



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN NİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



FİTOREMEDİYASYON ÇALIŞMALARI İÇİN
FİTOŞELATİN SENTAZ (PC_{S1}) GENİNİN
İZOLASYONU VE KLONLANMASI

Canan SEVİNÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Kasım-2019
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Canan Sevinç tarafından hazırlanan “Fitoremediyasyon Çalışmaları İçin Fitoşelatin Sentaz (PCS1) Geninin İzolasyonu ve Klonlanması” adlı tez çalışması 06/12/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ

.....

Danışman

Doç. Dr. Muhammad ASIM

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Allah BAKHSH

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. S. Savaş DURDURAN
FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Canan SEVİNÇ

06.12.2019

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FİTOREMEDİYASYON ÇALIŞMALARI İÇİN FİTOŞELATİN SENTAZ (*PCS1*) GENİNİN İZOLASYONU VE KLONLANMASI

Canan SEVİNÇ

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Muhammad ASIM

2019, 60 Sayfa

Jüri

Doç. Dr. Muhammad ASIM
Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ
Dr. Öğr. Üyesi Allah BAKHSH

Bitkilerde ağır metal toleransında rol aldığı bilinen genlerden biri Fitoşelatinler (PC) ailesine ait *PCS1* genleridir. PC'ler indirgenmiş glutatyondan (GSH) enzimatik olarak sentezlenir. γ -glutamilsistein dipeptidil transpeptidaz enzimi (EC 2.3.2.15, yaygın olarak fitoşelatin sentaz (PCS) olarak adlandırılır) ile katalize edilen reaksiyon, metal iyonları ile aktive edilir. Bitkiler, ağır metallerle karşı bir savunma mekanizması olarak, ağır metal varlığında PC sentezlerler ve bu metal-şelatlayıcılar, ağır metal iyonlarının bazılarıyla kompleksler oluştururlar, daha sonra sitosoldan, vakuole aktarılırlar. Tezin amacı doğrultusunda, bu metal-şelatlayıcı peptidleri sentezleyen *PCS1* genleri bitki kaynaklarından izole edilip klonlanması sağlanmıştır. Bu amaçla, *Arabidopsis thaliana* ve *Ceratophyllum demersum* bitkileri kullanılmıştır. *C. demersum* bitkisinde *PCS1* geni bulunmazken, *A. thaliana* bitkisinden *PCS1* geni izole edilip *Pfu* DNA Polimeraz ile yüksek doğrulukta amplifiye edilmiştir. Amplifikasyonu gerçekleştirilen *PCS1* genlerinin, pBIN61 (bitki ekspresyon vektörü) plazmidini ile T4 DNA Ligaz enzimi aracılığıyla ligasyonu sağlanmıştır. Ligasyon sonrası *PCS1* genlerini içeren pBIN61 plazmidleri ısı şoku transformasyon yoluyla *Escherichia coli* bakterisinin *JM109* ırkına aktarılmıştır. Transformasyonu yapılan *E. coli* bakterileri kanamisin (50 mg/L) içeren LB agar besi ortamına ekilerek kanamisin antibiyotikine dayanıklılık yoluyla, *PCS1* genlerini içeren plazmidleri taşıyan bakteri kolonilerinin seleksiyonu yapılmıştır ve koloni PCR, restriksiyon analizi yöntemleri ile doğrulamaya tabi tutulmuştur. Koloni PCR' da pozitif sonuç vererek, *PCS1* genini içeren pBIN61 plazmidini taşıdığı belirlenen koloniler seçilerek plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir ve ayrıca gliserol stokları -80 °C' de saklanmıştır. Pozitif klonlar, elektroporasyon cihazı kullanılarak *Agrobacterium* suşu *LBA4404* e transforme edilmiştir. Sonraki çalışmalarda *PCS1* genini içeren *Agrobacterium* ile farklı bitkilerin transformasyonu gerçekleştirilerek transgenik bitkiler oluşturulabileceği ve bu tür transgenik bitkilerin, ağır metallerle kirlenmiş ortamların fitoremediyasyonunda kullanılabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Arabidopsis thaliana*, gen klonlama, fitoremediyasyon, Fitoşelatin sentaz, *PCS1*

ABSTRACT

MS THESIS

ISOLATION AND CLONING OF PHYTOCHELATIN SYNTHASE (*PCS1*) GENE USED FOR PHYTOREMEDIATION STUDIES

Canan SEVİNÇ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN BIOTECHNOLOGY

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Muhammad ASIM

2019, 60 Pages

Jury

Assoc. Prof. Dr. Muhammad ASIM

Prof. Dr. Mehmet KARATAŞ

Asst. Prof. Dr. Allah BAKHSH

PCS1 genes of the Phytochelatins (PC) family are one of the known genes involved in heavy metal tolerance in plants. PCs are enzymatically synthesized from reduced glutathione (GSH). The reaction is catalyzed by γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase enzyme and activated by metal ions. Plants synthesize PC in the presence of heavy metal as a defense mechanism against heavy metals and these metal chelators form complexes with heavy metal ions. The aim of this thesis was to isolate and clone *PCS1* genes from plant sources. For this purpose, *Ceratophyllum demersum* ve *Arabidopsis thaliana* plants were used. *PCS1* gene could not be isolated from *C. demersum* plant but was found in *A. thaliana* plant and amplified with *Pfu* Polymerase with high accuracy rate. The amplified *PCS1* gene was ligated in plasmid pBIN61 (plant expression vector) by T4 DNA Ligase enzyme. After ligation, plasmids pBIN61 containing *PCS1* genes were transferred to the *JM109* strain of *Escherichia coli* by heat shock transformation. Transformed *E. coli* bacteria were inoculated to LB agar medium containing kanamycin (50 mg/L) and the colonies carrying plasmids containing *PCS1* genes were selected by colony PCR and restriction analysis methods. By using positive results in colony PCR, pBIN61 plasmid carrying *PCS1* gene were selected and plasmid isolation was performed and also stored at -80 °C using glycerol stocks. Positive clones were transformed into *Agrobacterium* strain *LBA4404* using the electroporation device. *Agrobacterium* containing *PCS1* gene will be used for genetic transformation studies in future studies and such transgenic plants can be used in phytoremediation of heavy metals contaminated environments.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, gene cloning, phytoremediation, Phytochelatins synthase, *PCS1*

ÖNSÖZ

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen, bu çalışmamda beni yönlendiren, yürütmemde yardımcı olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Muhammad ASİM'a, çalışmalarımın büyük çoğunluğunu laboratuvarında yürütmem için gerekli olanakları sağlayıp izin veren Sayın Doktor Öğretim Üyesi Allah BAKHSH hocama sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmalarımın Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi'nde yürüttüğüm kısımlarında, tecrübesi ile destek sağlayıp deneylerimi gerçekleştirmeme yardım eden Muneeb Hassan Hashmi'ye ayrıca teşekkür ederim.

Tez çalışmam ve tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteğiyle her zaman yanımda olan aileme, yüksek lisansımda yardımlarını benden esirgemeyen tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Canan SEVİNÇ
KONYA-2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Ağır Metal Kirliliği ve Biyoremediyasyon	1
1.2. Fitoremediyasyon	6
1.3. Hiperakümülatör Bitkiler	8
1.4. Bitkilerde Ağır Metal Mekanizmasının Moleküler Temelleri	10
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	14
2.1. Fitoremediyasyonda Güncel Biyoteknolojik Yaklaşımlar	14
2.2. Bitkilerde Metal Toleransı ve Birikiminin Genetik Düzenlenmesi Örnekleri.....	18
2.3. PCS Geninin Aşırı Ekspresyonu Deneyleri	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1. Bitki Materyali	25
3.2. Genomik DNA İzolasyonu	25
3.3. Fitoşelatin Sentaz (PCS) Geninin Amplifikasyonu	26
3.3.1. Fitoşelatin Sentaz (PCS) geninin <i>Taq</i> DNA polimeraz ile amplifikasyonu .	27
3.3.2. Fitoşelatin Sentaz (PCS) geninin <i>Pfu</i> DNA polimeraz ile amplifikasyonu ..	28
3.4. PCR Ürünlerinin Jel Elektroforezi	28
3.5. PCR Ürünlerinin Jelden Ekstraksiyonu	29
3.6. Plazmid İzolasyonu.....	30
3.7. Vektörün Restriksiyon Enzimi ile Kesimi	32
3.8. Klonlanacak Genin Restriksiyon Enzimi ile Kesimi	32
3.9. Ligasyon Reaksiyonu.....	33
3.10. Bakteriyel Transformasyon.....	33
3.11. Rekombinant Bakteriyel Kolonilerin Belirlenmesi	34
3.12. Rekombinant Bakteriyel Kolonilerden Plazmid İzolasyonu	35
3.13. <i>Bam</i> H1 Restriksiyon Enzimi ile Kesme İşlemi	35
3.14. <i>Agrobacterium</i> Hücrelerine Elektroporasyon	36
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	37

4.1. Araştırma Sonuçları	37
4.1.1. Genomik DNA izolasyonu ve <i>PCS1</i> geninin amplifikasyonu.....	37
4.1.1.1. <i>Ceratophyllum demersum</i> bitkisinde genomik DNA izolasyonu ve <i>CdPCS1</i> geninin amplifikasyonu.....	37
4.1.1.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkisinde genomik DNA izolasyonu ve <i>AtPCS1</i> geninin amplifikasyonu.....	38
4.1.2. Ligasyon ve transformasyon	40
4.1.3. Rekombinant bakteriyel kolonilerin belirlenmesi.....	40
4.1.4. <i>Agrobacterium</i> hücrelerine elektroporasyon	43
4.2. Tartışma	43
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	46
5.1 Sonuçlar	46
5.2 Öneriler	47
6. KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİş	59

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Bazı Ağır Metallerin İnsan Sağlığı Üzerindeki Toksik Etkisi	2
Tablo 1.2. Ağır metallerin fitoekstraksiyonunda etkili bazı hiperakümülatör bitkiler	9
Tablo 1.3. Ağır metallerin fitoremediyasyonu için bildirilen bitkilerin listesi	10
Tablo 2.1. Bitkilerde metal toleransı ve birikiminin genetik düzenlenmesi örnekleri (Bir genin aşırı ekspresyonu deneyleri, knockout (nakavt) deneyleri, birden fazla genin aşırı ekspresyonu deneyleri).....	19
Tablo 3.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> PCS1 genini çoğaltmak için PCR’ da kullanılacak primer listesi.....	26
Tablo 3.2. <i>Ceratophyllum demersum</i> PCS1 genini çoğaltmak için PCR’ da kullanılacak primer listesi.....	27
Tablo 3.3. <i>AtPCS1</i> , <i>CdPCS1</i> genlerinin Taq DNA Polimeraz ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu karışımı	27
Tablo 3.4. <i>AtPCS1</i> , <i>CdPCS1</i> genlerinin Taq DNA Polimeraz ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu koşulları	27
Tablo 3.5. <i>AtPCS1</i> geninin Pfu DNA Polimeraz ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonunun karışımı.....	28
Tablo 3.6. <i>AtPCS1</i> geninin Pfu DNA Polimeraz ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonunun koşulları.....	28
Tablo 3.7. pBIN61 vektörünün BamH1 restriksiyon enzimi ile kesimi.....	32
Tablo 3.8. <i>AtPCS1</i> geninin BamH1 restriksiyon enzimi ile kesimi	32
Tablo 3.9. Ligasyonda hazırlanan reaksiyon karışımı	33
Tablo 3.10. Koloni PCR reaksiyon karışımı	34
Tablo 3.11. Koloni PCR reaksiyon koşulları	34
Tablo 3.12. Rekombinant plazmitlerin BamH1 restriksiyon analizi ile doğrulanması ..	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Ağır metallerin fitoremediyasyonunda yer alan çeşitli mekanizmalar.....	6
Şekil 2.1. Fitoremediyasyon için seçilecek en faydalı bitki türlerinin, çeşitli seçeneklere göre, klasik ıslah (örn., Somatik hibridizasyon) veya transgenik yaklaşım yoluyla seçimi	14
Şekil 3.1. Klonlama amacıyla kullanılan pBIN61 transformasyon vektörü.....	30
Şekil 4.1. <i>CdPCS1</i> geninin <i>Taq</i> DNA Polimeraz ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonunun jel görüntüsü.....	38
Şekil 4.2. <i>AtPCS1</i> geninin <i>Pfu</i> DNA Polimeraz ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonunun jel görüntüsü.....	39
Şekil 4.3. <i>AtPCS1</i> geninin <i>Taq</i> DNA Polimeraz ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonunun jel görüntüsü.....	39
Şekil 4.4. <i>AtPCS1</i> genini çoğaltmak için kısmi primerler (378 bç) ile yapılan koloni PCR reaksiyonunun jel görüntüsü,.....	41
Şekil 4.5. <i>Bam</i> HI restriksiyon enzimiyle yapılan kesimden sonra pBIN61 plazmitlerinin <i>AtPCS1</i> genini içerdiğini gösteren jel fotoğrafı	42
Şekil 4.6. pBIN- <i>PCS1</i> 'in T-DNA bölgesi ile şematik gösterimi.	42

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Ag	: Gümüş
Al	: Alüminyum
As	: Arsenik
Au	: Altın
Ba	: Baryum
Be	: Berilyum
Bi	: Bizmut
°C	: Santigrat derece
Cd	: Kadmiyum
cm	: Santimetre
cm ³	: Santimetreküp
Co	: Kobalt
Cr	: Krom
Cu	: Bakır
dk	: Dakika
Fe	: Demir
g	: Gram
Ga	: Galyum
Ge	: Germanyum
Hg	: Cıva
In	: İndiyum
kg	: Kilogram
kb	: Kilobaz
L	: Litre
Li	: Lityum
M	: Molar
mg	: Miligram
Mg	: Magnezyum
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
Mn	: Manganez
Mo	: Molibden
ng	: Nanogram
Ni	: Nikel
Pb	: Kurşun
Pt	: Platin
rpm	: Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)
Se	: Selenyum
Sb	: Antinomi
sn	: Saniye
Sn	: Kalay
Sr	: Stronsiyum
Te	: Tellür
Tl	: Talyum
Ti	: Titanyum
U	: Uranyum

u	: Ünite
V	: Vanadyum
Zn	: Çinko
µl	: Mikrolitre
Mm	: Mikromolar

Kısaltmalar

Bç	: Baz çifti
CAX	: Cation/H ⁺ Exchanger (Kation/H ⁺ değiştirici)
CDF	: Cation diffusion facilitator (kation difüzyon kolaylaştırıcısı)
cDNA	: Komplementer (Tamamlayıcı) DNA
COPT	: Copper transport proteins (Bakır taşıyıcı proteinler)
CRISPR	: Clustered regularly interspaced short palindromic repeat (Kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik diziler)
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
GSH	: Glutasyon
HMA	: Heavy-metal ATPases (Ağır metal ATPazlar)
MT	: Metalloproteinler
MTP	: Metal tolerans proteinleri
NA	: Nikotinamid
NRAMP	: Natural resistance-associated macrophage protein (Doğal dirençle ilişkili makrofaj protein)
PC	: Phytochelatin (Fitoşelatin)
PCS	: Phytochelatin synthase (Fitoşelatin Sentaz)
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
TBE	: Tris-Borat-EDTA
ZIP	: Zinc/iron permease (Çinko/demir permeaz)

1. GİRİŞ

1.1. Ağır Metal Kirliliği ve Biyoremediyasyon

Ağır metaller, suya kıyasla nispeten yüksek bir yoğunluğa sahip metalik elementler olarak tanımlanmaktadır (Fergusson, 1990). Bununla birlikte, “ağır metaller” kesin olmasına rağmen, bilimsel literatürde yaygın olarak kullanılır ve genellikle 5 g/cm^3 ten daha büyük özgül yoğunluğa sahip bir grup element olarak tanımlanır (Duffus, 2002). Doğal olarak oluşan toplam 90 elementten 53' ü ağır metal olarak kabul edilir. Bunlar çoğunlukla periyodik tablodaki geçiş elementleri olarak adlandırılan kısma aittir (Rahman ve ark., 2019).

Sanayinin büyümesiyle birlikte endüstriyel atıkların çevreye, başlıca toprak ve suya salınması ile özellikle kentsel alanlarda ağır metallerin birikmesine neden olan önemli bir artış olmuştur. Ağır metaller, yer kabuğunun her yerinde doğal olarak bulunan elementler olsa da, çoğu çevresel kirlenme insan kaynaklı madencilik ve eritme işlemleri, endüstriyel üretim ve kullanım, metallerin ve metal içeren bileşiklerin evsel ve tarımsal kullanımı, ilaç atıkları gibi antropojenik faaliyetlerden kaynaklanmaktadır. (Shallari ve ark., 1998; He ve ark., 2005). Çevresel kirlenme aynı zamanda metal korozyonu, atmosferik birikim, metal iyonlarının toprak aşınması ve ağır metallerin sızması, çökeltme ve su kaynaklarından toprak ve yeraltı suyuna metal buharlaşması yoluyla da ortaya çıkabilir (Nriagu, 1989). Ayrışma ve volkanik patlamalar gibi doğal olayların da ağır metal kirliliğine önemli ölçüde katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Nriagu, 1989; Fergusson, 1990; Shallari ve ark., 1998; Bradl, 2002; He ve ark., 2005) Ağır metallerin toprağa ve sulara rastgele ve ayrışmadan salınması, toksik olmayan formlara parçalanamayacakları ve bu nedenle ekosistem üzerinde uzun süre kalıcı etkileri olacağı için dünya çapında büyük bir sağlık sorunudur. Birçoğu çok düşük konsantrasyonlarda bile toksiktir; Arsenik, kadmiyum, krom, nikel, kurşun, cıva, bakır, selenyum, gümüş, çinko vb. sadece sitotoksik değil aynı zamanda doğada kanserojen ve mutajenik etkiye sahiptir (Salem, 2000).

Kobalt (Co), bakır (Cu), krom (Cr), demir (Fe), magnezyum (Mg), manganez (Mn), molibden (Mo), nikel (Ni), selenyum (Se) ve çinko (Zn) metallerinin çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonlar için gerekli olan temel besinlerdir olduğu bildirilmiştir. Bu mikro besin maddelerinin yetersiz tedarik edilmesi, çeşitli hastalıklara veya sendromlara sebebiyet verir ve esansiyel metaller olarak kabul edilirler.

Alüminyum (Al), antinomi (Sb), arsenik (As), baryum (Ba), berilyum (Be), bizmut (Bi), kadmiyum (Cd), galyum (Ga), germanyum (Ge), altın (Au), indiyum (In), kurşun (Pb), lityum (Li), cıva (Hg), nikel (Ni), platin (Pt), gümüş (Ag), stronsiyum (Sr), tellür (Te), talyum (Tl), kalay (Sn), titanyum (Ti), vanadyum (V) ve uranyum (U) gibi diğer metaller herhangi bir biyolojik fonksiyona sahip değildir ve esansiyel olmayan metaller olarak kabul edilirler (Chang ve ark., 1996).

Esansiyel ağır metaller bitkilerde ve hayvanlarda biyokimyasal ve fizyolojik bazı fonksiyonlar sergiler. Bunlar birkaç anahtar enzimin önemli bileşenleridir ve çeşitli oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında önemli rol oynarlar (Chang ve ark., 1996). Örneğin bakır; katalaz, peroksidaz, sitokrom c oksidazlar, süperoksit dismutaz, ferroksidazlar, monoamin oksidaz ve dopamin β -monooksijenaz gibi oksidatif strese bağlı çeşitli enzimler için temel bir kofaktör olarak görev yapar (Stern, 2010). Bakıra benzer şekilde, biyolojik işleyiş için başka birkaç temel element gereklidir, ancak bu tür metallerin fazla miktarda olması, çeşitli olumsuz etkilere ve insan hastalıklarına yol açan hücrel ve doku hasarına neden olur. Bazıları için, faydalı ve toksik etkiler arasında çok dar bir konsantrasyon aralığı vardır (Chang ve ark., 1996; Tchounwou ve ark., 2008). Vücudunda yüksek konsantrasyonda ağır metal bulunan kişilerde kardiyovasküler bozukluklar, nörotoksisite, böbrek hasarı, diyabet riski ve kısırlık gibi önemli hastalıklar için potansiyel tehdit vardır (Rehman ve ark., 2018). Bu durum, ağır metallerin insan sağlığı üzerindeki zararlı etkilerini gösteren, Tablo 1.1’ de özeti verilen çeşitli raporlardan açıkça görülmektedir (Dixit ve ark., 2015).

