışmada, mikroarray analizinde kullanılan *Arabidopsis* gen çiplerinin *Brassica* türlerinde yapmış olduğumuz gen ekspresyonu profillemeye çalışmalarında kullanılabilirliğini anlamak amacıyla *Brassica* türlerine ait gen dizileri ile *Arabidopsis thaliana*'ya ait "GeneChip *Arabidopsis* ATH1 Genome Array"de bulunan bütün prob dizileri BLASTN algoritması ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.17). 1 milyona yakın EST dizisi çok az sayıda probun %100 benzerlik gösterdiği bulunmuştur (Tablo 4.6). İki tür arasındaki benzerliğin düşük oranda bulunmasının nedeni, evrimsel uzaklık ve

mutasyon birikimlerinin yanısıra EST dizilerindeki hatalardan kaynaklanabilir. Mikroarray analizinde hibridizasyon koşullarına bağlı olarak, 1 baz farklılığın bile proba hedef nükleotid zincir arasındaki melezlemeyi engelleyebilme olasılığının bulunması, gen ekspresyonu profillemeye analizlerinde hibridizasyon sinyali yoğunluğunun düşük olmasına neden olabilecektir. Ayrıca, biyoenformatik analiz sonucunda *Brassica* türlerine ait EST dizileri ile %100 benzerlik gösteren *A. thaliana* problemlerinin fonksiyonel kategorizasyonlarına bakıldığında, dizi benzerlikleri iyi korunmuş problemlerin çoğunluğunun temel biyolojik fonksiyonu olan genlerden dizayn edildiği görülmüştür (Şekil 4.18). Bu genlerin büyük çoğunlukla türler arasında çok iyi korunmuş referans (housekeeping) genler olması, TAH'ın kullanıldığı gen ekspresyonu profillemeye analizlerinde anlamlı sonuçlar yakalama şansını azaltmaktadır. Yapılan biyoenformatik analizle, *Arabidopsis* arraylerinin *Brassica* genlerinin geniş çaptaki ekspresyonunun ölçümünde başarısız olabileceği ortaya konmuştur.

TAH'ın kullanıldığı mikroarray analiz sonucunda elde edilen ham veriler "MultiExperiment Viewer" (<http://www.tm4.org>) programında işlenerek verilerin karşılaştırmalı analizi yapılmıştır. 24 saat boyunca Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök kısımlarında, kontrol grubuna oranla deney grubunda toplam 183 adet genin farklı ekspresyonu olduğu ve bu genlerden sadece 38 tanesinin istatistiksel olarak anlamlı ifade ettiği gösterilmiştir ( $p < 0,05$ ). Anlamlı fark gösteren genlerin 20 tanesinin teşvik edilen, 18 tanesinin baskılanan gen olduğu saptanmıştır (Tablo 4.2, Tablo 4.3). Bu genlerin fonksiyonel kategorizasyonları incelendiğinde, büyük oranda hücre içi bileşenlerde lokalize oldukları, hücresel süreçlere katıldıkları ve taşıyıcı aktivitesinde rol aldıkları belirlenmiştir. Bunun yanısıra taşıma sürecine katılan genlerin oranı da dikkat çekici bulunmuştur (%7,895) (Şekil 4.16). Ağır metal alımı ve taşınması ile ilgili olarak taşıyıcı aktivitesine katılan ve taşıma sürecinde rol oynayan genler Tablo 5.1'de gösterilmiştir. Taşıyıcı aktivitesinde rol alan (Tablo 4.4) ve taşıma sürecine katılan (Tablo 4.5) genlerin ontolojileri değerlendirildiğinde, tanımlanan gen sayısının çok az olduğu ve bu genlerin çoğunlukla benzer işlevleri yerine getirdikleri görülmektedir.

Tablo 5.1: Mikroarray analiz sonucunda tanımlanan taşıyıcı aktivitesine katılan ve taşıma sürecinde rol oynayan genler (“+” işareti teşvik edilen, “-“ işareti baskılanan genleri göstermektedir).

Lokus Tanımlayıcı	Baz Dizilerinin Genetik Yapısı ile İlgili Bilgi	Teşvik Edilen ya da Baskılanan Genler
AT3G30390	amino acid transporter family protein	+
AT1G32050	secretory carrier membrane protein (SCAMP) family protein	-
AT3G27170	CLC-B (chloride channel protein B); anion channel/voltage-gated chloride channel	-
AT5G03280	EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE 2); transporter	+
AT2G15290	ATTIC21/CIA5/PIC1/TIC21 (CHLOROPLAST IMPORT APPARATUS 5); copper uptake transmembrane transporter/ iron ion transmembrane transporter/ protein homodimerization	-
AT5G40890	ATCLC-A (CHLORIDE CHANNEL A); anion channel/voltage-gated chloride channel	-
AT3G46560	TIM9 (EMBRYO DEFECTIVE 2474); P-P-bond-hydrolysis-driven protein transmembrane transporter	+

3 ve 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlar (1, 10, 100  $\mu$ M)’da Pb uygulaması yapılan *A. thaliana* bitkisinde TİH’in kullanıldığı mikroarray analiz yöntemiyle gen ekspresyon profili çalışan Liu ve diğ. (2009), uygulamalar sonucunda anlatımı değişen toplam 1310 adet genin 774 tanesinin teşvik edildiğini, 536 tanesinin baskılandığını tespit etmiştir. Yapılan çalışmada uygulama süreleri karşılaştırıldığında, 24 saat uygulama yapılan örneklerde uygulanan tüm konsantrasyonlarda teşvik edilen gen sayısında belirgin bir artış görülmüş, baskılanan genlerin sayısı ise ilk iki konsantrasyonda değişmemiş ve sadece en yüksek konsantrasyonda artmıştır. Bununla birlikte anlatımı değişen genlerin büyük kısmının, yaygın olarak stres tarafından teşvik edilen yanıtlara katılan genler olduğu belirlenmiştir. Sülfür asimilasyonu, glutasyon metabolizması, IAA ve jasmonik asit biyosentezine katılan enzimler ya da proteinleri kodlayan bazı önemli genlerin aktivesi ise ilk kez Liu ve diğ. (2009) tarafından tanımlanmıştır. Analiz sonucunda seçilen 18 adet genin mRNA düzeyindeki kat değişimi RT-PCR yöntemiyle belirlenerek mikroarray verilerinin güvenilirliği %86,1 oranında doğrulanmıştır (Liu ve diğ., 2009). Bunun yanısıra Herbette ve diğ. (2006), farklı konsantrasyonlar (5, 50  $\mu$ M) ve uygulama süreleri (2, 6, 30 saat)’nde Cd uyguladıkları *A. thaliana* bitkisinde Cd detoksifikasyonu ve toleransı mekanizmasına katılan genleri ortaya çıkarmak için aynı bitkiye ait çipleri kullanarak mikroarray analiz yapmıştır. Bu çalışmayla 24,000’den fazla gen analiz edilmiş ve köklerde 5  $\mu$ M Cd uygulamasında 1092, 50  $\mu$ M Cd uygulamasında ise 2255



tane genin farklı eksprese olduğu belirlenmiştir. Farklı eksprese olan genlerin sayısının yapraklarda köklere göre daha az olduğu görülmüştür. Bununla birlikte düzenlenen genlerin sayısının tüm dokularda akümüle edilen Cd miktarı ile ilişkili olmadığı bildirilmiştir. Birçok metabolizma ya da fonksiyonlara katılan genlerin ekspresyon profillerinin, uygulanan konsantrasyondan ziyade zamana bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir. Ayrıca rasgele seçilen 8 adet gen ile RT-PCR yöntemi uygulanarak mikroarray sonuçlarının doğruluğu teyit edilmiştir (Herbette ve diğ., 2006). Bir başka çalışmada Abercrombie ve diğ. (2008), arsenik (As) stresinin *A. thaliana* bitkisi üzerinde gen ekspresyonuna etkisini mikroarray analiz yöntemiyle incelemiş ve mikroarray sonuçlarını RT-PCR yöntemiyle doğrulamıştır. Mikroarray analiz sonucunda As uygulamasıyla 46 adet genin teşvik edildiği belirlenmiştir. Etkilenen büyük fonksiyonel kategorilerin, fonksiyonu bilinmeyen genleri, hidrolazları ve antioksidan aktiviteyi; etkilenen diğer fonksiyonel kategorilerin ise transferaz, kinaz, liyaz, taşıyıcılar ve bağlayıcı aktivitelere sahip genleri içerdiği tespit edilmiştir. As tarafından 113 tane genin baskılandığı bildirilmiştir. Etkilenen büyük fonksiyonel kategorilerin, fonksiyonu bilinmeyen genleri, hidrolazları ve bağlayıcı aktiviteyi içerdiği bulunmuştur. Taşıyıcı, kinaz, transferaz ve transkripsiyonel regülatör aktiviteye sahip genler de As tarafından baskılanmıştır (Abercrombie ve diğ., 2008).

Pb uygulanan *B. juncea* var. P78 bitkilerinden elde edilen mikroarray sonuçları, yukarıda bahsi geçen *A. thaliana* ile yapılan çalışmalarla (Herbette ve diğ., 2006; Abercrombie ve diğ., 2008; Liu ve diğ., 2009) anlatımı değişen genler bakımından karşılaştırıldığında, TAH'm geniş çaplı gen ekspresyonu profillemelerinde TİH'e kıyasla daha başarısız olduğu görülmektedir (Tablo 4.2, Tablo 4.3, Şekil 4.16). Bu durum, proplar ve transkript dizileri arasındaki uyumun az olması nedeniyle belirli bir noktada hibridize olan transkript sayısının azalmasına ve dolayısıyla hibridizasyon sinyal yoğunluğunun düşük olmasına bağlanmıştır. Hudson ve diğ. (2007), *A. thaliana* temelli mikroarraylerin önemli sayıdaki *Brassica* genlerinin ekspresyonunun ölçümünde başarısız olabileceğini ve bunun TAH'da proplar ve transkript dizileri arasındaki uyumun az olmasından kaynaklanabileceğini belirtmiştir. Ayrıca *Brassica* tohumlarının gelişiminin gen ekspresyon profili üzerine etkisini ortaya koymak için *Arabidopsis* cDNA mikroarraylerinin uygulanabilirliğini araştıran Girke ve diğ. (2000), aynı hibridizasyon koşulları altında *Brassica-Arabidopsis* heterolog hibridizasyonu ile

*Arabidopsis-Arabidopsis* homolog hibridizasyonunun sinyal yoğunluklarını karşılaştırmış ve heterolog hibridizasyonun sinyal yoğunluğunun %50 daha düşük olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök kısımlarında, kontrol grubuna oranla deney grubunda anlatımı değişen genlerin çoğunlukla türler arası düzeyde korunmuş genler olması da (Şekil 4.16), TAH ile gen ekspresyonu çalışmalarında anlamlı sonuçlar yakalama şansının azaldığını göstermektedir. Bu sonuç aynı zamanda, *Brassica* türleri ile *Arabidopsis* problemleri arasında yapılan biyoenformatik analizle de uyum göstermektedir (Tablo 4.6, Şekil 4.18).

TAH'ın kullanıldığı mikroarray analiz sonuçlarının doğrulanması amacıyla Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök kısmında RT-PCR yöntemi uygulanmıştır. Yapılan çalışmalarda, bitki patojeni olan *Sclerotinia sclerotiorum* nedeniyle *B. napus* L.'de değişen lokal-defansla ilişkili genler *Arabidopsis* cDNA mikroarrayleri kullanarak tanımlamış ve RT-PCR yöntemiyle array sonuçları doğrulanmıştır (Liu ve diğ., 2005; Yang ve diğ., 2007). Öte yandan TAH sonucunda düşük transkript gösteren genlerin, genomik ölçekte *Brassica*'ya özgü primerlerin kullanıldığı RT-PCR yöntemiyle doğrulanamadığı bildirilmiştir (O'Hara ve diğ., 2002). Bu çalışmada TAH nedeniyle büyük ölçekli gen ekspresyon profili çıkarılamadığı için RT-PCR reaksiyonunda kullanılan genlerin seçiminde, mikroarray analiz sonucunda fark gösteren bütün genler (183 tane) taranmıştır (Şekil 4.19). Ağır metal akümüasyonu ve toleransı ile ilişkili moleküler mekanizmada rol oynayabileceği düşünülen genler arasından seçim yapılarak, *B. juncea*'da AA genomu bulunan *Brassica rapa*'ya özgü problemler hazırlanmıştır (Tablo 4.9). *B. juncea* var. P78 bitkisinin deney grubunda kontrol grubuna oranla farklı eksprese olan hedef genlerin, RT-PCR'yle mRNA seviyesinde belirlenen değişimleri ve mikroarray analiz sonucunda bulunan kat değişimleri karşılaştırıldığında, her iki yöntemde de hedef genlerin mRNA düzeyindeki kat değişimleri birbirleriyle uyumlu bulunmuş, fakat istatistiksel anlamda farklılık görülmüştür (Tablo 4.10). Böylece TAH'ın kullanıldığı mikroarray analizden elde edilen verilerin, *Brassica rapa*'ya özgü primerlerin kullanıldığı RT-PCR sonuçları ile paralel olduğu gösterilmiştir.

Pb ve Cd uygulamaları yapılan *B. juncea* bitkisinin kök, gövde ve yapraklarında RT-PCR yöntemiyle belirlenen, ağır metal metabolizmasıyla ilişkili olduğu düşünülen teşvik edilen ve baskılanan genlerin değişimleri Tablo 5.2’de verilmiştir.

Tablo 5.2: 24 saat boyunca Pb ve Cd uygulamaları yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin farklı kısımlarında teşvik edilen ve baskılanan genler (Pb ve Cd metabolizmalarına özgü yanıt gösteren genler kırmızı renk ile ifade edilmiştir).

	Pb Uygulaması			Cd Uygulaması		
	Kök	Gövde	Yaprak	Kök	Gövde	Yaprak
<b>BJMInd-1</b>	<b>2,33</b>	<b>0,67</b>	<b>-2,47</b>	<b>-1,41</b>	<b>1,89</b>	<b>2,46</b>
<b>BJMInd-2</b>	<b>1,83</b>	<b>2,04</b>	<b>-2,31</b>	<b>-1,70</b>	<b>-2,21</b>	<b>7,04</b>
<b>BJMInd-3</b>	<b>1,95</b>	<b>-3,02</b>	<b>1,20</b>	<b>-1,86</b>	<b>-2,44</b>	<b>1,92</b>
<b>BJMInd-4</b>	<b>2,01</b>	<b>1,38</b>	<b>1,38</b>	<b>1,76</b>	<b>-1,85</b>	<b>3,76</b>
<b>BJMRep-1</b>	<b>-1,27</b>	<b>1,30</b>	<b>-1,57</b>	<b>-1,53</b>	<b>-2,04</b>	<b>1,13</b>
<b>BJMRep-2</b>	<b>-1,22</b>	<b>1,18</b>	<b>1,48</b>	<b>-1,63</b>	<b>-1,28</b>	<b>-1,49</b>

Tablo 5.2’ye göre, her iki uygulamada da hedef genlerin ekspresyonları, bitkinin kök, gövde ve yapraklarında ağır metal stresine karşı sistemik (tüm dokularda aynı yönde) ya da lokal (dokuya özgü) yanıt oluşumuna işaret etmektedir. *B. juncea* bitkisinin tüm kısımlarında Pb uygulaması sonucunda BJMInd-4’de artış, Cd uygulamasında ise BJMRep-2’de azalış görülmesi, bu genlerin Pb ve Cd stresine karşı sistemik yanıt verdiklerini göstermektedir. Bununla birlikte, lokal yanıt gösteren bazı hedef genlerin mRNA düzeyindeki değişimlerinin Pb ve Cd uygulamaları arasında farklılık göstermesi sonucunda, her iki metale özgü anlatım gösteren genler belirlenmiştir. BJMInd-1, BJMInd-2 ve BJMInd-3, Pb uygulanan bitkilerin köklerinde artış gösterirken Cd uygulaması ile azalmıştır. Metal alımı ve taşınması ile ilişkili olarak gövde ve yapraklarda hedef genlerin değişimi incelendiğinde, gövdede BJMInd-2, BJMInd-4, BJMRep-1 ve BJMRep2 Pb uygulaması ile teşvik edilirken Cd uygulamasında baskılanmıştır. Yapraklarda ise BJMInd-1, BJMInd-2 ve BJMRep-1 Pb uygulanan bitkilerde azalma, Cd uygulananlarda artış göstermiş; BJMRep-2’de tam tersi değişim tespit edilmiştir. Yapılan birçok çalışmada, ağır metal metabolizmasıyla ilişkili olduğu düşünülen genlerin bitkinin farklı kısımlarında oluşturdukları sistemik ya da lokal yanıtları gösterilmiştir. Heiss ve diğ. (1999) 48 saat boyunca 25 µM Cd uygulaması

yapılan *B. juncea*'da sülfür asimilasyonuna katılan 3 enzimi kodlayan putativ düşük affiniteli sülfat taşıyıcılar (LAST) ve iki izoformu (ATP sülfürülaz ve APS redüktaz genleri) ile mirozinaz (MYR) genlerini klonlamıştır. Bitkinin kök ve yapraklarında ATPS ve APSR genlerinin ekspresyonlarının kuvvetli bir şekilde arttığı, MYR ekspresyonunun etkilenmediği bildirilmiştir. LAST transkriptlerinin ise, köklerde önemli derecede azalırken, yapraklarda herhangi bir değişikliğe uğramadığı rapor edilmiştir (Heiss ve diğ., 1999). Bir başka çalışmada, Cd uygulaması yapılan *B. napus* bitkisinde,  $\gamma$ -ECS ve LAST transkript seviyelerinin kök ve yapraklarda arttığı, HAST geni ekspresyonunun da köklerde arttığı, yapraklarda eksprese edilmediği tespit edilmiştir (Sun ve diğ., 2005). Minglin ve diğ. (2005) 48 saatlik Cd uygulaması sonucunda *B. juncea*'dan klonladıkları DD2 ve DD24 genlerinin yapraklarda arttığını köklerde azaldığını, DD21 ve DD22 genlerinin de köklerde artış yapraklarda azalma gösterdiğini bildirmiştir. Ayrıca Fassler ve diğ. (2011) Cd uygulanan tütün bitkilerinde Cd'nin alımı, dağılımı ve detoksifikasyonuna katılan bazı genlerin ekspresyonunu incelemiştir. NtMRP\_a, NtATM\_a, NtPDR\_a, NtSultr\_a, NtGSHI genleri köklerde artış gösterirken, toprak üstü organlarında herhangi bir değişim gözlenmemiştir. NtAPR\_a, NtAPR\_b genlerinin de köklerde artış, toprak üstü organlarında azalma gösterdiği bulunmuştur. Howarth ve diğ. (2003)'de Cd uygulaması yapılan *A. thaliana*'dan klonladıkları 4 farklı Sat geninin bitkinin farklı kısımlarındaki ekspresyonlarını incelemiş ve bu genlerin herbirinin dokuya özgü yanıtlar vererek farklı roller üstlendiklerini ortaya koymuştur.

Bu çalışmada, ağır metal metabolizmasında rol aldığı düşünülen ve mRNA düzeyinde ekspresyonları incelenen genlerin, gen ontolojisine göre fonksiyonel kategorizasyonları Tablo 5.3'de özetlenmiştir. Tabloda görüldüğü üzere, *BJMInd-1* fonksiyonu bilinmeyen bir gen dir. *B. juncea* var. P78 bitkisine Pb uygulaması sonucunda, BJMInd1 geni bitkinin kök ve gövdesinde teşvik edilirken, yapraklarda baskılanmıştır (Şekil 4.24). Cd uygulaması yapılan bitkilerde ise, BJMInd-1'in gövde ve yapraklarda arttığı, kökte azaldığı görülmüştür (Şekil 4.25). Ağır metal stresinin etkilediği ve biyolojik olarak fonksiyonu bilinmeyen birçok genin ekspresyonunun ortaya konması, gelecekteki araştırmalar için yeni genlerin belirlenmesine katkı sağlayacaktır.

Tablo 5.3: Tasarlanan primerlerin *A. thaliana* ve *B. rapa*'da karşılık geldiği genler ve gen ontolojisine göre fonksiyonel kategorizasyonları.

Primer Adı	<i>B. rapa</i> Gen Acces. No	<i>A. thaliana</i> Gen ID No	Hücreyel Bileşen	Moleküler Fonksiyon
<b>BJMInd-1</b>	gb EX048159	AT3G21550	Vakuol membranı ER	Bilinmiyor
<b>BJMInd-2</b>	gb EX094959	AT1G27770	Kloroplast iç membranı Plazma membranı ER	Kalmodulin bağlayıcı Ca kanal aktivitesi Ca-taşıma ATPaz aktivitesi
<b>BJMInd-3</b>	gb EX127933	AT4G39330.1	Apoplast	Çinko iyon bağlayıcı Sinnamil-alkol dehidrogenaz aktivitesi Oksidoredüktaz aktivitesi Protein bağlayıcı
<b>BJMInd-4</b>	gb GR718752	AT5G49890.1	Vakuol membranı	Anyon kanal aktivitesi Voltaj-kapılı klorid kanal aktivitesi
<b>BJMRep-1</b>	gb EX106898	AT2G28520	Vakuol Golgi vesikül membranı	ATPaz aktivitesi
<b>BJMRep-2</b>	gb EX096943	AT1G32050.1	Plazma membranı Mitokondri	Transmembran taşıyıcı aktivitesi

*BJMInd-2*, otoinhibe  $Ca^{+2}$ -ATPaz olarak işlev görmektedir. Otoinhibe  $Ca^{+2}$ -ATPaz ailesi, plazma membranından katyonların pompalanmasında fonksiyonel P-tipi ATPaz ailesinin bir üyesidir.  $P_{2B}$ -ATPaz'lar olarak da bilinen bu grup, memelilerde plazma membranında bulunan kalmodulin-uyarıcı ATPaz'larla ilişkilidir (Carafoli ve Brini, 2000; Geisler ve diğ., 2000a; Sze ve diğ., 2000). *Arabidopsis*'de 10, pirinçte 11 adet  $P_{2B}$ -ATPaz tanımlanmıştır. Bitkilerde en iyi karakterize edilen 4 tane  $P_{2B}$ -ATPaz'ın kalmodulin-düzenleyici otoinhibitör bölgeye sahip olduğu bilinmektedir (Malmstrom ve diğ., 1997; Harper ve diğ., 1998; Bonza ve diğ., 2000; Geisler ve diğ., 2000b; Baxter ve diğ., 2003). ATPaz'ların fonksiyonel rolü, hücrede Ca homeostazisini kontrol etmektir.  $Ca^{+2}$ 'nin elektrokimyasal gradiyente karşı sitozolden apoplasta ya da hücre içindeki organellere hareketi enerji gerektiren aktif taşıma ile yapılmaktadır. Bu süreç  $Ca^{+2}$ -ATPaz'lar tarafından katalize edilmektedir (White ve Broadley, 2003). Hücreden Ca ihracı, hızlı hücreyel sinyal süreçlerinde kullanılan gradiyenti oluşturmaktadır. Bu nedenle Ca bitkiler için önemli bir habercidir. Bitki hormonları, ışık, biyotik ve abiyotik stresleri içeren farklı sinyallerin hareketine aracılık etmektedir. Tüm bu sinyaller, sitozolik serbest Ca seviyesinde değişikliklere yol açmaktadır (Reddy ve diğ., 2002). Sitozolik  $Ca^{+2}$  seviyesindeki geçici değişiklikler,  $Ca^{+2}$  sensörleri aracılığıyla hücreyel süreçlerle kontrol edilmektedir. Bitkilerde bulunan  $Ca^{+2}$  sensörlerinden biri olan

kalmodulin ile  $Ca^{+2}$  bağlandığında, ATPaz'lar uyarılmaktadır (Geisler ve diğ., 2000a; Sze ve diğ., 2000). Zhao ve diğ. (2009) Cd, Cu, Al ve NaCl uygulamaları yapılan *A. thaliana* bitkisinin köklerinde mikroarray analiz sonucunda çeşitli Ca-bağlayıcı proteinleri kodlayan genlerin teşvik edildiğini göstermiş ve *Arabidopsis*'de Ca-aracılı sinyal yollarının rizotoksik streslere yanıtta önemli rollere sahip olduğu fikrini öne sürmüştür. Herbette ve diğ. (2006) Cd uygulaması yapılan *Arabidopsis*'in köklerinde ve yapraklarında Cd'ye yanıt olarak sinyal iletimine katılan birçok genin ekspresyonunun düzenlendiğini bildirmiştir. Bu genler arasında kalmodulinleri kodlayan genlerin bulunması, Cd'nin Ca sinyal yollarını kesintiye uğratacağı fikrini düşündürmüştür (Herbette ve diğ., 2006). Bu çalışmada BJMInd-2 geni, Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin kök ve gövde kısımlarında teşvik edilirken, yapraklarda baskılanmıştır (Şekil 4.24). Cd uygulanan bitkilere bakıldığında BJMInd-2'nin, sadece yapraklarda arttığı, kök ve gövdede azaldığı görülmüştür (Şekil 4.25).