Tablo 1.1. Bazı Ağır Metallerin İnsan Sağlığı Üzerindeki Toksik Etkisi

Ağır metal	EPA Düzenleme Sınırı (ppm)	Toksik Etkiler	Referans
Ag	0.10	Maruz kalınması cildin ve diğer vücut dokularının gri veya mavi-griye dönmesine, solunum problemlerine, akciğer ve boğaz tahrişine ve mide ağrısına neden olabilir.	Chang ve ark., (1996)
As	0.01	Oksidatif fosforilasyon ve ATP sentezi gibi temel hücrel süreçleri etkiler.	Tripathi ve ark., (2007)

Ba	2.0	Kalp ritmi bozukluğu, solunum yetmezliği, gastrointestinal disfonksiyon, kas seğirmesi ve yüksek kan basıncına neden olur.	Jacobs ve ark., (2002)
Cd	5.0	Kanserojen, mutajenik, endokrin bozucudur. Akciğer hasarı ve kırılğan kemiklere neden olur. Biyolojik sistemlerde kalsiyum düzenlemesini etkiler.	Degraeve, (1981); Salem ve ark., (2000)
Cr	0.1	Saç kaybı	Salem ve ark., (2000)
Cu	1.3	Beyin ve böbrek hasarı, yüksek seviyelerde karaciğer sirozu ve kronik anemi, mide ve bağırsak tahrişine neden olur	Degraeve, (1981); Nriagu, (1989); Fergusson, (1990); Kapoor ve ark., (1995); Shallari ve ark., (1998); Salem ve ark., (2000); Jacobs ve ark., (2002); Hussein ve ark., (2004); He ve ark., (2005); Ahluwalia ve Goyal, (2007); Tripathi ve ark., (2007); Wuana ve ark., (2011)
Hg	2.0	Otoimmün hastalıklar, depresyon, uyuşukluk, yorgunluk, saç dökülmesi, uykusuzluk, hafıza kaybı, huzursuzluk, görme bozukluğu, titreme, öfke patlaması, beyin hasarı, akciğer ve böbrek yetmezliğine neden olur.	Neustadt ve Pieczenik, (2007); Ainza ve ark., (2010); Gulati ve ark., (2010)
Ni	0.2	Kaşıntı gibi alerjik cilt hastalıkları, akciğer kanseri, doğurganlık, saç dökülmesine etki eder. İmmünotoksik, nörotoksik, genotoksik etkileri vardır.	Salem ve ark., (2000); Khan ve ark., (2007); Das ve ark., (2008); Duda-Chodak ve Baszczyk, (2008)
Pb	15	Çocuklarda aşırı maruz kalma, gelişimin bozulmasına, zekanın azalmasına, kısa süreli hafıza kaybına, öğrenme ve koordinasyon problemlerine, kardiyovasküler hastalık riskine neden olur.	Salem ve ark., (2000); Vinceti ve ark., (2001); Wuana ve ark., (2011)

Se	50	Günde yaklaşık 300 µg diyet maruziyeti endokrin fonksiyonunu, doğal öldürücü hücre aktivitesini, hepatotoksisiteyi ve gastrointestinal rahatsızlıkları etkiler.	Vinceti ve ark., (2001)
Zn	0.5	Baş dönmesi, halsizlik vb. neden olur	Hess ve Schmid, (2002)

EPA: U.S Environmental Protection Agency (ABD Çevre Koruma Ajansı)

Çevreyi insanlar adına daha sağlıklı kılmak için, kirlenmiş su kütlelerinin ve toprağın ağır metallere ve eser elementlerden arındırılması gerekir. Kimyasal çökeltme, filtrasyon, iyon değişimi, oksidasyon veya indirgeme, ters ozmos, elektrokimyasal arıtma, buharlaşma ve membran teknolojisi dahil olmak üzere bu ağır metalleri ortamdaki uzaklaştırmak için birkaç teknik vardır. Ancak bu tekniklerin çoğu, ağır metal konsantrasyonları 100 mg/L' den az olduğunda etkisiz hale gelir (Ahluwalia ve Goyal, 2007)

Ağır metal tuzlarının çoğu suda çözünabilir özelliktedir ve atık suda çözülür, bu da fiziksel ayırma yöntemleriyle ayrılamayacakları anlamına gelir (Hussein ve ark., 2004). Ek olarak, ağır metallerin konsantrasyonu çok düşük olduğunda fiziko-kimyasal yöntemler etkisiz ve pahalıdır. Alternatif olarak, ağır metallerin uzaklaştırılması için biyosorpsiyon ve/veya biyolojik birikim gibi biyolojik yöntemler, fiziko-kimyasal yöntemler yerine kullanılabilir (Kapoor ve ark., 1995).

Biyolojik yaklaşımlar doğal, uygun maliyetli, çevre dostu, yenilikçi ve gelecek vaat eden bir teknoloji olması ve daha geniş halk desteğine sahip olması nedeniyle fizyolojik yaklaşımlardan üstün olarak kabul edilir ve biyoremediyasyon olarak adlandırılırlar. Biyoremediyasyon, bakteri (Gadd, 2000; Morel ve ark., 2002), mantarlar (Gadd, 2000) ve bitkilerin (Morel ve ark., 2002; McCutcheon ve Schnoor 2003; Kvesitadze ve ark., 2006; Mackova ve ark., 2006; Peer ve ark., 2006; Eapen ve ark., 2007; Willey, 2007) etkisiyle çeşitli kimyasalların çevreden bozunması, çıkarılması, değiştirilmesi, immobilize edilmesi veya başka şekilde detoksifiye edilmesi olasılığını sunmaktadır. Biyoremediyasyondaki ilerlemelerin çoğu, mikrobiyoloji, kimya biyokimya, moleküler biyoloji, analitik kimya ve çevre mühendisliği gibi bilimsel alanların yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Her biri kendi bireysel yaklaşımına sahip olan bu farklı alanlar, son yıllarda biyoremediyasyonun gelişimine aktif olarak katkıda bulunmuştur (Sheehan, 1997).

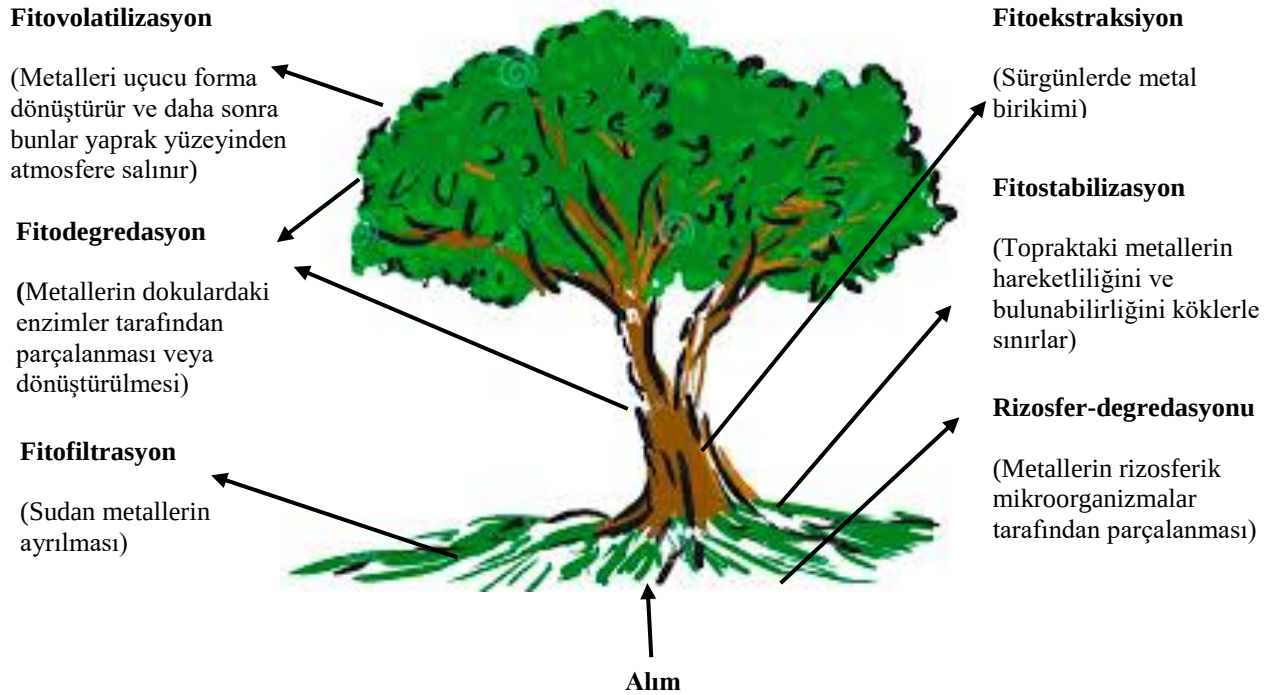
Çevresel kirleticileri ekosistemden uzaklaştırmak için kullanılan bir teknik olan biyoremediyasyon, tehlikeli kirleticileri yok etmek ve ekosistemi eski haline getirmek amacıyla, kirlenmiş habitatlarda hayatta kalmak için çeşitli stratejiler geliştiren mikroplara ve bitkilere özgü biyolojik mekanizmaları kullanır (Ayangbenro ve Babalola 2017). Biyoremediyasyonun temel prensipleri, bu çevresel kirletici maddelerin pH'larını, redoks reaksiyonlarını ve kirleticilerin kirli ortamdan adsorpsiyonlarını değiştirerek çözünürlüğünün azaltılmasını içerir (Jain ve ark., 2016). Redoks reaksiyonları, zararlı kirleticileri kimyasal olarak daha stabil, daha az hareketli veya atıl olan masum veya daha az toksik bileşiklere dönüştürmeyi içerir ve zehirli ağır metallerin, özellikle de As, Cr, Hg ve Se'nin toprak ve çökeltilerde daha az toksik veya zararsız biçimlere dönüştürülmesinde hayati bir rol oynar (Gadd, 2010; Rajapaksha ve ark., 2013; Tandon ve Singh, 2016).

Biyoremediyasyonun etkinliği, kullanılan organizmaların özellikleri, kontamine olmuş bölgedeki baskın çevresel faktörler ve kirleticilerin derecesi gibi birçok faktöre bağlıdır (Azubuike ve ark., 2016). Biyoremediyasyon ex-situ (yerinde olmayan) veya in-situ (yerinde) olabilir. İn-situ biyoremediyasyon, kontamine edici maddeleri parçalama kabiliyetinde olan mikroorganizmaları uyararak, çevreye yeni mikroorganizma ekleyerek, ya da genetik mühendisliği teknikleri kullanılıp mevcut mikroorganizmaları geliştirerek kontamine olmuş ortamların yerinde temizlenme işlemidir. Doğal mikroorganizmaların in-situ biyoremediyasyon için kullanılması, uygun besin seviyelerinin bulunmaması ve/veya kirli ortamdaki çevresel düzenlemelerden etkilenir. Ex-situ biyoremediyasyon, kontamine olmuş yerin jeolojisi, coğrafi bölgesi, tedavi maliyeti, kontaminasyon derinliği, kirletici türü ve kirliliğin derecesine dayalı olarak kontamine olmuş ortamın orijinal sahadan tedavi için farklı bir bölgeye götürülmesini içerir (Ojuederie ve Babalola 2017). İn-situ veya ex-situ biyoremediasyon için kullanılabilecek biyorepsiyon, biyoakümülayon (biyobirikim), biyotransformasyon ve biyo-mineralizasyon gibi farklı detoksifikasyon mekanizmaları vardır (Gadd, 2000; Lim ve ark., 2003; Malik, 2004; Lin ve Lin, 2005).

Biyoremediyasyon ile çevresel kirleticileri parçalamak ve bunları redoks prosesleriyle zararsız formlara dönüştürmek, metabolik potansiyele sahip mikroorganizmalar kullanılarak sağlanabilir (mikrobiyal biyoremediyasyon) (Jan ve ark., 2014) ya da çevreyi kirleten maddeleri bağlayan, özütleyen ve gideren bitkiler tarafından da gerçekleştirilebilir (fitoremediyasyon).

1.2. Fitoremediyasyon

Fitoremediyasyon, temel olarak bitkilerin ve ilişkili mikroorganizmaların, seçilen kirletici maddeleri topraktan, çamurdan, çökeltilerden, atık sudan ve yeraltı suyundan kısmen veya tamamen gidermek için kullanımını ifade eder. Radyonüklidlerin, organik kirleticilerin ve ayrıca ağır metallerin uzaklaştırılmasında kullanılabilir (Ali ve ark., 2013). Fitoremediyasyon, kirlenmiş alanların remediasyonuna yardımcı olmak için çeşitli bitki proseslerini ve bitkilerin fiziksel özelliklerini kullanır. Son yıllarda, bu özellik, ağır metaller ile kirlenmiş toprakların ıslahı için kullanılabileceğinden, fitoremediyasyona özel bir önem verilmiştir (Robinson ve ark., 1997; Martinez ve ark., 2006). Güneş enerjisi ile çalışan, uygun maliyetli, verimli ve çevre dostu bir yerinde iyileştirme teknolojisidir. Fitoremediyasyon tekniği, fito-ekstraksiyon, fitofiltrasyon, fito-stabilizasyon, fitovolatilizasyon ve fitobozulma (fitodegradasyon) gibi bir dizi farklı işlemi içerir (Alkorta ve ark., 2004). Ağır metallerin fito-düzenlemesinde yer alan çeşitli işlemlerin bir özeti, Şekil 1.1'de gösterilmektedir (Dixit ve ark., 2015).



Şekil 1.1. Ağır metallerin fitoremediyasyonunda yer alan çeşitli mekanizmalar

Fitoremediasyonun ilk basamağı fitoekstraksiyon, bitki kökleri tarafından toprak veya sudan kirletici maddelerin alınması ve bunların sürgünlere translokasyonu ve birikmesidir (Sekara ve ark., 2005). Metallerin sürgünlere translokasyonu, önemli bir biyokimyasal işlemdir ve etkili bir fito-ekstraksiyonda arzu edilir. Bir sonraki önemli fitoremediasyon işlemi, rizofiltrasyon (bitki köklerinin kullanımı), blastofiltrasyon (fide kullanımı) ve kaulofiltrasyon (bitki sürgünlerinin kullanımı) içeren fitofiltrasyondur (Mesjasz-Przybylowicz ve ark., 2004).

Yukarıdaki işlemlere ek olarak, çevrede bulunan metallerin hareket kabiliyetini ve biyoyararlanımını azaltan ve böylece yeraltı suyuna ya da besin zincirine geçmelerini engelleyen fitostabilizasyon veya fitomobilizasyon mekanizmaları vardır (Erakhrumen, 2007). Bitkiler, ağır metallerin toprakta immobilizasyonunu kökler, çökeltme, kompleks oluşumu veya rizosferdeki metal değerlik indirgemesi yoluyla emerek gerçekleştirirler (Barcelo ve Poschenrieder, 2003). Bitkiler tarafından alınan organik kirleticiler, rizosferik mikroorganizmalara bağlı olmayan dehalojenaz ve oksijenaz gibi enzimler tarafından metabolize edilir (Vishnoi ve Srivastava, 2008). Bununla birlikte, bitkiler tarafından absorbe edilen birkaç ağır metal, uçucu formlara dönüştürülür ve daha sonra fitovolatilizasyon adı verilen işlemle atmosfere salınır. Bu işlem kirli topraklardan Hg ve Se gibi bazı uçucu ağır metallerin uzaklaştırılması için kullanılmıştır (Karami ve Shamsuddin, 2010). Bununla birlikte, metalleri tamamen çıkarmaması, ancak bir ortamdan (toprak veya su) başka bir ortama aktarmaları gerçeği ile sınırlıdır.

Genel olarak fitoremediasyon teknolojisinin avantajları aşağıda özetlenmiştir (Lehr, 2004):

- In-situ (yerinde) işlemleri içerir ve güneşle çalışır.
- Maliyetler, mekanik işlemlerle ilişkili maliyetlerin yaklaşık % 20 ila 30' udur.
- Halk tarafından daha yüksek oranda destek görmüştür.
- Büyük kirli yüzey alanları dahil olmak üzere birçok remediasyon senaryosuna uygulanabilir.

Bununla birlikte, fitoremediasyon ile ilişkili bazı potansiyel dezavantajlar da tanımlanmıştır (Bayliss ve Langley, 2003; Lehr, 2004):

- Arıtma genellikle sık topraklar için yüzeyden 90 cm ve sık sular için yüzeyden 3 m uzakta bulunan alanlarla sınırlıdır.
- Yüksek konsantrasyonlarda tehlikeli madde, bitkiler için toksik olabilir.

- Diğer biyolojik arıtma teknolojileri ile aynı kütle transfer sınırlamalarını içerir.
- Tedavi süresi nispeten uzundur (genellikle birden fazla büyüme mevsimi).
- Konuma bağlı olarak mevsimsel olabilir.
- İklimsel veya hidrolojik koşullar, bazı bitkilerin büyüme oranını kısıtlayabilir.
- Kirletici maddeler besin zincirine hayvanlar (otoburlar) veya kirletici madde içeren bitki materyali tüketen böcekler yoluyla girebilir.
- Bozunma ürünleri yer altı sularına taşınabilir veya hayvanlarda biyolojik olarak birikebilir.
- Kirlenmeyi bir ortamdan başkasına transfer eder; örneğin topraktan havaya aktarır.
- Çok soğurulmuş ve zayıf soğurulmuş kirletici maddeler için etkili değildir.
- Bitkilerin toplanmasından kaynaklanan ikincil atıkların bertarafı sorunludur.
- Biyolojik bozunma ürünlerinin toksisitesi ve biyoyararlanımı her zaman bilinmemektedir.
- Hala gösteri aşamasındadır ve düzenleyicilere yabancıdır.

1.3. Hiperakümülatör Bitkiler

Son zamanlarda, ağır metallerin fitoremediyasyon yoluyla uzaklaştırılması, özellikle de kirletici maddeleri parçalamak ve detoksifiye etmek için hiperakümülatörlerle uzaklaştırılması, etkinliği ve maliyeti nedeniyle büyük ilgi görmüştür (Ahemad, 2014). Hiperakümülatasyon yapan bitkiler, ağır metallerle kirlenmiş topraklarda yetismeye uygundur ve kirleticileri gidermek için kullanılabilir (Da Conceição Gomes, 2016). Hiperakümülatörlerin, diğer bitkilere kıyasla daha yüksek ağır metal toleransı ve biriktirme yetenekleri gösterdikleri bulunmuştur (Prasad ve Freitas, 2003). Kirlenmiş alanlarda 10.000 mg/kg' dan fazla kuru ağırlıkta Zn veya Mn veya 1000 mg/kg' dan fazla kuru ağırlıkta Ni, Cu veya Pb veya 100 mg/kg' dan fazla kuru ağırlıkta Cd içeren bitkiler, hiperakkümülatör bitkiler olarak kabul edilir. Toksik ağır metalleri akümüle ettiği bilinen bazı bitki familyaları ise; Lamiaceae, Fabaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae ve Brassicaceae' dir. Ağır metallerin fito-ekstraksiyonunda kullanılan bazı hiperakümülatör bitkiler Tablo 1.2' de özetlenmiştir (Ojuederie ve Babalola, 2017).

Bunun dışında, yaklaşık 500 bitki türünde ağır metal hiperakkümüasyonu bildirilmiştir (Jaffre ve ark., 2013). Tablo 1.3’de ağır metallerin fitoremediyasyonu için bildirilen farklı bitkilerin listesi özetlenmektedir (Dixit ve ark., 2015). Ağaçlar, daha büyük kök sistemleri ve biyokütleleri nedeniyle fitoremediyasyon için daha uygundur (Da Conceição Gomes, 2016). Ancak ağaçlar metallerin biriktirilmesinde, düşük miktarlarda bile daha fazla zaman alırlar. Bu sorun ağaçlar yerine hızlı büyüyen bitkiler kullanılarak çözülebilir (He ve ark., 2010).

Toksik ağır metallerle büyük oranda kirlenen ortamlar, birden fazla ağır metale toleranslı olan, yüksek büyüme oranlarına sahip iyi miktarda harcanabilir biyokütle üretebilen ve oldukça rekabetçi olan yetiştirilebilir hiperakümülatör bitkilerle kolayca giderilebilir (Jaffre ve ark., 2013). Bununla birlikte, hiperakümülatörlerin kullanımını sınırlayan dezavantajlar vardır; ağır metal hiperakümülatörlerinin bulunmasındaki zorluk, yavaş büyümeleri ve daha düşük biyokütle verimidir. Bu, süreci oldukça zaman alıcı yapar ve bu nedenle hızlı bir şekilde arıtma gerektiren kontamine olmuş yerler veya atık su arıtma işlemleri için uygun değildir (Xiao ve ark., 2010).

Tablo 1.2. Ağır metallerin fito-ekstraksiyonunda kullanılan bazı hiperakümülatör bitkiler

Familya	Türler	Ağır Metal
Asteraceae	<i>Berkheya coddii</i>	Ni
Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i>	Pb, Cd, Zn
Brassicaceae	<i>Alyssum bertolonii</i>	Ni
Brassicaceae	<i>Alyssum murale</i>	Ni
Brassicaceae	<i>Arabidopsis halleri</i>	Zn, Cd
Brassicaceae	<i>Arabidopsis halleri</i>	Cd Cd
Caryophyllaceae	<i>Minuartia verna</i>	Zn, Cd, Pb
Crassulaceae	<i>Sedum alfredii</i>	Pb
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia cheiradenia</i>	Cu, Fe, Pb, Zn
Fabaceae	<i>Astragalus racemosus</i>	Se
Fabaceae	<i>Medicago sativa</i>	Pb
Poaceae	<i>Spartina argentinensis</i>	Cr
Pteridaceae	<i>Pteris vittata</i>	As
Pteridaceae	<i>Pteris vittata</i>	Hg
Violaceae	<i>Viola boashanensis</i>	Pb, Zn, Cd

Tablo 1.3. Ağır metallerin fitoremediyasyonu için bildirilen bazı bitkiler

Ağır metal	Türler
Cd, Cu, Pb, Zn	<i>Salix viminalis</i> , <i>Salix fragilis</i>
Cd	<i>Ricinus communis</i>
Cd, Pb, Zn	<i>Zea mays</i>
Cd, Cu, Pb, Zn	<i>Populus deltoides</i> , <i>Populus nigra</i> , <i>Populus trichocarpa</i>
Cd, Cu, Ni, Pb	<i>Jatropha curcas</i> L.
Hg	<i>Populus deltoides</i>
Se	<i>Brassica juncea</i> , <i>Astragalus bisulcatus</i>
Zn	<i>Populus canescens</i>

1.4. Bitkilerde Ağır Metal Mekanizmasının Moleküler Temelleri

Bitkilerde ağır metallere karşı ilk savunma hattı, kalın kütikül, trikomlar ve hücre çeperleri gibi biyolojik olarak aktif dokular olan morfolojik yapılardır (Emamverdian ve ark., 2015). Genel olarak, kökler metal alımının önündeki ilk engeldir ve bitkiler, toksik elementlerin emilimini önlemek için doku reaktif oksijen türlerinin konsantrasyonlarına veya dış metal dengesizliğine yanıt olarak kök yapılarını yeniden düzenleyebilirler (Hou ve ark., 2005; Khare ve ark., 2017). Metal iyonları bu engelleri aşar ve bitkinin dokularına ve hücrelerine girerse, ağır metalin zararlı etkilerini sınırlandırmak ve hafifletmek için bitki tarafından birkaç hücrel savunma mekanizması başlatılır (Silva ve Matos, 2016). Bitki hücreleri, serbest radikallerin istenmeyen etkilerini, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimatik antioksidanlar ve askorbat, glutatyon, alkaloidler, tokoferoller, vb. gibi enzimatik olmayan antioksidanlar oluşturarak azaltır (Rastgoo ve ark., 2011; Singh ve ark., 2016).