*BJMInd-3*, sinnamil alkol dehidrogenaz (CAD) fonksiyonuna sahiptir. CAD aktivitesindeki yükselme, lignin biyosentezi artışının temel indikatörüdür (dos Santos ve diğ., 2006; Kováčik ve diğ., 2009). Lignin biyosentezi muhtemelen iki sinyal iletim yolu tarafından kontrol edilmektedir. Bu yollardan biri, bitki savunma yanıtlarında vaskular doku ve diğer dokularda ortaya çıkan gelişimi içermektedir (Walter, 1992; Mitchell ve Barber, 1994). Lignin çoğunlukla lifler ve trakeal elementler gibi destekleyici ve iletici dokuların hücre duvarlarında birikmektedir. CAD aktivitesi, doğrudan lignin biyosentezine katılmaktadır. Bu enzim çok sayıda ağaç türünün ksilem dokusundan elde edilmesinin yanısıra lignifikasyona uğramamış dokularda da rapor edilmiştir (Blanco-Portales ve diğ., 2002). Herbette ve diğ. (2006) *Arabidopsis*'in kök ve yapraklarında Cd'ye yanıt olarak hücre duvarı metabolizmasına katılan genlerin transkript seviyelerindeki değişimi incelemiştir. Özellikle köklerde hücre duvarının primer yapısının Cd uygulamasından doğrudan etkilendiğini bulmuşlardır (Herbette ve diğ., 2006). Metal toleransı mekanizmasında hücre duvarının metal bağlayıcı özellikleri olduğu düşünülmüştür (Hall, 2002). Ayrıca stres koşullarında hücre duvarı yapısını güçlendiren bileşenlerin, sertliği arttırmak için değiştikleri bilinmektedir. CAD gibi lignin biyosentezine katılan proteinleri kodlayan genlerin teşvik edilmesiyle, bitkinin kök ve yapraklarında Cd'ye karşı lignin biyosentezinin arttığı fikri öne sürülmüştür (Herbette ve diğ., 2006). *B. juncea* var. P78 bitkisine Pb uygulaması sonucunda

BJMInd-3, kök ve yapraklarda artış, gövde de azalma göstermiştir (Şekil 4.24). Cd uygulanan bitkilerde ise, BJMInd-3 geni sadece yapraklarda teşvik edilirken, kök ve gövdede baskılandığı belirlenmiştir (Şekil 4.25).

*BJMInd-4*, klorür kanal aktivitesi göstermektedir. Bitkilerde anyon taşıyıcıların önemli bir grubunu oluşturan klorür kanal (CLC) ailesi, prokaryotlar ve ökaryotlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Bitkilerde CLC proteinleri osmoregülasyon, stoma hareketi, hücre sinyalleşmesi, besin alımı ve metal toleransı gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlara katılmaktadır. *Arabidopsis* genomunda 7 tane CLC (*AtCLCa-g*) geni tanımlanmıştır (Hechenberger ve diğ., 1996). *Arabidopsis* mutantlarının fizyolojik karakterizasyonları, *AtCLCa*, *AtCLCb* ve *AtCLCc*'nin bitkilerde nitrat seviyesinin düzenlenmesine katıldıklarını göstermektedir (Geelen ve diğ., 2000; Harada ve diğ., 2004; von der Fecht-Bartenbach ve diğ., 2010). *AtCLCa* vakuolde nitrat translokasyonunda rol oynamaktadır. Fakat bakteri ve memelilerde tanımlanan diğer tüm CLC'ler klorür taşınmasına katılmaktadır. *AtCLCc*, *AtCLCd* ve *AtCLCg*, klorür taşınmasında seçicilik göstermektedir (Zifarelli ve Pusch, 2009). Bu proteinlerin, stoma hareketi ya da tuz stresi gibi Cl taşıması gerektiren fizyolojik olgulara katıldığı düşünülmektedir (Hansch ve Mendel, 2009; Jossier ve diğ., 2010; Teakle ve Tyerman, 2010). Bu çalışmada Pb uygulaması yapılan *B. juncea* var. P78 bitkisinin tüm kısımlarında BJMInd-4 geninin teşvik edildiği görülmüştür (Şekil 4.24). Cd uygulaması sonucunda ise, BJMInd-4'ün kök ve yapraklarda arttığı, gövdede azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.25).

*BJMRep-1*, vakuolar proton ATPaz aktivitesine sahiptir. Tonoplastta çalışan transmembran taşıma sisteminin, ağır metal detoksifikasyonunda çok önemli role sahip olduğu bildirilmiştir (Dietz ve diğ., 2001; Clemens, 2006). Vakuolar membranda, vakuolde metal iyonlarının depolanmasından sorumlu tonoplast taşıyıcıların bazı sınıfları tanımlanmıştır. Bu taşıyıcıların hepsi enerji bağımlı proteinlerdir. Primer aktif taşıyıcılar ATP hidrolizinden elde edilen enerjiyi kullanırken, sekonder taşıyıcılar elektrokimyasal gradiyent ile enerji sağlamaktadır. Bu nedenle metal/proton antiportörler olarak çalışan diğer taşıyıcıların aktivitesi, doğrudan vakuolar ATPaz ve vakuolar PPaz'ın işlevselliğine bağlıdır (Gaxiola ve diğ., 2007). Ağır metal stresinde tonoplast proton pompalarının artan aktivitesi ve/veya gen ekspresyonu, bitki stres toleransına katılan mekanizmalardan biri olarak görülmektedir. Bu genin ekspresyonunun stres

faktörleri tarafından teşvik edildiğini gösteren birçok çalışmada, bitki toleransında tonoplast proton pompalarının önemli rolü olduğu onaylanmıştır. (Lehr ve diğ., 1999; Golldack ve Dietz, 2001; Wang ve diğ., 2001; Parks ve diğ., 2002; Fukuda ve diğ., 2004; Vera-Estrella ve diğ., 2005; Guo ve diğ., 2006). Bunun yanısıra metal taşınması ile ilgili yapılan çalışmalar da, ağır metal stresine bitki adaptasyonunda tonoplast proton pompalarının önemli bir role sahip olabileceğini göstermektedir. Örneğin, spesifik bir V-tip ATPaz inhibitörü olan bafilomisin ile yapılan çalışmada, *Silene vulgaris*'de Zn-toleransında tonoplasttan Zn taşınmasının V-ATPaz aktivitesine bağlı olduğu gösterilmiştir (Chardonnens ve diğ., 1999). Ancak, ağır metal uygulanan bitkilerde bu tonoplast enziminin işlevi ve regülasyonu hakkındaki bilgiler çok azdır. Kabała ve diğ. (2010) salatalık fidelerinin köklerinde yaptıkları çalışma ile V-ATPaz tarafından katalize edilen ATP hidrolizi ve ATP'ye dayalı proton taşınmasının Cu uygulaması yapılan bitkilerde arttığını, Cd uygulananlarda ise azaldığını bildirmiştir. Bununla birlikte salatalık fidelerinin köklerinde Cd ve Cu uygulamasıyla, tonoplasttaki H<sup>+</sup> pompalarının mRNA miktarlarının önemli derecede değişikliğe uğramadığını göstermiştir. Bu nedenle ağır metallere karşı tonoplast H<sup>+</sup> pompalarının değişen aktivitelerinin, gen ekspresyonundaki değişikliklere bağlı olmadığı fikri öne sürülmüştür (Kabała ve diğ., 2010). Ayrıca plazma membranındaki ATPaz'larda yapılan çalışmalarla, proton pompaları üzerinde Cd iyonlarının inhibitör etkisi (Astolfi ve diğ., 2003, 2005; Janicka-Russak ve diğ., 2008), Cu iyonlarının ise stimüle (Burzynski ve Kolano, 2003) ve inhibe edici (Burzynski ve Kolano, 2003; Janicka-Russak ve diğ., 2008) etkileri gösterilmiştir. Cd'ye karşın Cu'nun V-ATPaz aktivitesi üzerine etkisinin köklerde biriken metal miktarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ni uygulanan bitkilerde Ni iyonlarının plazma membranındaki ATPaz aktivitesini toprak üstü organlarda stimüle ettiği (Ros ve diğ., 1990; 1992a; 1992b), enzim aktivitesinde ise köklerdeki metal konsantrasyonuna bağlı olarak artış ya da azalış olduğu gözlenmiştir (Burzynski ve Buczek, 1994; Janicka-Russak ve diğ., 2008; Kabała ve Janicka-Russak, 2011). Bu çalışmada Pb uygulanan *B. juncea* var. P78 bitkisinde BJMRep-1 sadece gövde de artış göstermiş, kök ve yapraklarda azalmıştır (Şekil 4.24). Cd uygulaması yapılan bitkilerde BJMRep-1 geninin sadece yapraklarda teşvik edildiği, kök ve gövdede ise baskılandığı bulunmuştur (Şekil 4.25).



*BJMRep-2*, salgı taşıyıcı membran protein (SCAMP)'ler olarak işlev görmektedir. Eksositoz ve endositoz, hücre bölünmesi ve genişlemesi için önemli olaylardır. Ekzositoz süresince, lipidler, proteinler ve polisakkaritler Golgi aygıtında sentez ve/veya modifiye edilmekte ve plazma membranı ya da ekstrasellular alana taşınması için trans-Golgi ağındaki salgı veziküllerinde sıralanmaktadır (Toyooka ve Matsuoka, 2009). SCAMP'lar nematodlar, böcekler, balıklar, amfibiler, memlileri kapsayan birçok ökaryot ve bitkilerde yaygın olarak bulunan integral membran proteinlerdir (Brand ve diğ., 1991; Fernandez-Chacon ve diğ., 2000; Wang ve diğ., 2010). Gelişmiş ökaryotik hücrelerde Golgi aygıtı ve plazma membranı arasındaki veziküler trafikte rol oynamaktadır (Castle ve Castle, 2005; Toyooka ve Matsuoka, 2009). Pirinç SCAMP1, tütün BY-2 hücrelerinde eksprese edildiğinde, floresan proteinlerin plazma membrnında, trans-Golgi ağında ve salgı veziküllerinde lokalize oldukları bulunmuştur (Lam ve diğ., 2007a, 2007b, 2009; Toyooka ve diğ., 2009, Wang ve diğ., 2010). Aynı protein, bölünen hücrelerde hücre plağı oluşumuna katılmaktadır (Lam ve diğ., 2008). SCAMP ailesinin bir diğeri üyesi SCAMP2'nin tütün bitkisinde trans Golgi aygıtı, plazma membranı, hücre plağı ve trans-Golgi aygıtı ile plazma membranı arasında bulunan karakterize edilememiş bir bölgede yerleştiği görülmektedir (Toyooka ve diğ., 2009, Toyooka ve Matsuoka, 2009). SCAMP'ların fonksiyonu net olmamasına karşın bitki hücrelerindeki endositik ve salgı yolları için yararlı bir belirteç oldukları bilinmektedir (Wang ve diğ., 2010). *B. juncea* var. P78 bitkisine Pb uygulaması ile *BJMRep-2* geninin gövde ve yapraklarda teşvik edildiği, kökte baskılandığı belirlenmiştir (Şekil 4.24). Cd uygulanan bitkilerde ise *BJMRep-2*'inde sadece yapraklarda arttığı kök ve gövdede ise azaldığı bulunmuştur (Şekil 4.25).

Özetle bu çalışmada, farklı ağır metallerin uygulanmasıyla iyi bir Pb akümülatörü ve Cd hiperakümülatörü olduğu tespit edilen *B. juncea* var. P78 bitkisinin Pb uygulanmış kök kısmında ağır metal metabolizmasında rol oynayabilecek genlerin mikroarray tekniği ile taranması sonucunda, çoğunlukla türler arası düzeyde korunmuş az sayıda gen tanımlanmış ve buna bağlı olarak TAH'ın geniş ölçekte gen ekspresyonu profillemesinde kullanılabilirliğinin başarılı olmadığı ortaya konmuştur (Tablo 4.2, Tablo 4.3, Şekil 4.16). Mikroarray analiz sonucunda ağır metal akümülasyonu ve toleransı ile ilişkili olduğu düşünülen genlerin ekspresyon seviyeleri RT-PCR yöntemiyle Pb ve Cd uygulamaları yapılan bitkilerin farklı kısımlarında belirlenerek

(Şekil 4.24, Şekil 4.25), her iki ağır metale özgü anlatım gösteren genler bulunmuştur (Tablo 5.2). RT-PCR uygulamasında kullanılan genler, özellikle Pb etkisiyle bitkide anlatımı değişen genlerin tanımlanmasına yönelik araştırmalarda bugüne kadar çalışılmamış olması bakımından büyük önem taşımaktadır. Fakat gen dizisi bakımından yeterli veri tabanı bulunamadığı için *B. juncea* yerine *B. rapa*'dan tasarlanan bu genlerin, ağır metal metabolizmasında sahip oldukları rolün net bir şekilde belirlenmesi ileride yapılacak çalışmalarla sağlanacaktır.

Elde edilen bu özgün sonuçlar, ağır metal akümüasyonu ve toleransı ile ilişkili moleküler mekanizmada aydınlatılmamış noktaların açıklanmasına ve fitoremediasyon sistemlerinin geliştirilmesi bakımından ağır metal stresine karşı dayanıklı transgenik bitkilerin yapılmasına yönelik çalışmalara önemli kaynak oluşturmuştur.

## KAYNAKLAR

- ABERCROMBIE, J.M., HALFHILL, M.D., RANJAN, P., RAO, M.R., SAXTON, A.M., YUAN, J.S., STEWART, C.N., 2008, Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* plants to As (V) stress, *BMC Plant Biology*, 8, 87.
- AGRAWAL, V., SHARMA, K., 2006, Phytotoxic effects of Cu, Zn, Cd and Pb on *in vitro* regeneration and concomitant protein changes in *Holarrhena antidysentrica*, *Biol. Plant.*, 50, 307-310,.
- ARAZI, T., SUNKAR, R., KAPLAN, B., FROMM, H., 1999, A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni<sup>2+</sup> tolerance and Pb<sup>2+</sup> hypersensitivity in transgenic plants, *The Plant Journal*, 20, 171-182.
- ARNESANO, F., BANCI, L., BERTINI, I., CIOFI-BAFFONI, S., MOLTENI, E., HUFFMAN, D.L., O'HALLORAN, T.V., 2002, Metallochaperones and metal-transporting ATPases: a comparative analysis of sequences and structures, *Genome Research*, 12, 255-271.
- ASSUNÇÃO, A.G.L., COSTA MARTINS, P.D.A., DE FOLTER, S., VOOIJS, R., SCHAT, H., AARTS, M.G.M., 2001, Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *Plant, Cell and Environment*, 24, 217-226.
- ASTOLFI, S., ZUCHI, S., PASSERA, C., 2005, Effect of cadmium on H<sup>+</sup>-ATPase activity of plasma membrane vesicles isolated from roots of different S-supplied maize (*Zea mays* L.) plants, *Plant Science*, 169, 361–8.
- ASTOLFI, S., ZUCHIA, S., CHIANIA, A., PASSERA, C., 2003, In vivo and in vitro effects of cadmium on H<sup>+</sup>-ATPase activity of plasma membrane vesicles from oat (*Avena sativa* L.) roots, *Journal of Plant Physiology*, 160, 387–93.
- AXELSEN, K.B., PALMGREN, M.G., 2001, Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 126, 696-706.
- ATSDR, 2011, *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>.
- BABULA, P., ADAM, V., OPATRILOVA, R., ZEHNALÉK, J., HAVEL, L., KIZEK, R., 2008, Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 6 (4), 189-213.

- BAE, W., MEHRA, R.K., 1998, Properties of glutathione and phytochelatins-capped CdS bioanocrytallites, *Journal Inorganic Biochemistry*, 69, 33–43.
- BAKER, A.J.M., 1981, Accumulators and excluders strategies in the response of plants to heavy metals, *Journal of Plant Nutrition*, 3, 643-654.
- BAKER, A.J.M., BROOKS, R.R., 1989, Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry, *Biorecovery*, 1, 81-126.
- BAKER, A.J.M., MCGRATH, S.P., SIDOLI, C.M.D., REEVES, R.D., 1994, The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants, *Resources, Conservation and Recycling*, 11, 41-49.
- BALANDIN, T., CASTRESANA, C., 2000, AtCPX17, an *Arabidopsis* homolog of the yeast copper chaperone COX17, *Plant Physiology*, 129, 1852-1857.
- BAR-OR, C., CZOSNEK, H., KOLTAL, H., 2007, Cross-species microarray hybridizations: a developing tool for studying species diversity, *TRENDS in Genetics*, 23 (4), 200-207.
- BAR-OR, C., BAR-EYAL, M., GAL, T.Z., KAPULNIK, Y., CZOSNEK, H., KOLTAL, H., 2006, Derivation of species-specific hybridization-like knowledge out of cross-species hybridization results, *BMC Genomics* 7, 110
- BARKLA, B.J., PANTOJA, O., 1996, Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 159–184.
- BASU, S.K., EUDES, F., KOVALCHUK, I., 2010, *Biotech Crops for Ecology and Environment*, C. Kole et al. (eds.), Transgenic Crop Plants, DOI 10.1007/978-3-642-04812-8\_8, Springer-Verlag.
- BAXTER, I., TCHIEU, J., SUSSMAN, M.R., BOUTRY, M., PALMGREN, M.G., GRIBSKOV, M., HARPER, J.F., AXELSEN, K.B., 2003, Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice, *Plant Physiology*, 132, 618-328.
- BEARD, S.J., HASHIM, R., MEMBRILLO-HERNANDEZ, J., HUGHES, M.N., POOLE, R.K., 1997, Zinc (II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that the *zntA* gene (o732) encodes a cation transport ATPase, *Molecular Microbiology*, 25, 883-891.
- BEGONIA, G.B., DAVIS, C.D., BEGONIA, M.F.T., GRAY, C.N., 1998, Growth responses of Indian Mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern.] and its phytoextraction of lead from a contaminated soil, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61, 38-43.
- BELOUCHI, A., CELLIER, M., KWAN, T., SAINI, H.S., LEROUX, G., GROS, P., 1995, The macrophage- specific membrane protein Nramp controlling natural

- resistance to infections in mice has homologues expressed in the root system of plants, *Plant Molecular Biology*, 29, 1181-1196.
- BELOUCHI, A., KWAN, T., GROS, P., 1997, Cloning and characterization of the OsNramp family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions, *Plant Molecular Biology*, 33, 1085-1092.
- BELTRAMINI, M., LERCH, K., 1982, Copper transfer between *Neurospora* copper metallothionein and type 3 copper apoproteins, *FEBS Letters*, 142, 219–222.
- BENNETT, L.E., BURKHEAD, J.L., HALE, K.L., TERRY, N., PILONA, M., PILON-SMITS, E.A.H., 2003, Analysis of transgenic Indian mustard plants for phytoremediation of metal-contaminated mine tailings, *Journal of Environmental Quality*, 32 (2), 432–440.
- BHUIYAN, M.S.U, MIN, S.R., JEONG, W.J., SULTANA, S., CHOI, K.S., SONG, W.Y., LEE, Y., LIM, Y.P., LIU, J.R., 2011, Overexpression of a yeast cadmium factor 1 (YCF1) enhances heavy metal tolerance and accumulation in *Brassica juncea*, *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 105, 85–91.
- BLANCO-PORTALES, R., MEDINA-ESCOBAR, N., LOPEZ-RAEZ, J.A., GONZALES-REYES, J.A., VILLALBA, J.M., MOYANO, E., CABALLERO, J.L., MUNOZ-BLANCO, J., 2002, Cloning, expression and immunolocalization pattern of a cinnamyl alcohol dehydrogenase gene from strawberry, *Journal of Experimental Botany*, 53, 375, 1723-1734.
- BLAUDEZ, D., KOHLER, A., MARTIN, F., SANDERS, D., CHALOT, M., 2003, Poplar metal tolerance protein 1 confers zinc tolerance and is an oligomeric vacuolar zinc transporter with an essential leucine zipper motif, *Plant Cell*, 15, 2911-2928.
- BLAYLOCK, M.J., HUANG, J.W., 1999, *Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment*, New York: John Wiley and Sons Inc., pp. 53–70.
- BLAYLOCK, M.J., SALT, D.E., DUSHENKOV, S., ZAKHAROVA, O., GUSSMAN, C., KAPULINK, Y., ENSLEY, B.D., RASKIN, I., 1997, Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents, *Environmental Science and Technology*, 31, 860–865.
- BONZA, M.C., MORANDINI, P., LUONI, L., GEISLER, M., PALMGREN, M.G., DE MICHELIS, M.I., 2000, At-ACA8 encodes a plasma membrane-localized calcium-ATPase of *Arabidopsis* with a calmodulin-binding domain at the N terminus, *Plant Physiology*, 123, 1495–1506.
- BORRELLY, G.P., HARRISON, M.D., ROBINSON, A.K., COX, S.G., ROBINSON, N.J., WHITEHALL, S.K., 2002, Surplus zinc is handled by Zym1 metallothionein and Zhf endoplasmic reticulum transporter in *Schizosaccharomyces pombe*, *Journal of Biological Chemistry*, 277, 30394-30400.

- BOVET, L., EGGMAN, T., MEYLAN-BETTECH, M., POLIER, J., KAMMER, P., MARIN, E., FELLER, U., MARTINOIA, E., 2003, Transcription levels of *AtMRPs* after cadmium treatment: induction of *AtMRP3*, *Plant Cell Environment*, 26, 371-381.
- BOWERS, J.E., CHAPMAN, A.B., RONG, J.M., PATERSON, A.H., 2003, Unraveling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events, *Nature*, 422, 433-438.
- BRAND, S.H., LAURIE, S.M., MIXON, M.B., CASTLE, J.D., 1991, Secretory carrier membrane proteins 31–35 define a common protein composition among secretory carrier membranes, *Journal of Biological Chemistry*, 266, 18949–18957.
- BROADLEY, M., WILLEY, M.J., WILKINS, J.C., BAKER, A.J.M., MEAD, A., WHITE, P.J., 2001, Phylogenetic variation in heavy metal accumulation in angiosperms, *New Phytologist*, 152, 9–27.
- BRODSKY, L. I., JACOB-HIRSCH, J., AVIVI, A., TRAKHTENBROT, L., ZELKGSON, S., AMARKGLKO, N., PAZ, A., KOROL, A. B., BAND, M., RECHAVK, G., NEVO, E., 2005, Evolutionary regulation of the blind subterranean mole rat, *Spalax*, revealed by genome-wide gene expression, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 17047–17052.
- BROUWER, M., HOEXUM-BROUWER, T., CASHON, R.E., 1993, A putative glutathione-binding site in Cd Zn-metalllothionein identified by equilibrium binding and molecular modeling studies, *Biochemical Journal*, 294, 219–225.
- BROWN, M.H., PAULSEN, I.T., SKURRAY, R.A., 1999, The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters, *Molecular Microbiology*, 31, 393-395.
- BRUNET, J., VARRAULT, G., ZUILY-FODIL, Y., REPELLIN, A., 2009, Accumulation of lead in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) plants triggers systemic variation in gene expression in the shoots, *Chemosphere*, 77, 1113–1120.
- BUBB, J.M., LESTER, J.N., 1991, The impact of heavy metals on lowland rivers and the implications for man and the environment, *Sci. Tot. Environ.*, 100, 207–233.
- BUGHIO, N., YAMAGUCHI, H., NISHIZAWA, N.K., NAKANISHI, H., MORI, S., 2002, Cloning an iron-regulated metal transporter from rice, *Journal of Experimental Botany*, 53, 1677-1682.
- BURZYNSKI, M., BUCZEK, J., 1994, The influence of Cd, Cu, Pb and Ni on NO<sub>3</sub> – uptake by cucumber seedlings. II. In vitro and in vivo effect of Cd, Cu, Pb and Ni on the plasmalemma ATPase and oxidoreductase from cucumber seedling roots, *Acta Physiologiae Plantarum*, 16, 297–302.

- BURZYNSKI, M., KOLANO, E., 2003, In vivo and in vitro effects of copper and cadmium on the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from cucumber (*Cucumis sativus* L.) and maize (*Zea mays* L.) roots, *Acta Physiologiae Plantarum*, 25, 39–45.
- CAILLIATTE, R., LAPEYRE, B., BRIAT, J.F., MARI, S., CURIE, C., 2009, The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity, *Biochemical Journal*, 422, 217–228.
- CAILLIATTE, R., SCHIKORA, A., BRIAT, J.F., MARI, S., CURIE, C., 2010, High affinity manganese uptake by the metal transporter NRAMP1 is essential for Arabidopsis growth in low manganese conditions, *The Plant Cell*, 22, 904–917.
- CARAFOLI, E., BRINI, M., 2000, Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport, *Current Opinion Chemical Biology*, 4, 152–161.
- CARRIER, P., BARYLA, A., HAVAUX, M., 2003, Cadmium distribution and microlocalization in oilseed rape (*Brassica napus*) after long-term growth on cadmium-contaminated soil, *Planta*, 216, 939–950.
- CASTILLO-MICHEL, H.A., HERNANDEZ, N., MARTINEZ-MARTINEZ, A., PARSONS, J.G., PERALTA-VIDEA, J.R., GARDEA-TORRESDEY, J.L., 2009, Coordination and speciation of cadmium in corn seedlings and its effects on macro- and micronutrients uptake, *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 608–614.
- CASTLE, A., CASTLE, D., 2005, Ubiquitously expressed secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) 1–4 mark different pathways and exhibit limited constitutive trafficking to and from the cell surface, *Journal of Cell Science*, 118, 3769–80.
- CAVELL, A.C., LYDIATE, D.C., PARKIN, I.A.P., DEAN, C., TRICK, M., 1998, Collinearity between a 30-centimorgan segment of Arabidopsis thaliana chromosome 4 and duplicated regions within the *Brassica napus* genome, *Genome*, 41, 62–69.
- CELLIER, M., PRIVÉ, G., BELOUCHI, A., KWAN, T., RODRIGUES, V., CHIA, W., GROS, P., 1995, Nramp defines a family of membrane proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 10089–10093.
- CHANG, P., KIM, K.W., YOSHIDA, S., KIM, S.Y., 2005, Uranium accumulation of crop plants enhanced by citric acid, *Environmental Geochemistry and Health*, 27, 529–538.
- CHARDONNENS, A.N., KOEVOETS, P.L.M., VAN ZANTEN, A., SCHAT, H., VERKLEIJ, J.A.C., 1999, Properties of enhanced tonoplast zinc transport in naturally selected zinc tolerant *Silene vulgaris*, *Plant Physiology*, 120, 779–85.
- CHATTHAI, M., KAUKINEN, K.H., TRANBARGER, T.J., GUPTA, P.K., MISRA, S., 1997, The isolation of a novel; metallothionein related cDNA expressed in somatic and zygotic embryos of Douglas fir: regulation of ABA, osmoticum and metal ions, *Plant Molecular Biology*, 34, 243–254.

- CHIANG, H.C., LO, J.C., YEH, K.C., 2006, Genes associated with heavy metal tolerance and accumulation in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*: a genomic survey with cDNA microarray, *Environmental Science Technology*, 40, 6792–6798.
- CLEMENS, S., 2001, Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis, *Planta*, 212, 475–486.
- CLEMENS, S., 2006, Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants, *Biochimie*, 88, 1707–19.
- CLEMENS, S., KIM, E. J., NEUMANN, D., SCHROEDER, J.I., 1999, Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast, *EMBO Journal*, 18, 3325–3333.
- CLEMENS, S., ANTOSIEWICZ, D.M., WARD, J.M., SCHACHTMAN, D.P., SCHROEDER, J.I., 1998, The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 12043–12048.
- CLEMENS, S., PALMGREN, M.G., KRÄMER, U., 2002a, A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation, *TRENDS in Plant Science*, 7, 309–315.
- CLEMENS, S., BLOSS, T., VESS, C., NEUMANN, D., NIES, D.H., ZUR NIEDEN, U., 2002b, A transporter in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* cells mediated zinc storage and differentially affects transition metal tolerance, *Journal of Biological Chemistry*, 277, 18215–18221.
- COBBETT, C.S., GOLDSBROUGH, P., 2002, Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis, *Annual Review of Plant Biology*, 53, 159–182.
- COBBETT, C.S., HUSSAIN, D., HAYDON, M.J., 2003, Structural and functional relationship between type 1B heavy metal-transporting P-type ATPases in *Arabidopsis*, *New Phytologist*, 159, 315–321.
- COLANGELO, E.P., GUERINOT, M.L., 2006, Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants, *Current Opinion Plant Biology*, 9, 322–330.
- CONNOLLY, E.L., FETT, J.P., GUERINOT, M.L., 2002, Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation, *The Plant Cell*, 14, 1347–1357.
- COURBOT, M., WILLEMS, G., MOTTE, P., ARVIDSSON, S., ROOSENS, N., SAUMITOU-LAPRADE, P., VERBRUGGEN, N., 2007, A major quantitative trait locus for cadmium tolerance in *Arabidopsis halleri* colocalizes with HMA4, a gene encoding a heavy metal ATPase, *Plant Physiology*, 144, 1052–1065.



- CROWLEY, D.E., WANG, Y.C., REID, C.P.P., SZANSISZLO, P.J., 1991, Mechanism of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants, *Plant and Soil*, 130, 179-198.
- CUNNINGHAM, S., 1995, Current Topics in Plant Biochemistry, *In Proceedings/Abstracts of the Fourteenth Annual Symposium*, Physiology, Molecular Biology Columbia, pp. 47-48.
- CUNNINGHAM, S.D., BERTI, W.R., 1993, Remediation of Contaminated Soils with Green Plants: An Overview, *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 29, 207-212.
- CUNNINGHAM, S.D., OW, D.W., 1996, Promises and prospects of phytoremediation, *Plant Physiology*, 110, 715-719.
- CURIE, C., ALONSON, J.M., LE, J.M., 2000, Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport, *Biochemistry Journal*, 347, 749-755.
- CURIE, C., PANAVIENE, Z., LOULERGUE, C., DELLAPORTA, S.L., BRIAT, J.F., WALKER, E.L., 2001, Maize *yellow stripe 1* encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake, *Nature*, 409, 346-349.
- DAS, S., SEN, M., SAHA, C., CHAKRABORTY, D., DAS, A., BANERJEE, M., SEAL, A., 2011, Isolation and expression analysis of partial sequences of heavy metal transporters from *Brassica juncea* by coupling high throughput cloning with a molecular fingerprinting technique, *Planta*, 234, 139-156.
- DAVIES, T.G.E., COLEMAN, J.O.D., 2000, The *Arabidopsis thaliana* ATP-binding cassette proteins: an emerging superfamily, *Plant, Cell and Environment*, 23, 431-443.
- DELHAIZE, E., KATAOKA, T., HEBB, D.M., WHITE, R.G., RYAN, R.R., 2003, Genes encoding proteins of the cation diffusion facilitator family that confer manganese tolerance, *The Plant Cell*, 15, 1131-1142.
- DESBROSSES-FONROUGE, A.G., VOIGT, K., SCHROEDER, A., ARRIVAUULT, S., THOMINE, S., KRAMER, U., 2005, *Arabidopsis thaliana* MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation, *FEBS Letters*, 579, 4165-4174.
- DIERBERG, F.E., DEBUSK, T.A., GOULE, N.A., 1987, *In Aquatic Plants for Water Treatment and Resource Recovery*, Florida, Magnolia Publishing Inc, pp. 497-504.
- DIETZ, K-J., TAVAKOLI, N., KLUGE, C., MIMURA, T., SHARMA, S.S., HARRIS, G.C., CHARDONNENS, A.N., GOLLDACK, D., 2001, Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level, *Journal of Experimental Botany*, 52, 1969-80.
- DOS SANTOS, W.D., FERRARESE, M.L.L., FERRARESE-FILHO, O., 2006, High performance liquid chromatography method for the determination of cinnamyl

- alcohol dehydrogenase activity in soybean roots. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale*, 44 (7-9), 511–515.
- DRAGHICI, S., KHATRI, P, EKLUND, A.C., SZALLASI, Z., 2005, Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements, *Trends Genetic*, 22, 101–109.
- DUFFUS, J.H., 2002, “Heavy Metals”—A Meaningless Term?, *Pure and Applied Chemistry*, 74 (5), 793–807.
- DUQUENE, L., VANDENHOVE, H., TACK, F., MEERS, E., BAETEN, J., WANNIJN, J., 2009, Enhanced phytoextraction of uranium and selected heavy metals by Indian mustard and ryegrass using biodegradable soil amendments, *Science of The Total Environment*, 407, 1496–1505.
- DURRETT, T.P., GASSMANN, W., ROGERS, E.E., 2007, The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation, *Plant Physiology*, 144, 197–205.
- DUSHENKOV, V., KUMAR, P.B.A.N., MOTTO, H., RASKIN, I., 1995, Rhizofiltration: The use of plants to remove heavy metals from aqueous streams, *Environmental Science and Technology*, 29, 1239-1245.
- EAPEN, S., D’SOUZA, S.F., 2005, Prospects of genetic engineering of plants for Phytoremediation of toxic metals, *Biotechnol Advances*, 23 (2), 97–144.
- EBBS, S.D., KOCHAIN, L.V., 1997, Toxicity of zinc and copper to *Brassica* species: Implications for phytoremediation, *Journal of Environmental Quality*, 26, 776–781.
- EIDE, D., 1998, The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *Annual Review of Nutrition*, 18, 441-469.
- EIDE, D., BRODERIUS, M., FETT, J., GUERINOT, M.L., 1996, A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 5624- 5628.
- EVERTSZ, E.M., AU-YOUNG, J., RUVOLO, M.V., LIM, A.C., REYNOLDS, M.A., 2001, Hybridization cross-reactivity within homologous gene families on glass cDNA microarrays, *Biotechniques*, 31, 1182–1192.
- FASSLER, E., PLAZAC, S., PAIRRAUD, A., GUPTA, S.K., ROBINSON, B., SCHULIN, R., 2011, Expression of selected genes involved in cadmium detoxification in tobacco plants grown on a sulphur-amended metal-contaminated field, *Environmental and Experimental Botany*, 70, 158–165.
- FERNANDEZ-CHACON, R., ACHIRILOAIE, M., JANZ, R., ALBANESI, J.P., SUDHOF, T.C., 2000, SCAMP1 function in endocytosis, *Journal of Biological Chemistry*, 275, 12752-12756.

- FORSTNER, U., 1995, *Land contamination by metals: global scope and magnitude of the problem*, Metal speciation and contamination of soil, CRC, Boca Raton, pp. 1–33.
- FUKUDA, A., CHIBA, K., MAEDA, M., NAKAMURA, A., MAESHIMA, M., TANAKA, Y., 2004, Effect of salt and osmotic stresses of genes for the vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase, H<sup>+</sup>-ATPase subunit A, and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter from barley, *Journal of Experimental Botany*, 55, 585–94.
- FUSCO, N., MICHELETTO, L., DAL CORSO, G., BORGATO, L., FURINI, A., 2005, Identification of cadmium-regulated genes by cDNA-AFLP in the heavy metal accumulator *Brassica juncea* L., *Journal of Experimental Botany*, 56, 3017–3027.
- GARCIA-HERNÁNDEZ, M., MURPHY, A., TAIZ, L., 1988, Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 118, 387–397.
- GASIC, K., KORBAN, S.S., 2006, *Heavy Metal Stress*, Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants, Springer, Printed in the Netherlands, pp. 219–254.
- GAXIOLA, R.A., FINK, G.R., HIRSCHI, K.D., 2002, Genetic manipulation of vacuolar proton pumps and transporters, *Plant Physiology*, 129, 967–973.
- GAXIOLA, R.A., PALMGREN, M.G., SCHUMACHER, K., 2007, Plant proton pumps, *FEBS Letters*, 581, 2204–2214.
- GAYMARD, F., PILOT, G., LACOMBE, B., BOUCHEZ, D., BRUNEAU, D., BOUCHEREZ, J., MICHAUX-FERRIÈRE, N., THIBAUD, J.B., SENTENAC, H., 1998, Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K<sup>+</sup> release into the xylem sap, *Cell*, 94 (5), 647–55.
- GEELEN, D., LURIN, C., BOUCHEZ, D., FRACHISSE, J.M., LELIEVRE, F., COURTIAL, B., BARBIER-BRYGOO, H., MAUREL, C., 2000, Disruption of putative anion channel gene AtCLC-a in *Arabidopsis* suggests a role in the regulation of nitrate content, *Plant Journal*, 21, 259–267.
- GEISLER, M., AXELSEN, K.B., HARPER, J.F., PALMGREN, M.G., 2000a, Molecular aspects of higher plant P-type Ca<sup>2+</sup>-ATPases, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465, 52–78.
- GEISLER, M., FRANGNE, N., GOMES, E., MARTINOIA, E., PALMGREN, M.G., 2000b, The ACA4 gene of *Arabidopsis* encodes a vacuolar membrane calcium pump that improves salt tolerance in yeast, *Plant Physiology*, 124, 1814–1827.
- GENDRE, D., CZERNIC, P., CONÉJÉRO, G., PIANELLI, K., BRIAT, J-F., LEBRUN, M., MARI, S., 2007, TcYSL3, a member of the YSL gene family from the hyperaccumulator specie *Thlaspi caerulescens*, encodes a nicotinamine-Ni/Fe transporter, *Plant Journal*, 49, 1–15.

- GHOSH, M., SINGH, S.P., 2005, A Review On Phytoremediation Of Heavy Metals And Utilization Of Its Byproducts, *Applied Ecology And Environmental Research*, 3 (1), 1-18.
- GILAD, Y., RIFKIN, S.A., BERTONE, P., GERSTEIN, M., WHITE, K.P., 2005, Multi-species microarrays reveal the effect of sequence divergence on gene expression profiles, *Genome Research*, 15, 674– 680
- GIRKE, T., TODD, J., RUUSKA, S., WHITE, J., BENNING, C., OHLROGGE, J., 2000, Microarray analysis of developing *Arabidopsis* seeds, *Plant Physiology*, 124, 1570–1581.
- GISBERT, C., ROS, R., DE HARO, A., WALKER, D. J., BERNAL, M.P., SERRANO, R., NAVARRO-AVINO, J., 2003, A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303, 440–445.
- GOLLDACK, D., DIETZ, K-J., 2001, Salt-induced expression of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in the common ice plant is developmentally controlled and tissue specific, *Plant Physiology*, 125, 1643–54.
- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, M., GARCIA-BARRERA, T., JURADO, J., PRIETO-ÁLAMO, M.J., PUEYO, C., LÓPEZ-BAREA, J., GÓMEZ-ARIZA, J.L., 2008, Integrated application of transcriptomics, proteomics, and metallomics in environmental studies, *Pure Appl. Chem.*, 80 (12), 2609–2626.
- GORINOVA, N., NEDKOVSKA, M., TODOROVSKA, E., SIMOVA-STOILOVA, L., STOYANOVA, Z., GEORGIEVA, K., DEMIREVASKA-KEPOVA, K., ATANASSOV, A., HERZIG, R., 2007, Improved phytoaccumulation of cadmium by genetically modified tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). Physiological and biochemical response of the transformants to cadmium toxicity, *Environmental Pollution*, 145, 161–170.
- GREGER, M., BRAMMER, E., LINDSBERG, S., IDESTAM-ALAMQUIST, J., 1991, Uptake and physiological effects of cadmium in sugar beet (*Beta vulgaris*) related with mineral provision, *Journal of Experimental Botany*, 42, 729–737.
- GRIGORYEV, D.N, MA, S., SÍMON, B.A., IRIZARRY, R.A., YE, S.Q., GARCIA, J.G.N., 2005, In vitro identification and in silico utilization of interspecies sequence similarities using GeneChip technology, *BMC Genomics*, 6, 62.
- GRILL, E., LOFFLER, S., WINNACKER, E.L., ZENK, M.H., 1989, Phytochelatins, the heavy-metal binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatinsynthase), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 6838–6842.
- GROTZ, N., FOX, T., CONNOLLY, E., PARK, W., GUERINOT, M.L., EIDE, D., 1998, Identification of family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that

- respond to zinc deficiency, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 7220-7224.
- GROTZ, N., GUERINOT, M.L., 2002, Limiting nutrients: an old problem with new solutions?, *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 158-163.
- GUERINOT, M.L., 2000, The ZIP family of metal transporters, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465, 190-198.
- GUERRA, F., DUPLESSIS, S., KOHLER, A., MARTIN, F., TAPIA, J., LEBED, P., ZAMUDIO, ENRIQUE, F., GONZÁLEZ, E., 2009, Gene expression analysis of *Populus deltoides* roots subjected to copper stress. *Environmental and Experimental Botany*. 67, 335–344.
- GUO, W.-J., BUNDITHYA, W., GOLDSBROUGH, P.B., 2003, Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper, *New Phytologist*, 159, 369–381.
- GUO, S, YIN, H., ZHANG, X., ZHAO, F., LI, P., CHEN, S., ZHAO, Y., ZHANG, H., 2006, Molecular cloning and characterization of a vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase gene, SsVP, from halophyte *Suaeda salsa* and its overexpression increases salt and drought tolerance of *Arabidopsis*, *Plant Molecular Biology*. 60, 41–50.
- GUPTA, S.C., GOLDSBROUGH, P.B., 1991, Phytochelatin accumulation and cadmium tolerance in selected tomato cell lines, *Plant Physiology*, 97, 306-312.
- HA, S.B., SMITH, A.P., HOWDEN, R., DIETRICH, W.M., BUGG, S., O'CONNELL, M.J., GOLDSBROUGH, P.B., COBBETT, C.S., 1999, Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Plant Cell*, 11, 1153–1163.
- HAAG-KERWER, A., SCHÄFER, H.J., HEISS, S., WALTER, C., RAUSCH, T., 1999, Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis, *Journal of Experimental Botany*, 50, 1827–1835.
- HALL, J.L., 2002, Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance, *Journal of Experimental Botany*, 53, 1–11.
- HALL, J.L., WILLIAMS, J.E., 2003, Transition metal transporters in plants, *Journal of Experimental Botany*, 54, 2601–2613.
- HARADA, H., KUROMORI, T., HIRAYAMA, T., SHINOZAKI, K., LEIGH, R.A., 2004, Quantitative trait loci analysis of nitrate storage in *Arabidopsis* leading to an investigation of the contribution of the anion channel gene, AtCLC-c, to variation in nitrate levels, *Journal of Experimental Botany*, 55, 2005–2014.
- HANIKENNE, M., TALKE, I.N., HAYDON, M.J., LANZ, C., NOLTE, A., MOTTE, P., KROYMANN, J., WEIGEL, D., KRÄMER, U., 2008, Evolution of metal

- hyperaccumulation required cisregulatory changes and triplication of HMA4, *Nature*, 453, 391–395.
- HANSCH, R., MENDEL, R.R., 2009, Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl), *Current Opinion Plant Biology*, 12, 259–266.
- HARDIMAN, R.T., JACOBY, B., BANIN, A., 1984, Factors affecting the distribution of cadmium, copper and lead and their effects upon yield and zinc content in bush bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Plant Soil*, 81, 17–27.
- HARPER, J.F., HONG, B., HWANG, I., GUO, H.Q., STODDARD, R., HUANG, J.F., PALMGREN, M.G., SZE, H., 1998, A novel calmodulin-regulated Ca<sup>2+</sup>-ATPase (ACA2) from Arabidopsis with an N-terminal autoinhibitory domain, *Journal of Biological Chemistry*, 273, 1099–1106.
- HASSINEN, V., 2009, *Search for Metal-Responsive Genes in Plants*, Thesis (PhD), Kuopio University.
- HAYDON, M.J., COBBETT, C.S., 2007, Transporters of ligands for essential metal ions in plants, *New Phytologist*, 174, 499–506.
- HE, X., ZHANG, J., 2005, Rapid subfunctionalization accompanied by prolonged and substantial neofunctionalization in duplicate gene evolution, *Genetics*, 269, 1157–1164.
- HECHENBERGER, M., SCHWAPPACH, B., FISCHER, W.N., FROMMER, W.B., JENTSCH, T.J., STEINMEYER, K., 1996, A family of putative chloride channels from Arabidopsis and functional complementation of a yeast strain with a CLC gene disruption, *Journal of Biological Chemistry*, 271, 33632–33638.
- HEDRICH, R., NEHER, E., 1987, Cytoplasmic calcium regulates voltage dependent ion channels in plant vacuoles, *Nature*, 329, 833–836.
- HEISS, S., SCHÄFER, H.J., HAAG-KERWER, A., RAUSCH, T., 1999, Cloning sulfur assimilation genes of *Brassica juncea* L.: cadmium differentially affects the expression of a putative low-affinity sulfate transporter and isoforms of ATP sulfurylase and APS reductase, *Plant Molecular Biology*, 39, 847–857.
- HERBETTE, S., TACONNAT, L., HUGOUVIEUX, V., PIETTE, L., MAGNIETTE, M.-L.M., CUINE, S., AUROY, P., RICHAUD, P., FORESTIER, C., BOURGUIGNON, J., RENOU, J.-P., VAVASSEUR, A., LEONHARDT, N., 2006, Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots, *Biochimie*, 88, 1751–1765.
- HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH, P.S., and GRIFFITH, R., 1992, Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences, *Biotechnology* 10, 413–417.

- HIGUCHI, K., SUZUKI, K., NAKANISHI, H., YAMAGUCHI, H., NISHIZAWA, N.K., MORI, S., 1999, Cloning of nicotinamide synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores, *Plant Physiology*, 119, 471–479.
- HIMELBLAU, E., AMASINO, R.M., 2000, Delivering copper within plant cell, *Plant Biology*, 3, 205-210.
- HIMELBLAU, E., MIRA, H., LIN, S.J., CULOTTA, V.C., PENARRUBIA, L., AMASINO, R.M., 1998, Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene *ATX1* from *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 117, 1227-1234.
- HIRAYAMA, T., KIEBER, J.J., HIRAYAMA, N., KOGAN, M., GUZMAN, P., NOURIZADEH, S., ALONSO, J.M., DAILEY, W.P., DANCIS, A., ECKER, J.R., 1999, Responsive-to-antagonist 1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signalling in *Arabidopsis*, *Cell*, 97, 383-393.
- HIRSCHI, K., 2001, Vacuolar  $H^+/Ca^{2+}$  transport: who's directing the traffic?, *Trends in Plant Science*, 6, 100-104.
- HIRSCH, R.E., LEWIS, B.D., SPALDING, E.P., SUSSMAN, M.R., 1998, A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition, *Science*, 280, 918-921.
- HIRSCHI, K.D., KORENKOV, V.D., WILGANOWSKI, N.L., WAGNER, G.J., 2000, Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance, *Plant Physiology*, 124, 125-134.
- HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I., 1938, The water culture method for growing plants without soil, *Cal. Agri. Exp. Station Circular*, 347, 1-39.
- HOWDEN, R., GOLDSBROUGH, P.B., ANDERSEN, C.R., COBBETT, C.S., 1995, Cadmium-sensitive, *cad1*, mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient, *Plant Physiology*, 107, 1059–1066.
- HUANG, J.W., CUNNINGHAM, S.D., 1996, Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation, *New Phytologist*, 134, 75-84.
- HUDSON, M.E., BRUGGINK, T., CHANG, S.H., YU, W., HAN, B., WANG, X., VAN DER TOORN, P., ZHU, T., 2007, Analysis of Gene Expression during *Brassica* Seed Germination Using a Cross-Species Microarray Platform, *The Plant Genome*, 47, 96-112.
- HUSSAIN, D., HAYDON, M.J., WANG, Y., WONG, E., SHERSON, S.M., YOUNG, J., CAMAKARIS, J., HARPER, J.F., COBBETT, C.S., 2004, P-Type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 16, 1327-1339.
- INDORIA, A.K., POONIA, S.R., 2006, Phytoextractability of lead from soil by some oilseed crops as affected by sewage sludge and farmyard manure, *Archives of Agronomy and Soil Science*, 52, 667–677.

- INGLE, R.A., MUGFORD, S.T., REES, J.D., CAMPBELL, M.M., SMITH, J.A.C., 2005, Constitutively high expression of the histidine biosynthetic pathway contributes to nickel tolerance in hyperaccumulator plants, *Plant Cell*, 17, 2089–2106.
- INOUE, H., HIGUCHI, K., TAKAHASHI, M., NAKANISHI, H., MORI, S., NISHIZAWA, N.K., 2003, Three rice nicotianamine synthase genes, OsNAS1, OsNAS2, and OsNAS3 are expressed in cells involved in long-distance transport of iron and differentially regulated by iron, *Plant Journal*, 36, 366–381.
- ISAYENKOV, S., ISNER, J.S., MAATHUIS, F.J.M., 2010, Vacuolar ion channels: Roles in plant nutrition and signalling, *FEBS Letters*, 584, 1982–1988.
- JABEEN, R., AHMAD, A., IQBAL, M., 2009, Phytoremediation of Heavy Metals: Physiological and Molecular Mechanisms, *Botanical Review*, 75, 339–364.
- JANICKA-RUSSAK, M., KABAŁA, K., BURZYNSKI, M., KŁOBUS, G., 2008, Response of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase to heavy metal stress in *Cucumis sativus* roots, *Journal of Experimental Botany*, 59, 3721–8.
- JIANG, W., LIU, D., HOU, W., 2000, Hyperaccumulation of lead by roots, hypocotyls, and shoots of *Brassica juncea*, *Biologia Plantarum*, 43, 603–606.
- JOHN, R., AHMAD, P., GADGILA, K., SHARMA, S., 2009, Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters and metal accumulation by *Brassica juncea* L., *International Journal of Plant Production*, 3 (3), 65–75
- JOHNSTON, J.S., PEPPER, A.E., HALL, A.E., CHEN, Z.J., HODNETT, G., DRABEK, J., LOPEZ, R., PRICE, H.J., 2005, Evolution of genome size of Brassicaceae, *Annals of Botany*, 95, 229–235.
- JONAK, C., NAKAGAMI, H., HIRT, H., 2004, Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium, *Plant Physiology*, 136, 3276–3283.
- HOWARTH, J.R., DOMINGUEZ-SOLIS, J.R., GUTIÉRREZ-ALCALÁ, G., WRAY, J.L., ROMERO, L.C., GOTOR, C., 2003, The serine acetyltransferase gene family in *Arabidopsis thaliana* and the regulation of its expression by cadmium, *Plant Molecular Biology*, 51: 589–598.
- JOSSIER, M., KRONIEWICZ, L., DALMAS, F., LE THIEC, D., EPHRITIKHINE, G., THOMINE, S., BARBIER-BRYGOO, H., VAVASSEUR, A., FILLEUR, S., LEONHARDT, N., 2010, The *Arabidopsis* vacuolar anion transporter, AtCLCc, is involved in the regulation of stomatal movements and contributes to salt tolerance, *The Plant Journal*, 64, 563–576.
- KABAŁA, K., JANICKA-RUSSAK, M., 2011, Differential regulation of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-PPase in *Cucumis sativus* roots by zinc and nickel, *Plant Science*, 180, 531–539.



- KABAŁA, K., JANICKA-RUSSAK, M., KŁOBUS, G., 2010, Different responses of tonoplast proton pumps in cucumber roots to cadmium and copper, *Journal of Plant Physiology*, 1328-1335.
- KAMPFENKEL, K., KUSHNIR, S., BABIYCHUK, E., INZEÂ, D., VAN MONTAGU, M., 1995, Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue, *Journal of Biological Chemistry*, 270, 28479-28486.
- KARIN, M., 1985, Metallothioneins: proteins in search of function, *Cell*, 41, 9–10.
- KAWASAKI, S., BORCHERT, C., DEYHOLOS, M., WANG, H., BRAZILLE, S., KAWAI, K., GALBRAITH, D., BOHNERT, H.J., 2001, Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice, *Plant Cell*, 13, 889–906.
- KHAN, A.G., KUEK, C., CHAUDHRY, T.M., KHOO, C.S., HAYES, W.J., 2000, Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation, *Chemosphere*, 41, 197-207.
- KLAPHECK, S., SCHLUNZ, S., BERGMAN, L., 1995, Synthesis of phytochelatins and homo-phytochelatins in *Pisum sativum* L., *Plant Physiology*, 107, 515–521.
- KOBAE, Y., UEMURA, T., SATO, M.H., OHNISHI, M., MIMURA, T., NAKAGAWA, T., MAESHIMA, M., 2004, Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis, *Plant and Cell Physiology*, 45, 1749–1758.
- KOHLER, C., MERKLE, T., NEUHAUS, G., 1999, Characterization of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulinregulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Journal*, 18, 97-104.
- KOCH, M., HAUBOLD, B., MITCHELL-OLDS, T., 2001, Molecular systematics of the Brassicaceae: Evidence from coding plastidic *matK* and nuclear *Chs* sequences, *American Journal of Botany*, 88, 534–544.
- KOHLER, A., BLAUDEZ, D., CHALOT, M., MARTIN, F., 2004, Cloning and expression of multiple metallothioneins from hybrid poplar, *New Phytologist*, 164, 83–93.
- KOVÁČIK, J., KLEJDUS, B., HEDBAVNY, J., ŠTORK, F., BAČKOR, M., 2009, Comparison of cadmium and copper effect on phenolic metabolism, mineral nutrients and stress-related parameters in *Matricaria chamomilla* plants, *Plant Soil*, 320, 231-242.
- KRAMER, U., TALKE, I.N., HANNIKENNE, M., 2007, Transition metal transport, *FEBS Letters*, 581, 2263–2272.