Metal homeostazında önemli olan bir diğer faktör, ağır metal homeostazi genleridir. Bu tür genlerin birkaç alt ailesi belirlenmiştir:

P1B-ATPaz 'ların bir alt ailesi olan ağır metal ATPazlar (HMA), bitkilerde tek değerlikli (Cu^+ , Ag^+) ve iki değerlikli (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+}) ağır metal iyonlarının taşınmasında rol oynar. Arabidopsis, sırasıyla iki değerlikli ve tek değerlikli iyon homeostazını düzenleyen *AtHMA1* - *AtHMA4* ve *AtHMA5* – *AtHMA8* olmak üzere sekiz P1B tipi ATPaz'a sahiptir (Williams ve Mills, 2005). Bunların yarısı, çok sayıda proteinde kofaktör olarak görev yapan ve oksitlenmiş Cu (II) ve indirgenmiş Cu (I)

arasında geçiş yapabilen ancak aşırı miktarlarda bulunduğunda toksik olan temel bir mikro element Cu' ın homeostazında rol oynar (Burkhead ve ark., 2009). Dolayısıyla, HMA genleri grubu, esas olarak sitoplazmadan ksileme metalleri pompalayarak veya onları vakuole, golgi aparatına veya kloroplastlara taşıyarak element dengesine katılır. Plazma zarına lokalize olan *HMA5*, temel olarak köklerde ve daha sonra aşırı Cu ile düzenlenmiş bitkinin generatif organlarında eksprese edilir (Andres-Colas ve ark., 2006; Deng ve ark., 2013). *AtHMA6* ve *AtHMA8*'in Cu'ı kloroplastlara taşıdığı bilinmektedir ve *AtHMA7*' nin Cu'ı etilen reseptörlerine verdiği biliniyor (Huang ve ark., 2016).

Bununla birlikte, en çok çalışılan HMA' lar *HMA3* ve *HMA4*'tür ve Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} ve Cu^{2+} transportuna katılırlar. Hiperakümülatör olmayan bitkilerde, her iki gen de ağırlıklı olarak köklerde ifade edilir. Bazı pirinç çeşitlerinde bulunan *OsHMA3*'ün fonksiyonel olmayan bir alelinin kök sürgünündeki Cd translokasyonunu arttırdığı ve bunun sonucunda sürgünlerde ve tahıllarda yüksek Cd birikimine neden olduğu bildirilmiştir. *OsHMA4* geni, kök vakuollerinde Cu^{2+} 'nın sekense edilmesini sağlar ve tahıllardaki Cu birikimini sınırlandırır. Kök plazma membranında bulunan *HMA2*, Zn, Cd ve diğerk iki değerkli iyonların köklerden sürgünlere geçişinden sorumludur. *HMA1* kloroplastlarda iki değerkli metal homeostazında yer alır (Belykh ve ark., 2019).

Çinko-demir permeaz ailesi (ZIP) dört temel mikro besin maddesinin taşınmasında yer alır: Zn, Fe, Mn ve Cu bunlara ek olarak Cd de dahil olmak üzere çeşitli toksik ağır metallerin taşınmasında da görevlidir (Milner ve ark., 2013). oğru ZIP proteininin sekiz potansiyel transmembran alanına ve proteinin amino ve karboksitermik uçlarının plazma zarının dış yüzeyine yerleştirildiğı ve histidin kalıntıları bakımından zengin bir değışken metal bağlama bölgesinin bulunduğu bir zar topolojisine sahip olduğu tahmin edilmektedir. *A. thaliana*' da 15 ZIP geninden *AtIRT1*, *AtIRT2* ve *AtIRT3* genlerinin Fe alımı ve taşınmasında rol oynadığı ve diğerklerinin Zn (*AtZIP1*, *AtZIP2*, *AtZIP3*, *AtZIP7*, *AtZIP11* ve *AtZIP12*), Mn (*AtZIP1*, *AtZIP2*, *AtZIP5*, *AtZIP6*, *AtZIP7* ve *AtZIP9*) ve Fe (*AtZIP7*) homeostazında görev aldığı düşünölmektedir (Vert ve ark., 2001; Lin ve ark., 2009; Milner ve ark., 2013; Zelazny ve Vert, 2015).

Bitkilerde katyon difüzyon kolaylaştırıcısının (CDF) bir alt ailesi, *MTP* (Metal Tolerans Proteini) gen ailesi olarak bilinir. Bu aile, aşırı miktarda iyonun sitoplazmadan çıkarılmasını destekler. Bu grup, Zn, Mn ve Zn/Fe taşıyıcılarını içerir ve bazı *MTP*' lerin seçiciliğı son yıllarda doğrulanmıştır. *Brassica rapa*'da bulunan *CDF* genleri, Fe (10

gen), Cu (11 gen), Zn (beş gen), Mn ve Mg (her biri iki gen), Co (bir gen) ve ayrıca Na ve Cd (her biri dört gen) taşınmasında rol oynar (Belykh ve ark., 2019).

Kasyon/hidrojen⁺ antiport ailesinin (CAX), tuz toleransında rol oynadığı bilinirken, metal hiperakümülatör bitkisinin CAX'lerinin kadmiyum taşınması ve toleransı ile ilgili olduğu bulunmuştur (Pittman ve Hirschi, 2016). CAX proteinleri, bazı durumlarda sitosolik Ca²⁺ sinyalleşmesinin modülatörleri olarak çeşitli abiyotik stres tepki yollarında rol oynar, ancak bazı durumlarda, pH ve reaktif oksijen türü düzenleyicileri olarak görev yaparlar (Baliardini ve ark., 2016; Pittman ve Hirschi, 2016). Bir Ca²⁺/H⁺ antiporter olan *CAX1* ise Cd toleransında yer aldığı bilinmektedir (Mishra ve ark., 2017).

Bakır taşıyıcı proteinleri ailesi (COPT), aşırı konsantrasyon tehlikesi ve mikro besin metal eksikliğinin tehlikeli etkileri arasındaki dengeyi sağlar. Ailenin tüm üyeleri, plazma zarında yer almakta ve yedisi pirinçte (Yuan ve ark., 2011) ve altı tanesi *A. thaliana*'da (Perea-Garcia ve ark., 2013; Perea-Garcia ve ark., 2016) tanımlanmıştır. Pirinç *COPT1* ve *COPT5* köklerde ve yapraklarda ifade edilir ve *COPT4* genç bitkilerde daha yüksek ekspresyona sahip köklerde ifade edilir. *COPT2* ve *COPT3* esas olarak yapraklarda ve salkımda ifade edilir, *COPT7* yaşam döngüsü boyunca sabit ifadeli köklerde ve yapraklarda, *COPT6* ise yapraklarda ifade edilir (Yuan ve ark., 2011). *A. thaliana* *COPT1*, embriyolar, trikomal, stomalar, polenler ve kök uçlarında yüksek oranda ifade edilir ve köklerde Cu alımına aracılık ettiği bilinmektedir (Garcia-Molina ve ark., 2013). *COPT2* köklerde bulunur ve Cu alımı ve dağılımında rol oynar, ayrıca, *COPT2* Au alımına da katılır (Tiwari ve ark., 2017).

Dirençle ilişkili doğal makrofaj protein ailesi (NRAMPs), bitkiler, hayvanlar, maya ve bakteriler dahil olmak üzere organizmalarda nispeten evrimsel olarak korunur. Hücre içi bakteriyel patojenlerin hedeflendiği hayvan makrofajlarının doğal bağışıklığında önemli bir rol oynar ve iki değerli metal taşınmasında yer alır. Arabidopsis'in vakumlu membranlarında çalışan *AtNRAMP3* ve *AtNRAMP4*, muhtemelen demir homeostazına katılmaktadır. Ayrıca, her iki gen de vakuollerden Fe ve Mn akışını sağlar. Ayrıca, *AtNRAMP3* bozulması Cd direncinde bir artışa neden olur, ancak aşırı ifade, aşırı duyarlılığın artmasına neden olur. *AtNRAMP3*'ün Fe dengesine bağlı olarak Cd, Mn ve Zn transferini ayarladığı bilinmektedir (Belykh ve ark., 2019).

Fe homeostazında yer alan Basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transkripsiyon faktörleri Cd direncinde yer alır (Wu ve ark., 2012; Xu ve ark., 2017; Yao ve ark., 2018). Genler Fe aktarımını stabilize eder fakat Cd'nin yer değiştirmesini köklerden

sürgünlere azaltır. bHLH104'ün, Cd atılımında ve toleransında rol oynayan ağır metal detoksifikasyonu ile ilişkili *IREG2*, *MTP*, *HMA*, *ZIP* ve *NAS* ailelerinin genlerini pozitif olarak düzenlediği gösterilmiştir (Wu ve ark., 2012; Yao ve ark., 2018).

Fitoşelatinler (PC'ler), nikotinamid (NA), glutatyon, amino asitler, metalotiyoninler (MT'ler) ve defensinler gibi düşük molekül ağırlıklı şelatörler, toksik iz metallerine bağlanıp şelatlarlar. Sitosoldeki serbest Cd iyon konsantrasyonunu azalttığı bilinen *PDF2.6* defensin, diğer şelatlayıcılarla kompleksleşir ve vakuolde lokalize olur veya floem ve ksilem vasıtasıyla üst parçalara aktarılır. Bu bileşikler arasında, metalotiyoninler, metalotiyonin benzeri proteinler ve defensinler, gen ekspresyonunun doğrudan ürünleridir. Diğerlerinin seviyeleri, sırasıyla PC veya NA için fitoşelatin sentaz ve nikotinamid sentaz gibi biyosentezlerinde yer alan enzimlerin aktivitesini gerektirir (Belykh ve ark., 2019).

Glutatyon ve PC seviyelerinin düzenlenmesini kontrol eden glutatyon sentaz (GS) ve fitoşelatin sentaz (PCS) gibi enzimleri kodlayan genlerin ağır metal toleransının sağlanması için aday genler olduğu bildirilmiştir. Birçok bitki türünde ve mayada bu enzimatik genlerin aşırı ifade edilmesi yüksek seviyelerde ağır metal birikimi ve toleransına neden olabilmektedir.

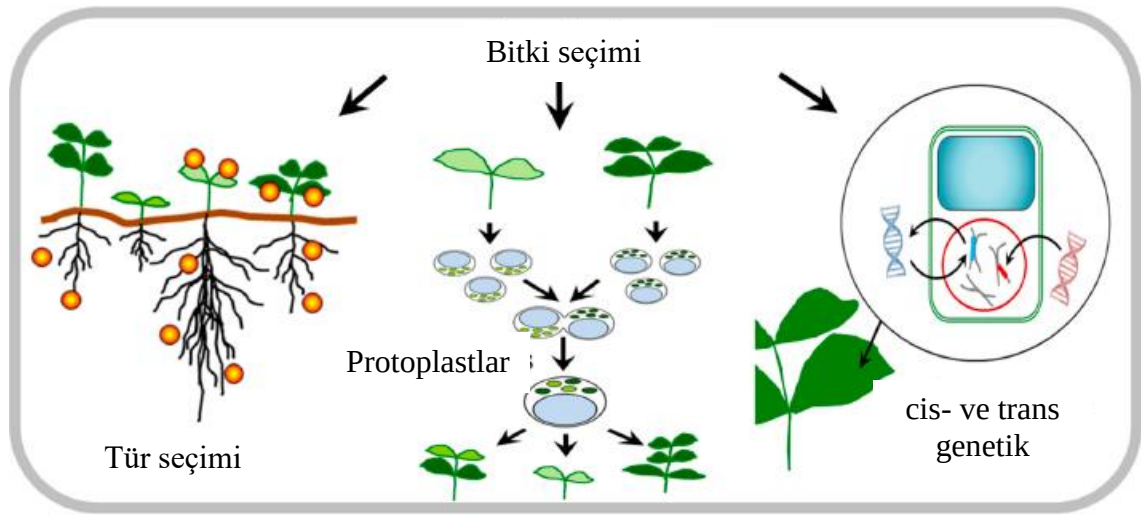
Ağır metal toleransında önemli rolleri olduğu ileri sürülen PC'lerin biyosentezi, ifadesi, düzenlenmesi ve fonksiyonu üzerine moleküler düzeyde çalışmalar olmasına rağmen, bu proteinlerin fonksiyonları halen tartışma konusudur. Bu nedenle, bu tez çalışmasında PC seviyelerinin düzenlenmesini kontrol eden fitoşelatin sentaz (PCS) enzimini kodlayan PCS genlerinin farklı bitki kaynaklarından izolasyonu ve uygun bitki klonlama vektörüne klonlanması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Fitoremediyasyonda Güncel Biyoteknolojik Yaklaşımlar

Genomik, proteomik, transkriptomik ve metabolomik gibi omik teknolojilerdeki son gelişmeler, fitoremediyasyon teknolojilerinin faydalarını maksimize eden özelliklerin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Fitoremediyasyon teknolojisinin ana kısıtı, bitki ömrünü kısaltan ve uçucu hale gelerek atmosfere salgılanan kirleticilerin veya metabolitlerinin, bitki dokularında birikmesidir. Bu problem, bitkilerin çeşitli inorganik kirleticilere karşı metal toleransı, birikimi ve bozulma potansiyelinin manipülasyonu ile minimize edilebilir.

Bitki biyokütlesini, metal alımını veya metal toksisitesine toleransı artırarak fitoremediyasyon verimliliğinin artırılması, yeni fitoremediyasyon programlarının geliştirilmesinde önemli bir adımdır. Fitoremediyasyonun etkinliği şekil 2.1’ de resmedildiği gibi, geleneksel yaklaşımlarla (örneğin bitki ıslahı veya hibridizasyonu ve seçimi gibi) veya uygun fenotiplerle bitkilerin gelişimine katkıda bulunan biyoteknolojik tekniklerle yani tasarımcı bitkilerin oluşturulması ile iyileştirilebilir (DalCorso ve ark., 2019).



Şekil 2.1. Fitoremediyasyon için seçilecek en faydalı bitki türlerinin, çeşitli seçeneklere göre, klasik ıslah (örn., Somatik hibridizasyon) veya transgenik yaklaşım yoluyla seçimi

Tasarımcı bitki yaklaşımı kullanılarak, metallerin parçalanmasından sorumlu olan bakteri genleri bitkilerde de metallerin parçalanmasına izin vermek için bitki dokularına sokulabilir (Van Aken ve ark., 2011). Çeşitli ağır metal kirleticiler için genetik olarak işlenmiş olan bitkiler ile gerçekleştirilen biyoremediasyon uygulaması, uygun maliyetli ve çevre dostu olması ve fizikokimyasal stratejilere göre insan sağlığına daha az tehlikeli olması sebebiyle ön plandadır (Singh, 2011). Transgenik bitkide detoksifikasyon ve inorganik kirletici maddelerin birikimi için çeşitli mikrobiyal genler kullanılabilir (Maestri ve Marmiroli, 2011). Metalotiyoninler ve fitoşelatinler gibi metal-detoksifiye edici şelatörler, çeşitli ağır metallerin alımını, taşınmasını ve birikmesini arttırarak bitkiye direnç sağlayabilir (Ruis ve Daniell, 2009). Benzer şekilde, bakteriyel redüktaz taşıyan transgenik bitkiler, bitki sürgünlerinde arsenik biriktirirken Hg ve Se'nin uçuculuğunu artırabilir (Maestri ve Marmiroli, 2011; Bitther ve ark., 2012). Kavak, söğüt ve *Jatropha* gibi hızlı büyüyen ve aynı zamanda yüksek biyokütle üreten bitkiler hem bitki örtüsü oluşturmada hem de enerji üretiminde kullanılabilir. Bununla birlikte, metallerin topraktan veya sudan transferi sorunu çözmez ve enerji üretmek için kontamine olmuş metalle kirlenmiş bitki malzemelerinin yakılması, metalleri atmosfere salıverir ve sorunu topraktan veya sudan havaya taşır. Dolayısıyla, bu tür metal biriktiren biyokütle, çevre için herhangi bir tehlike oluşturmayacak şekilde uygun şekilde depolanmalı veya atılmalıdır.

Hızlı büyüyen ve yüksek biyokütle üreten bitkilerin arasında kavak, hızlı büyüme oranı ve kısa bir süre içinde (5-8 yıl) yüksek biyokütle üretme potansiyeli nedeniyle en fazla araştırılanıdır. Kavak melezi çeşitlerinin birçoğu, remediasyon potansiyelini arttırmak için mikrobiyal katabolik genler ve spesifik taşıyıcılar ile genetik olarak modifiye edilmiştir (Gullner, 2001; Doty, 2007). Örneğin cıva redüktaz ve γ -glutamilsistein sentetaz genleri aktararak, Hg, Cd ve Cu'ya karşı direnç artışı ve bu metallerin daha yüksek konsantrasyonlarının birikmesi sağlanmıştır (Gullner, 2001; Bittsanszky ve ark., 2005). Daha önce belirtildiği gibi, istenen bitki türlerinin çoklu genlerle manipülasyonu, hem biyokütlenin ek faydalar için kullanılmasını sağlarken hem de kirleticilerin tamamen bozulmasını kolaylaştıracaktır (Abhilash ve ark., 2012).

Fitoremediasyon verimliliğini arttırmak için, yabanil hiperakümülatör türlerinin ağır metal birikimi ve toleransı ile ilişkili genetik belirleyiciler, önemli ölçüde yüksek biyokütleli bitkilerin genomuna sokulabilir (Dushenkov ve ark., 2002). Örneğin, *B. juncea* protoplastları, *Noccaea caerulescens*' in metal direnç yeteneğini *B. juncea*'ya somatik hibridizasyonla aktarmak için *N. caerulescens* protoplastları ile

kaynaştırılmıştır. Hibrit bitkiler, *N. Caerulescens* ait yüksek Zn ve Ni birikim potansiyelini ve toleransını ve *B. juncea*'ya özgü yüksek biyokütle üretimini göstermiştir (Brewer ve ark., 1999).

Klasik ıslah ve genetik yaklaşımlar kullanılarak elde edilen pozitif sonuçlara rağmen, moleküler mühendislik yöntemleri de kirlenmiş alanların ıslahı için bitki fitoremediyasyon potansiyelini ve verimliliğini arttırmada yardımcı olabilir. Hem nükleer hem de sitoplazmik genom transformasyonu için hâlihazırda kullanılan rekombinant DNA teknolojileri ve farklı bitki türleri için genom dizilerinin mevcudiyeti, arzu edilen belirleyicilerin, hiperakümülatör türlerden, yüksek biyokütle mahsullerine ve fitoremediyasyon için uygun olan diğer türlere de transferine izin verir. Örneğin, oksidatif strese cevap vermek veya hiperakümülatör bitkilerin biyokütle üretimini artırmak için metal alımı, taşınması, birikmesi ve detoksifikasyonundan sorumlu olan genlerin metal toleransını ve birikimini arttırmak için genetik mühendisliği kullanılabilir (Fasani ve ark., 2018). Doğu pamuk ağacı bitkisi, *Escherichia coli*'den izole edilmiş ve modifiye edilmiş *merA* (Hg^{2+} yi bitkiler tarafından uçurolabilen ve daha az toksik olan Hg^0 'a dönüştüren merkürük iyon redüktaz) ve *merB* (organik Hg'yi Hg^{2+} 'ya çeviren organomerkülür liyaz) genleri aktarılarak cıva ile kontamine olmuş olan alanların ıslahı için genetik olarak tasarlanmıştır. *MerA/merB* aktarılan bitkiler, fenilmerkürük asetatlara, yabancı tip kontrollere göre daha dirençli olduğu ve organik Hg' yi daha verimli bir şekilde detoksifiye edebildiği görülmüştür (Lyyra ve ark., 2007).

Bitki fitoremediyasyon potansiyelini geliştirmek için şu anda yaygın olarak kullanılan genler, metal iyonlarının taşıyıcılarını kodlayan genlerdir (Fasani ve ark., 2018). Örneğin, Shim ve ark. (Shim ve ark., 2013) vakuol içine toksik metal tecritinde yer alan bir vakuolar taşıyıcıyı kodlayan maya *ScYCF1* genini (*Saccharomyces cerevisiae* - maya kadmiyum faktörü 1) eksprese eden (anlatımını yapan) genetik olarak tasarlanmış Bonghwa kavak (*Populus alba* x *P. tremula* var. *glandulosa*) hatları üretmiştir. Bu hatlar Güney Kore'de bir maden sahasında ağır metalle kirlenmiş bir toprakta büyütüldüğünde, *ScYCF1* genini ifade eden bitkilerde Cd toksisite semptomlarında azalma ve yabancı bitkilere kıyasla çok daha fazla Cd biriktirme özelliği gözlenmiştir. Bitkiler tarladaki kirlenmiş toprakta test edildiğinde ise, kuru ağırlık ve transgenik köklerde Cd, Zn ve Pb birikimi yabancı tiplere göre anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur ve bu durum kirlenmiş topraklarda bu hatların uzun

sürekli fito-ekstraksiyonda ve yüksek derecede fitostabilizasyonda potansiyel kullanımı olabileceğini göstermiştir (Shim ve ark., 2013).