- KRAMER, U., COTTER-HOWELS, J.D., CHARNOCK, J.M., BAKER, A.J.M., SMITH, A.C., 1996, Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate Nickel, *Nature*, 379, 635–638.
- KRAMER, U., PICKERING, I.J., PRINCE, R.C., RASKIN, I., SALT, D.E., 2000, Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species, *Plant Physiology*, 122, 1343–1354.
- KUBISTA, M., ANDRADE, J.M., BENGTSSON, M., FOROOTAN, A., JONÁK, J., LIND, K., 2006, The real-time polymerase chain reaction, *Mol Aspects Med*, 27, 95–125.
- KUMAR, P.B.A.N., DUSHENKOV, V., MOTTO, H., RASKIN, I., 1995, Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils, *Environmental Science and Technology*, 29, 1232–1238.
- KUSHWAHA, H.R., KUMAR, G., VERMA, P.K., SINGLA-PAREEK, S.L., PAREEK, A., 2011, Analysis of a salinity induced BjSOS3 protein from *Brassica* indicate it to be structurally and functionally related to its ortholog from *Arabidopsis*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 49 (9), 996–1004.
- KUPPER, H., ZHAO, F.J., MCGRATH, S.P., 1999, Cellular compartmentation of Zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *Plant Physiology*, 119, 305–312.
- LAL, N., 2010, *Molecular Mechanisms and Genetic Basis of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants*, Plant Adaptation and Phytoremediation, Springer Science, DOI 10.1007/978-90-481-9370-7-2.
- LAM, S.K., TSE, Y.C., ROBINSON, D.G., JIANG, L., 2007b, Tracking down the elusive early endosome, *Trends Plant Science*, 12, 497–505.
- LAM, S.K., CAI, Y., HILLMER, S., ROBINSON, D.G., JIANG, L., 2008, SCAMPs highlight the developing cell plate during cytokinesis in tobacco BY-2 cells, *Plant Physiology*, 147, 1637–45.
- LAM, S.K., CAI, Y., HILLMER, S., ROBINSON, D.G., JIANG, L., 2009, The BFA-induced compartments from Golgi apparatus and trans-Golgi network are distinct in plant cells, *Plant Journal*, 60, 865–881.
- LAM, S.K., SIU, C.L., HILLMER, S., JANG, S., AN, G., ROBINSON, D.G., JIANG, L., 2007a, Rice SCAMP1 defines clathrin-coated, trans-golgi-located tubular-vesicular structures as an early endosome in tobacco BY-2 cells, *Plant Cell*, 19, 296–319.
- LANG, M., ZHANG, Y., CHAI, T., 2005a, Identification of genes up-regulated in response to Cd exposure in *Brassica juncea* L., *Gene*, 363, 151–158.

- LANG, M.L., ZHANG, Y., GUAN, Z.Q., CHAI, T.Y., 2005b, PCR-enriched cDNA pool method for cloning of gene homologues, *Plant Molecular Biology Reporter*, 23, 219–226.
- LANG, M, HAO, M., FAN, Q., WANG, W., MO, S., ZHAO, W., ZHOU, J., 2011, Functional characterization of BjCET3 and BjCET4, two new cation-efflux transporters from *Brassica juncea* L., *Journal of Experimental Botany*, 4467-4480.
- LANQUAR, V., LELIEVRE, F., BOLTE, S., 2005, Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron, *The EMBO Journal*, 24, 4041–4051.
- LANQUAR, V., RAMOS, M.S., LELIEVRE, F., BARBIER-BRYGOO, H., KRIEGER-LISZKAY, A., KRAMER, U., THOMINE, S., 2010, Export of vacuolar manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is required for optimal photosynthesis and growth under manganese deficiency, *Plant Physiology*, 152, 1986–1999.
- LEE, J.R.D., REEVES, R.R., BROOKS, R.R., JAFFRE, T., 1977, Isolation and identification of a citrate complex of nickel from nickel-accumulated plants, *Phytochemistry*, 16, 1502–1505.
- LEE, J.Y., LEE, D.H., 2003, Use of serial analysis of gene expression technology of reveal changes in gene expression in *Arabidopsis* pollen undergoing cold stress, *Plant Physiology*, 132, 517–529.
- LEE, S., AN, G., 2009, Over-expression of OsIRT1 leads to increased iron and zinc accumulations in rice, *Plant, Cell and Environment*, 32, 408–416.
- LEHR, A., KIRSCH, M., VIERECK, R., SCHIEMANN, J., RAUSCH, T., 1999, cDNA and genomic cloning of sugar beet V-type H<sup>+</sup>-ATPase subunit A and c isoforms: evidence for coordinate expression during plant development and coordinate induction in response to high salinity, *Plant Molecular Biology*, 39, 463–75.
- LI, L., HE, Z., PANDEY, G.K., TSUCHIYA, T., LUAN, S., 2002, Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification, *Journal of Biological Chemistry*, 277, 5360-5368.
- LI, L., TUTONE, A.F., DRUMMOND, R.S.M., GARDNER, R.C., LUAN, S., 2001, A novel family of magnesium transport genes in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, 13, 2761-2775.
- LIANG, Z.Y., PILON-SMITS, E.A., JOUANIN, L., TERRY, N., 1999, Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance, *Plant Physiology*, 119, 1, 73–80.
- LIU, D., JIANG, W., LIU, C., XIN, C., HOU, W., 2000, Uptake and accumulation of lead by roots, hypocotyls and shoots of Indian mustard [*Brassica juncea* (L.)], *Bioresource Technology*, 71, 273–277.

- LIU, R., ZHAO, J., XIAO, Y., MENG, J., 2005, Identification of prior candidate genes for Sclerotinia local resistance in *Brassica napus* using Arabidopsis cDNA microarray and Brassica–Arabidopsis comparative mapping, *Science in China Series C: Life Sciences*, 48, 460–470.
- LIU, T., LIU, S., GUAN, H., MA, L., CHEN, Z., GU, H., QU, L., 2009, Transcriptional profiling of *Arabidopsis* seedlings in response to heavy metal lead (Pb), *Environmental and Experimental Botany*, 67, 2, 377–386.
- LIUA, D., JIANGA, W., LIUA, C., XINA, C., HOU, W., 2000, Uptake and accumulation of lead by roots, hypocotyls and shoots of Indian mustard [*Brassica juncea* (L.)], *Bioresource Technology*, 71, 273–277.
- LOMBI, E., ZHAO, F.J., DUNHAM, S.J., McGRATH, S.P., 2000, Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*, 145, 11–20.
- LOMBI, E., TEARALL, K.L., HOWARTH, J.R., ZHAO, F.J., HAWKESFORD, M.J., McGRATH, S.P., 2002, Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *Plant Physiology*, 128, 1359–1367.
- LONG, X.X., YANG, X.E., NI, W.Z., 2002, Current status and perspective on phytoremediation of heavy metal polluted soils, *Journal of Applied Ecology*, 13, 757–762.
- LYNCH, M., FORCE, A., 2000, The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization, *Genetics*, 154, 459–473.
- MA, L.G., LI, J.M., QU, L.J., JANET, H., CHEN, Z.L., ZHAO, H.Y., DENG, X.W., 2001, Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways, *Plant Cell*, 13, 2589–2607.
- MADEJON, P., MARANON, T., MURILLO, J.M., ROBINSON, B., 2004, White poplar (*Populus alba*) as a biomonitor of trace elements in contaminated riparian forests, *Environmental Pollution*, 132, 145–155.
- MAESHIMA, M., 2001, Tonoplast transporters: organization and function, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 469–497.
- MAESTRI, E., MARMIROLI, M., VISIOLI, G., MARMIROLI, N., 2010, Metal tolerance and hyperaccumulation: Costs and trade-offs between traits and environment, *Environmental and Experimental Botany*, 68, 1–13.
- MAŁECKA, A., PIECHALAK, A., MORKUNAS, I., TOMASZEWSKA, B., 2008, Accumulation of lead in root cells of *Pisum sativum*, *Acta Physiologiae Plantarum*, 30, 629–637.

- MALMSTROM, S., ASKERLUND, P., PALMGREN, M., 1997, A calmodulin-stimulated  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from plant vacuolar membranes with a putative regulatory domain at its N-terminus, *FEBS Letters*, 400, 324–328.
- MARTINOIA, E., MASSONNEAU, A., FRANGNE, N., 2000, Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants, *Plant Cell Rep.*, 41, 1175–1186.
- MARTINOIA, E., KLEIN, M., GEISLER, M., BOVET, L., FORESTIER, C., KOLUKISA OGLU, U., MUÈLLER-ROÈBER, B., SCHULZ, B., 2002, Multifunctionality of plant ABC transporters more than just detoxifiers, *Planta*, 214, 345–355.
- MÄSER, P., THOMINE, S., SCHROEDER, J.I., WARD, J.M., HIRSCHI, K., SZE, H., TALKE, I.N., AMTMANN, A., MAATHUIS, F.J.M., SANDERS, D., HARPER, J.F., TCHÏEU, J., GRIBSKOV, M., PERSANS, M.W., SALT, D.E., KIM, S.A., GUERINOT, M.L., 2001, Phylogenetic relationship within cation transporter families of *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, 126, 1646–1667.
- MCNAIR, M.R., TILSTONE, G.H., SMITH, S.S., 2000, *The genetics of metal tolerance and accumulation in higher plants*, Phytoremediation of Contaminated Soil and Water, Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 235–250.
- MEJARE, M., BILLOW, L., 2001, Metal binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals, *Trends Biotechnology*, 19, 67–73.
- MENGONI, A., GONNELLII, C., HAKVOORT, H.W.J., GALARDI, F., BAZZICALUPO, M., GABBRIELLI, R., SCHAT, H., 2003, Evolution of copper-tolerance and increased expression of a 2b-type metallothionein gene in *Silene paradoxa* L. populations, *Plant Soil*, 257, 451–457.
- METWALLY, A., SAFRONOVA, V.I., BELIMOV, A.A., DIETZ, K.J., 2005, Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L., *Journal of Experimental Botany*, 56, 167–178.
- MEYERS, D.E.R., AUCHTERLONIE, G.J., WEBB, R.I., WOOD, B., 2008, Uptake and localisation of lead in the root system of *Brassica juncea*, *Environmental Pollution*, 153, 323–332.
- MEYERS, D.E.R., KOPITTKER, P.M., AUCHTERLONIE, G.J., WEBB, R.I., 2009, Characterization of lead precipitate following uptake by roots of *Brassica juncea*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28, 11, 2250–2254.
- MILLER, O.R., 1998, *Extractable Nitrate in Plant Tissue: Ion-Selective Electrode Method*, Handbook of Reference Methods for Plant Analysis, CRC, Boca Raton, pp. 57–61.

- MILLER, N.A., GONG, Q., BRYAN, R., RUVOLO, M., TURNER, L.A., LABRIE, S.T., 2002, Cross-hybridization of closely related genes on high-density microarrays, *Biotechniques*, 32, 620–625.
- MILLS, R.F., KRIJGER, G.C., BACCARINI, P.J., HALL, J.L., WILLIAMS, L.E., 2003, Functional expression of AtHMA4, a P1B-type ATPase in the Zn/Co/Cd/Pb subclass, *The Plant Journal*, 35, 164–175.
- MILNER, M.J., KOCHIAN, L.V., 2008, Investigating heavy-metal hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a model system, *Annals of Botany*, 102, 3–13.
- MINGLIN, L., YUXIU, Z., TUANYAO, C., 2005, Identification of genes up-regulated in response to Cd exposure in *Brassica juncea* L., *Gene*, 363, 151–158.
- MIRA, H., MARTINEZ-GARZIA, F., PENARRUBIA, L., 2001, Evidence for the plant-specific intercellular transport of the Arabidopsis copper chaperone CCH, *Plant Journal*, 25, 521–528.
- MITCHELL, H.J., BARBER, M.S., 1994, Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat leaves, *Plant Physiology*, 104, 551–556.
- MOORE, S., PAYTON, P., WRIGHT, M., TANKSLEY, S., GIOVANNONI, J., 2005, Utilization of tomato microarrays for comparative gene expression analysis in the Solanaceae, *Journal of Experimental Botany*, 56, 2885–2895.
- MORITA, Y., KATAOKA, A., SHIOTA, S., MIZUSHIMA, T., TSUCHIYA, T., 2000, NorM of *Vibrio parahaemolyticus* is an Na<sup>+</sup>-driven multidrug efflux pump, *Journal of Bacteriology*, 182, 6694–6697.
- MUTHUKUMAR, B., YAKUBOV, B., SALT, D.E., 2007, Transcriptional activation and *BjMTP1*, *BMC Plant Biology*, 7, 1–12.
- NANDA, K.P.B.A., DUSHENKOV, V., MOTTO, H., RASKIN, I., 1995, Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils, *Environmental Science Technology*, 29, 1232–1238.
- NIES, D.H., 1992, Resistance to cadmium, cobalt, zinc, and nickel in microbes, *Plasmid*, 27, 17–28.
- NOWROUSIAN, M., RINGELBERG, C., DUNLAP, J.C., LOROS, J.J., KÜCK, U., 2005, Cross-species microarray hybridization to identify developmentally regulated genes in the filamentous fungus *Sordaria macrospora*, *Molecular Genetics and Genomics*, 273, 137–149.
- O'HARA, P., SLABAS, A.R., FAWCETT, T., 2002, Fatty acid and lipid biosynthetic genes are expressed at constant molar ratios but different absolute levels during embryogenesis, *Plant Physiology*, 129, 310–320.

- OOMEN, R.J.F.J., WU, J., LELIEVRE, F., BLANCHET, S., RICHAUD, P., BARBIER-BRYGOO, H., AARTS, M.G.M., THOMINE, S., 2009, Functional characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *New Phytologist*, 181, 637–650.
- O'NEILL, C.M., BANCROFT, I., 2000, Comparative physical mapping of the segments of the genome of *Brassica oleracea* var. *alboglabra* that are homologous to sequenced regions of chromosomes 4 and 5 of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Journal*, 23, 233-243.
- PALMGREN, M.G., AXELSEN, K.B., 1998, Evolution of P-type ATPases, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1365, 37–45.
- PAN, A., YANG, M., TIE, F., LI, L., CHEN, Z., RU, B., 1994, Expression of mouse metallothionein-I-gene confers cadmium resistance in transgenic tobacco plants, *Plant Molecular Biology*, 24, 341–351.
- PAPOYAN, A., KOCHIAN, L.V., 2004, Identification of *Thlaspi caerulescens* genes that may be involved in heavy metal hyperaccumulation and tolerance. Characterization of a novel heavy metal transporting ATPase, *Plant Physiology*, 136, 3814–3823.
- PARKS, G.E., DIETRICH, M.A., SCHUMAKER, K.S., 2002, Increased vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activity in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCl, *Journal of Experimental Botany*, 53, 1055-65.
- PAULSEN, I.T., SAIER, M.H., 1997, A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins, *Journal of Membrane Biology*, 156, 99–103.
- PEDERSEN, P., CARAFOLI, E., 1987, Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function, *Trends in Biochemical Sciences*, 4, 146–150.
- PEER, W.A., BAXTER, I.R., RICHARDS, E.L., FREEMAN, J.L., MURPHY, A.S., 2005, *Phytoremediation and hyperaccumulator plants*, Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification, DOI 10.1007/4735\_100, Springer.
- PFAFFL, M.W., 2001, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.*, 29 (9), 45.
- PEÑA, M.M.O., LEE, J., THIELE, D., 1999, A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution, *American Society for Nutritional Sciences*, 129 (7), 1251-1260.
- PENCE, N.S., LARSEN, P.B., EBBS, S.D., LETHAM, D.L.D., LASAT, M.M., GARVIN, D.F., EIDE, D., KOCHIAN, L.V., 2000, The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 4956-4960.

- PERFUS-BARBEOCH, L., LEONHARDT, N., VAVASSEUR, A., FORESTIER, C., 2002, Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status, *Plant Journal*, 32, 539-548.
- PERSANS, M.W., NIEMAN, K., SALT, D.E., 2001, Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 9995-10000.
- PERSANS, M.W., YAN, X., PATNOE, J-M.M.L., KRAMER, U., SALT D.E., 1999, Molecular dissection of the role of histidine in nickel hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*, *Plant Physiology*, 121, 1117-1126.
- PIECHALAK, A., TOMASZEWSKA, B., BARALKIEWICZ, D., MALECKA, A., 2002, Accumulation and detoxification of lead ions in legumes, *Phytochemistry*, 60, 153-167.
- POTTOSIN, I.I., SCHOENKNECHT, G., 2007, Vacuolar calcium channels, *Journal of Experimental Botany*, 58, 1559-1569.
- PREZEMECK, E., HAASE, N.U., 1991, The binding of manganese, copper and cadmium to peptides of the xylem sap of plant roots, *Water Air Soil Pollution*, 57-58, 569-577.
- QIU, R.L., ZHAO, X., TANG, Y.T., YU, F.M., HU, P.J., 2008, Antioxidative response to Cd in a newly discovered cadmium hyperaccumulator, *Arabidopsis paniculata* F., *Chemosphere*, 74, 6-12.
- QUIROS, C.F., GRELLET, F., SADOWSKI, J., SUZUKI, T., LI, G., WROBLEWSKI, T.B., 2001, *Arabidopsis* and *Brassica* comparative genomics: Sequence, structure, and gene content in the *AB11-Rps2-Ck1* chromosomal segment and related regions, *Genetics*, 157, 1321-1330.
- RANA, D., VAN DEN BOOGAART, T., O'NEILL, C.M., HYNES, L., BENT, E., MACPHERSON, L., PARK, J.Y., LIM, Y.P., BANCROFT, I., 2004, Conservation of the microstructure of genome segments in *Brassica napus* and its diploid relatives, *Plant Journal*, 40, 725-733.
- RASCIO, N., NAVARI-IZZO, F., 2011, Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting?, *Plant Science*, 180, 169-181.
- RASKIN, I., SMITH, R.D., SALT, D.E., 1997, Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment, *Current Opinion Biotechnology*, 8, 221-226.
- RASKIN, I., KUMAR, P.B.A.N., DUSHENKOV, S., SALT, D., 1994, Bioconcentration of heavy metals by plants, *Current Opinion Biotechnology*, 5, 285-290.
- RAUSER, W.E., 1990, Phytochelatins, *Annual Review of Biochemistry*, 59, 61-86.



- RAUSER, W. E., 1995, Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis and function, *Plant Physiology*, 109, 1141–1149.
- RAUSER, W. E., 1999, Structure and function of metal chelators produced by plants—the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins, *Cell Biochemistry and Biophysics*, 31, 19–48.
- REA, P.A., 1999, MRO subfamily of ABC transporters from plants and yeast, *Journal of Experimental Botany*, 50, 895–913.
- REA, P.A., LI, Z.S., LU, Y.P., DROZDOWICZ, Y.M., 1998, From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 727–760.
- REDDY, V.S., ALI, G.S., REDDY, A.S.N., 2002, Genes Encoding Calmodulin-binding Proteins in the *Arabidopsis* Genome, *The Journal Of Biological Chemistry*, 277, 12, 9840–9852.
- REISINGER, S., SCHIAVON, M., TERRY, N., PILON-SMITS, E.A.H., 2008, Heavy metal tolerance and accumulation in Indian mustard (*Brassica juncea* L.) expressing bacterial gamma-glutamylcysteine synthetase or glutathione synthetase, *International Journal of Phytoremediation*, 10, 440–454.
- RENN, S.C.P., AUBIN-HORTH, N., HOFMANN, H.A., 2004, Biologically meaningful expression profiling across species using heterologous hybridization to a cDNA microarray, *BMC Genomics*, 5, 42.
- RICHAU, K.H., KOZHEVNIKOVA, A.D., SEREGIN, I.V., VOOIJS, R., KOEVOETS, P.L.M., SMITH, J.A.C., IVANOV, V.B., SCHAT, H., 2009, Chelation by histidine inhibits the vacuolar sequestration of nickel in roots of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *New Phytologist*, 183, 106–116.
- RIO, M., DEL FONG, R., DE-HARO, A., 2004, Heavy metal uptake by Brassica species growing in the polluted soils of Aznacollar (Southern Spain), *Fresenius Environmental Bulletin*, 13, 1439–1443.
- RIO, M., DEL FONG, R., FERNANDEZ-MARTINEZ, J., DOMINGUEZ, J., HARO, A., DE-HARO, A., 2000, Field trials of *Brassica carinata* and *Brassica juncea* in polluted soils of the Guadiamar river area, *Fresenius Environmental Bulletin*, 9, 328–332.
- ROGERS, E.E., GUERINOT, M.L., 2002, FRD3, a member of the multidrug and toxin efflux family, controls iron deficiency responses in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, 14, 1787–1799.
- ROOSENS, N.H., BERNARD, C., LEPLAE, R., VERBRUGGEN, N., 2004, Evidence for copper homeostasis function of metallothionein (MT3) in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *FEBS Lett.*, 577, 9–16.

- ROOSENS, N.H., LEPLAE, R., BERNARD, C., VERBRUGGEN, N., 2005, Variations in plant metallothioneins: the heavy metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as a case study, *Planta*, 222, 716–729.
- ROS, R., COOKE, D.T., BURDEN, R.S., JAMES, C.S., 1990, Effects of the herbicide MCPA, and the heavy metals, cadmium and nickel on the lipid composition, Mg<sup>2+</sup>-ATPase activity and fluidity of plasma membranes from rice, *Oryza sativa* (cv. Bahia) shoots, *Journal of Experimental Botany*, 41, 457–462.
- ROS, R., COOKE, D.T., MARTINEZ-CORTINA, C., PICAZO, I., 1992a, Nickel and cadmium-related changes in growth, plasma membrane lipid composition, ATPase hydrolytic activity and proton-pumping of rice (*Oryza sativa* L. cv. Bahia) shoots, *Journal of Experimental Botany*, 43, 1475–1481.
- ROS, R., MORALES, A., SEGURA, J., PICAZO, I., 1992b, In vivo and in vitro effects of nickel and cadmium on the plasmalemma ATPase from rice (*Oryza sativa* L.) shoots and roots, *Plant Science*, 83, 1–6.
- ROTH, C., RASTOGI, S., ARVESTAD, L., DITTMAR, K., LIGHT, S., EKMAN, D., LIBERLES, D.A., 2007, Evolution after gene duplication: models, mechanisms, sequences, systems and organisms, *Journal of Experimental Zoology*, 306B, 58–73.
- SALT, D.E., WAGNER, G.J., 1993, Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a Cd<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiport activity, *Journal of Biological Chemistry*, 268, 12297–12302.
- SALT, D.E., RAUSER, W.E., 1995, MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots, *Plant Physiology*, 107, 1293–1301.
- SALT, D.E., KRAMER, U., 2000, *Mechanisms of metal hyperaccumulation in plants*, Phytoremediation of Toxic Metals, John Wiley and Sons Inc., New York, pp. 231–246.
- SALT, D.E., PRINCE, R.C., BAKER, A.J.M., RASKIN, I., PICKERING, I.J., 1999, Zinc ligands in the metal accumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy, *Environmental Science Technology*, 33, 713–717.
- SALT, D.E., BLAYLOCK, M., KUMAR, N.P.B.A., DUSHENKOV, V., ENSLEY, D., CHET, I., RASKIN, I., 1995, Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants, *Biotechnology*, 13, 468–474.
- SALT, D.E., PICKERING, I.J., PRINCE, R.C., GLEBA, D., DUSHENKOV, S., SMITH, R.D., RASKIN, I., 1997, Metal accumulation by aquacultured seedlings of Indian Mustard, *Environmental Science and Technology*, 31, 1636–1644.
- SAMBROOK, J., FRITSCHI, E.F., MANIATIS, T., 1989, *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- SANCENÓN, V., PUIG, S., MIRA, H., THIELE, D., PEÑARRUBIA, L., 2003, Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Molecular Biology*, 51, 577–587.
- SARRET, G., SAUMITOU-LAPRADE, P., BERT, V., PROUX, O., HAZEMANN, J.L., TRAVERSE, A., MARCUS, M.A., MANCEAU, A., 2002, Forms of zinc accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*, *Plant Physiology*, 130, 1815–1826.
- SCHACHTMAN, D.P., KUMAR, R., SCHROEDER, J.I., MARSH, E.L., 1997, Molecular and functional characterization of a novel low-affinity cation transporter (LCT1) in higher plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 11079–11084.
- SCHAT, H., TEN BOOKUM, W., 1992, Genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*, *Heredity*, 68, 219–229.
- SCHAT, H., VOOIJS, R., KUIPER, E., 1996, Identical major gene loci for heavy metal tolerances that have independently evolved in different local populations and subspecies of *Silene vulgaris*, *Evolution*, 50, 1888–1895.
- SCHUURINK, R.C., SHARTZER, S.F., FATH, A., JONES, R.L., 1998, Characterization of a calmodulin-binding transporter from the plasma membrane of barley aleurone, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 1944–1949.
- SCHÛTZENDÛBEL, A., POLLE, A., 2002, Plant response to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization, *Journal of Experimental Botany*, 372, 1351–1365.
- SEKI, M., NARUSAKA, M., ABE, H., KASUGA, M., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., CARNINCI, P., HAYASHIZAKI, Y., SHINOZAKI, K., 2001, Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray, *Plant Cell*, 13, 61–72.
- SETH, C.S., CHATURVEDI, P.K., MISRA, V., 2008, The role of phytochelatins and antioxidants in tolerance to Cd accumulation in *Brassica juncea* L., *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 76–85.
- SETH, C.S., MISRA, V., CHAUHAN, L.K.S., 2011, Accumulation, Detoxification, and Genotoxicity of Heavy Metals in Indian Mustard (*Brassica juncea* L.), *International Journal of Phytoremediation*, 14 (1), 1–13.
- SHAH, K., DUBEY, R.S., 1995, Effect of Cd on RNA level as well as activity and molecular forms of ribonuclease in growing rice seedlings, *Plant Physiology and Biochemistry*, 33, 577–584.
- SHAH, K., DUBEY, R.S., 1998, A 18 kDa cadmium inducible protein complex: its isolation and characterization from rice (*Oryza sativa* L.) seedlings, *J. Plant Physiol.*, 152, 448–454.