Genetik mühendislik araçları arasında, kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) -Cas9 sistemi, farklı aday organizmalarda geniş bir gen yelpazesinde kullanılmak için oldukça dikkat çekicidir. CRISPR-Cas9 teknolojisi, bitkilerde seçilen özellikleri geliştirmek için kullanılabilecek spesifik DNA dizilerini hedef alan devrim niteliğinde ve çok yönlü bir gen düzenleme aracıdır (Didovyyk ve ark., 2016). Bu nedenle, bu teknik, kirli topraklar ve sulara karşı fitoremediyasyon potansiyelini arttırmak için, bitki genomunda istenen bir gen setini transfer etmek veya modüle etmek için kullanılabilir. Fitoremediyasyon için düşünülebilecek hipertolerant/hiperakümülatör model bitki türlerinin genom dizilerinin mevcudiyeti (örneğin; Cd, Ni ve Zn hiperakümülatörü *N. caerulea*, Cd ve Zn hiperakümülatörü *A. halleri* veya As hiperakümülatörü *P. vittata* gibi) ve biyoinformatik araçların ilerlemesi, CRISPR-Cas9 genom düzenleme sisteminin, bitki fitoremediyasyon potansiyelinin geliştirilmesinde kullanımı için yeni fırsatlar yaratmıştır (Basharat ve ark., 2018).

CRISPR-Cas9 teknolojisi, metal ligandlarının sentezinde rol oynayan veya metal taşıyıcı proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonunu ortaya koymak ve modüle etmek için kullanılabilir (Basharat ve ark., 2018). Günümüzde, bu tekniğin potansiyeline rağmen, genom düzenlemedeki uygulamaları hala bu alanda erken bir aşamadır. Ancak, CRISPR-Cas9 sisteminin tesislerde metal içeriğinin azaltılması için başarıyla kullanıldığı bir kaç rapor mevcuttur. CRISPR-Cas9 sistemi kullanılarak, pirinç metal taşıyıcı gen *OsNRAMP5* için yeni pirinç hatları nakavt edildi. Bu bitkiler sürgünlerde, köklerde ve hububatlarda, hidroponik kültür üzerinde ve Cd ile kirlenmiş çeltik tarla denemelerinde düşük Cd birikimi göstermiş ve yabanıl tipe benzer biyokütle ise korunmuştur (Tang ve ark., 2017). Bu çalışma, CRISPR-Cas9 sisteminin, fitoremediyasyon yoluyla sürdürülebilir çevre temizliği sağlamak için kullanılabilecek, modifiye edilmiş ağır metal içerikli bitkilerin geliştirilmesi için potansiyelinin iyi bir örneğidir.

Ek olarak, fitoremediyasyon için, CRISPR teknolojisinin daha yetenekli bakteri suşları oluşturmak için kullanılabildiği bitki büyümesini teşvik edici rizobakteriler (PGPR) ile bitki ilişkisinden de faydalanılabilir (Basharat ve ark., 2018). CRISPR-Cas9 teknolojisinin bitkilere ve PGPR'ye uygulanması, biyokütle verimini ve/veya ağır metal

toleransı, birikimi ve detoksifikasyonunu arttırabilir ve böylece fitoremediyasyon programlarında uygulama potansiyellerini arttırmak için kullanılabilir.

2.2. Bitkilerde Metal Toleransı ve Birikiminin Genetik Düzenlenmesi Örnekleri

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar ile metal fazlalığına karşı bitki toleransını geliştirmek için önemli çabalar sarf edilmiştir. Örneğin; Cd ve diğer metallere karşı artan direnç, metal homeostaz genlerinin heterolojik aşırı ekspresyonu ile Tablo 2.1' deki 1-15 çalışmalarında elde edilmiştir (Belykh ve ark., 2019). Promotörde, diğer bitki kısımlarında veya bütün bitki gövdesinde ifade edilen başka bir gene ait olan bir değişiklik durumunda benzer bir etkiye ulaşılabilir. Pirinç ağır metal ATPaz' ları ile yapılan bir çalışma bunu doğrulamaktadır. *OsHMA2* gen promotörünün altında (köklerde ve boğumlarda ifade edilir) *OsHMA3* geninin (doğal olarak pirinç kök hücrelerinin tonoplastında ifade edilir) ifade edilmesi, köklerde ve düğümlerde daha fazla çalışmaya başlamasına neden olur (Shao ve ark., 2018)

Ferritin geninin tohum depolama proteini glutelin *GluB-1* promotörü altında aşırı ifadesinin, buğday tanesinde Fe birikimini arttırdığı gösterilmiştir. *A. thaliana*' da mısır *ZmZIP7* geninin aşırı ekspresyonu, tohumlarda artmış demir depolanması ile sonuçlanmıştır. Doğal Fe ve Zn alım genlerinin, *ZmZIP7* ve iki diğer ZIP aile genleri, *ZmZIP3* ve *ZmIRT1*'in Arabidopsis genomuna dahil edilmesinden sonra verici bitkide regülasyonda da etkili oldukları bulundu. Fe ve Zn metallerinin kökten gövdeye translokasyonunda yer alan genlerin baskılanması, *ZmZIP3* ve *ZmIRT1* ile transforme edilmiş bitkiler ile gösterilmiştir; sürgünlerde metallerin azalmasıyla sonuçlanmıştır, ancak *ZmIRT1* aşırı ekspresyonu altında, Arabidopsis tohumlarının Fe yönünden zenginleştiği kaydedilmiştir (Belykh ve ark., 2019).

Ayrıca, metal homeostazisinde yer alan genlerin yönelimli aktivasyonu nedeniyle, transkripsiyon faktörlerinin heterolojik aşırı ekspresyonunda da başarıya ulaşan çalışmalar mevcuttur.

Tablo 2.1. Bitkilerde metal toleransı ve birikiminin genetik düzenlenmesi örnekleri (Bir genin aşırı ekspresyonu deneyleri, knockout (nakavt) deneyleri, birden fazla genin aşırı ekspresyonu deneyleri)

Gen Adı	Etkisi	Verici Organizma	Alıcı Organizma
Bir genin aşırı ekspresyon deneyleri			
1 PtABCC1	Hg toleransında artış	<i>P. trichocarpa</i>	<i>A. thaliana</i>
2 H ⁺ -ATPaz (V-ATPaz)	Cd toleransında artış	<i>Jugans regia</i>	<i>A. thaliana</i>
3 VsPCS1	Cd alımında artış	<i>Vicia sativa</i>	<i>A. thaliana</i>
4 AtPCS1	Köklerde Cd ve As birikiminde artış	<i>A. thaliana</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
5 GmORG3	Cd toleransında artış	<i>Glycine max</i>	<i>N. tabacum</i>
6 GmORG3	Sürgünlere Fe translokasyonunun artışı, Cd translokasyonunun azalması	<i>G. max</i>	<i>G. max</i>
7 AtMTP1 under A. hallery promoter	Zn toleransında artış	<i>A. halleri</i>	<i>A. thaliana</i>
8 SaNRAMP6	Yapraklarda Cd birikiminin artışı	<i>S. alfredii</i>	<i>A. thaliana</i>
9 CsMTP9	Mn ve Cd aşırılıklarına karşı direnci artırır, metallerin köklerden sürgünlere taşınımını artırır	<i>Cucumis sativus</i>	<i>A. thaliana</i>
10 CsMTP8	Yüksek Mn'ye toleransı ve Mn birikimini artırır	<i>C. sativus</i>	<i>A. thaliana</i>
11 TaHMA2	Kök uzunluğunu, taze ağırlığı ve Zn, Cd' un köklerden sürgünlere taşınımını artırır	<i>Triticum aestivum</i>	<i>A. thaliana</i>
12 NcZNT1 (AtZIP4 ortoloğu)	Zn, Cd fazlalığına toleransı, Cd ve Zn birikimini artırır	<i>N. caerulea</i>	<i>A. thaliana</i>
13 OsMTP1	Cd toleransında ve birikiminde artış, gelişmiş tiyol içeriği, orta derecede As toleransı	<i>O. sativa</i>	<i>N. tabacum</i>
14 OsMTP11	Mn toleransında artış, köklerde ve sürgünlerde Mn birikiminde azalma	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>
15 ZmZIP7	Fe ve Zn fazlalığına ve hem metallerin köklerde hem de sürgünlerde birikmesine karşı direnç artışı; Tohumlarda Fe depolanmasını artırır.	<i>Zea mays</i>	<i>A. thaliana</i>
16 AtHMA4	Metal homeostazi genlerinin yeniden düzenlenmesi	<i>A. thaliana</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
17 Zm ZIP3	Köklerde Zn birikiminde artış ve sürgünlerde azalma	<i>Z. mays</i>	<i>A. thaliana</i>
18 ZmIRT1	Tohum ve köklerde Fe ve Zn birikiminde artış, sürgünlerde azalma	<i>Z. mays</i>	<i>A. thaliana</i>
19 OsO3L2, OsO3L3	Tahıllarda Cd birikiminde azalma; Tahıldaki Cu, Fe, Mn ve Zn konsantrasyonu etkilenmemiştir	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>

20 AtHMA4 tam uzunluktaki gen, C-terminal bölgesi eksik, yalnız C-terminal bölgesi, CaMV35S promotörünün altında	Tam uzunluktaki gen, Zn alımını sadece 10 μ M artırırken, Cd alımını değiştirmemiştir. C-terminal bölgesinin eksikliği Cd ve Zn alımı üzerinde etkisi yoktur. C-terminal bölgesi ekspresyonu Cd ve Zn alımını ve sürgünlere translokasyonu arttırmıştır	<i>A. thaliana</i>	<i>N. tabacum</i>
21 AtHMA4 (tam uzunlukta) CaMV35S promotörünün altında	Cd'deki azalma ve ayrıca sürgünlerde diğer mikro elementlerin (B, Co, Cu, Ni, Mo, Zn) birikimi, kök lignifikasyon seviyesinin artışı gözlenmiştir. Nt ZP1 ve SIRT1 seviyelerinin artması Fe ve Zn eksikliğine neden olmuştur.	<i>A. thaliana</i>	<i>N. tabacum</i>
22 Ferritin GluB-1 promotörü altında	Cd ve Cu değerlerinde azalma ve tahılda Zn ve Fe birikiminde artış	<i>Medicago falcata</i>	<i>T. aestivum</i>
23 OsHMA3, OsHMA2 promotörü altında	Tahılda Cd birikiminde azalma ve diğer organlarda Cd birikiminde artış	<i>O. sativa</i>	<i>O. sativa</i>
24 AtCOPT1	Pirinç Fe-homeostazı genlerinin modifiye edilmiş ifadesi; Genç yapraklarda Cu ve Fe artırır	<i>A. thaliana</i>	<i>O. sativa</i>
25 NtPIC1	Artan klorofil seviyesi; Köklerde düşük, sürgünlerde yüksek Fe,; düşük Cd birikimi	<i>N. tabacum</i>	<i>N. tabacum</i>
26 SnYSL3	Köklerde Fe ve Mn birikiminde azalma, bu metallerin sürgünlere translokasyonunun artışı Cd ve Fe'de artış, Mn translokasyonunda artış gözlenmemiştir	<i>Solanum nigrum</i>	<i>A. thaliana</i>
27 TaCNR2	Cd, Zn ve Mn'nın sürgünlere taşınımının artışı ve tane kabuğunda birikimi	<i>T. aestivum</i>	<i>O. sativa</i>
28 TuCAX1a, TuCAX1b	Ca, Zn toleransında artış, Ca, Zn sürgünlere translokasyonunun artışı	<i>Triticum urartu</i>	<i>A. thaliana</i>
29 AtIREG2	Yüksek Ni konsantrasyonuna toleransın artışı	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>
30 TuCNR10	Artan Cd, Zn, Mn toleransı, sürgünlere translokasyon artışı, ancak pirinç taneleri Zn ve Mn biriktirir ancak Cd gözlenmez.	<i>T. urartu</i>	<i>A. thaliana O. sativa</i>
31 AtCAX2 AtCAX4	Kök boşluklarına Cd ve Zn taşınımını artırmak	<i>A. thaliana</i>	<i>N. tabacum</i>

Knockout (nakavt) deneyleri ve doğal allelik varyasyon seçimi

32 OsHMA3 aminoacid mutation	Sürgün ve tahıllarda Cd birikiminde artış	<i>O. sativa</i>	
33 OsHMA4 allelic variation	Kök boşluklarında Cu birikimi ve eş zamanlı olarak tahılda Cu birikimine karşılık gelen değişiklikler	<i>O. sativa</i>	

34 OsLCT1	Tahılda Cd birikiminde azalma	<i>O. sativa</i>	
35 HMA5 NRAMP5	Cu fazlalığında köklerde Cu birikiminde artış Büyüme ve tahıl veriminde azalma, köklerde ve sürgünlerde Mn ve Cd'de düşük birikim	<i>A. thaliana</i> <i>O. sativa</i>	
36 COPT2	Cu ve Fe eksikliğine karşı artan direnç	<i>A. thaliana</i>	
37 COPT5	Artan Cd toksisitesi	<i>A. thaliana</i>	
38 COPT6	Yapraklarda Cu birikiminin artışı ve tohumlarda azalışı	<i>A. thaliana</i>	
39 AtABCC1, AtABCC2	Cd'ye artan duyarlılık	<i>A. thaliana</i>	
40 Nramp2 AtNRAMP3, AtNRAMP4 double knockout	Fotosistem II aktivitesinin azalması, oksidatif stresin artması ve Mn eksikliğinde vakuol ve kloroplastlarda Mn azalması Yabanıl tipe kıyasla vakuollerde artan Mn birikimi; fotosistem II işlevinde azalma	<i>A. thaliana</i>	
Birden fazla genin aşırı ekspresyon deneyleri			
41 FIT + AtHLH38 FIT + AtHLH39	Cd toleransında artış, sürgünlere daha düşük Cd translokasyonu, diğer metal tolerans genlerinde aktivite değişikliği	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>
42 ThWRKY7 + ThVHAc1	Artan Cd toleransı	<i>Tamarix hispida</i>	<i>A. thaliana</i>
43 AtIRT1 + AtNAS + PvFER	Tahıllarda Fe ve Zn birikiminde artış, Fe eksikliğinde daha iyi büyüme	<i>A. thaliana</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>O. sativa</i>
44 AtNRAMP3 + AtNAS + PvFER ya da AtNRAMP3 + PvFER	Cilalı tanelerde Fe ve Zn artışı	<i>A. thaliana</i> , <i>P. vulgaris</i>	<i>O. sativa</i>

2.3. PCS Geninin Aşırı Ekspresyonu Deneyleri

Sistein bakımından zengin tiyol reaktif peptidlerin bir ailesi olan fitoşelatinler (PC), bitkilerde metal iyonlarının homeostatik kontrolünde merkezi bir rol oynamaktadır. Bitkilerde PC sentezi için, substrat olarak indirgenmiş glutatyon (GSH) kullanılır ve fitoşelatin sentaz (PCS) (EC 2.3.2.15) olarak adlandırılan bir γ -glutamil sisteinil dipeptidil transpeptidaz tarafından katalize edilir (Vatamaniuk ve ark., 2000). Fitoşelatinler, çeşitli ağır metallere ve metaloidlere bağlanır ve bunları fitoremediyasyon için iyi adaylar haline getirir. Fitoşelatin sentaz, bitkilerde ağır metallere karşı toleransı arttırmak için bir strateji olarak kullanılabilir.

1999'dan beri PCS' yi şifreleyen birkaç gen, farklı organizmalardan klonlanmıştır; örneğin, *OsPCS1* (pirinç), *TaPCS1* (buğday), *AtPCS1* (*Arabidopsis*) ve *CePCS1* (*Caenorhabditis elegans*) ve metal toleranslı *Brassica juncea* ve sarımsak (*Allium sativum*) bitkilerinden *BjPCS1* ve *AsPCS1* (Vatamaniuk ve ark., 1999; Clemens ve ark., 2001; Heiss ve ark., 2003; Zhang ve ark., 2005).

Çalışmalar, PC biyosentezinde yer alan genlerin aşırı ekspresyonu sonucu, transgenik bitkilerde ağır metallerin ve metaloitlerin birikimini ve toleransını arttırdığını göstermiştir.

Daha yüksek biyokütleyle sahip transgenik bitkiler geliştirmek için, bir buğday PCS geninin (*TaPCS1*) aşırı ekspresyonu ile gerçekleşecek olan biyoteknolojik modifikasyon için bir tütün türü seçilmiştir ve tasarlanan başka bir tütün bitkisi, 100 kat daha fazla biyokütle üretilip ve maden topraklarında *Thlaspi caerulescens*' ten daha yüksek seviyelerde ağır metal biriktirmiştir (Gisbert ve ark., 2003).

Arabidopsis thaliana'da sarımsak ve fırıncı mayasından türetilen *AsPCS1* ve *GSH1* genleri aynı anda aşırı ifade edilmiştir. Bu tür aşırı ekspresyonun transgenik bitkilerde Cd ve As toleransı ve biriktirme kabiliyetini artırıp arttırmadığı araştırılmıştır. Tek genli transgenik hatlar, yabani tipten daha fazla Cd ve As toleransına sahip olup daha fazla oranda bu metallerin birikimini gerçekleştirmiştir. Tek genli transgenik hatlarla karşılaştırıldığında, çift genli transformantlar, Cd ve As metallerine karşı önemli ölçüde daha yüksek tolerans sergilemiştir ve daha fazla oranda birikim gerçekleştirmişlerdir. Çift genli transgenik hatlardan biri olan PG1, tek genli transgenik hatlara göre Cd miktarının iki katını biriktirmiştir (Guo ve ark., 2008).

AtPCS1'i aşırı eksprese eden transgenik *Arabidopsis* bitkileri, Cd aşırı duyarlılık sergilerken (Li ve ark., 2004) buğday *TaPCS1*'i eksprese eden transgenik tütün bitkileri Cd toleransında hafif bir artış göstermiştir (Gisbert ve ark., 2003).

Hint hardalı (*B. juncea* L.) içinde PCS şifreleyen bir *Arabidopsis thaliana* *AtPCS1* genini eksprese ederek, ağır metallerin ve metaloidlerin topraktan birikmesine karşı toleransı arttırılmış transgenik bitkiler geliştirilmiştir (Gasic ve Korban, 2007).

Yapılan başka bir çalışmada, bir *AtPCS* geni, *in planta* transformasyon protokolü kullanılarak pirinçte aşırı eksprese edilmiştir. Çalışmada, seçilen transgeniklerin üç farklı CdCl₂ stres seviyesine (50, 75 ve 125 µM) maruz kalmaları üzerine artmış Cd seviyeleri biriktirebileceği belirlenmiştir (Venkataramaiah ve ark., 2011).

PC sentezini, metal birikimini ve metal toleransını artırmak amacıyla Arabidopsis'te bir Arabidopsis PC sentazını (*AtPCS1*) aşırı ifade eden transgenik bitkiler elde edilmiştir. Bu transgenik bitkiler, yabanıl tip bitkilere kıyasla, 3 gün boyunca 85 μM CdCl_2 stresi altında 1.3 ila 2.1 kat daha fazla PCs üretimi gerçekleştirmiştir. Ancak Cd stresine aşırı duyarlılık göstermişlerdir ve bu aşırı duyarlılık, çinko (Zn) için de gözlenip, bakır (Cu) için gözlenmemiştir (Lee ve ark., 2003).

Akümülatör bitki olmayan *Nicotiana tabacum*'da Arabidopsis fitoşelatin sentaz geni (*AtPCS1*) aşırı ifade edilmiştir. Yabanıl tip bitkiler ve *Agrobacterium rhizogenes* rolB onkojeni barındıran bitkiler, bir 35S-*AtPCS1* kaseti ile transforme edilmiştir. Kültürlenmiş rolB köklerinde Cd^{2+} toleransı, *AtPCS1*'in aşırı ekspresyonu sonucu artmıştır ve kültür ortamına indirgenmiş glutatyon (GSH, *PCS1*'in substratı) eklendiğinde daha da çok arttığı gözlenmiştir. Tüm fidelerde *AtPCS1*'nin aşırı ekspresyonu ile, hem rolB hem de yabanıl tip fidelerin köklerinde ve sürgünlerinde Cd^{2+} birikiminde iki kat bir artışa neden olmuştur. Benzer şekilde, yetişkin bitkilerde hem köklerde hem de sürgünlerde daha yüksek PC üretimi ile bağlantılı Cd^{2+} birikiminde önemli bir artış gözlenmiştir (Pomponi ve ark., 2006)

Buğday *PCS1* geninin (*TaPCS19*), *Nicotiana glauca* bitkisinde aşırı ekspresyonu, Cd^{2+} ve Pb^{2+} toleransını ve bitkilerinin Pb^{2+} birikimini büyük ölçüde arttırmıştır. Ayrıca, *TaPCS1* ifadesinin yapraklarda Cd^{2+} taşınımına izin verdiği de gözlenmiştir (Gong ve ark., 2003).

Wojas ve arkadaşları tarafından 2008'de gerçekleştirilen bir çalışmada, *AtPCS1* ve *CePCS*'nin aşırı ifadesinin tütünde (*N. tabacum* var. Xanthi) etkilerini karşılaştırmakta ve tekli homolog genlerin eklenmesinin, istenen etkinin zıttına yol açan farklı bir ölçüde hücrel metabolik yolları nasıl etkilediğini göstermektedir. WT (Wild type: yabanıl tip) ve *CePCS* transformantlarının aksine, *AtPCS1*'i aşırı eksprese eden bitkiler, çalışılan hatlar arasında kadmiyum birikiminde önemli bir fark olmamasına rağmen, Cd-hipersensitifti. Ek olarak, *AtPCS1* transformantlarındaki PCS aktivitesi, *CePCS* ve WT bitkilerinden yaklaşık 5 kat daha yüksekti. *AtPCS1* eksprese eden bitkilerde, çarpıcı bir şekilde γ -glutamilsistein birikimi ve buna bağlı olarak güçlü glutatyon tükenmesi görülmüştür. Buna karşılık, *CePCS* transformantlarında, glutatyon seviyesinde daha küçük bir azalma ve γ -glutamilsistein konsantrasyonunda daha az belirgin bir değişiklik fark edilmiştir. *AtPCS1* ekspresyonu nedeniyle NPT (protein olmayan tiyoller) kompozisyonundaki belirgin değişiklikler, düşük SH:Cd oranlarıyla

yansıtılan orta derecede azalmış Cd-detoksifikasyon kapasitesine ve muhtemelen Cd-hassasiyetindeki artışı açıklayan daha yüksek oksidatif strese yol açmıştır. Sonuçlar, PCS genlerini aşırı eksprese eden bitkilerin kadmiyuma karşı tepkilerinin, transgenler tarafından üretilen fitoşelatin sentaz aktivitesinde türlere bağlı farklılıklardan kaynaklanabileceğini göstermektedir (Wojas ve ark., 2008).

Bu çalışmalar baz alınarak denilebilir ki, bir model organizmada farklı türlerden PCS genlerinin aşırı ekspresyonu, fonksiyonları hakkında önemli bilgiler verebilir ve araştırmacılar tarafından sorulan bazı soruları cevaplayabilir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali

Bu tez kapsamında bitki materyali olarak *A. thaliana* (farekulağı teresi) ve *C. demersum* (tilki kuyruğu) bitkileri kullanılmıştır. *A. thaliana* Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Tarımsal Genetik Mühendisliği Bölümü'nden temin edilmiştir. *C. demersum* bitkisi ise Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü'nden ve akvaryum süs bitkisi olarak ticari araçlardan elde edilmiştir.

3.2. Genomik DNA İzolasyonu

Fitoşelatin sentaz (PCS1) geni *A. thaliana* ve *C. demersum* (tilki kuyruğu) bitkilerinden izole edilmiştir. Gen izolasyonu için, genomik DNA, bitki DNA ekstraksiyon kiti (Thermo Scientific GeneJET Bitki Genomik DNA Pürifikasyon Mini Kit, K0791) kullanılarak *A. thaliana* yapraklarından izole edilirken, *C. demersum* bitkisinden ise tüm bitki dokusu kullanılmıştır. DNA izolasyonu aşağıda verilen protokol takip edilerek gerçekleştirilmiştir.

- 100 mg bitki dokusu üzerine sıvı nitrojen eklenerek havan içinde havaneli ile iyice ezilir.
- Ezilmiş bitki dokusu, 350 µL Liziz tamponu A içeren 1,5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılır. İyice karıştırmak için 10-20 saniye vortekslenir.
- 50 µL Liziz Tamponu B ve 20 µL RNaz A eklenir.
- Numune çalkalayıcı inkübatörde 10 dakika boyunca 65 °C'de inkübe edilir.
- 130 µL Presipitasyon Solüsyonu eklenir ve tüp 2-3 kez ters yüz edilerek karıştırılır. Buz üzerinde 5 dakika inkübe edilir.
- 14.000 rpm' de 5 dakika santrifüjlenir.
- Süpernatant toplanır (450-550 µL) ve temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılır. 400 µL Bitki gDNA Bağlama Solüsyonu ve 400 µL %96 etanol eklenir ve iyice karıştırılır.

- Hazırlanan karışımın yarısı (600-700 μ L) kolon tüpe aktarılır. 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir. Kolon tüpün altındaki çözelti atılır ve kalan karışım aynı kolon tüpe eklenir. 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir.
- Kolona 500 μ L Yıkama Tamponu I eklenir. 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir. Kolon tüpün altındaki çözelti boşaltılır ve kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilir.
- Kolona 500 μ L Yıkama Tamponu II eklenir. Maksimum hızda (14.000 rpm) 3 dakika santrifüjlenir. Toplama tüpünü boşaltılır. Arıtma kolonu tekrar tüpün içine yerleştirilir ve 1 dakika boyunca maksimum hızda (14.000 rpm) tekrar döndürülür. Akış çözeltisini içeren toplama tüpü atılır ve kolon steril bir 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.
- Kolon membranının merkezine 100 μ L Elüsyon Tamponu eklenir, oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir ve 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir.
- 100 μ L Elüsyon Tamponunu kullanarak ikinci bir elüsyon adımı uygulanır. Saflaştırılmış DNA sonraki adımlar için kullanılmaya hazırdır.

3.3. Fitoşelatin Sentaz (PCS) Geninin Amplifikasyonu

Fitoşelatin Sentaz (PCS1) genini çoğaltmak için *BamH1* (*Bacillus amyloliquefaciens*' ten) çıkıntıları da olan tam uzunluktaki primerler, T3 yazılımı kullanılarak tasarlanmıştır (Tablo 3.1, Tablo 3.2). Ayrıca hedef genin kısmi fragmanını PCR ile çoğaltmak için de iç (ara) primerler de tasarlanmıştır.

Tablo 3.1. *A. thaliana* PCS1 genini çoğaltmak için PCR' da kullanılacak primer listesi

İsim	Primer Dizisi (5'-3')	Bağlanma Sıcaklığı	Ürün boyutu (bp)
<i>AtPCS1</i> -FLF	ACA GGATCC ATGGAAGGATTTTCAGGTTGATT	55°C	1350
<i>AtPCS1</i> -FLR	ACA GGATCC CTAATAGGCAGGAGCAGCGAG		
<i>AtPCS1</i> -IF	CAAAGGCTTGTTGCCAAGGA	55°C	378
<i>AtPCS1</i> -IR	GTTGCCGTCGAAGATGCAAT		

*FL= Tam Uzunluktaki Primerler *IF= Kısmi Primerler

Tablo 3.2. *C.demersum PCS1* genini çoğaltmak için PCR’ da kullanılacak primer listesi

İsim	Primer Dizisi (5’-3’)	Ürün boyutu (bp)
<i>CdPCS1</i> -FLF	GGCCATGGATGGCCATTGCTGGACTT	1700
<i>CdPCS1</i> -FLR	GCGGTACCAGTTATGTAGTAGGCCTA	
<i>CdPCS1</i> -IF	ACTGCCATTTGATTGCATCT	505
<i>CdPCS1</i> -IR	GCCGTTCTCAGTACATCTTC	

*FL= Tam Uzunluktaki Primerler *IF= Kısmi Primerler

3.3.1. Fitoşelatin Sentaz (*PCS*) geninin *Taq* DNA polimeraz ile amplifikasyonu

PCR reaksiyonunda kalıp olarak *A. thaliana* ve *C. demersum* genomik DNA'sı kullanılarak 20 µL reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

PCR reaksiyon hacimleri Tablo 3.3’de verildiği şekilde, PCR reaksiyon koşulları ise Tablo 3.4’de verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.3. *AtPCS1*, *CdPCS1* genlerinin *Taq* DNA Polimeraz ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu karışımı

Reaktifler	Gerekli hacim
Kalıp DNA (10 ng)	4 µL
İleri Primer (0.5 µM)	1 µL
Geri Primer (0.5 µM)	1 µL
PCR Master Mix (1X)	10 µL
Total Hacim	Steril Distile Su ile 20 µL tamamlanır

Tablo 3.4. *AtPCS1*, *CdPCS1* genlerinin *Taq* DNA Polimeraz ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu koşulları

95 °C	5 dk	X 34 döngü
94 °C	15 sn	
56 °C	15 sn	
72 °C	20 sn	
72 °C	7 dk	

3.3.2. Fitoşelatin Sentaz (PCS) geninin *Pfu* DNA polimeraz ile amplifikasyonu

PCR reaksiyonunda kalıp olarak *A. thaliana* genomik DNA'sı kullanılarak 50 µL reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. 10 ng konsantrasyondaki genomik DNA'yı içeren kalıp DNA ile, ileri ve geri primerlerin her birinden 0.50 µM (*Bam*H1 bölgesi dahil edildi), dNTP'ler 100 µM, 1X PCR Tamponu (50 mM KCl, 1.5 mM MgSO₄ ve 10mM Tris-HCl) ve 1 birim *Pfu* Polimeraz reaksiyon hacimleri ile PCR gerçekleştirilmiştir.

PCR reaksiyon hacimleri Tablo 3.5'de verildiği şekilde, PCR reaksiyon koşulları ise Tablo 3.6'de verildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.5. *AtPCS1* geninin *Pfu* DNA Polimeraz ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu karışımı

Reaktifler	Gerekli hacim
Kalıp DNA (10 ng)	5 µL
İleri Primer (0.5 µM)	2 µL
Geri Primer (0.5 µM)	2 µL
dNTP'ler (100 µM)	1 µL
<i>Pfu</i> Polimeraz Tamponu (1X)	5 µL
<i>Pfu</i> Polimeraz (1 U)	0.4 µL
Total Hacim	Steril Distile Su ile 50 µL tamamlanır

Tablo 3.6. *AtPCS1* geninin *Pfu* DNA Polimeraz ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu koşulları

95 °C	5 dk	X 40 döngü
95 °C	30 sn	
60 °C	30 sn	
72 °C	3 dk	
72 °C	15 dk	

3.4. PCR Ürünlerinin Jel Elektroforezi

PCR ürünleri, %1'lik agaroz jelde, 90 voltta 1 saat yürütülmüştür. Jel 1 g agarozun 100 ml 1X TBE (Tris-Borat-EDTA) tamponunda mikrodalga fırında çözündürülmesiyle hazırlanmıştır. Sıcaklığı 50 - 60°C'ye düştüğü zaman DNA' nın UV'de

görüntülenebilmesi için, 5 µl Etidyum bromür eklenmiştir. Jel hazırlanmasında Sambrook ve ark., (2001) tarafından verilen protokol takip edilmiştir. Elektroforez işlemi sonlandırıldıktan sonra jel Ultraviyole ışık altında jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

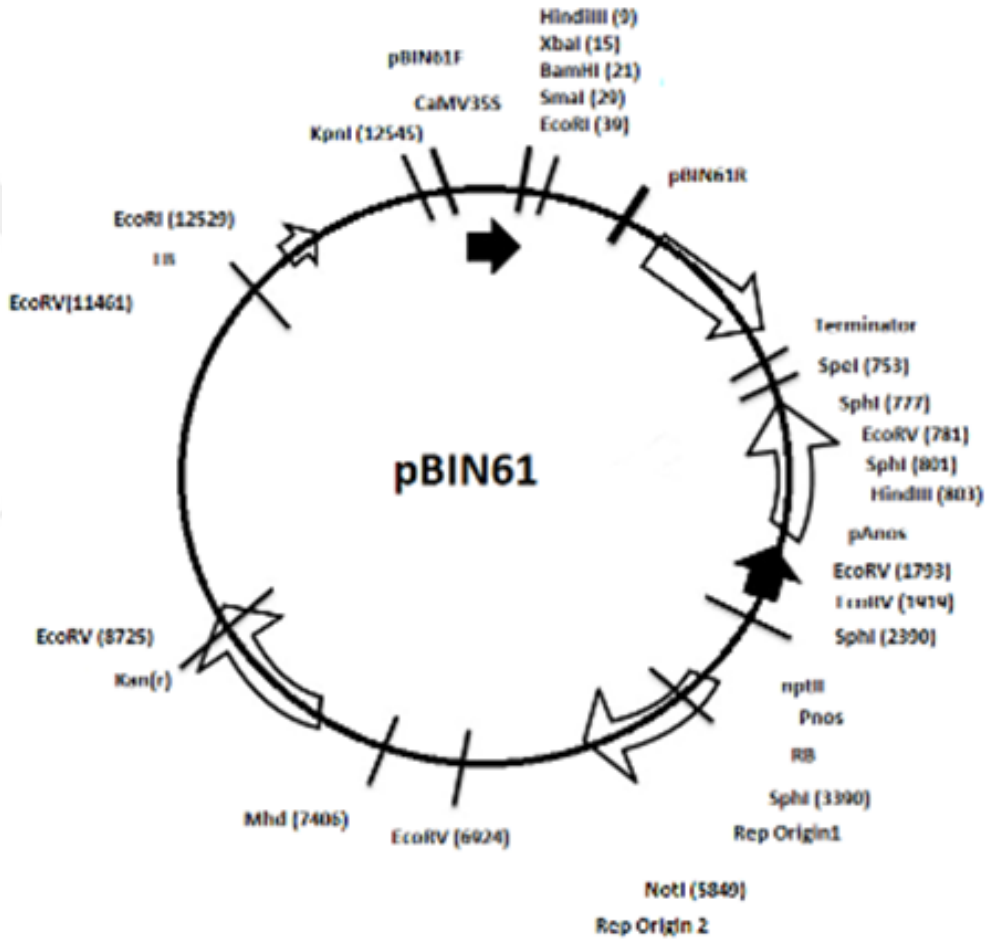
3.5. PCR Ürünlerinin Jelden Ekstraksiyonu

Jel ekstraksiyon kiti (Thermo Scientific GeneJET Jel Ekstraksiyon Kiti, K0691) kullanılarak, aşağıdaki protokol takip edilerek jel üzerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

- Temiz bir bistüri kullanılarak DNA parçasını içeren jel kısmı kesilir. Kesilen jel dilimi önceden tartılıp darası alınmış 1,5 mL'lik bir tüpe yerleştirilir ve tartılır. Jel diliminin ağırlığı kaydedilir.
- Jel dilimine 1:1 oranda bağlanma tamponu eklenir.
- Jel karışımı 50-60 °C'de 10 dakika boyunca, jel dilimi tamamen çözülene kadar inkübe edilir. Jelin tamamen çözülmediğinden emin olmak için kolona yüklemmeden önce jel karışımı kısa bir süre vortekslenir.
- GeneJET saflaştırma kolonuna kadar çözündürülmüş jel çözeltisi aktarılır. 1 dakika santrifüjlenir. Kolon tüpün altındaki çözelti boşaltılır ve kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilir.
- GeneJET saflaştırma kolonuna kitte yer alan protokole uygun şekilde Etanol ile seyreltilmiş 700 µL Yıkama Tamponu eklenir. 1 dakika santrifüjlenir. Kolon tüpün altındaki çözelti boşaltılır ve kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirilir.
- Yıkama tamponunu tamamen çıkarmak için boş GeneJET saflaştırma kolonu ek olarak 1 dakika daha santrifüjlenir.
- GeneJET saflaştırma kolonu temiz bir 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne aktarılır. Kolon membranının merkezine 50 µL Elüsyon Tamponu eklenir. 1 dakika santrifüjlenir.
- GeneJET saflaştırma kolonu atılır ve saflaştırılmış DNA sonraki adımlar için kullanıma hazırdır.

3.6. Plazmid İzolasyonu

PCR yöntemiyle çoğaltılan *AtPCS1* genlerinin klonlanması için bitki ekspresyon vektörü olan pBIN61 plazmidi kullanılmıştır ve Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tarımsal Genetik Mühendisliği Bölümü'nden temin edilmiştir. pBIN61 plazmidi restriksiyon enzimi kesim bölgeleri ile beraber Şekil 3.1' de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Klonlama amacıyla kullanılan pBIN61 transformasyon vektörü. Vektörün T-DNA bölgesi, bitki tarafından seçilebilir marker olarak kullanılan kanamisin direnci kodlayan *nptII* geni içerir. Vektör ayrıca bakteri seçimi için de *nptII* genleri içerir.

Ligasyon aşamasından önce pBIN61 plazmid vektörünün -80 °C' de dondurulmuş ve buzda çözündürülmüş stoğundan alınıp ekim yapılmıştır. 10 mL LB Broth (Luria-Bertani) besiyeri ve 10 µL Kanamisin (50 mg/L) içeren falkon tüpe 40 µL vektör eklenip, 37 °C' de gece boyu inkübasyonu sağlanmıştır. Gece boyunca büyütülen kültürden plazmit izolasyonu, ticari plazmit izolasyon kitine (Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit, K0503) ait izolasyon protokolü izlenerek yapılmıştır.

- Büyütülen kültürü içeren 50 mL'lik falkon tüplerde 14.000 rpm'de santrifüj yapılır. Süpernatant atılır.
- Pellet üstüne 250 µL çözündürme solüsyonu eklenip pellet çözünene kadar pipetaj yapılır. Tamamen çözündüğüne emin olduktan sonra 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.
- 250 µL Lizis Solüsyonu eklenir ve solüsyon viskoz hale gelene ve hafif berraklaşınca kadar tüp 4-6 kez ters yüz edilerek iyice karıştırılır.
- 350 µL Nötralizasyon Solüsyonu eklenir ve tüp hemen 4-6 kez ters yüz edilerek iyice karıştırılır.
- Hücre kalıntılarını ve kromozomal DNA'yı çökertmek amacıyla 5 dakika santrifüjlenir.
- Süpernatant, GeneJET kolon tüpüne aktarılır.
- 1 dakika santrifüjlenir. Kolon tüpün altındaki çözelti boşaltılır ve kolon tüp tekrar toplama tüpüne yerleştirilir.
- 500 µL Yıkama Solüsyonu eklenir. 30-60 saniye santrifüjlenir. Kolon tüpün altındaki çözelti boşaltılır ve kolon tüp tekrar toplama tüpüne geri yerleştirilir.
- 500 µL Yıkama Solüsyonu kullanılarak yıkama prosedürü tekrarlanır.
- Kolon tüpün altındaki çözelti boşaltılır ve kalan Yıkama solüsyonundan tamamen kurtulmak için 1 dakika daha santrifüjlenir.
- GeneJET kolonu 1,5 ml'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılır. Plazmid DNA'sını ayrıştırmak için GeneJET kolon membranının merkezine 50 µL Elüsyon Tamponu eklenir. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilir ve 2 dakika boyunca santrifüjlenir.
- GeneJET saflaştırma kolonu atılır ve saflaştırılmış plazmid DNA'sı sonraki adımlar için kullanıma hazırdır.

3.7. Vektörün Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

Klonlamada kullanılacak pBIN61 plazmid vektörünün izolasyonu yapıldıktan sonra, ligasyon aşamasından önce, klonlanacak genin ve vektörün aynı restriksiyon enzimi ile kesimi gerçekleştirilmiştir. Plazmid DNA'sı, aşağıda verilen şekilde *Bam*H1 enzimi ile restriksiyon kesimine tabi tutulmuştur (Tablo 3.7.).

Tablo 3.7. pBIN61 vektörünün *Bam*H1 restriksiyon enzimi ile kesimi

Reaktifler	Gerekli Miktar
Plazmid (pBIN61)	30 ng
Kesim Tamponu (10X)	5 µL
<i>Bam</i> H1	1.5 µL (1 unit/uL)
Total Hacim	Steril Distile Su ile 50 µL tamamlanır

3.8. Klonlanacak Genin Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

Ligasyon aşamasından önce, klonlanacak genin ve vektörün aynı restriksiyon enzimi ile kesimi gerçekleştirilmiştir. *AtPCS1* geni, aşağıda verilen şekilde *Bam*H1 enzimi ile restriksiyon kesimine tabi tutulmuştur (Tablo 3.8.).

Tablo 3.8. *AtPCS1* geninin *Bam*H1 restriksiyon enzimi ile kesimi

Reaktifler	Gerekli Miktar
Klonlanacak Gen (<i>AtPCS1</i>)	10 ng
Kesim Tamponu (10X)	2 µL
<i>Bam</i> H1	0.2 µL (1 unit/uL)
Total Hacim	Steril Distile Su ile 20µL tamamlanır

*Bam*H1 restriksiyon enzimi ile kesimi yapılan pBIN61 vektörü ve klonlanacak *AtPCS1* geninin, ligasyon reaksiyonundan önce uygun konsantrasyonun görselleştirilmesi için %1'lik agaroz jel üzerinde çalıştırılmıştır. Jelde görülen bantların yoğunluğuna göre vektör ve gen konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.9. Ligasyon Reaksiyonu

Ligasyon PCR 'la çoğaltılan ve klonlanacak olan *AtPCS1* geninin pBIN61 plazmid vektörü ile birleştirilmesi işlemidir. Bu aşamada PCR ile çoğaltılan *AtPCS1* geninden, çoğaltılan genin miktarını gösteren bandların yoğunluğuna bağlı olarak hangi hacimlerde alınması gerektiği belirlenmiştir. Ligasyon reaksiyonu, 3: 1 insert:vektör oranına göre uygulanmıştır (Tablo 3.9.) ve hazırlanan karışım 16 °C 'de gece boyunca inkübe edilerek ligasyon işlemi tamamlanmıştır.

Tablo 3.9. Ligasyonda hazırlanan reaksiyon karışımı

Reaktifler	Gerekli Miktar
Klonlanacak gen (<i>AtPCS1</i>)	25 ng
Vektör (pBIN61)	75 ng
10X Ligasyon tamponu	2 µl
T4 DNA Ligaz	1µl (4.0 Weiss units)
Total hacim	Steril Distile Su ile 20 µL tamamlanır

3.10. Bakteriyel Transformasyon

Transformasyon işlemi, ligasyon karışımının bir kısmının, hücre duvarı geçirgen hale getirilmiş *Escherichia coli* bakterisine aktarılmasıdır. Bu amaçla aşağıdaki adımlar izlenmiştir;

- *E. coli* bakterisinin *JM109* ırkının -80 °C' de dondurulmuş ve buzda çözündürülmüş competent hücrelerinden 50 µl alınarak 1,5 ml'lik tüpe konulmuştur.
- pBIN61 plazmidi ve *AtPCS1* genlerini içeren ligasyon karışımı 65 °C' de 10 dk ısı şokuna maruz bırakılmıştır.
- Ligasyon karışımından 6 µl alınarak tüplerdeki *E. coli JM109* kompetent hücrelere eklenerek 20 dakika boyunca buzda bekletilmiştir.
- Daha sonra karışım 42 °C' de 1 dk süreyle bekletilerek ısı şoku uygulanmıştır
- Tekrar 2 dakika buza konularak transformasyon işlemi tamamlanmıştır.