- SHAH, K., NONGKYNRIH, J.M., 2007, Metal hyperaccumulation and bioremediation, *Biologia Plantarum*, 51 (4), 618-634.
- SHARMA, R. K., AGRAWAL, M., 2006, Single and Combined Effects of Cadmium and Zinc on Carrots: Uptake and Bioaccumulation, *Journal of Plant Nutrition*, 29:10,1791-1804.
- SHAUL, O., HILGEMANN, D.W., DE-ALMEIDA-ENGLER, J., VAN MONTAGU, M., INZEÂ, D., GALILI, G., 1999, Cloning and characterization of a novel  $Mg^{2+}/H^{+}$  exchanger, *EMBO Journal*, 18, 3973-3980.
- SHIELDS, R., 2006, MIAME, We have a problem, *Trends in Genetics*, 22, 65–66.
- SIKKA, R., NAYYAR, V., SIDHU, S.S., 2010, Bioaccumulation of Lead by Indian Mustard in a Loamy Sand Soil Artificially Contaminated with Lead: Impact on Plant Growth and Uptake of Metal, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 41, 1257–1270.
- SOLIOZ, M., ODERMATT, A., 1995, Copper and silver transport by Cop B-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*, *Journal of Biological Chemistry*, 270, 9217-9221.
- SOLIOZ, M., VULPE, C., 1996, CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals, *Trends in Biochemical Sciences*, 21, 237-241.
- STEFFENS, J.C., 1990, The heavy-metal binding peptides of plants, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41, 553–575.
- STEPHAN, U.W., SCHOLZ, G., 1993, Nicotianamine: mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem?, *Physiologia Plantarum*, 88, 522–529.
- STOHS, S.J., BAGCHI, D., 1995, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Radical Biology and Medicine*, 18, 321–336.
- SUN, R., ZHOU, Q., JIN, C., 2006, Cadmium accumulation in relation to organic acids in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newly found cadmium hyperaccumulator, *Plant Soil*, 285, 125–134.
- SUN, Q., YE, Z.H., WANG, X.R., WONG, M.H., 2007, Cadmium hyperaccumulation leads to an increase of glutathione rather than phytochelatin in the cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii*, *Journal of Plant Physiology*, 164, 1489-1498.
- SUN, X., SUN, X-M., YANG, Z-M., LI, S-Q., WANG, J., WANG, S-H, 2005, Expression of *Brassica napus* L.  $\Gamma$ -Glutamylcysteine Synthetase and low and high-affinity Sulfate Transporters in response to excess cadmium, *Journal of Integrative Plant Biology* Formerly *Acta Botanica Sinica*, 47 (2), 243–250.
- SUNKAR, R., KAPLAN, B., BOUCHEÂ, N., ARAZI, T., DOLEV, D., TALKE, M., FRANS, J.M., SANDERS, D., BOUCHEZ, D., FROMM, H., 2000, Expression of a

- truncated tobacco NtCBP4 channel in transgenic plants and disruption of the homologous Arabidopsis CNGC1 gene confer Pb<sup>2+</sup> tolerance, *The Plant Journal*, 24, 533-542.
- SZE, H., LIANG, F., HWANG, I., CURRAN, A.C., HARPER, J.F., 2000, Diversity and regulation of plant Ca<sup>2+</sup>-pumps: insights from expression in yeast, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 433–462.
- ŞAHİN-ÇEVİK, M., 2005, Mikroarray Teknolojisi ve Bitkilerde Uygulama Alanları, *Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9-3.
- TAKAHASHI, R., ISHIMARU, Y., SENOURA, T., SHIMO, H., ISHIKAWA, S., ARAO, T., NAKANISHI, H., NISHIZAWA, N.K., 2011, The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice, *J. Exp. Bot.*, 62, 4843–4850.
- TALKE, I.N., HANIKENNE, M., KRÄMER, U., 2006, Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*, *Plant Physiology*, 142, 148–167.
- TEAKLE, N.L., TYERMAN, S.D., 2010, Mechanisms of Cl transport contributing to salt tolerance, *Plant Cell Environment*, 33, 566–589.
- TESTER, M., LEIGH, R.A., 2001, Partitioning of nutrient transport processes in roots, *J. Exp. Bot.*, 52, 445–457.
- THEODOULOU, F.L., 2000, Plant ABC transporters, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465, 79-103.
- THOMINE, S., WANG, R., WARD, J.M., CRAWFORD, N.M., SCHROEDER, J.I., 2000, Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 4991-4996.
- THOMINE, S., LELIEÁVRE, F., DEBARBIEUX, E., SCHROEDER, J.I., BARBIER-BRYGOO, H., 2003, AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency, *The Plant Journal*, 34, 685-695.
- TONG, Y.P., KNEER, R., ZHU, Y.G., 2004, Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for phytoremediation, *Trends in Plant Science*, 9, 7–9.
- TOYOOKA, K., MATSUOKA, K., 2009, Exo- and endocytotic trafficking of SCAMP2, *Plant Signaling & Behavior*, 4 (12), 1196-1198.
- TOYOOKA, K., GOTO, Y., ASATSUMA, S., KOIZUMI, M., MITSUI, T., MATSUOKA, K., 2009, A mobile secretory vesicle cluster involved in mass transport from the golgi to the plant cell exterior, *Plant Cell*, 21, 1212–1229.

- UDOM, A.O., BRADY, F.O., 1980, Reactivation in vitro of zinc-requiring apoenzymes by rat liver zincthionein, *Biochemical Journal*, 187, 329–335.
- VAMERALI, T., BANDIERA, M., MOSCA, G., 2010, Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review, *Environmental Chemistry Letters*, 8, 1–17.
- VAN ASSCHE, F., CLIJSTER, H., 1990, Effects of metal in enzyme activity in plants, *Plant Cell Environ*, 13, 773-780.
- VAN DE MORTEL, J.E., VILLANUEVA, L.A., SCHAT, H., KWEKKEBOOM, J., COUGHLAN, S., MOERLAND, P.D., VAN THEMAAT, E.V.L., KOORNNEEF, M, AARTS, M.G.M., 2006, Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and the related metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *Plant Physiology*, 142, 1127–1147.
- VAN DER ZAAL, B.J., NEUTEBOOM, L.W., PINAS, J.E., CHARDONNENS, A.N., SCHAT, H., VERKLEIJ, J.A.C., HOOYKAAS, P.J.J., 1999, Over-expression of a novel Arabidopsis gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation, *Plant Physiology*, 119, 1047-1055.
- VAN HO, A., WARD, D.M., KAPLAN, J., 2002, Transition metal transport in yeast, *Annual Review of Microbiology*, 56, 237-261.
- VAN HOOFF, N.A., HASSINEN, V.H., HAKVOORT, H.W., BALLINTIJN, K.F., SCHAT, H., VERKLEIJ, J.A., ERNST, W.H., KARENLAMPI, S.O., TERVAHAUTA, A.I., 2001, Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene, *Plant Physiology*, 126, 1519–1526.
- VASSIL, A.D., KAPULNIK, Y., RASKIN, I., SALT, D.E., 1998, The role of EDTA in lead transport and accumulation by Indian Mustard, *Plant Physiology*, 117, 447-453.
- VATAMANIUK, O.K., MARI, S., LU, Y.P., REA, P.A., 1999, AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and in vitro reconstitution, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 7110–7115.
- VÁZQUEZ, M.D., POSCHENREIDER, C., BARCELO, J., BAKER, A.J.M., HATTON, P., COPE, G.H., 1994, Compartmentation of zinc in roots and leaves of the zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* J& C Presl. *Botanica Acta*. 107, 243–250.
- VERA-ESTRELLA, R., BARKLA, B.J., GARCIA-RAMIREZ, L., PANTOJA, O., 2005, Salt stress in *Thellungiella halophila* activates Na<sup>+</sup> transport mechanisms required for salinity tolerance, *Plant Physiology*, 139, 1507–17.

- VERT, G., BRIATT, J.F., CURIE, C., 2001, *Arabidopsis* IRT2 gene encodes a root periphery iron transporter, *The Plant Journal*, 26, 181-189.
- VERT, G., BARBERON, M., ZELAZNY, E., SEGUELA, M., BRIAT, J.F., CURIE, C., 2009, *Arabidopsis* IRT2 cooperates with the high-affinity iron uptake system to maintain iron homeostasis in root epidermal cells, *Planta*, 229, 1171–1179.
- VERT, G., GROTZ, N., DEÂDALDEÂCHAMP, F., GAYMARD, F., GUERINOT, M.L., BRIAT, J.F., CURIE, C., 2002, IRT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth, *The Plant Cell*, 14, 1223-1233.
- VOGELI-LANGE, F., WAGNER, G.J., 1989, Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco. Implication of a transport function for cadmium-binding peptides, *Plant Physiology*, 92, 1086–1093.
- VON DER FECHT-BARTENBACH, J., BOGNER, M., DYNOWSKY, M., LUDEWIG, U., 2010, CLC-b mediated  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  exchange across the tonoplast of *Arabidopsis* vacuoles, *Plant Cell Physiology*, 51, 960–968.
- VON WIREN, N., KLAIR, S., BANSAL, S., BRIAT, J.F., KHODR, H., SHIORI, T., LEIGH, R.A., HIDER, R.C., 1999, Nicotinamide chelates both Fe III and Fe II. Implications for metal transport in plants, *Plant Physiology*, 119, 1107–1114.
- WALKER, D.J., LEIGH, R.A., MILLER, A.J., 1996, Potassium homeostasis in vacuolate plant cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 10510–10514.
- WALTER, M.H., 1992, *Regulation Of Lignification in Defence*, Plant Gene Research: Genes Involved In Plant Defence, Wien, Springer, pp. 327-352.
- WANG, B., LUTTGE, U., RATAJCZAK, R., 2001, Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of halophyte *Suaeda salsa*, *Journal of Experimental Botany*, 52, 2355–65.
- WANG, H., TSE, Y.C., LAW, A.H.Y., SUN, S.S.M, SUN, Y-B., XU, Z-F., HILLMER, S., ROBINSON, D.G., JIANG, L., 2010, Vacuolar sorting receptors (VSRs) and secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) are essential for pollen tube growth, *The Plant Journal*, 61, 826–838.
- WANG, Z., ZHANG, Y., HUANG, Z., HUANG, L., 2008, Antioxidative response of metal-accumulator and non-accumulator plants under cadmium stress, *Plant Soil*, 310, 137–149.
- WEAST, R.C., 1984, *CRC Handbook of chemistry and physics*, 64th edn., Boca Raton, CRC Pres.
- WHITE, P.J., BROADLEY, M.R., 2003, Calcium in Plants, *Annals of Botany*, 92, 487-511.

- WHITE, P.J., BOWEN, H.C., DEMIDCHIK, V., NICHOLS, C., DAVIES, J.M., 2002, Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1564, 299-309.
- WIERZBICKA, M., 1999, Comparison of lead tolerance in *Allium cepa* with other plant species, *Environmental Pollution*, 104, 41-52.
- WILLEMS, G., DRÄGER, D.B., COURBOT, M., GODÉ, C., VERBRUGGEN, N., SAUMITOU-LAPRADE, P., 2007, The genetic basis of zinc tolerance in the metallophyte *Arabidopsis halleri* ssp. *halleri* (Brassicaceae): an analysis of quantitative trait loci. *Genetics*, 176, 659-674.
- WILLEMS, G., FRÉROT, H., GENNEN, J., SALIS, P., SAUMITOU-LAPRADE, P., VERBRUGGEN, N., 2010, Quantitative trait loci analysis of mineral element concentrations in the *Arabidopsis halleri* × *Arabidopsis lyrata petraea* F2 progeny on cadmium-contaminated soil, *New Phytologist*, 187, 368-379.
- WILLIAMS, L.E., PITTMAN, J.K., HALL, J.L., 2000, Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465, 104-126.
- WINTZ, H., VULPE, C., 2002, Plant copper chaperones, *Biochemical Society Transactions*, 30, 732-735.
- WINTZ, H., FOX, T., WU, Y.Y., FENG, V., CHEN, W., CHANG, H.S., ZHU, T., VULPE, C., 2003, Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis, *Journal of Biological Chemistry*, 278, 47644-47653.
- WU, F.B., CHEN, F., WEI, K., ZHANG, K.B., 2004, Effect of cadmium on free amino acid, glutathione and ascorbic acid concentrations in two barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.) differing in cadmium tolerance, *Chemosphere*, 57, 447-454.
- XU, J., CHAI, T.Y., ZHANG, Y.X., LANG, M.L., HAN, L., 2009, The cation-efflux transporter BjCET2 mediates zinc and cadmium accumulation in *Brassica juncea* L. leaves, *Plant Cell Reports*, 28, 1235-1242.
- XU, J., ZHANG, Y.X., WEI, W., HAN, L., GUAN, Z.Q., WANG, Z., CHAI, T.Y., 2008, BjDHNs confer heavy-metal tolerance in plants, *Mol Biotechnol.*, 38, 91-98.
- XU, W., BAK, S., DECKER, A., PAQUETTE, S.M., FEYEREISEN, R., GALBRAITH, D.W., 2001, Microarray-based analysis of gene expression in very large gene families: the cytochrome P450 gene superfamily of *Arabidopsis thaliana*, *Gene*, 272, 61-74.
- YAMAGUCHI, H., NISHIZAWA, N.K., NAKANISHI, H., MORI, S., 2002, IDI7, a new iron-regulated ABC transporter from barley roots, localizes to the tonoplast, *Journal of Experimental Botany*, 53, 727-735.



- YANG, B., SRIVASTAVA, S., DEYHOLOS, M.K., KAV, N.N.V., 2007, Transcriptional profiling of canola (*Brassica napus* L.) responses to the fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*, *Plant Science*, 173, 156–171.
- YANG, X., FENG, Y., HE, Z., STOFFELLA, P.J., 2005, Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18, 339-353.
- YANG, Y.-W., LAI, K.N., TAI, P.-Y., LI, W.-H., 1999, Rates of nucleotide substitution in angiosperm mitochondrial DNA sequences and dates of divergence between *Brassica* and other angiosperm lineages, *Journal of Molecular Evolution*, 48, 597–604.
- YOLTAŞ, A., KARABOZ, İ., 2010, DNA Mikroarray Teknolojisi ve Uygulama Alanları, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 8, 1-19.
- ZAIER, H., MUDARRA, A., KUTSCHER, D., FERNANDEZ DE LA CAMPA, M.R., ABDELLY, C., SANZ-MEDEL, A., 2010, Induced lead binding phytochelatin in *Brassica juncea* and *Sesuvium portulacastrum* investigated by orthogonal chromatography inductively coupled plasma-mass spectrometry and matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 671, 48–54.
- ZHANG, M., LIU, X., YUAN, L., WU, K., DUAN, J., WANG, X., YANG, L., 2011, Transcriptional profiling in cadmium-treated rice seedling roots using suppressive subtractive hybridization, *Plant Physiology and Biochemistry*, 1-8.
- ZHAO, C-R., IKKA, T., SAWAKI, Y., KOBAYASHI, Y., SUZUKI, Y., HIBINO, T., SATO, S., SAKURAI, N., SHIBATA, D., KOYAMA, H., 2009, Comparative transcriptomic characterization of aluminum, sodium chloride, cadmium and copper rhizotoxicities in *Arabidopsis thaliana*, *BMC Plant Biology*, 9, 32.
- ZHIGANG, A., CUIJIE, L., YUANGANG, Z., YEJIE, D., WACHTER, A., GROMES, R., RAUSCH, T., 2006, Expression of BjMT2, ametallothionein 2 from *Brassica juncea*, increases copper and cadmium tolerance in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*, but inhibits root elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings, *Journal of Experimental Botany*, 57, 3575–3582.
- ZHOU, J., GOLDSBROUGH, P.B., 1994, Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 6, 875–884.
- ZHU, Y.L., PILON-SMITS, E.A., TARUN, A.S., WEBER, S.U., JOUANIN, L., TERRY, N., 1999, Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase, *Plant Physiology*, 121, 1169–1178.
- ZHU, H., SHIPP, E., SANCHEZ, R.J., LIBA, A., STINE, J.E., HART, P.J., GRALLA, E.B., NERSISSIAN, A.M., VALENTINE, J.S., 2000, Cobalt (<sup>2+</sup>) binding to human

and tomato copper chaperone for superoxide dismutase: implications for the metal ion transfer mechanism, *Biochemistry*, 39, 5413- 5421.

ZIFARELLI, G., PUSCH, M., 2009, CLC transport proteins in plants, *FEBS Letters*, 584, 2122–2127.

ZIMERI, A.M., DHANKHER, O.P., MCCAIG, B., MEAGHER, R.B., 2005, The plant MT1 metallothioneins are stabilized by binding cadmium and are required for cadmium tolerance and accumulation, *Plant Molecular Biology*, 58, 839–855.

## EKLER

### Ek-A:

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment: **BJMInd-1**

```

gi | 156821905 | gb | EX048159.1 | EX0
gi | 32516376 | gb | CD834436.1 | CD83
gi | 72289911 | gb | AM061487.1 | AM06
gi | 189120610 | gb | FG573034.1 | FG5
gi | 308689019 | gb | DK569321.1 | DK5
-----
-----GAACAACCAACAATAAAAAAGCTAA---AAAAT
-----TAAAAGCTAA---AAATT
-----

gi | 156821905 | gb | EX048159.1 | EX0
gi | 32516376 | gb | CD834436.1 | CD83
gi | 72289911 | gb | AM061487.1 | AM06
gi | 189120610 | gb | FG573034.1 | FG5
gi | 308689019 | gb | DK569321.1 | DK5
-----
-----ATGTCGACAACATTCAAAATCGATAAGAGAC
TACCTGAA--GAATATCAAAAATGTTGACACACATTCAAAATCGATAAGAGAC
TACCTGAA--GAATATCAAAAATGTCGACAACATTCAAAATCGATAAGAGAC
-----GAGAC
-----

gi | 156821905 | gb | EX048159.1 | EX0
gi | 32516376 | gb | CD834436.1 | CD83
gi | 72289911 | gb | AM061487.1 | AM06
gi | 189120610 | gb | FG573034.1 | FG5
gi | 308689019 | gb | DK569321.1 | DK5
CGGACATATTCAGGTGTAGGAGACCTCATCAGGCTCCTCCCGACAGGAAC
CGGACATATTCAGGTGTAGGAGACCTCATCAGGCTCCTCCCGACAGGAAC
CGGACATATTCAGGTGTAGGAGACCTCATCAGGCTCCTCCCGACAGGAAC
CGGACATATTCAGGTGTAGGAGACCTCATCAGGCTCCTCCCGACAGGAAC
-----

gi | 156821905 | gb | EX048159.1 | EX0
gi | 32516376 | gb | CD834436.1 | CD83
gi | 72289911 | gb | AM061487.1 | AM06
gi | 189120610 | gb | FG573034.1 | FG5
gi | 308689019 | gb | DK569321.1 | DK5
AGTCTTCTTGTTCC--CAGTCTTGAACC--CTGTCTTAACCAACAATGGAC
AGTCTTCTTGTTCC--CAGTCTTGAACC--CTGTCTTAACCAACAATGGAC
AGTCTTCTTGTTCC--CAGTCTTGAACC--CTGTCTTAACCAACAATGGAC
AGTCTTCTTGTTCC--CAGTCTTGAACC--CTGTCTTAACCAACAATGGAC
-----T--CAGTCTTAAACC--CTGTCTTAACCAACAATGGAC
*****  ****  *****

gi | 156821905 | gb | EX048159.1 | EX0
gi | 32516376 | gb | CD834436.1 | CD83
gi | 72289911 | gb | AM061487.1 | AM06
gi | 189120610 | gb | FG573034.1 | FG5
gi | 308689019 | gb | DK569321.1 | DK5
ATTGCCTCCTAATCAACAATACTTAACCGGAGCTCTTAT--CGTTATCTG
ATTGCCTCCTAATCAACAATACTTAACCGGAGCTCTTAT--CGTTATCTG
ATTGCCTCCTAATCAACAATACTTAACCGGAGCTCTTAT--CGTTATCTG
ATTGCCTCCTAATCAACAATACTTAACCGGAGCTCTTAT--CGTTATCTG
ATTGCCTCCTAATCAACAATACTTAACCGGAGCTCTTAT--CGTTATATG
***  ****  *****

gi | 156821905 | gb | EX048159.1 | EX0
gi | 32516376 | gb | CD834436.1 | CD83
gi | 72289911 | gb | AM061487.1 | AM06
gi | 189120610 | gb | FG573034.1 | FG5
gi | 308689019 | gb | DK569321.1 | DK5
CGCCTTCTCT--TGCTGCTTCACTTGCTTCAACCG---ATAGTTACCGAACA
CGCCTTCTCT--TGCTGCTTCACTTGCTTCAACCG---ATAGTTACCGAACA
CGCCTTCTCT--TGCTGCTTCACTTGCTTCAACCG---ATAGTTACCGAACA
CGCCTTCTCT--TGCTGCTTCACTTGCTTCAACCG---ATAGTTACCGAACA
CGCCTTCTCG--TGCTGCTTCACTTGCTTCAACCG---ATAGCTACCGAACT
*****  *****

gi | 156821905 | gb | EX048159.1 | EX0
gi | 32516376 | gb | CD834436.1 | CD83
gi | 72289911 | gb | AM061487.1 | AM06
gi | 189120610 | gb | FG573034.1 | FG5
gi | 308689019 | gb | DK569321.1 | DK5
AGGGACGGCTACG--TTCACATA---TGGAGTCGCCACCATGAAGGGTCTCT
AGGGACGGCTACG--TTCACATA---TGGAGTCGCCACCATGAAGGGTCTCT
AGGGACAGCTACG--TTCGCTA---TGGAGTCGCCACCATGAAGGGTCTCT
AGGGACGGCTACG--TTCACATA---TGGAGTCGCCACCATGAAGGGTCTCT
AGTGACGGTTACG--TTCACATA---TGGAGTCGCTACCGTGAAGGGTCTCT
**  ***  *  ****  ***  ***  *****  ***  *****

gi | 156821905 | gb | EX048159.1 | EX0
gi | 32516376 | gb | CD834436.1 | CD83
gi | 72289911 | gb | AM061487.1 | AM06
gi | 189120610 | gb | FG573034.1 | FG5
gi | 308689019 | gb | DK569321.1 | DK5
GGCCAGATTCATCTTCGAAAGATTTGTCTTCGTATCGGCTTAGAGTTGGA
GGCCAGATTCATCTTCGAAAGATTTGTCTTCGTATCGGCTTAGAGTTGGA
GGCCAGATTCATCTTCGAAAGATTTGTCTTCGTATCGGCTTAGAGTTGGA
GGCCAGATTCATCTTCGAAAGATTTGTCTTCGTATCGGCTTAGAGTTGGA
GGCCAGATTCCTTCAAAGGATTTGTCTTCGTATCGGCTTAGAGTTGGA
*****  *****  **  *****

gi | 156821905 | gb | EX048159.1 | EX0
gi | 32516376 | gb | CD834436.1 | CD83
gi | 72289911 | gb | AM061487.1 | AM06
GATTTTCGTTTCATGCTTTCT--TTACTCTTATTTGTTTTCAGTGTATTTTCGT
GATTTTCGTTTCATGCTTTCT--TTACTCTTATTTGTTTTCAGTGTATTTTCGT
GATTTTCGTTTCATGCTTTCT--TTACTCTTATTTGTTTTCAGTGTATTTTCGT