450 µl LB besiyeri transformasyonu gerçekleştirilen bakterilere ilave edilip 37 °C' de çalkalayıcı inkübatörde 1 saat süreyle inkübe edilmiştir. Hücreler daha sonra kanamisin (50 mg/L) içeren LB agar plakalarına ekilip 37 °C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün birkaç koloni gözlenmiştir; bunlar koloni PCR ve restriksiyon analizi kullanılarak doğrulamaya tabi tutulmuştur.

3.11. Rekombinant Bakteriyel Kolonilerin Belirlenmesi

Koloni PCR, *AtPCS1* geninin kısmi fragmanını çoğaltmak için spesifik kısmi primerler (378 bç; Tablo 3.1) kullanılarak küçük bir koloni alınarak çalıştırılmıştır. Bu amaçla önce elde edilen tek koloniler, steril bir pipet ucuyla alınarak kanamisin (50 mg/L) ve LB agar ortamı içeren yeni bir petri kabına, 1 cm² büyüklüğünde bir alana çizme yoluyla inokule edilerek 37 °C'de 16 saat boyunca büyütüldükten sonra kullanılmak üzere 4 °C' de saklanmıştır. Daha sonra koloni PCR reaksiyonu aşağıda verildiği şekilde uygulanmıştır (Tablo 3.10.).

Tablo 3.10. Koloni PCR reaksiyon karışımı

Reaktifler	Gerekli Miktar
İleri Primer	1 µL
Geri Primer	1 µL
PCR Mix	7,5 µL
Total hacim	Steril Distile Su ile 20 µL tamamlanır

PCR karışımı hazırlanıp PCR tüplerine konulur. Koloni PCR için hazırlanıp PCR tüplerine konulan karışıma, çizilerek büyütülen bakteri kolonilerinden, steril bir pipet ucuyla alınarak bakteri kolonisi eklenmiştir. Bakteri eklenen koloni PCR karışımı ile aşağıda verilen koşullarda PCR gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.11.).

Tablo 3.11. Koloni PCR reaksiyon koşulları

95 °C	4 dk	X 34 döngü
94 °C	15 sn	
56 °C	15 sn	
72 °C	15 sn	
72 °C	7 dk	

Koloni PCR ürünleri, %1' lik agaroz jelde, 90 voltta 1 saat yürütülmüştür. Jel 1 g agarozun 100 ml 1X TBE (Tris-Borat-EDTA) tamponunda mikrodalga fırında çözdürülmesiyle hazırlanmıştır. Sıcaklığı 50 – 60 °C'ye düştüğü zaman DNA'nın UV' de görüntülenebilmesi için, 5 µl Etidyum bromür eklenmiştir. Jel hazırlanmasında Sambrook ve ark., (2001) tarafından verilen protokol takip edilmiştir. Elektroforez işlemi sonlandırıldıktan sonra jel Ultraviyole ışık altında jel görüntüleme sisteminde görüntülenip fotoğraflanmıştır.

3.12. Rekombinant Bakteriyel Kolonilerden Plazmid İzolasyonu

Koloni PCR' dan elde edilen sonuçların elektroforez yöntemiyle analiz edilmesinden sonra *AtPCS1* genini içeren pBIN61 plazmidini taşıdığı belirlenen koloniler seçilerek 50 mg/L Kanamisin içeren LB ortamına inoküle edilmiştir. Gece boyunca inkübasyonun ardından, plazmid izolasyonu yapılmıştır. Plazmid DNA'sı, plazmid DNA özütlem kiti (Thermo Scientific GeneJET Plazmid Miniprep Kit, K0502) kullanılarak daha önce tarif edildiği şekilde izole edilmiştir.

3.13. *Bam*H1 Restriksiyon Enzimi ile Kesme İşlemi

Elde edilen pBIN61 plazmit DNA' sı, aşağıda verilen şekilde restriksiyon analizine tabi tutulmuştur (Tablo 3.12.).

Bu karışım 37 °C' de 16 saat bekletilerek plazmitlerin restriksiyon kesim işlemi yapılmıştır. *Bam*HI enzimiyle kesme işleminin tamamlanmasından sonra elde edilen DNA'lar %1' lik agaroz jeline elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında jel görüntüleme sisteminde görüntülenmiş ve 1350 bç' lik *AtPCS1* genini taşıyıp taşımadıkları kesin olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.12. Rekombinant plazmitlerin *Bam*H1 restriksiyon enzimi analizi ile doğrulanması

Reaktifler	Gerekli Miktar
Plazmid DNA'sı	1 ug
10X Kesim Tamponu	2 µl
<i>Bam</i> H1	1µl (1 unit/ul)
Total Hacim	20µl (steril distile su ile tamamlanır)

3.14. *Agrobacterium* Hücrelerine Elektroporasyon

pBIN61-*AtPCS1* plazmidi Bio-Rad elektroporasyon cihazı (# 165-2105) kullanılarak hücre duvarı geçirgen hale getirilmiş (yetkili) *Agrobacterium* suşu LBA4404'e transforme edilmiştir. LBA4404' ün yetkili hücreleri, 2 µL plazmid (50 ng) ile karıştırılıp ardından buza yerleştirilmiştir. Elektroporasyon cihazı, 200 ohm'luk bir direnç ile 2.2 kV' lık gerilim ve 25 µF kapasitansta ayarlanmıştır. Elektroporasyondan sonra, 1 mL SOC çözeltisi ilave edilip 28 °C' de 3 saat boyunca 200 rpm'de inkübe edilmiştir. Kültür, transforme olmuş hücrelerin seçimi için 50 mg/L kanamisin antibiyotikli LB ortamı içeren plakalara yayılmıştır. Petri plakaları, 28 °C' de 24-48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Pozitif klonlar, koloni PCR kullanılarak doğrulanmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Araştırma Sonuçları

Genomik DNA izolasyonu ve *PCS1* geninin PCR ile amplifikasyonu işlemleri için *Arabidopsis thaliana* ve *Ceratophyllum demersum* bitkilerinin her ikisi de kullanılmasına rağmen; ligasyon, transformasyon ve gen klonlamanın diğer basamakları sadece *A. thaliana PCS1* geni (*AtPCS1*) ile gerçekleştirilmiştir.

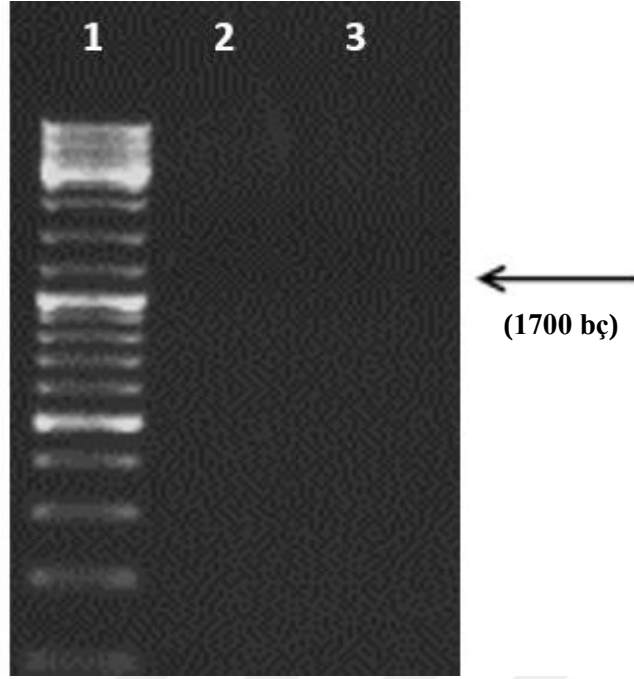
4.1.1. Genomik DNA izolasyonu ve *PCS1* geninin amplifikasyonu

4.1.1.1. *Ceratophyllum demersum* bitkisinde genomik DNA izolasyonu ve *CdPCS1* geninin amplifikasyonu

C. demersum bitkisinden izole edilen genomik DNA, *PCS1* genini PCR ile çoğaltmak için kalıp olarak kullanılmıştır. Fitoşelatin sentaz (*PCS1*) genini çoğaltmak için *Bam*H1 çıkıntıları da olan ve T3 yazılımı kullanılarak tasarlanan tam uzunluktaki ileri ve geri primerler (Tablo 3.2) kullanılmıştır. *Taq* DNA Polimeraz kullanılarak amplifiye edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiş ve UV ışığı altında görselleştirilmiştir.

Şekil 4.1' de görüldüğü gibi, tam uzunluktaki *CdPCS1* genini (1700 bp) temsil eden herhangi bir bant gözlemlenmemiştir.

Sonuç olarak *C. demersum* genomik DNA' sı kullanılarak, uygun primerler eşliğinde, *Taq* DNA Polimeraz ile tekrar tekrar yapılan PCR taramaları sonucunda *PCS1* geni saptanamamıştır. Çalışmalar ticari süs bitkisi olarak satın alınan *C. demersum* türlerinde de aynı şekilde gerçekleştirilmiştir ve yine gen saptanamamıştır. *C. demersum* bitkisinde *PCS1* geninin saptanamaması sebebi ile klonlama çalışmaları sadece *A. thaliana* bitkisi ile yürütülmüştür.

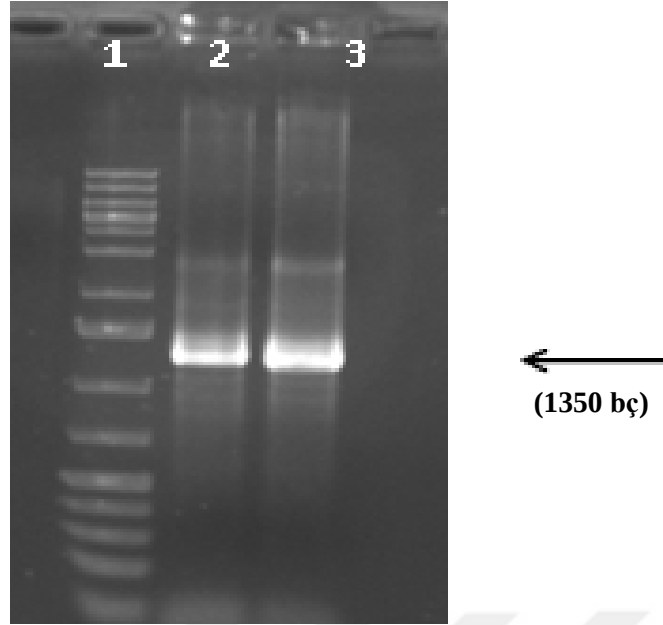


Şekil 4.1. *CdPCS1* geninin *Taq* DNA Polimeraz ile gerçekleştirilen PCR amplifikasyonunun jel görüntüsü, Şerit 1: 1 kb plus DNA Merdiveni (Fermentas), Şerit 2-3: Amplifiye edilmiş PCR ürünü (Görülmesi gereken, ancak görülmeyen bant düzeyi (1700 bp) ok ile gösterilmiştir)

4.1.1.2. *Arabidopsis thaliana* bitkisinde genomik DNA izolasyonu ve *AtPCS1* geninin amplifikasyonu

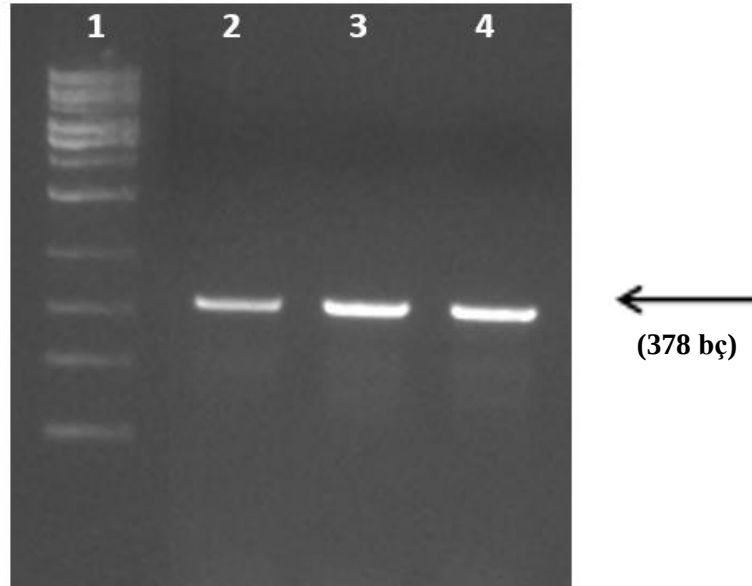
Genomik DNA, *A. thaliana* bitkisinden izole edilmiştir. Bu genomik DNA, *PCS1* genini PCR ile çoğaltmak için kalıp olarak kullanılmıştır. Fitoşelatin sentaz (*PCS1*) genini çoğaltmak için *Bam*H1 çıkıntıları da olan ve T3 yazılımı kullanılarak tasarlanan tam uzunluktaki ve kısmi ileri ve geri primerler (Tablo 3.1) kullanılmıştır. *Taq* DNA Polimeraz ve *Pfu* DNA Polimeraz kullanılarak amplifiye edilmiş PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiş ve UV ışığı altında görselleştirilmiştir.

Pfu DNA Polimeraz ile yapılan PCR sonucunda, Şekil 4.2' de görüldüğü gibi, tam uzunluktaki *PCS1* genini (1350 bp) temsil eden spesifik bir bant gözlemlenmiştir.



Şekil 4.2. *AtPCS1* geninin *Pfu* DNA Polimeraz ile gerçekleştirilen PCR amplifikasyonunun jel görüntüsü, Şerit 1: 1 kb plus DNA Merdiveni (Fermentas), Şerit 2-3: Amplifiye edilmiş PCR ürünü (1350 bç)

Taq DNA Polimeraz ile yapılan PCR sonucunda ise Şekil 4.3' de görüldüğü gibi, kısmi primerlerle çoğaltılan *PCS1* genini (378 bç) temsil eden spesifik bir bant gözlemlenmiştir.



Şekil 4.3. *AtPCS1* geninin *Taq* DNA Polimeraz ile gerçekleştirilen PCR amplifikasyonunun jel görüntüsü, Şerit 1: 1 kb plus DNA Merdiveni (Fermentas), Şerit 2-4: Amplifiye edilmiş PCR ürünü (378 bç)

4.1.2. Ligasyon ve transformasyon

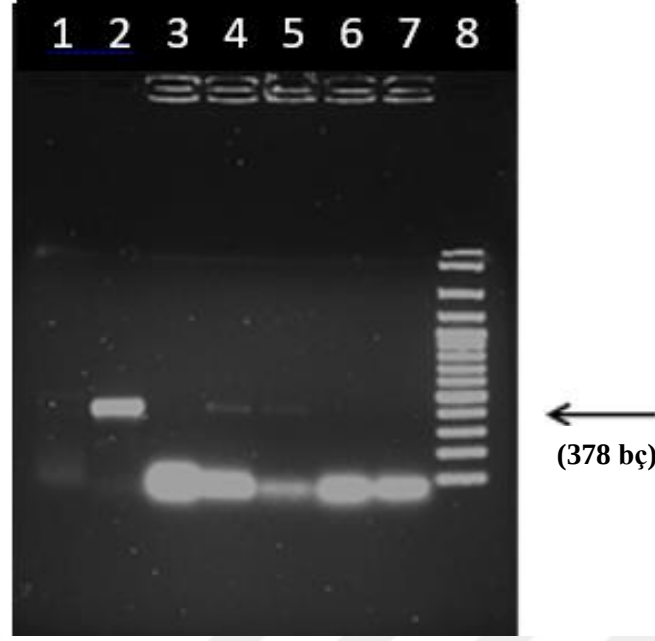
Pfu DNA Polimeraz ile amplifiye edilmiş *AtPCS1* genine ait PCR ürünleri agaroz jelden kesilmiştir ve DNA, jel saflaştırma kiti (Thermo Scientific GeneJET Jel Ekstraksiyon Kiti, K0721) kullanılarak izole edilmiştir. Aktarılabak gen (*AtPCS1*) ve vektör pBIN61'in uygun enzimler ile kesimleri gerçekleştirilmiştir ve ligasyon reaksiyonundan önce uygun konsantrasyonun görselleştirilmesi için agaroz jeli üzerinde yürütülmüştür. Ligasyon reaksiyonu, 3: 1 insert:vektör oranına göre uygulanmıştır ve 16 °C' de gece boyunca inkübe edilmiştir.

AtPCS1 genlerini içeren pBIN61 plazmidleri ısı şoku transformasyon yoluyla *E. coli* bakterisinin *JM109* ırkına aktarılmıştır. Transformasyonu yapılan *E. coli* bakterileri kanamisin (50 mg/L) içeren LB agar besisi ortamına ekilerek kanamisin antibiyotigine dayanıklılık yoluyla, *AtPCS1* genlerini içeren plazmidleri taşıyan bakteri kolonilerinin seleksiyonu yapılmıştır.

4.1.3. Rekombinant bakteriyel kolonilerin belirlenmesi

Transformasyonu yapıp, kanamisin (50 mg/L) içeren LB agar besisi ortamına ekilen *E. coli* bakterilerinin, 37 °C' de gece boyunca inkübasyonunun ardından birkaç koloni gözlemlendi. Bu kolonilerde üreyen bakterilerin, *AtPCS1* genlerini gerçekten içirip içermediğini kesin olarak belirlemek amacıyla koloni PCR ve restriksiyon analizi yöntemiyle taraması yapıp doğrulamaya tabi tutulmuştur. Koloni PCR, *AtPCS1* geninin iç fragmanını çoğaltmak için spesifik kısmi primerler (378 bp, Tablo 3.1) kullanılarak, küçük bir koloni alınarak çalıştırılmıştır. PCR koşulları daha önce tarif edildiği gibi takip edilmiştir. Koloni PCR'ın tamamlanmasından sonra elde edilen PCR ürünleri DNA büyüklük markörleriyle birlikte, % 1'lik agaroz jelinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılarak, ultraviyole ışık altında görüntülenerek analiz edilmiştir (Şekil 4.4).

PCS1 genlerini içeren kolonilerin belirlenmesi için yapılan koloni PCR sonuçları Şekil 4.4' de gösterilmektedir. Sonuçlar incelendiğinde taranan tüm kolonilerden 4 ve 5 numaralı kolonilerin 378 bp' lik bir DNA bantı göstererek pozitif sonuç verdiği yani *AtPCS1* genini içerdiği belirlenmiştir.

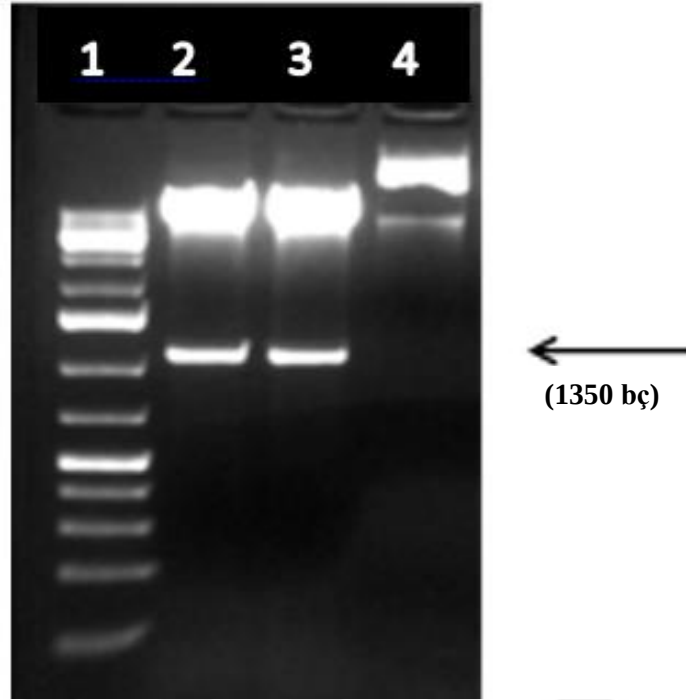


Şekil 4.4. *PCS1* genini çoğaltmak için kısmi primerler (378 bç) ile yapılan koloni PCR reaksiyonunun jel görüntüsü, Şerit 1: Negatif kontrol, Şerit 2: Pozitif kontrol (*PCS1* geninin jel ile ayrılan parçası), Şerit 3-7: Tarama için seçilen koloniler, Şerit 8: 1kb plus DNA merdiven (Fermentas)

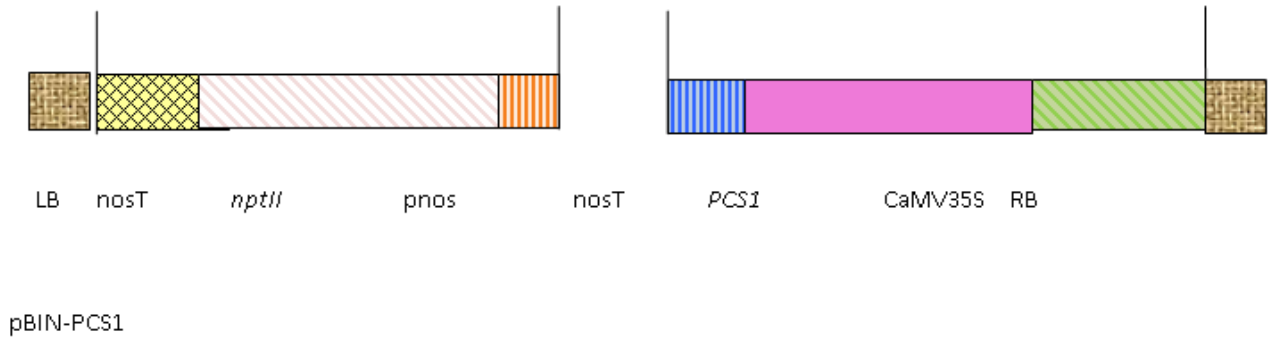
Koloni PCR’ da pozitif sonuç vererek, *AtPCS1* genini içeren pBIN61 plazmidini içerdiği belirlenen koloniler seçilerek, 50 mg/L kanamisin içeren LB sıvı ortamı içerisinde 37 °C’ de çalkalamalı inkübatörde 16 saat boyunca büyütülmüştür. Bunların bir kısmı alınarak gliserol stok hazırlanıp daha sonra kullanılmak üzere -80 °C derin dondurucuda saklanmıştır.

Geriye kalan kısımdan ise plazmid DNA özütleme kiti (Thermo Scientific GeneJET Plazmid Miniprep Kit, K0502) kullanılarak daha önce tarif edildiği şekilde plazmid izolasyonu yapılmıştır.

Elde edilen bu plazmid DNA’ ları, klonlaması yapılan bölgenin her iki yanında bulunan *Bam*HI restriksiyon enzimi kesme bölgelerinden kesim yaparak, klonlanan DNA parçasını plazmidten ayıran *Bam*HI restriksiyon enzimiyle kesilmiştir. Kesilen DNA’ lar daha sonra %1’ lik agaroz jelinde büyüklük markörleriyle birlikte yürütülerek ultraviyole ışık altında incelendiğinde pozitif olan 12.939 bç büyüklüğünde pBIN61 plazmid DNA’ sı ve 1350 bç büyüklüğünde *AtPCS1* genine ait bantlar elde edildiği görülmüştür. *AtPCS1* genini içeren plazmidlerin *Bam*HI enzimiyle kesilmesi sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.5’ de gösterilmiştir. Bunun sonucunda ise klonlanan plazmidlerin *AtPCS1* genini taşıdıkları kesinleşmiştir. Vektör, Şekil 4.6’da şematize edilmiştir.



Şekil 4.5. *Bam*HI restiriksiyon enzimiyle yapılan kesimden sonra pBIN61 plazmitlerinin *AtPCS1* genini (1350 bç) içerdiğini gösteren jel fotoğrafı: Şerit 1: 1 kb DNA merdiveni (Fermentas), Şerit 2-3: Kesilmiş plazmid DNA, Şerit 4: Kesilmemiş plazmid DNA (kontrol)



Şekil 4.6. pBIN-*PCS1*'in T-DNA bölgesi ile şematik gösterimi. *PCS1* geni, pBIN61 vektöründe çoğaltılıp klonlanmıştır. Vektör, kanamisine karşı direnci sağlayan, bitki tarafından seçilebilir bir marker olarak *nptII* içerir.

4.1.4. *Agrobacterium* hücrelerine elektroporasyon

pBIN61-*AtPCS1* plazmidi Bio-Rad elektroporasyon cihazı (# 165-2105) kullanılarak hücre duvarı geçirgen hale getirilmiş (yetkili) *Agrobacterium* suşu LBA4404'e transforme edilmiştir. Elektroporasyondan sonra, 1 mL SOC çözültisi ilave edilip 28 °C' de 3 saat boyunca 200 rpm'de inkübe edilmiştir. Kültür, transforme olmuş hücrelerin seçimi için 50 mg/L kanamisin antibiyotikli LB ortamı içeren plakalara yayılmıştır. Petri plakaları, 28 °C' de 24-48 saat süreyle inkübe edilmiştir. Pozitif klonlar, koloni PCR kullanılarak doğrulanmıştır.

4.2. Tartışma

Günümüzde, hızlı nüfus artışı, düzensiz kentleşme, besin ve enerji yetersizliği, hızla gelişen teknolojik gelişmeler ve insanların aşırı tüketim isteği, çevre kirliliği sorununu ortaya çıkarmıştır. Ağır metaller, yerkabuğunda doğal olarak bulunan, yok edilemeyen ve bozulmayan bileşiklerdir. Bu ağır metaller, toprak, su ve havada kirliliğe yol açabilirler. Bu metaller içerisinde kurşun, bakır, çinko, nikel, kobalt, kadmiyum, krom, gümüş, arsenik ve civa gibi metal iyonları, canlı sistemler ve çevre sağlığı yönünden son derece toksik etki göstermektedir. Toprak ve diğer çevre ortamlarındaki ağır metal kirliliğini ortadan kaldırmak ve gidermek için çevreye zararlı ve oldukça pahalı bir uygulama olan fiziksel arıtım (remediyasyon) teknolojileri yerine bitkiler kullanılmakta ve bu uygulamaları içeren teknolojiler “Fitoremediyasyon Teknolojisi” olarak adlandırılmaktadır. Doğada doğal olarak bulunan bazı bitkiler, ağır metal detoksifikasyonu ile ilişkili tolerans mekanizmalarına sahip olduğundan metal stresi altında canlılıklarını sürdürebilmektedir. Ağır metal birikimi ve toleransı ile ilgili mekanizmaların daha iyi anlaşılmasında bu bitkilerde yapılan moleküler çalışmalar büyük önem taşımaktadır (Robinson ve ark., 1997; Martinez ve ark., 2006; Ali ve ark., 2013).

Bitkilerde, metal stresi altında indüklenen çeşitli genlerin, metabolitlerin, transkripsiyon faktörlerinin ve stresle uyarılabilen proteinlerin karakterizasyonu metabolomik, transkriptomik, proteomik gibi çeşitli omik yaklaşımlar aracılığıyla tanımlanmıştır. Çalışmalar, bitkilerdeki metal toleransının yeni bir genin varlığına bağlı olmadığını, sadece metal stresinde yaygın olan genlerin farklı ekspresyonundan

kaynaklandığını ortaya koyar. Örneğin, bu genlerin aşırı ekspresyonu ile metal toleransı artırılabilir.

Bitkilerde ağır metal toleransında rol aldığı bilinen genlerden biri Fitoşelatinler (PC) ailesine ait *PCS1* genleridir. PC'ler indirgenmiş glutatyon (GSH) enzimatik olarak sentezlenir. γ -glutamilsistein dipeptidil transpeptidaz enzimi (EC 2.3.2.15, yaygın olarak fitoşelatin sentaz (PCS) olarak adlandırılır) ile katalize edilen reaksiyon, metal iyonları ile aktive edilir (Vatamaniuk ve ark., 2000). Son birkaç yılda, PCS genleri Arabidopsis (*AtPCS1*), buğday (*TaPCS1*), *Schizosaccharomyces pombe* (*SpPCS1*) ve *Caenorhabditis elegans* (*CePCS1*) gibi organizmalarda tanımlanmıştır (Vatamaniuk ve ark., 1999; Heiss ve ark., 2003; Zhang ve ark., 2005; Clemens ve ark., 2001).

Bitkiler, ağır metallere karşı bir savunma mekanizması olarak, ağır metal varlığında PC sentezlerler ve bu metal-şelatlayıcılar, ağır metal iyonların bazılarıyla kompleksler oluştururlar, daha sonra sitosoldan, vakuole aktarılırlar. Bu nedenle, tezin amacı bu metal-şelatlayıcı peptidleri sentezleyen *PCS1* genlerinin bitki kaynaklarından izole edilip klonlanmasının sağlanmasıdır.

Bu amaçla *C. demersum* bitkisinden genomik DNA izolasyonu yapıp, *Taq* DNA Polimeraz ile PCR amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Literatürde *C. demersum* *PCS1* geni ile ilgili yapılan birtakım çalışmalar (Mishra ve ark. 2006; Mishra ve ark. 2009; Shukla ve ark. 2012; Shukla ve ark. 2013) bulunmasına rağmen, tekrar tekrar yapılan PCR taramaları sonucunda *C. demersum* bitkisinde *PCS1* geni saptanamamıştır.

C. demersum ile başarı yakalanamadığı için, *A. thaliana* bitkisi ile klonlama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. *A. thaliana*' dan genomik DNA izole edilip, *AtPCS1* geni hem *Taq* DNA Polimeraz hem de *Pfu* DNA Polimeraz ile amplifiye edilmiştir. *Pfu* DNA Polimeraz ile aşağıda açıklanan nedenlerden dolayı yüksek doğrulukta amplifikasyon sağlandığı için klonlama çalışmaları, bu polimeraz ile amplifikasyonu gerçekleştirilen PCR ürünleri ile yürütülmüştür.

Pfu DNA Polimeraz, *Pyrococcus furiosus*'den (DSM3638) izole edilen bir termostabil enzimdir. 5'-3'DNA polimeraz aktivitesine ek olarak, 3'-5' eksonükleaz proofreading (hata okuma) aktivitesine sahiptir. *Pfu* DNA Polimeraz, incelenen tüm termostabil DNA polimerazlardan daha düşük hata oranını göstermektedir. *Pfu* DNA Polimerazın doğruluğunun Vent® DNA polimerazdan (New England Biolabs, Inc.) yaklaşık 2 kat daha yüksek ve *Taq* DNA Polimerazdan yaklaşık 6 kat daha yüksek olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Fiala ve Setter, 1986; Slater, 1998).

Çalışmamızın devamında, amplifikasyonu gerçekleştirilen *AtPCS1* genlerinin, pBIN61 plazmidi ile T4 DNA Ligaz enzimi aracılığıyla ligasyonu sağlanmış ve ısı şoku transformasyon yoluyla *E. coli* bakterisinin *JM109* ırkına aktarılmıştır. *AtPCS1* genlerini içeren plazmidleri taşıyan bakteri kolonilerinin seleksiyonu koloni PCR, restriksiyon analizi yöntemleri ile yapılmıştır. Koloni PCR' da pozitif sonuç vererek, *AtPCS1* genini içeren pBIN61 plazmidini taşıdığı belirlenen koloniler seçilerek plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir ve ayrıca gliserol stokları hazırlanarak -80 °C' de hazırlanıp saklanmıştır. Transformasyon işlemi için; pozitif klonlar elektroporasyon cihazı kullanılarak *Agrobacterium* suşu LBA4404' e transforme edilmiştir.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Fitoremediasyon teknolojisi, ağır metallerle kontamine olmuş toprak ve su kaynaklarının remediasyonu için kullanılmaktadır. Hiperakümülatör bitkiler, ağır metallerle kirlenmiş, kontamine alanların fitoremediasyonu için bu bitkilerin potansiyel kullanımlarından dolayı, son yıllarda hızla artan ilgi görmektedir. Bununla birlikte, bu teknolojinin kullanımında bazı sınırlamalar ve dezavantajlar da mevcuttur. Hiperakümülatör olduğu belirlenen bitkilerin çoğunun hem düşük biyokütleyle sahip hem de olumsuz çevre koşullarına adapte olamaması bu sınırlamalardandır (Xiao ve ark., 2010). Bu sınırlamaların üstesinden gelebilmek için bitkilerdeki metal hiperakümülasyonu ve toleransı ile ilişkili moleküler mekanizmaların iyi şekilde anlaşılması gerekmektedir.

Bitki DNA'sının klonlanması, genetik mühendisliği, gen çalışmaları ve bitki araştırmalarındaki diğer uygulamalar için önemli bir adımdır. Çalışmamızda, bitki ekspresyon vektöründe *AtPCS1* genini klonlamak için klasik klonlama yöntemi kullanılmıştır; bu yöntem birçok araştırmacı tarafından daha önce de kullanılmıştır (Anayol ve ark., 2016; Ahmed ve ark., 2017). Hazırlanan tüm yapılar *E. coli* JM109 suşunda klonlanmıştır. Gen fragmanının varlığını doğrulamak için koloni PCR ve restriksiyon analizi reaksiyonları yapılmıştır. Ekspresyon vektörü (pBIN-PCS1), Eppendorf Eporator® cihazı kullanılarak elektroporasyon yoluyla *A. tumefaciens* LBA4404 suşuna aktarılmıştır. Geliştirilen bitki ifadesi, transgenler üreterek sonraki fitoremediasyon çalışmaları için bir platform oluşturacaktır.

Metal alınımlı, birikimi ve taşınımı mekanizmaları ile ilgili bilgilerin elde edilmesi, fitoremediasyon için transgenik bitkilerin geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır. Hücre içinde ağır metal metabolizması ile ilgili proteinlerin (MT'ler, PC'ler ve vakuolar taşıyıcılar) aşırı üretiminin metal birikimi ve bitkisel yapılarda metal depolanmasını arttırdığı bilinmektedir. Ayrıca, plazma membranlarındaki taşıyıcıların aşırı üretimi ile de artan ağır metal birikimi sağlanabilmektedir (Wu ve ark., 2012; Xu ve ark., 2017). Fitoremediasyon için aday gen veya proteinlerin proteomik ve genomik teknolojileri ile araştırılması sonucunda elde edilecek veriler sayesinde bitkilerdeki metal metabolizması ve metallerle kontamine olmuş alanların remediasyonu için yeni bitkilerin geliştirilmesi önemli olacaktır.

5.2 Öneriler

PC'ler, bitkilerde bazı ağır metallerin toleransı için gereklidir ve bu nedenle, bu metal-şelatlayıcı peptidlerin farklı bitki kaynaklarından izole edilip klonlanması ile, bitkilerde *PCS1*'in, daha yüksek ağır metal toleransı sağlaması beklenir.

Bu çalışmada doğal olarak metal biriktirebilme özelliğinde olan *C. demersum* bitkisinden elde edilecek *PCS1* geni ile klonlama yapılması planlanmıştır fakat literatürde *C. demersum PCS1* geni ile ilgili yapılan birtakım çalışmalar (Shukla ve ark. 2013, Shukla ve ark. 2012, Mishra ve ark. 2009, Mishra ve ark. 2006) bulunmasına rağmen, gerçekleştirdiğimiz PCR taramaları sonucunda bitkide *PCS1* geni saptanamamıştır. *C. demersum*' da *PCS1* geninin saptanamamasının nedenlerinden birinin, genin ekspresyon düzeyinin çok düşük olması ile alakalı olabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple, bitkinin ağır metal ile muamelesinden sonra ağır metal metabolizması ile ilgili genlerin ekspresyon düzeyinin artabileceği ve bu bitkilerden ilgili genlerin başarılı izolasyonunun yapılabileceği önerilmektedir.

Bu çalışmadan yola çıkılarak, sonraki çalışmalarda *PCS1* genini içeren *Agrobacterium* ile farklı bitkilerin transformasyonu gerçekleştirilerek transgenik bitkiler oluşturulabileceği ve bu tür transgenik bitkilerin, ağır metallerle kirlenmiş ortamların fitoremediyasyonunda kullanılabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abhilash, P.C. Powell, J.R. Singh, H.B. Singh, B.K. 2012, Plant-microbe interactions: Novel applications for exploitation in multipurpose remediation Technologies, *Trends Biotechnol.* 30, 416–420.
- Ahmed, H.A.A. Onarıcı, S. Bakhsh, A. Akdoğan, G. Karakoç, Ö.C. Özcan, S.F. Aydın, G. Aasim, M. Ünlü, L. Sancak, C. Naimov, S. Özcan, S. 2017, Targeted expression of insecticidal hybrid SN19 gene in potato leads to enhanced resistance against Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) and tomato leafminer (*Tuta absoluta* Meyrick). *Plant Biotechnol Rep*, 11, 315–329
- Ahemad, M. 2014, Remediation of metalliferous soils through the heavy metal resistant plant growth promoting bacteria: Paradigms and prospects. *Arab. J. Chem.*
- Ahluwalia, S.S. Goyal, D. 2007, Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresour. Technol.* 98, 2243–2257.
- Ainza, C. Trevors, J. Saier, M. 2010, Environmental mercury rising. *Water Air Soil Poll.* 205, 47–48.
- Ali, H. Khan, E. Sajad, M.A. 2013, Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications, *Chemosphere*, 91, 869–881.
- Alkorta, I. Hernandez-Allica, J. Becerril, J.M. Amezaga, I. Albizu, I. Garbisu, C. 2004, Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as Zinc, Cadmium, Lead, and Arsenic, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 3, 71–90.
- Anayol E, Bakhsh A, Karakoc O.C, Onarıcı S, Köm D, Aasim M, Özcan S.F, Barpete S, Khabbazi S.D, Önel B, Sancak C, Khawar K.M, Ünlü L, Özcan S, 2016, Towards better insect management strategy: restriction of insecticidal gene expression to biting sites in transgenic cotton, *Plant Biotechnol Rep*, 10, 83–94
- Andres-Colas, N. Sancenon, V. Rodriguez-Navarro, S. Mayo, S. Thiele, D. J. Ecker, J. R. 2006, The Arabidopsis heavy metal P-type ATPase *HMA5* interacts with metallochaperones and functions in copper detoxification of roots. *The Plant Journal*, 45, 225–236.
- Ayangbenro, A.S. Babalola, O.O. 2017, A new strategy for heavy metal polluted environments: A review of microbial biosorbents, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 14, 94.
- Azubuike, C.C. Chikere, C.B. Okpokwasili, G.C. 2016, Bioremediation techniques-classification based on site of application: Principles, advantages, limitations and prospects. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 180.

- Baliardini, C. Corso, M. Verbruggen, N. 2016, Transcriptomic analysis supports the role of Cation Exchanger 1 in cellular homeostasis and oxidative stress limitation during cadmium stress, *Plant Signaling & Behavior*, 11(6), e1183861.
- Barcelo, J. Poschenrieder, C. 2003, Phytoremediation: principles and perspectives, *Contrib. Sci.* 2, 333–344.
- Basharat, Z. Novo, L.A.B. Yasmin, A. 2018, Genome editing weds CRISPR: What is in it for phytoremediation, *Plants*, 7, 51.
- Bayliss, C.R. Langley, K.F. 2003, Nuclear Decommissioning, Waste Management, and Environmental Site Remediation, *Elsevier*, Butterworth-Heineman
- Belykh, E. S. Maystrenko, T. A. Velegzhaninov, I. O. 2019, Recent Trends in Enhancing the Resistance of Cultivated Plants to Heavy Metal Stress by Transgenesis and Transcriptional Programming, *Molecular Biotechnology*.
- Bitther, O.P. Pilon-Smits, E.A.H. Meagher, R.B. Doty, S. 2012, Biotechnological approaches for phytoremediation. In *Plant Biotechnology and Agriculture*, Academic Press: Oxford, UK, 309–328.
- Bittsanszkya, A. Kömives, T. Gullner, G. Gyulai, G. Kiss, J. Heszky, L. Radimszky, L. Rennenberg, H. 2005, Ability of transgenic poplars with elevated glutathione content to tolerate zinc (2+) stress, *Environ. Int.* 31, 251–254.
- Bradl, H. (Editör), 2002, Heavy Metals in the Environment: Origin, Interaction and Remediation, Academic Press, Londra.
- Brewer, E.P. Saunders, J.A. Scott, A.J. Chaney, R.L. McIntosh, M.S. 1999, Somatic hybridization between the zinc accumulator *Thlaspi caerulescens* and *Brassica napus*, *Theor. Appl. Genet.* 1999, 99, 761–771.
- Burkhead, J. L. Gogolin-Reynolds, K. A. Abdel-Ghany, S. E. Cohu, C. M. Pilon, M. 2009, Copper homeostasis, *New Phytologist*, 182, 799–816.
- Chang, L.W. Magos, L. Suzuki, T. 1996, Toxicology of Metals. Boca Raton. CRC Press; USA.
- Clemens, S. Schroeder, J.I. Degenkolb T. 2001, Caenorhabditis elegans expresses a functional phytochelatin synthase, *European Journal of Biochemistry*, 268, 3640–3643.
- Da Conceição Gomes, M.A. Hauser-Davis, R.A. de Souza, A.N. Vitoria, A.P. 2016, Metal phytoremediation: General strategies, genetically modified plants and applications in metal nanoparticle contamination, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 134, 133–147.
- DalCorso, G. Fasani, E. Manara, A. Visioli, G. Furini, A. 2019, Heavy Metal Pollutions: State of the Art and Innovation in Phytoremediation, *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3412.

- Das, N. Vimala, R. Karthika, P. 2008, Biosorption of heavy metals-An overview. *Indian J. Biotechnol*, 7, 159–169.
- Degraeve, N. 1981, Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium. *Mutat. Res.* 86, 115–135.
- Deng, F. Yamaji, N. Xia, J. Ma, J. F. 2013, A member of the heavy metal P-type ATPase *OsHMA5* is involved in xylem loading of copper in rice, *Plant Physiology*, 163(3), 1353–1362.
- Didovyk, A. Borek, B. Tsimring, L. Hasty, J. 2016, Transcriptional regulation with CRISPR-Cas9: Principles, advances, and applications, *Curr. Opin. Biotechnol*, 40, 177–184.
- Dixit R. Wasiullah, Malaviya D. Pandiyan K. Singh U.B. Sahu A. Shukla R. Singh B.P. Rai J.P. Sharma P.K. Lade H. Paul D. 2015, Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aquatic Environment: An Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes. *Sustainability*, 7, 2189–2212.
- Doty, S.L. 2007, Enhanced metabolism of halogenated hydrocarbons in transgenic plants contain mammalian P450 2E1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 6287–6291.
- Duda-Chodak, A. Baszczyk, U. 2008, The impact of nickel on human health. *J. Elementol.* 13, 685–696.
- Duffus, J.H. 2002, Heavy metal - a meaningless term, *Pure Appl Chem.* 74(5), 793–807.
- Dushenkov, S. Skarzhinskaya, M. Glimelius, K. Gleba, D. Raskin, I. 2002, Bioengineering of a phytoremediation plant by means of somatic hybridization. *Int. J. Phytoremed.* 4, 117–126.
- Eapen, S. Singh, S. D'Souza, S.F. 2007, Environmental Bioremediation Technologies, *Springer*.
- Emamverdian, A. Ding, Y. Mokhberdoran, F. Xie, Y. 2015, Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *Sci. World J.* 2015, 756120.
- Erakhrumen, A.A. 2007, Phytoremediation: An environmentally sound technology for pollution prevention, control and remediation in developing countries, *Educ. Res. Rev.* 2, 151–156.
- Fasani, E. Manara, A. Martini, F. Furini, A. DalCorso, G. 2018, The potential of genetic engineering of plants for the remediation of soils contaminated with heavy metals, *Plant Cell Environ.* 41, 1201–1232.
- Fergusson, J.E. (Editor), 1990, The Heavy Elements: Chemistry, Environmental Impact and Health Effects. *Pergamon Press*, Oxford.