```



```

gi | 156893483 | gb | EX094959.1 | EX0      TGAAGCACTTCGAACTCTTTGCCTCGCTTATCTGGAAATCGGTGATGAAT
gi | 242285970 | gb | GR447619.1 | GR4      -----
gi | 156949010 | gb | EX124718.1 | EX1      -----
gi | 254056511 | gb | GR719366.1 | GR7      -----
gi | 112353923 | gb | AM389953.1 | AM3      -----

gi | 156893483 | gb | EX094959.1 | EX0      TCTCATTAGAAGATCCCATTCCAAGTGGAGGATACACTTGCATAGGTATT
gi | 242285970 | gb | GR447619.1 | GR4      -----GAGGATACACTTGCATAGGTATT
gi | 156949010 | gb | EX124718.1 | EX1      -----
gi | 254056511 | gb | GR719366.1 | GR7      -----
gi | 112353923 | gb | AM389953.1 | AM3      -----

gi | 156893483 | gb | EX094959.1 | EX0      GTGGGCATCAAAGACCCTGTTCCGCCCTGGTGTCAAGGAGTCTGTTGCCGAT
gi | 242285970 | gb | GR447619.1 | GR4      GTGGGCATCAAAGACCCTGTTCCGCCCTGGTGTCAAGGAGTCTGTTGCCGAT
gi | 156949010 | gb | EX124718.1 | EX1      -----
gi | 254056511 | gb | GR719366.1 | GR7      -----
gi | 112353923 | gb | AM389953.1 | AM3      -----

gi | 156893483 | gb | EX094959.1 | EX0      TTGTAGAGCTGCTGGAATCACTGTCAGAATGGTACTGGAGATAACATTA
gi | 242285970 | gb | GR447619.1 | GR4      CTGTAGAGCTGCTGGAATCACAGTCAGAATGGTACTGGAGATAACATTA
gi | 156949010 | gb | EX124718.1 | EX1      -----
gi | 254056511 | gb | GR719366.1 | GR7      -----
gi | 112353923 | gb | AM389953.1 | AM3      -----

gi | 156893483 | gb | EX094959.1 | EX0      CAACTGCAAAAGCCATAGCCAGGGAGTGCGGGATATTGACTGA-TGATGG
gi | 242285970 | gb | GR447619.1 | GR4      CTACTGCAAAAGGCTATAGCCAGGGAGTGCGGGATATTGACTGA-TGATGG
gi | 156949010 | gb | EX124718.1 | EX1      -----
gi | 254056511 | gb | GR719366.1 | GR7      -----
gi | 112353923 | gb | AM389953.1 | AM3      -----

gi | 156893483 | gb | EX094959.1 | EX0      CATAGCTATCGAAGGCCCCGAGTTCGGGAGAAAAGTGAAGAGGAATTAC
gi | 242285970 | gb | GR447619.1 | GR4      CATAGCTATCGAAGGCCCTGAGTTCAGGAAAAAAGTGAAGAGGAATTGC
gi | 156949010 | gb | EX124718.1 | EX1      -----AATTAC
gi | 254056511 | gb | GR719366.1 | GR7      -----
gi | 112353923 | gb | AM389953.1 | AM3      -----

gi | 156893483 | gb | EX094959.1 | EX0      TCAAGCTAATCCCAAATTTGCAGGTCATGGCTCGATCGTCACCCATGGAT
gi | 242285970 | gb | GR447619.1 | GR4      TCAAGCTAATCCCAAATTTGCAGGTCATGGCTCGATCGTCACCCATGGAT
gi | 156949010 | gb | EX124718.1 | EX1      TCAAGCTAATCCCAAATTTGCAGGTCATGGCTCGATCGTCACCCATGGAT
gi | 254056511 | gb | GR719366.1 | GR7      -----GATCGTCACCCATGGAT
gi | 112353923 | gb | AM389953.1 | AM3      -----

gi | 156893483 | gb | EX094959.1 | EX0      AAGCATACTTTGGTGAGAAACCTCCGTACAATGTTTCAGGAAGTCGTTGC
gi | 242285970 | gb | GR447619.1 | GR4      AAGCATACTTTGGTGAGAAACCTCCGTACAATGTTTCAGGAAGTCGTTGC
gi | 156949010 | gb | EX124718.1 | EX1      AAGCATACTTTGGTGAGAAACCTCCGTACAATGTTTCAGGAAGTCGTTGC
gi | 254056511 | gb | GR719366.1 | GR7      AAGCATACTTTGGTGAGAAACCTCCGTACAATGTTTCAGGAAGTCGTTGC
gi | 112353923 | gb | AM389953.1 | AM3      -----GC
**

gi | 156893483 | gb | EX094959.1 | EX0      AGTGACAGGTGATGGAACAAATGATGCTCCTGCCCTTCATGA----AGCT
gi | 242285970 | gb | GR447619.1 | GR4      AGTGACAGGTGATGGAACAAATGATGCTCCTGCCCTTCATGA----AGCT
gi | 156949010 | gb | EX124718.1 | EX1      AGTGACAGGTGATGGAACAAATGATGCTCCTGCCCTTCATGA----AGCT
gi | 254056511 | gb | GR719366.1 | GR7      AGTGACAGGTGATGGAACAAATGATGCTCCTGCCCTTCATGA----AGCT
gi | 112353923 | gb | AM389953.1 | AM3      GTC--CGGGTGTGGNNNAA-TGATGCTCCTGCCCTTCATGA----AGCT
* ***** ** *****
*****

gi | 156893483 | gb | EX094959.1 | EX0      GATATTGGACTTGCAATGGGAATTTCTGGAACCGAGGTGGCAAAAAGAGAG
gi | 242285970 | gb | GR447619.1 | GR4      GATATTGGACTTGCAATGGGAATTTCTGGAACCGAGGTGGCAAAAAGAGAG
gi | 156949010 | gb | EX124718.1 | EX1      GATATTGGACTTGCAATGGGAATTTCTGGAACCGAGGTGGCAAAAAGAGAG
gi | 254056511 | gb | GR719366.1 | GR7      GATATTGGACTTGCAATGGGAATTTCTGGAACCGAGGTGGCAAAAAGAGAG
gi | 112353923 | gb | AM389953.1 | AM3      GATATTGGACTTGCAATGGGAATTTCTGGAACCGAGGTGGCAAAAAGAGAG
*****

gi | 156893483 | gb | EX094959.1 | EX0      TGGGATGTGATTATCCTAGATGACAACCTTCTCGACGATTGTCACAGTGG
gi | 242285970 | gb | GR447619.1 | GR4      TGGGATGTGATTATCCTAGATGATAACTTCTCGACGATTGTCACAGTGG
gi | 156949010 | gb | EX124718.1 | EX1      TGGGATGTGATTATCCTAGATGACAACCTTCTCGACGATTGTCACAGTGG

```

gi | 254056511 | gb | GR719366.1 | GR7  
gi | 112353923 | gb | AM389953.1 | AM3

TGCAGATGTGATTATCCTTGATGATAAATTCTCGACGATTGTCAGTGTG  
TCCGGATGTGATTATCCTAGATGATAAATTCTCGACGATTGTCAGTGTG  
\*\*\*\*\*

gi | 156893483 | gb | EX094959.1 | EX0  
gi | 242285970 | gb | GR447619.1 | GR4  
gi | 156949010 | gb | EX124718.1 | EX1  
gi | 254056511 | gb | GR719366.1 | GR7  
gi | 112353923 | gb | AM389953.1 | AM3

CCAAATGGGGCCGTTCTGTGTACATAAACATTCAGAAATTTGTTTCAGTTC  
CCAAATGGGGCCGTTCTGTGTACATAAACATTCAGAAATTTGTTTCAGTTC  
CCAAATGGGGCCGTTCTGTGTACATAAACATTCAGAAATTTGTTTCAGTTC  
CCAAATGGGGCCGTTCTGTGTACATAAACATTCAGAAATTTGTTTCAGTTC  
\*\*\*\*\*

gi | 156893483 | gb | EX094959.1 | EX0  
gi | 242285970 | gb | GR447619.1 | GR4  
gi | 156949010 | gb | EX124718.1 | EX1  
gi | 254056511 | gb | GR719366.1 | GR7  
gi | 112353923 | gb | AM389953.1 | AM3

CAGCTGACAGTAAACGTTGTGGCTCTTATTGTCAACTTCTTATCAGCCTG  
CAGCTGACAGTAAACGTTGTGGCTCTTATTGTCAACTTCTTATCAGCCTG  
CAGCTGACAGTAAACGTTGTGGCTCTTATTGTCAACTTCTTATCAGCCTG  
CAGCTGACAGTAAACGTTGTGGCTCTTATTGTCAACTTCTTATCAGCCTG  
CAGCTGACAGTAAACGTTGTGGCTCTTATTGTCAACTTCTTATCAGCCTG  
\*\*\*\*\*

gi | 156893483 | gb | EX094959.1 | EX0  
gi | 242285970 | gb | GR447619.1 | GR4  
gi | 156949010 | gb | EX124718.1 | EX1  
gi | 254056511 | gb | GR719366.1 | GR7  
gi | 112353923 | gb | AM389953.1 | AM3

CC----TTACTGGAAACGCGCCTCTGACTGCTGTCCAGCTACTATGGGTT  
CC----TTACTGGAAACGCGCCTCTAACAGCTGTCCAGCTACTATGGGTT  
CC----TTACTGGAAACGCGCCTCTGACTGCTGTCCAGCTACTATGGGTT  
CC----TTACTGGAAACGCGCCTCTGACTGCTGTCCAGCTACTATGGGTT  
CC----TTACTGGAAACGCGCCTCTAACAGCTGTCCAGCTACTATGGGTT  
\*\* \*\*\*\*\*

**gi | 156893483 | gb | EX094959.1 | EX0**  
gi | 242285970 | gb | GR447619.1 | GR4  
gi | 156949010 | gb | EX124718.1 | EX1  
gi | 254056511 | gb | GR719366.1 | GR7  
gi | 112353923 | gb | AM389953.1 | AM3

AACATGATAATGGACACACTTGGAGCACTCGCGCTAGCCACAGAACACC  
AACATGATAATGGACACACTTGGAGCACTCGCGCTAGCCACAGAACACC  
AACATGATAATGGACACACTTGGAGCACTCGCGCTAGCCACAGAACACC  
AACATGATAATGGACACACTTGGAGCACTCGCGCTAGCCACAGAACACC  
AACATGATAATGGACACACTTGGAGCACTCGCGCTAGCCACAGAACACC  
\*\*\*\*\*

**gi | 156893483 | gb | EX094959.1 | EX0**  
gi | 242285970 | gb | GR447619.1 | GR4  
gi | 156949010 | gb | EX124718.1 | EX1  
gi | 254056511 | gb | GR719366.1 | GR7  
gi | 112353923 | gb | AM389953.1 | AM3

ACAGGACGATCTGATGAAGAGAACCAGTGGGAAGGAAAGGAAACTTCA  
ACAGGACGATCTGATGAAGAGAACCAGTGGGAAGGAAAGGAAACTTCA  
ACAGGACGATCTGATGAAGAGAACCAGTGGGAAGGAAAGGAAACTTCA  
ACAGGACGATCTGATGAAGAGAACCAGTGGGAAGGAAAGGAAACTTCA  
ACAGGACGATCTGATGAAGAGAACCAGTGGGAAGGAAAGGAAACTTCA  
\*\*\*\*\*

gi | 156893483 | gb | EX094959.1 | EX0  
gi | 242285970 | gb | GR447619.1 | GR4  
gi | 156949010 | gb | EX124718.1 | EX1  
gi | 254056511 | gb | GR719366.1 | GR7  
gi | 112353923 | gb | AM389953.1 | AM3

TAAGCAATGTAATGTGGAGGAACATCCTTGGTTCAGTCACTA-----  
TAAGCAATGTAATGTGGAGGAACATCCTTGGCCAGTCACTATACCAGCTT  
TAAGCAATGTAATGTGGAGGAACATCCTTGGTTCAGTCACTATACCAGCTT  
TAAGCAATGTAATGTGGAGGAACATCCTTGGTTCAGTCACTATACCAGCTT  
TAAGCAATGTAATGTGGAGGAACATCCTTGGCCAGTCACTATACCAGCTT  
\*\*\*\* \*\*\*\*\*

gi | 156893483 | gb | EX094959.1 | EX0  
gi | 242285970 | gb | GR447619.1 | GR4  
gi | 156949010 | gb | EX124718.1 | EX1  
gi | 254056511 | gb | GR719366.1 | GR7  
gi | 112353923 | gb | AM389953.1 | AM3

-----  
GTCATCATATGGTGTCTCCAACAAGGGGAA-----  
GTCATCATATGGTGTCTCCA-----  
GTCATCATATGGTGTCTCCAACAAGGGAAAGACAATGTTCCGTATCGA  
GTCATCATATGGTGTCTCCAACAAGGGGAAAGACAATGTTCCGTATCGA

gi | 156893483 | gb | EX094959.1 | EX0  
gi | 242285970 | gb | GR447619.1 | GR4  
gi | 156949010 | gb | EX124718.1 | EX1  
gi | 254056511 | gb | GR719366.1 | GR7  
gi | 112353923 | gb | AM389953.1 | AM3

-----  
-----  
-----  
CTCCGACTTAACACTCAATACCCCTTATCTTCAACACCTTCGCTCTCTGCC  
CTCCGACTTAACACTCAATACCCCTTATCTTCAACACCTTCGCTCTCTGCC

gi | 156893483 | gb | EX094959.1 | EX0  
gi | 242285970 | gb | GR447619.1 | GR4  
gi | 156949010 | gb | EX124718.1 | EX1  
gi | 254056511 | gb | GR719366.1 | GR7  
gi | 112353923 | gb | AM389953.1 | AM3

-----  
-----  
-----  
AGGTGTTCAATGAGATAAGCTCGAGGAAATGGAGAAGATTGATGTGTTT  
AGGTGTTCAATGAGATAAGCTCGAGGAAATGGAGAAGATTGATGTGTTT

gi | 156893483 | gb | EX094959.1 | EX0  
gi | 242285970 | gb | GR447619.1 | GR4  
gi | 156949010 | gb | EX124718.1 | EX1  
gi | 254056511 | gb | GR719366.1 | GR7  
gi | 112353923 | gb | AM389953.1 | AM3

-----  
-----  
-----  
ACGGGGATACTAAGAACTACGTGTTCCGTAGGGGTTCTAACGTGTACGGT  
ACGNNNATACTGAAGAACTACGTGTTCCGTAGGGGTTCTAACGTGTACGGT



gi | 308710470 | gb | DK490449.1 | DK4  
gi | 119431783 | gb | DY024977.1 | DY0  
gi | 156952291 | gb | EX127933.1 | EX1

AGTAGGAGTGATCACTGGTTCTTGCCAATCTTGCGAATCTTGTAACCAAG  
AGTAGGAGTGATCACTGGTTCTTGCCAGTCTTGCGAATCTTGTAACCAAG  
AGTAGGAGTGATCACTGGTTCTTGCCAGTCTTGCGAATCTTGTAACCAAG  
\*\*\*\*\*

gi | 156909869 | gb | EX110849.1 | EX1  
gi | 156900750 | gb | EX102180.1 | EX1  
gi | 308710470 | gb | DK490449.1 | DK4  
gi | 119431783 | gb | DY024977.1 | DY0  
gi | 156952291 | gb | EX127933.1 | EX1

ATCTTGAAAACACTACTGTCCCAATGTCTTTCACCTACA-----ACTCCA  
ATCTTGAAAACACTACTGTCCCAATGTCTTTCACCTACA-----ACTCCA  
ATCTTGAAAACACTACTGTCCCAATGTCTTTCACCTACA-----ACTCCA  
ATCTTGAAAACACTACTGTCCCAATGTCTTTCACCTACA-----ACTCCA  
ATCTTGAAAACACTACTGTCCCAATGTCTTTCACCTACA-----ACTCCA  
\*\*\*\*\*

gi | 156909869 | gb | EX110849.1 | EX1  
gi | 156900750 | gb | EX102180.1 | EX1  
gi | 308710470 | gb | DK490449.1 | DK4  
gi | 119431783 | gb | DY024977.1 | DY0  
**gi | 156952291 | gb | EX127933.1 | EX1**

TAGGATCCGATGGAACCAAGACCTA-CGGTGGATATTCGGAGTCCATTGT  
TAGGATCCGATGGAACCAAGACCTA-CGGTGGATATTCGGAGTCCATTGT  
TAGGATCCGATGGAACCAAGACCTA-CGGTGGATATTCGGAGTCCATTGT  
TAGGATCCGATGGAACCAAGACCTA-CGGTGGATATTCGGAGTCCATTGT  
TAGGATCCGATGGAACCAAGACCTA-CGGTGGATATTCGGAGTCCATTGT  
TAGGATCCGATGGAACCAAGACCTA-CGGTGGATATTCGGAGTCCATTGT  
\*\*\*\*\*

gi | 156909869 | gb | EX110849.1 | EX1  
gi | 156900750 | gb | EX102180.1 | EX1  
gi | 308710470 | gb | DK490449.1 | DK4  
gi | 119431783 | gb | DY024977.1 | DY0  
**gi | 156952291 | gb | EX127933.1 | EX1**

GGTCGATCAACGTTTTGTC-TTACAGTTTTCCCAGGGATTGCCTAGCGAT  
GGTCGATCAACGTTTTGTC-TTACAGTTTTCCCAGGGATTGCCTAGCGAT  
GGTCGATCAACGTTTTGTC-TTACAGTTTTCCCAGGGATTGCCTAGCGAT  
GGTCGATCAACGTTTTGTC-TTACAGTTTTCCCAGGGATTGCCTAGCGAT  
GGTCGATCAACGTTTTGTC-TTACAGTTTTCCCAGGGATTGCCTAGCGAT  
GGTCGATCAACGTTTTGTC-TTACAGTTTTCCCAGGGATTGCCTAGCGAT  
\*\*\*\*\*

gi | 156909869 | gb | EX110849.1 | EX1  
gi | 156900750 | gb | EX102180.1 | EX1  
gi | 308710470 | gb | DK490449.1 | DK4  
gi | 119431783 | gb | DY024977.1 | DY0  
**gi | 156952291 | gb | EX127933.1 | EX1**

TCGGGTGCCCCCTTGCTGTGTGCTGGT-ATCACTGTGTATAGTCCAATGA  
TCGGGTGCCCCCTTGCTGTGTGCTGGT-ATCACTGTGTATAGTCCAATGA  
TCGGGTGCCCCCTTGCTGTGTGCTGGA-ATCACTGTGTATAGTCCAATGA  
TCGGGTGCCCCCTTGCTGTGTGCTGGT-ATCACTGTGTATAGTCCAATGA  
TCGGGTGCCCCCTTGCTGTGTGCTGGT-ATCACTGTGTATAGTCCAATGA  
TCGGGTGCCCCCTTGCTGTGTGCTGGT-ATCACTGTGTATAGTCCAATGA  
\*\*\*\*\*

gi | 156909869 | gb | EX110849.1 | EX1  
gi | 156900750 | gb | EX102180.1 | EX1  
gi | 308710470 | gb | DK490449.1 | DK4  
gi | 119431783 | gb | DY024977.1 | DY0  
gi | 156952291 | gb | EX127933.1 | EX1

AGTA-CTATGGTATGACCGAGCCAGGGAA--GCATTTGGGCGTGGCTGGA  
AGTA-CTATGGTATGACCGAGCCAGGGAA--GCATTTGGGCGTGGCTGGA  
AGTA-TTATGGTATGACCGAGCCAGGGAA--GCATTTGGGCGTGGCTGGA  
AGTA-CTATGGTATGACCGAGCCAGGGAA--GCATTTGGGCGTGGCTGGA  
AGTA-CTATGGTATGACCGAGCCAGGGAA--GCATTTGGGCGTGGCTGGA  
AGTA-CTATGGTATGACCGAGCCAGGGAA--GCATTTGGGCGTGGCTGGA  
\*\*\*\*

gi | 156909869 | gb | EX110849.1 | EX1  
gi | 156900750 | gb | EX102180.1 | EX1  
gi | 308710470 | gb | DK490449.1 | DK4  
gi | 119431783 | gb | DY024977.1 | DY0  
gi | 156952291 | gb | EX127933.1 | EX1

-CTTGGTGGGCTT---GGTCATGTTGCTGTCAAGATTGGTAAAGCCTTTG  
-CTTGGTGGGCTT---GGTCATGTTGCTGTCAAGATTGGTAAAGCCTTTG  
-CTTGGTGGGCTT---GGTCATGTTGCTGTCAAGATTGGTAAAGCCTTTG  
-CTTGGTGGGCTT---GGTCATGTTGCTGTCAAGATTGGTAAAGCCTTTG  
-CTTGGTGGGCTT---GGTCATGTTGCTGTCAAGATTGGTAAAGCCTTTG  
-CTTGGTGGGCTT---GGTCATGTTGCTGTCAAGATTGGTAAAGCCTTTG  
\*\*\*\*\*

gi | 156909869 | gb | EX110849.1 | EX1  
gi | 156900750 | gb | EX102180.1 | EX1  
gi | 308710470 | gb | DK490449.1 | DK4  
gi | 119431783 | gb | DY024977.1 | DY0  
gi | 156952291 | gb | EX127933.1 | EX1

GTTTGAAAGTTACTGTGATTAGTTCTTCTCCTAGTAAAGAAGACGAAGCT  
GTTTGAAAGTTACTGTGATTAGTTCTTCTCCTAGTAAAGAAGACGAAGCT  
GTTTGAAAGTTACTGTGATTAGTTCTTCTCCTAGTAAAGAAGACGAAGCC  
GTTTGAAAGTTACTGTGATTAGTTCTTCTCCTAGTAAAGAAGACGAAGCT  
GTTTGAAAGTTACTGTGATTAGTTCTTCTCCTAGTAAAGAAGACGAAGCT  
GTTTGAAAGTTACTGTGATTAGTTCTTCTCCTAGTAAAGAAGACGAAGCT  
\*\*\*\*\*

gi | 156909869 | gb | EX110849.1 | EX1  
gi | 156900750 | gb | EX102180.1 | EX1  
gi | 308710470 | gb | DK490449.1 | DK4  
gi | 119431783 | gb | DY024977.1 | DY0  
gi | 156952291 | gb | EX127933.1 | EX1

ATTAATCGACTTGGTGTGATTGCTTTCTTGTCTCATCTGATCCTCAGAA  
ATTAATCGACTTGGTGTGATTGCTTTCTTGTCTCATCTGATCCTCAGAA  
ATTAATCGACTTGGTGTGATTGCTTTCTTGTCTCATCTGATCCTCAGAA  
ATTAATCGACTTGGTGTGATTGCTTTCTTGTCTCATCTGATCCTCAGAA  
ATTAATCGACTTGGTGTGATTGCTTTCTTGTCTCATCTGATCCTCAGAA  
ATTAATCGACTTGGTGTGATTGCTTTCTTGTCTCATCTGATCCTCAGAA  
\*\*\*\*\*

gi | 156909869 | gb | EX110849.1 | EX1  
gi | 156900750 | gb | EX102180.1 | EX1  
gi | 308710470 | gb | DK490449.1 | DK4  
gi | 119431783 | gb | DY024977.1 | DY0  
gi | 156952291 | gb | EX127933.1 | EX1

GATGAAGGCTGCAATTGGAACATGGACTATATATCGATACGGTATCAG  
GATGAAGGCTGCAATTGGAACATGGACTATATATCGATACGGTATCAG  
GATGAAGGCTGCAATTGGAACATGGACTATATATCGATACGGTATCAG  
GATGAAGGCTGCAATTGGAACATGGACTATATATCGATACGGTATCAG  
GATGAAGGCTGCAATTGGAACATGGACTATATATCGATACGGTATCAG  
GATGAAGGCTGCAATTGGAACATGGACTATATATCGATACGGTATCAG  
\*\*\*\*\*

gi | 156909869 | gb | EX110849.1 | EX1  
gi | 156900750 | gb | EX102180.1 | EX1  
gi | 308710470 | gb | DK490449.1 | DK4  
gi | 119431783 | gb | DY024977.1 | DY0  
gi | 156952291 | gb | EX127933.1 | EX1

CAGTACATGCTCTGTTCCACTGCT-TGGTTTACTCAAAGTCAATGGAAA  
CAGTACATGCTCTGTTCCACTGCT-TGGTTTACTCAAAGTCAATGGAAA  
-----  
CAGTACATGCTCTGTTCCACTGCT-TGGTTTACTCAAAGTCAATGGAAA  
CAGTACATGCTCTGTTCCACTGCT-TGGTTTACTCAAAGTCAATGGAAA



```

gi | 156909869 | gb | EX110849.1 | EX1      GCTTGT-----
gi | 156900750 | gb | EX102180.1 | EX1      GCTTGT-----
gi | 308710470 | gb | DK490449.1 | DK4      -----
gi | 119431783 | gb | DY024977.1 | DY0      -----
gi | 156952291 | gb | EX127933.1 | EX1      GCTTGTACGTTAGGCTTACCTGAGAAGCCTCTTGAGCTACCAATCTTCC

gi | 156909869 | gb | EX110849.1 | EX1      -----
gi | 156900750 | gb | EX102180.1 | EX1      -----
gi | 308710470 | gb | DK490449.1 | DK4      -----
gi | 119431783 | gb | DY024977.1 | DY0      -----
gi | 156952291 | gb | EX127933.1 | EX1      CTCTTGTCTCGGAAGAAAAATGGTGGGAGGAAGTGACATTGGAGGGATG

gi | 156909869 | gb | EX110849.1 | EX1      -----
gi | 156900750 | gb | EX102180.1 | EX1      -----
gi | 308710470 | gb | DK490449.1 | DK4      -----
gi | 119431783 | gb | DY024977.1 | DY0      -----
gi | 156952291 | gb | EX127933.1 | EX1      AAGGAGACACAAGAGATGCTTGAGTTCTGCGCTAAGCATAACATAACGGC

gi | 156909869 | gb | EX110849.1 | EX1      -----
gi | 156900750 | gb | EX102180.1 | EX1      -----
gi | 308710470 | gb | DK490449.1 | DK4      -----
gi | 119431783 | gb | DY024977.1 | DY0      -----
gi | 156952291 | gb | EX127933.1 | EX1      AGATATTGAGCTG-----

gi | 156909869 | gb | EX110849.1 | EX1      -----
gi | 156900750 | gb | EX102180.1 | EX1      -----
gi | 308710470 | gb | DK490449.1 | DK4      -----
gi | 119431783 | gb | DY024977.1 | DY0      -----
gi | 156952291 | gb | EX127933.1 | EX1      -----

gi | 156909869 | gb | EX110849.1 | EX1      -----
gi | 156900750 | gb | EX102180.1 | EX1      -----
gi | 308710470 | gb | DK490449.1 | DK4      -----
gi | 119431783 | gb | DY024977.1 | DY0      -----
gi | 156952291 | gb | EX127933.1 | EX1      -----

gi | 156909869 | gb | EX110849.1 | EX1      -----
gi | 156900750 | gb | EX102180.1 | EX1      -----
gi | 308710470 | gb | DK490449.1 | DK4      -----
gi | 119431783 | gb | DY024977.1 | DY0      -----
gi | 156952291 | gb | EX127933.1 | EX1      -----

gi | 156909869 | gb | EX110849.1 | EX1      -----
gi | 156900750 | gb | EX102180.1 | EX1      -----
gi | 308710470 | gb | DK490449.1 | DK4      -----
gi | 119431783 | gb | DY024977.1 | DY0      -----
gi | 156952291 | gb | EX127933.1 | EX1      -----

gi | 156909869 | gb | EX110849.1 | EX1      -----
gi | 156900750 | gb | EX102180.1 | EX1      -----
gi | 308710470 | gb | DK490449.1 | DK4      -----
gi | 119431783 | gb | DY024977.1 | DY0      -----
gi | 156952291 | gb | EX127933.1 | EX1      -----

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment: **BJMInd-4**

```

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1      -----
gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7      -----
gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5      -----
gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5      -----
gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0      -----
gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5      GAAAACCGTTGCCGATGTTTCAACAAAGGGTGTATGACCAGATTGTGACA

```

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1  
 gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7  
 gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5  
 gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5  
 gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0  
 gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5

-----  
 ---GAAAGGACTGCCGTACATGGAGGACCATGCAGAGCCGTACATGCGCAA  
 -----AGGACTGCCGTACATGGAGGACCATGCAGAGCCGTACATGCGCAA  
 -----  
 ATGAAAGGACTGCCGTACATGGAGGACCATGCAGAGCCGTACATGCGCAA

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1  
 gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7  
 gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5  
 gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5  
 gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0  
 gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5

-----  
 TTTGGTGGCAAAGGATGTTGTTGCTGGACCTTTGTTATCCTTTTCGAGAG  
 TTTGGTGGCAAAGGATGTTGTTGCTGGACCTTTGTTATCCTTTTCGAGAG  
 ---GTGGCAAAGGATGTTGTTGCTGGACCTTTGTTATCCTTTTCGAGAG  
 TTTGGTGGCAAAGGATGTTGTTGCTGGACCTTTGTTATCCTTTTCGAGAG

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1  
 gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7  
 gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5  
 gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5  
 gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0  
 gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5

-----  
 TTGAAAAGGTTGGGGTAATATGGCAGGCTTTAAAGATGACTAGTCATAAT  
 TTGAAAAGGTTGGGGTAATATGGCAGGCTTTAAAGATGACTAGTCATAAT  
 TTGAAAAGGTTGGGGTAATATGGCAGGCTTTAAAGATGACTAGTCATAAT  
 TTGAAAAGGTTGGGGTAATATGGCAGGCTTTAAAGATGACTAGTCATAAT

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1  
 gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7  
 gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5  
 gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5  
 gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0  
 gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5

-----ACGCCCGCCCGGCC  
 -----  
 GGTTCCTGTGATTGATGAGCCACCTTTTACTGAAGCTTCTGAGCTTTG  
 GGTTCCTGTGATTGATGAGCCACCTTTTACTGAAGCTTCTGAGCTTTG  
 GGTTCCTGTGATTGATGAGCCGCTTTTACTGAAGCTTCTGAGCTTTG  
 GGTTCCTGTGATTGATGAGCCACCTTTTACTGAAGCTTCTGACTTTG

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1  
 gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7  
 gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5  
 gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5  
 gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0  
 gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5

CCCCCGGGGAAGAAGACGCGGAGGGGACCAGATCTCCAGGATGGCGGA  
 -----GCTTCTCCAAGGGAAGAGAT  
 TGGGATTGCCTTGAGATCCCATCTGCTTGTGCTTCTCCAAGGGAAGAGAT  
 TGGGATTGCCTTGAGATCCCATCTGCTTGTGCTTCTCCAAGGGAAGAGAT  
 TGGGATTGCCTTGAGATCCCATCTGCTTGTGCTTCTCCAAGGGAAGAGAT  
 TGGGATTGCCTTGAGATCCCATCTGCTTGTGCTTCTCCAAGGGAAGAGAT  
 \*\*\*\*\* \*\* \*

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1  
 gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7  
 gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5  
 gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5  
 gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0  
 gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5

GGAAGAANNNGATGTCCTGCAGTCCGGTCCGGAATCCCGGGTTCGACCC  
 TCTCAAAGCAGAAAACC--ACATTCGGTTCTCAAATCTTAGA-----  
 TCTCAAAGCAGAAAACG--ACGTTTCGGTTCTCAAATCTTAGA-----  
 TCTCAAAGCAGAAAACG--ACGTTTCGGTTCTCAAATCTTAGA-----  
 TCTCAAAGCAGAAAACC--ACATTCGGTTCTCAAATCTTAGA-----  
 TCTCAAAGCAGAAAACG--ACGTTTCGGTTCTCAAATCTTAGA-----  
 \*\*\*\*\* \*\*

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1  
**gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7**  
 gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5  
 gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5  
 gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0  
 gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5

AGCGTCCGCAAAGCTCGCGACTTTGCGAAAGCAGGGTTAGGGAAAGGGCT  
 ---AGCTGCAAAGCTCGCGACTTTGCGAAAGCAGGGTTAG**GGAAAGGGCT**  
 ---AGCTGCAAAGCTCGCGACTTTGCGAAAGCAGGGTTAGGGAAAGGGCT  
 ---AGCTGCAAAGCTCGCGACTTTGCGAAAGCAGGGTTAGGGAAAGGGCT  
 ---AGCTGCAAAGCTCGCGACTTTGCGAAAGCAGGGTTAGGGAAAGGGCT  
 \* \*\*\*\*\*

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1  
**gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7**  
 gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5  
 gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5  
 gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0  
 gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5

CAAGATTGAAGATTTGGTTATAAGTGTTGAG---GAGATGGAGATGTATG  
**CAAGATTGAAGATTTGGTTATAAGTGTTGAG**---GAGATGGAGATGTATG  
 CAAGATTGAAGATTTGGTTATAAGTGTTGAG---GAGATGGAGATGTATG  
 CAAGATTGAAGATTTGGTTATAAGTGTTGAG---GAGATGGAGATGTATG  
 CAAGATTGAAGATTTGGTTATAAGTGTTGAG---GAGATGGAGATGTATG  
 CAAGATTGAAGATTTGGTTATAAGTGTTGAG---GAGATGGAGATGTATG  
 \*\*\*\*\*

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1  
**gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7**  
 gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5  
 gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5  
 gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0  
 gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5

TTGATCTTCATCCCATCACTAACACATCTCCATACACTGTGCTTGAGACT  
 TTGATCTTCATCCCATCACTAACACATCTCCATACACTGTGCTTGAGACT  
 TTGATCTTCATCCCATCACTAACACATCTCCATACACTGTGCTTGAGACT  
 TTGATCTTCATCCCATCACTAACACATCTCCATACACTGTGCTTGAGACT  
 TTGATCTTCATCCCATCACTAACACATCTCCATACACTGTGCTTGAGACT  
 TTGATCTTCATCCCATCACTAACACATCTCCATACACTGTGCTTGAGACT  
 \*\*\*\*\*

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1  
 gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7  
 gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5

TTGTCCTGGCTAAAGCGGCCATTCTTTCCGCCAACTTG-----GCCTT  
 TTGTCCTAGCTAAAGCGGCCATTCTTTCCGCCAACTTG-----GCCTT  
 TTGTCCTGGCTAAAGCGGCCATTCTTTCCGCCAACTTG-----GCTTT

gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5  
gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0  
gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5

TTGTCTCTGGCTAAAGCGGCCATTCTTTTCCGCCAACTTG-----GCCTT  
TTGTCTCTGGCTAAAGCGGCCATTCTTTTCCGCCAACTTG-----GCCTT  
TTGTCTCTGGCTAAAGCGGCCATTCTTTTCCGCCAACTTG-----GCCTT  
\*\*\*\*\* \*\* \*\*

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1  
gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7  
gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5  
gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5  
gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0  
gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5

CGCCACTTGTGTGTGGTGCCAAAACACCAGGGAGACCGCCTATTGTTGG  
**CGCCACTTGTGTGTGGTGCCAAAACACCAGGGAGACCGCCTATTGTTGG**  
CGCCACTTGTGTGTGGTGCCAAAACACCAGGGAGACCGCCTATTGTTGG  
CGCCACTTGTGTGTGGTGCCAAAACACCAGGGAGACCGCCTATTGTTGG  
CGCCACTTGTGTGTGGTGCCAAAACACCAGGGAGACCGCCTATTGTTGG  
CGCCACTTGTGTGTGGTGCCAAAACACCAGGGAGACCGCCTATTGTTGG  
\*\*\*\*\*

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1  
gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7  
gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5  
gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5  
gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0  
gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5

GATACT----TACAAGGCATGATT-TCATGCCGGAACATGTCCTAGGACT  
GATACT----TACAAGGCATGATT-TCATGCCGGAACATGTCCTAGGACT  
GATACT----TACAAGGCATGATT-TCATGCCGGAACATGTCCTAGGACT  
GATACT----TACAAGGCATGATT-TCATGCCGGAACATGTCCTAGGACT  
GATACT----TACAAGGCATGATT-TCATGCCGGAACATGTCCTAGGACT  
GATACT----TACAAGGCATGATT-TCATGCCGGAACATGTCCTAGGACT  
\*\*\*\*\*

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1  
gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7  
gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5  
gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5  
gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0  
gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5

CTACCCTCACATTGATCCTCTCAAGTGAACCTGGTGATGAGGAATTGAG  
CTACCCTCACATTGATCCTCTCAAGTGAACCTG---TTAGCCGTT---  
CTACCCTCACATTGATCCTCTCAAGTGAACCTGGTGATAAGGAATTGAG  
CTACCCTCACATTGATCCTCTCAAGTGAACCTGGTGATGAGGAATTGAG  
CTACCCTCACATTGATCCTCTCAAGTGAACCTGGTGATGAGGAATTGAG  
CTACCCTCACATTGATCCTCTCAAGTGAACCTGGTGATGAGGAATTGAG  
CTACCCTCACATTGATCCTCTCAAGTGAACCTGGTGATGAGGAATTGAG  
\*\*\*\*\* \* \*\* \*\*

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1  
gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7  
gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5  
gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5  
gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0  
gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5

AAAAAGTCTAATAGATTGTTTTTCATTTTATTCTCATTGATGAACATGT  
--TTAGTCTTCTTGTGCTTGCATTTGGTATTACTTTTTTTTGGT-TTC  
AAAAAGTCTAATAGATTGTTTTTCATTTTATTCTCATTGATGAACATGT  
AAAAAGTCTAATAGATTGTTTTTCATTTTATTCTCATTGATGAACATGT  
AAAAAGTCTAATAGATTGTTTTTCATTTTATTCTCATTGATGAACATGT  
AAAAAGTCTAATAGATTGTTTTTCATTTTATTCTCATTGATGAACATGT  
\*\*\* \* \*\* \*\* \* \* \* \* \*

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1  
gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7  
gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5  
gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5  
gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0  
gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5

G----CATATCAAAATCGAAAACAGATTTGCAATTCTATTGCTCTCATT  
A----TGTAATAAAAACATTTCTTTCCAGGTGATAAGGAATTGAGAAAAA  
G----CATATCAAAATCGAAAACAGATTTGCAATTCTATTGCTCTCATT  
G----CATATCAAAATCGAAAACAGATTTGCAATTCTATTGCTCTCATT  
G----CATATCAAAATCGAAAACAGATTTGCAATTCTATTGCTCTCATT  
G----CATATCAAAATCGAAAACAGATTTGCAATTCTATTGCTCTCATT  
\* \* \* \* \* \* \* \*

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1  
gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7  
gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5  
gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5  
gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0  
gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5

GTCCAGAATTATATATTTACTAAAATTATTTGG-TATGAAGAATAATGGG  
GTCCAATAGATTGTTTTTCATTTTATT--CTCGT-TGTGATGAACGTGCA  
GTCCAGAATTATATATTTACTAAAATTATTTGG-TATGAAGAATAATGGG  
GTCCAGAATTATATATTTACTAAAATTATTTGG-TATGAAGAATAAAAAA  
-----  
GTCCAGAATTATATATTTACTAAAATTATTTGG-TATGAAG-----

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1  
gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7  
gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5  
gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5  
gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0  
gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5

-ATTGTG-CAAAAACAAACATGCGAGTCTTTACATAACAATAACGCAGG  
TATCANAAATCGAAAACAGATTTGTAATTCNNAANANAAAAANTAAAAATA  
-ATTGTGC-----  
AAAAAAAAC-----  
-----  
-----

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1  
gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7  
gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5  
gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5  
gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0  
gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5

GCGGCCCTCTAGAGATCCAAGCTTACTTACCGTGCATGCGACGTCAT  
AAAAA-----AAAAAAATATAAACAAAAG-----  
-----  
-----  
-----  
-----

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1  
gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7  
gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5  
gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5  
gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0  
gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5

AACTCTTCTATAAGTGTACCTAAATTCATTCCTGCGCGTCTTTTAC  
-----  
-----  
-----  
-----  
-----

```

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1      TCCGTCTTGGCTGGAATACCCCTGGCGGTACCCACTTAATCGCCTTGGCAG
gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7      -----
gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5      -----
gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5      -----
gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0      -----
gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5      -----

```

```

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1      CCC-----
gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7      -----
gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5      -----
gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5      -----
gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0      -----
gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5      -----

```

```

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1      -----
gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7      -----
gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5      -----
gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5      -----
gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0      -----
gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5      -----

```

```

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1      -----
gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7      -----
gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5      -----
gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5      -----
gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0      -----
gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5      -----

```

```

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1      -----
gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7      -----
gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5      -----
gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5      -----
gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0      -----
gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5      -----

```

```

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1      -----
gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7      -----
gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5      -----
gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5      -----
gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0      -----
gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5      -----

```

```

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1      -----
gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7      -----
gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5      -----
gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5      -----
gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0      -----
gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5      -----

```

```

gi | 151252734 | gb | EV163153.1 | EV1      -----
gi | 254059708 | gb | GR718752.1 | GR7      -----
gi | 308643111 | gb | DK538367.1 | DK5      -----
gi | 308667728 | gb | DK536545.1 | DK5      -----
gi | 151009225 | gb | EV023038.1 | EV0      -----
gi | 308607906 | gb | DK523319.1 | DK5      -----

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment: **BJMRep-1**

```

gi | 156905918 | gb | EX106898.1 | EX1      -----
gi | 308697906 | gb | DK516647.1 | DK5      -----
gi | 308608003 | gb | DK523700.1 | DK5      -----
gi | 150081099 | gb | EE443838.1 | EE4      -----
gi | 308668845 | gb | DK533499.1 | DK5      CTCTTCATTAGACATAAGGTATCAGTTCATACCTCAGATGATATTCTGAA

```

gi | 156905918 | gb | EX106898.1 | EX1  
 gi | 308697906 | gb | DK516647.1 | DK5  
 gi | 308608003 | gb | DK523700.1 | DK5  
 gi | 150081099 | gb | EE443838.1 | EE4  
 gi | 308668845 | gb | DK533499.1 | DK5

-----  
 -----  
 -----  
 -----  
 CAGCCTATTCGGTTACCTTTCGCTACTCATCATCATCAAGTGGTGTACTG

gi | 156905918 | gb | EX106898.1 | EX1  
 gi | 308697906 | gb | DK516647.1 | DK5  
 gi | 308608003 | gb | DK523700.1 | DK5  
 gi | 150081099 | gb | EE443838.1 | EE4  
 gi | 308668845 | gb | DK533499.1 | DK5

-----  
 -----  
 -----  
 -----  
 -----TACATGTTTCTAAGTCC  
 -----CATGTTTCTAAGTCCA  
 GATCACAAGCGGACTTGTATCATGTGATGATCTACATGTTTCTGAGTCCC

gi | 156905918 | gb | EX106898.1 | EX1  
 gi | 308697906 | gb | DK516647.1 | DK5  
 gi | 308608003 | gb | DK523700.1 | DK5  
 gi | 150081099 | gb | EE443838.1 | EE4  
 gi | 308668845 | gb | DK533499.1 | DK5

-----  
 -----  
 -----  
 -----  
 -----  
 AACTGAAGAAGCTTGGTGAAGTGTGTTCTGGGGCCAACGTCTACTTCA  
 ACCGAAGAAGCTTGGTGAAGTGTGTTCTGGGGCCAACGTCCACTTCA  
 ACCGAAGAAGCTTGGTGAAGTGTGTTCTGGGGCCAGCGTCCACTTCA

gi | 156905918 | gb | EX106898.1 | EX1  
 gi | 308697906 | gb | DK516647.1 | DK5  
 gi | 308608003 | gb | DK523700.1 | DK5  
 gi | 150081099 | gb | EE443838.1 | EE4  
 gi | 308668845 | gb | DK533499.1 | DK5

-----  
 -----  
 -----  
 -----  
 -----  
 GATTTTGTACTGCTTATGGCATTTCATCGCTGTCCATGGATGCTTTTTTC  
 GATTTTGTACTGCTTATGGCATTTCATCGCTGTCCATGGATGCTTTTTTC  
 GATTTTGTATTGCTTATGGCATTTCATTGCCGTTCATGGATGCTTTTTTC

gi | 156905918 | gb | EX106898.1 | EX1  
 gi | 308697906 | gb | DK516647.1 | DK5  
 gi | 308608003 | gb | DK523700.1 | DK5  
 gi | 150081099 | gb | EE443838.1 | EE4  
 gi | 308668845 | gb | DK533499.1 | DK5

-----  
 -----  
 -----  
 -----  
 -----  
 CTAACCCCTTTGCTCTCAGGAAAATTACATGGAGAGGTTTCAAGGTCGC  
 CTAACCCCTTTGCTCTCAGGAAAATTACATGGAGAGGTTTCAAGGTCGC  
 CAAACCTTTTGCTCTCAGGAAAATTACATGGAGAGGTTTCAAGGTCGA

gi | 156905918 | gb | EX106898.1 | EX1  
 gi | 308697906 | gb | DK516647.1 | DK5  
 gi | 308608003 | gb | DK523700.1 | DK5  
 gi | 150081099 | gb | EE443838.1 | EE4  
 gi | 308668845 | gb | DK533499.1 | DK5

-----  
 -----  
 -----  
 -----  
 -----  
 -----GTGATCTGGATGTAGAACCCAGG  
 ACGTACGGTGTCTTGGTACTTCTGAGGTGGATCTGGATGTAGAACCCAGG  
 ACTTACGGCGTTCTAGGTACTTCTGAGGTGGATCTGGATGTAGAACCCAGG

gi | 156905918 | gb | EX106898.1 | EX1  
 gi | 308697906 | gb | DK516647.1 | DK5  
 gi | 308608003 | gb | DK523700.1 | DK5  
 gi | 150081099 | gb | EE443838.1 | EE4  
 gi | 308668845 | gb | DK533499.1 | DK5

-----  
 -----  
 -----  
 -----  
 -----  
 CTCAGCTAGAGGCCATCAGGAAGAAGAGTTCAACTTCAGCGAGATTTTTG  
 CTCAGCTAGAGGCCATCAGGAAGAAGAGTTCAACTTCAGCGAGATTTTTG  
 CTCAGCTAGAGGCCATCAGGAAGAAGAGTTCAACTTCAGCGAGATTTTTG  
 CTCAGCTAGAGGCCATCAGGAAGAAGAGTTTAACTTCAGCGAGATTTTTG

gi | 156905918 | gb | EX106898.1 | EX1  
 gi | 308697906 | gb | DK516647.1 | DK5  
 gi | 308608003 | gb | DK523700.1 | DK5  
 gi | 150081099 | gb | EE443838.1 | EE4  
 gi | 308668845 | gb | DK533499.1 | DK5

-----  
 -----  
 -----  
 -----  
 -----  
 -----TTCAGTTTCTAAC  
 TACATCAATTGATTCACCTCCATAGAGTTTGTCTAGGTTTCAAGTTTCTAAC  
 TACATCAATTGATTCACCTCCATAGAGTTTGTCTAGGTTTCAAGTTTCTAAC  
 TACATCAATTGATTCACCTCCATAGAGTTTGTCTAGGTTTCAAGTTTCTAAC  
 TCCATCAGTTGGTTTCACTCCATAGAGTTTGTCTAGGTTTCAAGTTTCTAAC  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

**gi | 156905918 | gb | EX106898.1 | EX1**  
 gi | 308697906 | gb | DK516647.1 | DK5  
 gi | 308608003 | gb | DK523700.1 | DK5  
 gi | 150081099 | gb | EE443838.1 | EE4  
 gi | 308668845 | gb | DK533499.1 | DK5

**ACAGCATCTTACCTTCGTCTCTGGGCTCTTAGTTTGGCTCATTCCGAATT**  
 ACAGCATCTTACCTTCGTCTCTGGGCTCTTAGTTTGGCTCATTCCGAATT  
 ACAGCATCTTACCTTCGTCTCTGGGCTCTTAGTTTGGCTCATTCCGAATT  
 ACAGCATCTTACCTTCGTCTCTGGGCTCTTAGTTTGGCTCATTCCGAATT  
 ACAGCATCTTATCTTCGTCTCTGGGCTCTGAGTTTGGCTCATTCCGAATT  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

**gi | 156905918 | gb | EX106898.1 | EX1**  
 gi | 308697906 | gb | DK516647.1 | DK5  
 gi | 308608003 | gb | DK523700.1 | DK5  
 gi | 150081099 | gb | EE443838.1 | EE4  
 gi | 308668845 | gb | DK533499.1 | DK5

**GTCGACGGTCTTCTATGAGAAAGTTCTTCTTCTTGCCTGGGGTATGAGA**  
 ATCGACGGTCTTCTATGAGAAAGTTCTTCTTCTTGCCTGGGGTATGAGA  
 ATCGACGGTCTTCTATGAGAAAGTTCTTCTTCTTGCCTGGGGTATGAGA  
 GTCGACGGTCTTCTATGAGAAAGTTCTTCTTCTTGCCTGGGGTATGAGA  
 GTCGACGGTCTTCTATGAGAAAGTTCTTCTTCTTGCCTGGGGTATGAGA  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

gi | 156905918 | gb | EX106898.1 | EX1  
 gi | 308697906 | gb | DK516647.1 | DK5  
 gi | 308608003 | gb | DK523700.1 | DK5  
 gi | 150081099 | gb | EE443838.1 | EE4

**ACA**TTTTGATCAGGTTAATCGGATTAGTGGTGTGCGTTTGCACACGCG  
 ACATTTTGTATCAGGTTAATCGGATTAGTGGTGTGCGTTTGCACACGCG  
 ACATTTTGTATCAGGTTAATCGGATTAGTGGTGTGCGTTTGCACACGCG  
 ACATTTTGTATCAGGTTAATCGGATTAGTGGTGTGCGTTTGCACACGCG

```

gi | 308668845 | gb | DK533499.1 | DK5      ACATTTTGGATCCGGTTAATCGGAGTAGTGGTGTGTTGCGTTTGCAACAGCT
*****

gi | 156905918 | gb | EX106898.1 | EX1      TTTTACTTCTGATGATGGAAACACTGAGTGCCTTCTTCATGCTCTGCG
gi | 308697906 | gb | DK516647.1 | DK5      TTTTACTTCTGATGATGGAAACACTGAGTGCCTTCTTCATGCTCTGCG
gi | 308608003 | gb | DK523700.1 | DK5      TTTTACTTCTGATGATGGAAACACTGAGTGCCTTCTTCATGCTCTGCG
gi | 150081099 | gb | EE443838.1 | EE4      TTTTACTTCTGATGATGGAAACACTGAGTGCCTTCTTCATGCTCTGCG
gi | 308668845 | gb | DK533499.1 | DK5      TTTTACTTCTGATGATGGAAACACTAAGTGCCTTCTTCATGCGCTGCG
*****

gi | 156905918 | gb | EX106898.1 | EX1      TCTTCACTGGGTTGAGTTCATGGGGAAGTTCCTCCATGGAGATGGTTACA
gi | 308697906 | gb | DK516647.1 | DK5      TCTTCACTGGGTTGAGTTCATGGGGAAGTTCCTCCATGGGATGGTTACA
gi | 308608003 | gb | DK523700.1 | DK5      TCTTCACTGGGTTGAGTTCATGGGGAAGTTCCTCCATGGGATGGTTACA
gi | 150081099 | gb | EE443838.1 | EE4      TCTTCACTGGGTTGAGTTCATGGGGAAGTTCCTCCATGGAGATGGTTACA
gi | 308668845 | gb | DK533499.1 | DK5      TCTTCACTGGGTTGAATTCATGGGGAAGTTCCTTCATGGAGATGGTTACA
*****

gi | 156905918 | gb | EX106898.1 | EX1      AGTTCAAGCCTTTCTCATTGCTTTAATCTCAAATGACGATGAATAAAGT
gi | 308697906 | gb | DK516647.1 | DK5      AGTTCAAGCCTTTCTCATTGCTTTAATCTCAAATGACGATGAATAAAGT
gi | 308608003 | gb | DK523700.1 | DK5      AGTTCAAGCCTTTCTCATTGCTTTAATCTCAAATGACGATGAATAAAGT
gi | 150081099 | gb | EE443838.1 | EE4      AGGTC AAGCCTTTCTCATTGCT-----
gi | 308668845 | gb | DK533499.1 | DK5      AGTTCAAGCCTTTCTCATTGCTTTGATCTCAGATGACGATGAATAAAT
** *****

gi | 156905918 | gb | EX106898.1 | EX1      ATACCCT-----CTAAGCCATTTGCACATCCCACCTTTCCCTCAA
gi | 308697906 | gb | DK516647.1 | DK5      CTACCCTAGAATCCTC-CTAAGCCATTTGCGCATCCCACCTTTCCCTCAA
gi | 308608003 | gb | DK523700.1 | DK5      CTACCCTAGAATCCTC-CTAAGCCATTTGCGCATCCCACCTTTCCCTCAA
gi | 150081099 | gb | EE443838.1 | EE4      -----
gi | 308668845 | gb | DK533499.1 | DK5      CAACCTTAAACTCCTCAGCCAGCCATTTGCACATCCCACCTTTCCCTCAC

gi | 156905918 | gb | EX106898.1 | EX1      TTATCCACCCAGAAAGAATATATAGAAGAAAATTTGCTCGAAACAGATT
gi | 308697906 | gb | DK516647.1 | DK5      TTATCCACCCAAAAGAATATATAGAAGAAAATTTGCTCGAAACAGATT
gi | 308608003 | gb | DK523700.1 | DK5      TTATCCACCCAAAAGAATATATAGAAGAAAATTTGCTCGAAACAGATT
gi | 150081099 | gb | EE443838.1 | EE4      -----
gi | 308668845 | gb | DK533499.1 | DK5      CC-----

gi | 156905918 | gb | EX106898.1 | EX1      -ATACGGTAACATCCATTGCTTCGTCTTTTACTTTTTAAATCTTTTTAA
gi | 308697906 | gb | DK516647.1 | DK5      TATACGGTAACATCCATTGCTTCGTCTTTTACTTTTTAAATCTTTTTAA
gi | 308608003 | gb | DK523700.1 | DK5      TATACGGTAACATCCATTGCTTCGTCTTTTACTTTTTAAATCTTTTTAA
gi | 150081099 | gb | EE443838.1 | EE4      -----
gi | 308668845 | gb | DK533499.1 | DK5      -----

gi | 156905918 | gb | EX106898.1 | EX1      CCGAAGCTTTTGAAATTAGTATTGTAGTTAATGACAAAAGTTGAGAATGT
gi | 308697906 | gb | DK516647.1 | DK5      CCGAAGCTTTTGAAATTAGTATTGTAGTTAATGACAAAAGTTGAGAATGT
gi | 308608003 | gb | DK523700.1 | DK5      CCGAAGCTTTTGAAATTAGTATTGTAGTTAATGACAAAAGTTGAGAATGT
gi | 150081099 | gb | EE443838.1 | EE4      -----
gi | 308668845 | gb | DK533499.1 | DK5      -----

gi | 156905918 | gb | EX106898.1 | EX1      CTTTGTTTACCCT-TAAAAGCAGAACATGTTAGATCACTTTTT-GAGTTTT
gi | 308697906 | gb | DK516647.1 | DK5      CTTTGTTTACCCCTAAAAGCAGAACATGTTAGATCACTTTTTGGAGTTTT
gi | 308608003 | gb | DK523700.1 | DK5      C-----
gi | 150081099 | gb | EE443838.1 | EE4      -----
gi | 308668845 | gb | DK533499.1 | DK5      -----

gi | 156905918 | gb | EX106898.1 | EX1      TTTTCTTTAATACATACA-ACATCCCTA-----
gi | 308697906 | gb | DK516647.1 | DK5      CTTTCTTTGATACATACATATATCCCTGTCATGGATTTTTTTGGAGGCGAG
gi | 308608003 | gb | DK523700.1 | DK5      -----
gi | 150081099 | gb | EE443838.1 | EE4      -----
gi | 308668845 | gb | DK533499.1 | DK5      -----

gi | 156905918 | gb | EX106898.1 | EX1      -----
gi | 308697906 | gb | DK516647.1 | DK5      AGACAAATGAGAACACTATGTTGGCAAATCATTTACCCTTTGATATAAAA
gi | 308608003 | gb | DK523700.1 | DK5      -----
gi | 150081099 | gb | EE443838.1 | EE4      -----
gi | 308668845 | gb | DK533499.1 | DK5      -----

gi | 156905918 | gb | EX106898.1 | EX1      -----
gi | 308697906 | gb | DK516647.1 | DK5      AAAACATACGTGAAGT

```

```
gi | 308608003 | gb | DK523700.1 | DK5 -----
gi | 150081099 | gb | EE443838.1 | EE4 -----
gi | 308668845 | gb | DK533499.1 | DK5 -----
```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment: **BJMRep-2**

```
gi | 112357842 | gb | AM388079.1 | AM3 -----
gi | 126478782 | gb | EE463476.1 | EE4 --GACACCAGTCGGTGTGCTATCTATCTTTC-TCTCTCTCTCTCTCTCTCT
gi | 254058229 | gb | GR717181.1 | GR7 -----GGCTACGCAGTCGGTGTGCT-----CTCTCTCTCTCTCT
gi | 156886210 | gb | EX088281.1 | EX0 -----ACGCAGTCGGTGTGCTATCTATCTTCTCTCTCTCT
gi | 156895467 | gb | EX096943.1 | EX0 -----AGTTTGCTACGCAGTCGGTGTGCTATCTATCTTCTCTCTCTCT
gi | 122031612 | gb | EH420477.1 | EH4 -----
gi | 308632147 | gb | DK459783.1 | DK4 -----GATCGGAGAATAAGATTCT
gi | 308655591 | gb | DK508159.1 | DK5 GGGTCTCACTCTCACTGGATCTCGGGCGATCTTATCGGAGAATAAGATTCT
gi | 150899080 | gb | ES929538.1 | ES9 -----
gi | 308712336 | gb | DK468165.1 | DK4 -----
```

```
gi | 112357842 | gb | AM388079.1 | AM3 ---CCCACGCGTCC-GGGATCTGCAATCAACAATGAATCGCCACCACGAT
gi | 126478782 | gb | EE463476.1 | EE4 GTCTTCGTAATCTAGGGATCTGCAATCAACAATGAATCGCCACCACGAT
gi | 254058229 | gb | GR717181.1 | GR7 TTCTTCGTAATCTAGGGATCTTCAATCAACAATGAATCGCCACCACGAC
gi | 156886210 | gb | EX088281.1 | EX0 TTCTTCGTAATCTAGGGATCTTCAATCAACAATGAATCGCCACCACGAC
gi | 156895467 | gb | EX096943.1 | EX0 TTCTTCGTAATCTAGGGATCTGCAATCAACAATGAATCGCCACCACGAC
gi | 122031612 | gb | EH420477.1 | EH4 -----GAATCTAGGGATCTGCAATCAACAATGAATCGCCACCACGAC
gi | 308632147 | gb | DK459783.1 | DK4 GAGGTGGTAAATAAAGGGATCGGCAACCAACAATGAATCGTCACCACGAC
gi | 308655591 | gb | DK508159.1 | DK5 GAGGTGGTAAATAAAGGGATCGGCAACCAACAATGAATCGTCACCACGAC
gi | 150899080 | gb | ES929538.1 | ES9 -----GAAAGGGATCTGAGTGAACCAACGATGAATCGCCACCACGAC
gi | 308712336 | gb | DK468165.1 | DK4 -----GGTGAATCTAGGGATCTGCAATCAACAATGAATCGCCACCACGAT
*** **
```

```
gi | 112357842 | gb | AM388079.1 | AM3 CCCAACCCCTTTCGATGAAGAGGAAGAAGAAATCGTCAATCCATTTCTCTAG
gi | 126478782 | gb | EE463476.1 | EE4 CCCAACCCCTTTCGATGAAGAGGAAGAAGAAATCGTCAATCCATTTCTCTAG
gi | 254058229 | gb | GR717181.1 | GR7 CCCAACCCCTTTCGATGAAGAGGAAGAAGAAATCGTCAATCCCTTCTCTAA
gi | 156886210 | gb | EX088281.1 | EX0 CCCAACCCCTTTCGATGAAGAGGAAGAAGAAATCGTCAATCCCTTCTCTAA
gi | 156895467 | gb | EX096943.1 | EX0 CCCAACCCCTTTCGATGAAGAGGAAGAAGAAATCGTCAATCCCTTCTCTAA
gi | 122031612 | gb | EH420477.1 | EH4 CCCAACCCCTTTCGATGAAGAGGAAGAAGAAATCGTCAATCCCTTCTCTAA
gi | 308632147 | gb | DK459783.1 | DK4 CCCAACCCCTTTCGATGAGGAAGATGAAGAAATCGTCAATCCCTTCTCTAA
gi | 308655591 | gb | DK508159.1 | DK5 CCCAACCCCTTTCGATGAGGAAGATGAAGAAATCGTCAATCCCTTCTCTAA
gi | 150899080 | gb | ES929538.1 | ES9 CCCAACCCCTTTCGATGAGGAAGATGAAGAAATCGTCAATCCCTTCTCTAA
gi | 308712336 | gb | DK468165.1 | DK4 CCCAACCCCTTTCGATGAAGAGGAAGAAGAAATCGTCAATCCATTTCTCTAG
*** **
```

```
gi | 112357842 | gb | AM388079.1 | AM3 AGGCGGTGGACGAGTTCCCGCTGCATCTAGGC--CAGTTGGATTTGGCCA
gi | 126478782 | gb | EE463476.1 | EE4 AGGCGGTGGACGAGTTCCCGCTGCATCTAGGC--CAGTTGGATTTGGCCA
gi | 254058229 | gb | GR717181.1 | GR7 AGGCGGTGGACGAGTTCCCGCTGCATCTAGGC--CAGTTGGATTTGGCCA
gi | 156886210 | gb | EX088281.1 | EX0 AGGCGGTGGACGAGTTCCCGCTGCATCTAGGC--CAGTTGGATTTGGCCA
gi | 156895467 | gb | EX096943.1 | EX0 AGGCGGTGGACGAGTTCCCGCTGCATCTAGGC--CAGTTGGATTTGGCCA
gi | 122031612 | gb | EH420477.1 | EH4 AGGCGGTGGACGAGTTCCCGCTGCATCTAGGC--CAGTTGGATTTGGCCA
gi | 308632147 | gb | DK459783.1 | DK4 AGGCGGTGGACGAGTTCCCGCTGCATCTAGGC--CAGTTGGATTTGGCCA
gi | 308655591 | gb | DK508159.1 | DK5 AGGCGGTGGACGAGTTCCCGCTGCATCTAGGC--CAGTTGGATTTGGCCA
gi | 150899080 | gb | ES929538.1 | ES9 AGGCGGTGGACGAGTTCCCGCTGCATCTAGGC--CAGTTGGATTTGGCCA
gi | 308712336 | gb | DK468165.1 | DK4 AGGCGGTGGACGAGTTCCCGCTGCATCTAGGC--CAGTTGGATTTGGCCA
***** **
```

```
gi | 112357842 | gb | AM388079.1 | AM3 AAGCCTCGATGCTACTGTTGATATTTCCCTGGATAACATGAATG---ACT
gi | 126478782 | gb | EE463476.1 | EE4 AAGCCTCGATGCTACTGTTGATATTTCCCTGGATAACATGAATG---ACT
gi | 254058229 | gb | GR717181.1 | GR7 AAGCCTCGATGCTACTGTTGATATTTCCCTGGATAACATGAATG---ACT
gi | 156886210 | gb | EX088281.1 | EX0 AAGCCTCGATGCTACTGTTGATATTTCCCTGGATAACATGAATG---ACT
gi | 156895467 | gb | EX096943.1 | EX0 AAGCCTCGATGCTACTGTTGATATTTCCCTGGATAACATGAATG---ACT
gi | 122031612 | gb | EH420477.1 | EH4 AAGCCTCGATGCTACTGTTGATATTTCCCTGGATAACATGAATG---ACT
gi | 308632147 | gb | DK459783.1 | DK4 AAGCCTCGATGCTACTGTTGATATTTCCCTGGATAACATGAATG---ACT
gi | 308655591 | gb | DK508159.1 | DK5 AAGCCTCGATGCTACTGTTGATATTTCCCTGGATAACATGAATG---ACT
gi | 150899080 | gb | ES929538.1 | ES9 AAGCCTCGATGCTACTGTTGATATTTCCCTGGATAACATGAATG---ACT
gi | 308712336 | gb | DK468165.1 | DK4 AAGCCTCGATGCTACTGTTGATATTTCCCTGGATAACATGAATG---ACT
***** **
```

```
gi | 112357842 | gb | AM388079.1 | AM3 CTTACAGAAACAGAGAAAGCTTGCTGAC----TGGGAAGCTGAGCTTAG
gi | 126478782 | gb | EE463476.1 | EE4 CTTACAGAAACAGAGAAAGCTTGCTGAC----TGGGAAGCTGAGCTTAG
gi | 254058229 | gb | GR717181.1 | GR7 CTTCTCAGAAACAGAGAAAGCTTGCTGAC----TGGGAAGCTGAGCTTAG
gi | 156886210 | gb | EX088281.1 | EX0 CTTCTCAGAAACAGAGAAAGCTTGCTGAC----TGGGAAGCTGAGCTTAG
gi | 156895467 | gb | EX096943.1 | EX0 CTTCTCAGAAACAGAGAAAGCTTGCTGAC----TGGGAAGCTGAGCTTAG
gi | 122031612 | gb | EH420477.1 | EH4 CTTACAGAAACAGAGAAAGCTTGCTGAC----TGGGAAGCTGAGCTTAG
gi | 308632147 | gb | DK459783.1 | DK4 CTTACAGAAACAGAGAAAGCTTGCTGAC----TGGGAAGCTGAGCTTAG
```





\*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*

gi | 112357842 | gb | AM388079.1 | AM3
gi | 126478782 | gb | EE463476.1 | EE4
gi | 254058229 | gb | GR717181.1 | GR7
gi | 156886210 | gb | EX088281.1 | EX0
gi | 156895467 | gb | EX096943.1 | EX0
gi | 122031612 | gb | EH420477.1 | EH4
gi | 308632147 | gb | DK459783.1 | DK4
gi | 308655591 | gb | DK508159.1 | DK5
gi | 150899080 | gb | ES929538.1 | ES9
gi | 308712336 | gb | DK468165.1 | DK4

GTACAGGCCTCTCTACCGAGCCATGAGGACTGACAGCGCTTTGAAGTTTG
GTACAGGCCTCTCTACCGAGCCATGAGGACTGACAGCGCTTTGAAGTTTG
GTACAGGCCTCTCTACCGAGCCATGAGGACTGACAGCGCTTTGAAGTTTG
GTACAGGCCTCTCTACCGAGCCATGAGGACTGACAGCGCTTTGAAGTTTG
GTACAGGCCTCTCTACCGAGCCATGAGGACTGACAGCGCTTTGAAGTTTG
GTACAGGCCTCTCTACCGAGCCATGAGGACTGACAGCGCTTTGAAGTTTG
GTACAGGCCTCTCTACCGAGCCATGAGGACTGACAGCGCTTTGAAGTTTG
GTACAGGCCTCTCTACCGAGCCATGAGGACTGACAGCGCTTTGAAGTTTG
GTACAGGCCTCTCTACCGAGCCATGAGGACTGACAGCGCTTTGAAGTTTG
GTACAGGCCTCTCTACCGAGCCATGAGGACTGACAGCGCTTTGAAGTTTG
\*\*\*\*\*

gi | 112357842 | gb | AM388079.1 | AM3
gi | 126478782 | gb | EE463476.1 | EE4
gi | 254058229 | gb | GR717181.1 | GR7
gi | 156886210 | gb | EX088281.1 | EX0
gi | 156895467 | gb | EX096943.1 | EX0
gi | 122031612 | gb | EH420477.1 | EH4
gi | 308632147 | gb | DK459783.1 | DK4
gi | 308655591 | gb | DK508159.1 | DK5
gi | 150899080 | gb | ES929538.1 | ES9
gi | 308712336 | gb | DK468165.1 | DK4

GTTGGTTTTTCTTACCTACTTGATTACATTGGCTTCTGCATCG--TTG
GTTGGTTTTTCTTACCTACTTGATTACATTGGCTTCTGCATCG--TTG
GTTGGTTTTTCTTACCTACTTGATTACATTGGCTTCTGCATCG--TTG
GTTGGTTTTTCTTACCTACTTGATTACATTGGCTTCTGCATCG--TTG
GTTGGTTTTTCTTACCTACTTGATTACATTGGCTTCTGCATCG--ATG
GTTGGTTTTTCTTACCTACTTGATTACATTGGTTTCTGCATCG--TTG
GTTGGTTTTTCTTACCTACTTGATTACATTGGTTTCTGCATCG--TTG
GTTGGTTTTTCTTACCTACTTGATTACATTGGTTTCTGCATCG--TTG
GTTGGTTTTTCTTACCTACTTGATTACATTGGCTTCTGCATCG--TTG
GTTGGTTTTTCTTACCTACTTGATTACATTGGCTTCTGCATCG--TTG
\*\*\*\*\*

gi | 112357842 | gb | AM388079.1 | AM3
gi | 126478782 | gb | EE463476.1 | EE4
gi | 254058229 | gb | GR717181.1 | GR7
gi | 156886210 | gb | EX088281.1 | EX0
gi | 156895467 | gb | EX096943.1 | EX0
gi | 122031612 | gb | EH420477.1 | EH4
gi | 308632147 | gb | DK459783.1 | DK4
gi | 308655591 | gb | DK508159.1 | DK5
gi | 150899080 | gb | ES929538.1 | ES9
gi | 308712336 | gb | DK468165.1 | DK4

CTGCCATTGCCCCCGCAT-----
CTGCCATTGCCCCCGCATCTTTTCCATGGAAAATCA-----
CCGCCATTGCCCCCGCATCTTTTCCAT-----
CCGCCATTGCCCCCGCATCTTTTCCATGGAAAATCATTAAACGGGTGTG
CCGCCATTGCCCCCGCATCTTTTCCATGGAAAATCATTAAACGGGTGTG
CCGCCATTGCCCCCGCATCTTTTCCAT-----
CCGCCATTGCCCCCGCATCTTTTCCAGGGGAAGTCTTTAAACGGGTGTG
CCGCCATTGCCCCCGCATCTTTTCCAGGGGAAGTCTTTAAACGGGTGTG
CCGCCATTGCCCCCGCATCTTTTCCAGGGGAAGTCTTTGACGGGTGTG
CTGCCATTGCCCCCGCATCTTTTCCATGGAAAATCATTAAACGGGTGTG
\* \*\*\*\*\* \*\* \*

gi | 112357842 | gb | AM388079.1 | AM3
gi | 126478782 | gb | EE463476.1 | EE4
gi | 254058229 | gb | GR717181.1 | GR7
gi | 156886210 | gb | EX088281.1 | EX0
gi | 156895467 | gb | EX096943.1 | EX0
gi | 122031612 | gb | EH420477.1 | EH4
gi | 308632147 | gb | DK459783.1 | DK4
gi | 308655591 | gb | DK508159.1 | DK5
gi | 150899080 | gb | ES929538.1 | ES9
gi | 308712336 | gb | DK468165.1 | DK4

-----
-----
-----
CTTGCAGC-----
CTTGCAGCAATTGATGTCATCTCAGACAGTGTATTAGCCGGGATCTTCTA
-----
CTTGCAGCAATTGATGTCATCTCAGACAGTTTATTAGCAGG-ATCTTCTA
CTTGCAGCAATTGATGTCATCTCAGACAGTTTATTAGCAGG-ATCTTCTA
CTTG-----
CTTGCAGCAATTGATGTCATCTCAGACAGTGTATTAGCCGGGATCTTCTA

gi | 112357842 | gb | AM388079.1 | AM3
gi | 126478782 | gb | EE463476.1 | EE4
gi | 254058229 | gb | GR717181.1 | GR7
gi | 156886210 | gb | EX088281.1 | EX0
gi | 156895467 | gb | EX096943.1 | EX0
gi | 122031612 | gb | EH420477.1 | EH4
gi | 308632147 | gb | DK459783.1 | DK4
gi | 308655591 | gb | DK508159.1 | DK5
gi | 150899080 | gb | ES929538.1 | ES9
gi | 308712336 | gb | DK468165.1 | DK4

-----
-----
-----
CTTCATCGGCTTTGGTCTCTTCTGCTTGGAGTCACTTCTGAGTCTATGGG
-----
CTTTATCGGTTTTGGTCTCTTCTGCTTGGAGTCACTTCTGAGTCTATGGG
CTTTATCGGTTTTGGTCTCTTCTGCTTGGAGTCACTTCTGAGTCTATGGG
-----
CTTCATCGGCTTTGGTCTCTTCTGCTTGGAGTCACTTCTGAGTCTATGGG

gi | 112357842 | gb | AM388079.1 | AM3
gi | 126478782 | gb | EE463476.1 | EE4
gi | 254058229 | gb | GR717181.1 | GR7
gi | 156886210 | gb | EX088281.1 | EX0
gi | 156895467 | gb | EX096943.1 | EX0
gi | 122031612 | gb | EH420477.1 | EH4
gi | 308632147 | gb | DK459783.1 | DK4
gi | 308655591 | gb | DK508159.1 | DK5
gi | 150899080 | gb | ES929538.1 | ES9
gi | 308712336 | gb | DK468165.1 | DK4

-----
-----
-----
TTC-----
-----
TTCTTCAGAAAATTTACCTCT-----
-----
TTCTTCAGAAAATTTACCTCTACTTTATGGGGAACAAGTA-----

gi | 112357842 | gb | AM388079.1 | AM3

-----

```

gi | 126478782 | gb | EE463476.1 | EE4 -----
gi | 254058229 | gb | GR717181.1 | GR7 -----
gi | 156886210 | gb | EX088281.1 | EX0 -----
gi | 156895467 | gb | EX096943.1 | EX0 -----
gi | 122031612 | gb | EH420477.1 | EH4 -----
gi | 308632147 | gb | DK459783.1 | DK4 -----
gi | 308655591 | gb | DK508159.1 | DK5 -----
gi | 150899080 | gb | ES929538.1 | ES9 -----
gi | 308712336 | gb | DK468165.1 | DK4 -----

```

```

gi | 112357842 | gb | AM388079.1 | AM3 -----
gi | 126478782 | gb | EE463476.1 | EE4 -----
gi | 254058229 | gb | GR717181.1 | GR7 -----
gi | 156886210 | gb | EX088281.1 | EX0 -----
gi | 156895467 | gb | EX096943.1 | EX0 -----
gi | 122031612 | gb | EH420477.1 | EH4 -----
gi | 308632147 | gb | DK459783.1 | DK4 -----
gi | 308655591 | gb | DK508159.1 | DK5 -----
gi | 150899080 | gb | ES929538.1 | ES9 -----
gi | 308712336 | gb | DK468165.1 | DK4 -----

```

```

gi | 112357842 | gb | AM388079.1 | AM3 -----
gi | 126478782 | gb | EE463476.1 | EE4 -----
gi | 254058229 | gb | GR717181.1 | GR7 -----
gi | 156886210 | gb | EX088281.1 | EX0 -----
gi | 156895467 | gb | EX096943.1 | EX0 -----
gi | 122031612 | gb | EH420477.1 | EH4 -----
gi | 308632147 | gb | DK459783.1 | DK4 -----
gi | 308655591 | gb | DK508159.1 | DK5 -----
gi | 150899080 | gb | ES929538.1 | ES9 -----
gi | 308712336 | gb | DK468165.1 | DK4 -----

```

```

gi | 112357842 | gb | AM388079.1 | AM3 -----
gi | 126478782 | gb | EE463476.1 | EE4 -----
gi | 254058229 | gb | GR717181.1 | GR7 -----
gi | 156886210 | gb | EX088281.1 | EX0 -----
gi | 156895467 | gb | EX096943.1 | EX0 -----
gi | 122031612 | gb | EH420477.1 | EH4 -----
gi | 308632147 | gb | DK459783.1 | DK4 -----
gi | 308655591 | gb | DK508159.1 | DK5 -----
gi | 150899080 | gb | ES929538.1 | ES9 -----
gi | 308712336 | gb | DK468165.1 | DK4 -----

```

```

gi | 112357842 | gb | AM388079.1 | AM3 -----
gi | 126478782 | gb | EE463476.1 | EE4 -----
gi | 254058229 | gb | GR717181.1 | GR7 -----
gi | 156886210 | gb | EX088281.1 | EX0 -----
gi | 156895467 | gb | EX096943.1 | EX0 -----
gi | 122031612 | gb | EH420477.1 | EH4 -----
gi | 308632147 | gb | DK459783.1 | DK4 -----
gi | 308655591 | gb | DK508159.1 | DK5 -----
gi | 150899080 | gb | ES929538.1 | ES9 -----
gi | 308712336 | gb | DK468165.1 | DK4 -----

```

## Ek-B:

>gi|304436124|gb|HM565958.1| *Brassica juncea* var. *tumida* actin mRNA, partial cds

```

CCGACCGTATGAGCAAGGAAATCACGGCGCTTGCACCTAGCAGCATGAAGATCAAGGTGGTGGCTCC
TCCTGAGAGGAAATACAGTGTCTGGATTGGAGGATCTATCCTTGCATCCCTCAGCACTTTCCAACAG
ATGTGGATTTCAAAGGGAGAGTACGATGAGTCAGGTCCATCCATTGTCCACAGGAA

```

## **ÖZGEÇMİŞ**

1978 yılında İstanbul'da doğdum. Lise eğitimimi 1995 yılında Yeşilköy 50.Yıl Lisesi'nde tamamladım. 2001 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldum. Aynı yıl İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Botanik programında yüksek lisans eğitimime başladım ve 2005 yılında yüksek lisans tezimi bitirdim. 2001 yılında İstanbul Üniversitesi Botanik Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandım. 2010 yılında İstanbul Üniversitesi Botanik Anabilim Dalı'nda Biyolog kadrosuna geçiş yaptım ve halen görevime devam etmekteyim. Evliyim.