- Fiala, G. Setter, K.O. 1986, *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C, *Arch. Microbiol.* 145, 56.
- Gadd, G.M. 2000, Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization, *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 271–279.
- Gadd, G.M. 2010, Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation, *Microbiology*, 156, 609–643.
- Garcia-Molina, A. Andres-Colas, N. Perea-Garcia, A. Neumann, U. Dodani, S. C. Huijser, P. 2013, The Arabidopsis *COPT6* transport protein functions in copper distribution under copper-deficient conditions, *Plant and Cell Physiology*, 54, 1378–1390.
- Gasic, K. Korban, S.S. 2007, Transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*) plants expressing an Arabidopsis phytochelatin synthase (*AtPCS1*) exhibit enhanced As and Cd tolerance, *Plant Mol Biol*, 64(4), 361-369.
- Gisbert C. Ros R. De Haro A. Walker D.J. Pilar Bernal M. Serrano R. Navarro-Avino J. 2003, A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation, *Biochem Biophys Res Commun.* 303(2), 440-5.
- Gong, J.M. Lee, D.A. Schroeder, J.L. 2003, Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatin and cadmium in Arabidopsis, *PNAS*, 100 (17), 10118-10123.
- Gulati, K. Banerjee, B. Bala Lall S. Ray, A. 2010, Effects of diesel exhaust, heavy metals and pesticides on various organ systems: Possible mechanisms and strategies for prevention and treatment. *Indian J. Exp. Biol.* 48, 710–721.
- Gullner, G. 2001, Enhanced tolerance of transgenic poplar plants overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase towards chloroacetanilide herbicides, *J. Exp. Bot.* 52, 971–979.
- Guo, W.J. Meetam, M. Goldsbrough, P.B. 2008, Examining the Specific Contributions of Individual Arabidopsis Metallothioneins to Copper Distribution and Metal Tolerance, *Plant Physiology*, 146, 1697–1706
- He, C. Tan, G. Liang, X. Du.W. Chen, Y. Zhi, G. 2010, Effect of Zn-tolerant bacterial strains on growth and Zn accumulation in *Orychophragmus violaceus*. *Appl. Soil. Ecol.* 44, 1–5.
- He, Z.L. Yang, X.E. Stoffella, P.J. 2005, Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J Trace Elem Med Biol.* 19(2–3), 125–140.
- Heiss S, Wachter A, Bogs J, Cobbett C, Rausch T. 2003, Phytochelatin synthase (*PCS*) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure, *J Exp Bot.* 54(389), 1833-9.

- Hess, R. Schmid, B. 2002, Zinc supplement overdose can have toxic effects. *J. Pediat. Hematol. Onc.* 24, 582–584.
- Hou, X. Tong, H. Selby, J. Dewitt, J. Peng, X. He, Z. H. 2005, Involvement of a cell wall-associated kinase, WAKL4, Arabidopsis mineral responses. *Plant Physiology*, 139(4), 1704–1716.
- Huang, X.Y. Deng, F. Yamaji, N. Pinson, N. Fujii-Kashino, M. Danku, J. 2016, A heavy metal P-type ATPase *OsHMA4* prevents copper accumulation in rice grain. *Nature Communications*, 7, 12138.
- Hussein, H. Farag, S. Moawad, H. 2004, Isolation and characterization of *Pseudomonas* resistant to heavy metals contaminants. *Arab. J. Biotechnol.* 7, 13–22.
- Jacobs, I.A. Taddeo, J. Kelly, K. Valenziano, C. 2002, Poisoning as a result of barium styphnate explosion. *Am. J. Ind. Med.* 41, 285–288.
- Jaffre, T. Pillon, Y. Thomine, S. Merlot, S. 2013, The metal hyperaccumulators from New Caledonia can broaden our understanding of nickel accumulation in plants. *Front. Plant Sci.* 4, 279.
- Jain, S. Arnepalli, D. 2016, Biomineralisation as a remediation technique: A critical review. In *Proceedings of the Indian Geotechnical Conference (IGC2016)*, Chennai, India.
- Jan, A.T. Azam, M. Ali, A. Haq, Q.M.R. 2014, Prospects for exploiting bacteria for bioremediation of metal pollution, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 44, 519–560.
- Kapoor, A. Viraraghvan, T. 1995, Fungal biosorption-An alternative treatment option for heavy metal bearing wastewater: A review. *Bioresour. Technol.* 53, 195–206.
- Karami, A. Shamsuddin, Z.H. 2010, Phytoremediation of heavy metals with several efficiency enhancer methods, *Afr. J. Biotechnol.* 9, 3689–3698.
- Khan, M.A. Ahmad, I. Rahman, I. 2007, Effect of environmental pollution on heavy metals content of *Withania somnifera*. *J. Chin. Chem. Soc.* 54, 339–343.
- Khare, D. Mitsuda, N. Lee, S. Song, W.-Y. Hwang, D. Ohme- Takagi, M. 2017, Root avoidance of toxic metals requires the *GeBP-LIKE 4* transcription factor in *Arabidopsis thaliana*, *New Phytologist*, 213(3), 1257–1273.
- Kvesitadze, G. Khatishashvili, G. Sadunishvili, T. Ramsden, J.J. 2006, Biochemical Mechanisms of Detoxification in Higher Plants, *Springer*.
- Lee, S. Moon, J.S. Ko, T.S. Petros, D. Goldsbrough, P.B. Korban, S.S. 2003, Overexpression of Arabidopsis Phytochelatin Synthase Paradoxically Leads to Hypersensitivity to Cadmium Stress, *Plant Physiol.* 131, 656–663.
- Lehr, J.H. 2004, Wiley's Remediation Technologies Handbook. Major Contaminant Chemicals and Chemical Groups, *John Wiley & Sons*.

- Li, Y. Dhankher, O. P. Carreira, L. Lee, D. Chen, A. Schroeder, J.I. Balish, R.S. Meagher, R.B. 2004, Overexpression of Phytochelatase in Arabidopsis Leads to Enhanced Arsenic Tolerance and Cadmium Hypersensitivity, *Plant and Cell Physiology*, 45(12), 1787–1797.
- Lim, P.E. Mak, K.Y. Mohamed, N. Noor, A.M. 2003, Removal and speciation of heavy metals along the treatment path of wastewater in subsurface-flow constructed wetlands. *Water Sci. Technol.* 48, 307–313.
- Lin, C.C. Lin, H.L. 2005, Remediation of soil contaminated with the heavy metal (Cd^{2+}), *J. Hazard. Mater.* 122, 7–15.
- Lin, Y. F. Liang, H. M. Yang, S. Y. Boch, A. Clemens, S. Chen, C. C. 2009, Arabidopsis *IRT3* is a zinc-regulated and plasma membrane localized zinc/iron transporter, *New Phytologist*, 182(2), 392–404.
- Lyyra, S. Meagher, R.B. Kim, T. Heaton, A. Montello, P. Balish, R.S. Merkle, S.A. 2007, Coupling twomercury resistance genes in Eastern cottonwood enhances the processing of organomercury, *Plant Biotechnol. J.* 5, 254–262.
- Mackova, M. Dowling, D. Macek, T. 2006, Phytoremediation Rhizoremediation, *Springer*.
- Maestri, E. Marmiroli, M. 2011, Genetic and molecular aspects of metal tolerance and hyperaccumulation, Metal Toxicity in Plants: Perception, Signalling and Remediation, *Springer*, Berlin, Germany, 41–61.
- Malik, A. 2004, Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int.* 30, 261–278.
- Martinez, M. Bernal, P. Almela, C. Velez, D. Garcia-Agustin, P. Serrano, R. Navarro-Avino, J. 2006, An engineered plant that accumulates higher levels of heavy metals than *Thlaspi caerulescens*, with yields of 100 times more biomass in mine soils, *Chemosphere*, 64, 478–485.
- McCutcheon, S.C. Schnoor, J.L. 2003, Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants, *Wiley-Interscience*.
- Mesjasz-Przybylowicz, J. Nakonieczny, M. Migula, P. Augustyniak, M. Tarnawska, M. Reimold, W.U. Koeberl, C. Przybylowicz, W. Glowacka, E. 2004, Uptake of cadmium, lead, nickel and zinc from soil and water solutions by the nickel hyperaccumulator *Berkheya coddii*. *Acta Biol. Cracov. Bot.* 46, 75–85.
- Milner, M. J. Seamon, J. Craft, E. & Kochian, L. V. 2013, Transport properties of members of the ZIP family in plants and their role in Zn and Mn homeostasis. *Journal of Experimental Botany*, 64(1), 369–381.
- Mishra S, Srivastava S, Tripathi R.D, Kumar R, Seth C.S, Gupta D.K. 2006, Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of

- phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation, *Chemosphere*, 65(6), 1027-39.
- Mishra S, Tripathi R.D, Srivastava S, Dwivedi S, Trivedi P.K, Dhankher O.P, Khare A, 2009, Thiol metabolism play significant role during cadmium detoxification by *Ceratophyllum demersum* L. *Bioresour Technol.* 100(7), 2155-61.
- Mishra, S. Mishra, A. Küpper, H. 2017, Protein biochemistry and expression regulation of cadmium/zinc pumping ATPases in the Hyperaccumulator plants *Arabidopsis halleri* and *Nocca caerulescens*, *Frontiers in Plant Science*, 8, 835.
- Morel, J.L. Echevarria, G. Goncharova, N. 2002, Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils, *IOS Press, NATO Public Diplomacy Division-Springer*. Amsterdam.
- Neustadt, J. Pieczenik, S. 2007, Toxic-metal contamination: Mercury. *Integr. Med.* 6, 36 37.
- Nriagu, J.O. 1989, A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals, *Nature*, 338, 47–49.
- Ojuederie, O. B. Babalola, O.O. 2017, Microbial and Plant-Assisted Bioremediation of Heavy Metal Polluted Environments: A Review, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14, 1504.
- Padmavathiamma, P.K. Li, L.Y. 2007, Phytoremediation technology: Hyperaccumulation metals in plants. *Water Air Soil Poll.* 184, 105–126.
- Peer, W.A. Baxter, I.R. Richards, E.L. Freeman, J.L. Murphy, A.S. 2006, Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification: From Microbes to Man, *Springer*.
- Perea-Garcia, A. Andres-Borderia, A. Mayo de Andres, S. Sanz, A. Davis, A. M. Davis, S. J. 2016, Modulation of copper deficiency responses by diurnal and circadian rhythms in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Experimental Botany*, 67(1), 391–403.
- Perea-Garcia, A. Garcia-Molina, A. Andres-Colas, N. Vera- Sirera, F. Perez-Amador, M. A. Puig, S. 2013, Arabidopsis copper transport protein *COPT2* participates in the cross talk between iron deficiency responses and low-phosphate signaling, *Plant Physiology*, 162(1), 180–194.
- Pittman, J.K. Hirschi, K.D. 2016, CAX-ing a wide net: Cation/H⁺ + transporters in metal remediation and abiotic stress signaling, *Plant Biology*, 18(5), 741–749.
- Pomponi, M. Censi, V. Di Girolamo, V. 2006, Overexpression of Arabidopsis phytochelatin synthase in tobacco plants enhances Cd²⁺ tolerance and accumulation but not translocation to the shoot, *Planta*, 223(2), 180.

- Prasad, M.N.V. Freitas, H.M.D.O. 2003, Metal hyperaccumulation in plants-Biodiversity prospecting for phytoremediation technology, *Electro. J. Biotechnol.* 6, 285–321.
- Rahman, Z. Singh, V.P., 2019, The relative impact of toxic heavy metals (THMs) (arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr)(VI), mercury (Hg), and lead (Pb)) on the total environment: an overview, *Environ Monit Assess*, 191, 419.
- Rajapaksha, A.U. Vithanage, M. Ok, Y.S. Oze, C. 2013, Cr (VI) formation related to Cr (III)-muscovite and birnessite interactions in ultramafic environments. *Environ. Sci. Technol.* 47, 9722–9729.
- Rastgoo, L. Alemzadeh, A. Afsharifard, A. 2011, Isolation of two novel isoforms encoding zinc-and copper-transporting P1b-atpase from gouan (*Aeluropus littoralis*). *Plant Omics J.* 4, 377–383.
- Rehman, K. Fatima F. Waheed I. Akash M.S.H. 2018, Prevalence of exposure of heavy metals and their impact on health consequences, *J Cell Biochem.* 119, 157–184.
- Robinson, B.H. Brooks, R.R. Howes, A.W. Kirkman, J.H. Gregg, P.E.H. 1997, The potential of the high biomass nickel hyperaccumulator *Berkheya coddii* for phytoremediation and phytomining, *J. Geochem. Explor.* 60, 115–126.
- Ruis, O.N. Daniell, H. 2009, Genetic engineering to enhance mercury phytoremediation, *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 213–219.
- Salem, H.M. Eweida, E.A. Farag, A. 2000, Heavy metals in drinking water and their environmental impact on human health. In *ICEHM 2000*, Cairo University: Giza, Egypt, 542–556.
- Sambrook, J. Green, M.R. 2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 4e, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, ISBN: 978-087969577-4.
- Sekara, A. Poniedzialek, M. Ciura, J. Jedrzejczyk, E. 2005, Cadmium and lead accumulation and distribution in the organs of nine crops: implications for phytoremediation, *Pol. J. Environ. Stud.* 14, 509–516.
- Shallari, S. Schwartz, C. Hasko, A. Morel, J.L. 1998, Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania, *Sci Total Environ.* 19209, 133–142.
- Shao, J. F. Xia, J. Yamaji, N. Shen, R. F. Ma, J. F. 2018, Effective reduction of cadmium accumulation in rice grain by expressing *OsHMA3* under the control of the *OsHMA2* promoter, *Journal of Experimental Botany*, 69(10), 2743–2752.
- Sheehan, D. 1997, Bioremediation Protocols, *Humana Press*, Totowa, New Jersey.
- Shim, D. Kim, S. Choi, Y.I. Song, W.Y. Park, J. Youk, E.S. Jeong, S.C. Martinoia, E. Noh, E.W. Lee, Y. 2013, Transgenic poplar trees expressing yeast cadmium factor 1 exhibit the characteristics necessary for the phytoremediation of mine tailing soil, *Chemosphere*, 90, 1478–1486.

- Shukla, D. Kesari, R. Mishra, 2012, Expression of phytochelatin synthase from aquatic macrophyte *Ceratophyllum demersum* L. enhances cadmium and arsenic accumulation in tobacco, *Plant Cell Rep.* 31(9), 1687-1699
- Shukla, D. Kesari, R. Tiwari, M. 2013, Expression of *Ceratophyllum demersum* phytochelatin synthase, *CdPCS1*, in *Escherichia coli* and *Arabidopsis* enhances heavy metal(loid)s accumulation, *Protoplasma*, 250(6), 1263–1272.
- Silva, P. Matos, M. 2016, Assessment of the impact of aluminum on germination, early growth and free proline content in *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 131, 151–156.
- Singh, A. Prasad, S.M. Singh, S. Singh, M. 2016, Phytoremediation potential of weed plants' oxidative biomarker and antioxidant responses. *Chem. Ecol.* 32, 684–706.
- Singh, B.K. 2011, Emerging and genomic approaches in bioremediation. In *Proceedings of the 4th International Contaminated Site Remediation Conference*, Adelaide, Australia.
- Slater, M. 1998, *Pfu* DNA Polymerase: A high fidelity enzyme for nucleic acid amplification, *Promega Notes*, 68, 7–10.
- Stern, B.R. 2010, Essentiality and toxicity in copper health risk assessment: overview, update and regulatory considerations. *Toxicol Environ Health*, 73(2), 114–127.
- Tandon, P.K. Singh, S.B. 2016, Redox processes in water remediation, *Environ. Chem. Lett.* 14, 15–25.
- Tang, L. Mao, B. Li, Y. Lv, Q. Zhang, L.P. Chen, C. He, H. Wang, W. Zeng, X. Shao, Y. 2017, Knockout of *OsNramp5* using the CRISPR/Cas9 system produces low Cd accumulating indica rice without compromising yield, *Sci. Rep.* 7, 14438.
- Tchounwou P, Newsome C, Williams J, Glass K. 2008, Copper-induced cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma cells. *Metal Ions Biol Med.* 10, 285–290.
- Tiwari, M. Venkatachalam, P. Penarrubia, L. Sahi, S. V. 2017, *COPT2*, a plasma membrane located copper transporter, is involved in the uptake of Au in *Arabidopsis*, *Scientific Reports*, 7(1), 11430.
- Tripathi, R.D. Srivastava, S. Mishra, S. Singh, N. Tuli, R. Gupta, D.K. Maathuis, F.J.M. 2007, Arsenic hazards: Strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends Biotech.* 25, 158–165.
- Van Aken, B. Tehrani, R. Schnoor, J. 2011, Endophyte-assisted phytoremediation of explosives in poplar trees by *Methylobacterium populi* BJ001T. In *Endophytes of Forest Trees: Biology and Applications*, Springer, Heidelberg, The Netherlands, 80, 217–234,

- 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 (12), 7110-7115.
- Vatamaniuk, O.K. Mari, S. Lu, Y.P. Rea, P.A. 2000, Mechanism of Heavy Metal Ion Activation of Phytochelatin (PC) Synthase Blocked Thiols Are Sufficient For Pc Synthase-Catalyzed Transpeptidation Of Glutathione And Related Thiol Peptides, *Journal of Biological Chemistry*, 275 (40), 31451-31459.
- Venkataramaiah, N. Ramakrishna, S.V. Sreevathsa, R. 2011, Overexpression of phytochelatin synthase (*AtPCS*) in rice for tolerance to cadmium stress, *Biologia*, 66(6), 1060-1073.
- Vert, G. Briat, J.F. Curie, C. 2001, *Arabidopsis IRT2* gene encodes a root-periphery-iron transporter, *The Plant Journal*, 26(2), 181–189.
- Vinceti, M. Wei, E.T. Malagoli, C. Bergomi, M. Vivoli, G. 2001, Adverse health effects of selenium in humans. *Rev. Environ. Health*, 16, 233–251.
- Vishnoi, S.R. Srivastava, P.N. 2008, Phytoremediation-green for environmental clean, *The 12th World Lake Conference*, Jaipur, India.
- Willey, N. 2007, Phytoremediation Methods and Reviews, *Humana Press Inc.*
- Williams, L. E. Mills, R. F. 2005, P-1B-ATPases-an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants, *Trends in Plant Science*, 10, 491–502.
- Wojas, S. Clemens, S. Hennig, J. Skłodowska, A. Kopera, E. Schat, H. Bal, W. Antosiewicz, D.M. 2008, Overexpression of phytochelatin synthase in tobacco: distinctive effects of *AtPCS1* and *CePCS* genes on plant response to cadmium, *Journal of Experimental Botany*, 59(8), 2205–2219.
- Wu, H. Chen, C. Du, J. Liu, H. Cui, Y. Zhang, Y. 2012, Co-overexpression FIT with *AtbHLH38* or *AtbHLH39* in *arabidopsis*-enhanced cadmium tolerance via increased cadmium sequestration in roots and improved iron homeostasis of shoots, *Plant Physiology*, 158(2), 790–800.
- Wuana, R.A. Okieimen, F.E. 2011, Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecol.* 2011, 20. Makale.
- Xiao, X. Luo, S. Zeng, G. Wei, W. Wan, Y. Chen, L. Guo, H. Cao, Z. Yang, L. Chen, J. 2010, Biosorption of cadmium by endophytic fungus (EF) *Microsphaeropsis* sp. LSE10 isolated from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Bioresour. Technol.* 101, 1668–1674.
- Xu, Z. Liu, X. He, X. Xu, L. Huang, Y. Shao, H. 2017, The soybean basic Helix-Loop-Helix transcription factor ORG3- like enhances cadmium tolerance via increased iron and reduced cadmium uptake and transport from roots to shoots, *Frontiers in Plant Science*, 8, 1098.

- Yao, X. Cai, Y. Yu, D. Liang, G. 2018, bHLH104 confers tolerance to cadmium stress in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Integrative Plant Biology*, 60(8), 691–702.
- Yuan, M. Li, X. Xiao, J. Wang, S. 2011, Molecular and functional analyses of COPT/Ctr-type copper transporter-like gene family in rice, *BMC Plant Biology*, 11, 69.
- Zelazny, E. Vert, G. 2015, Regulation of iron uptake by *IRT1*: Endocytosis pulls the trigger, *Molecular Plant*, 8(7), 977– 979.
- Zhang H, Jiang Y, He Z, Ma M. 2005, Cadmium accumulation and oxidative burst in garlic (*Allium sativum*), *J Plant Physiol.* 162(9), 977-84.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Canan SEVİNÇ
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Van/Sary
Telefon : 0553 846 6303
Faks : --
e-mail : canansevinc@erbakan.edu.tr

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	Tes-iş Adapazarı Anadolu Lisesi, Adapazarı, Sakarya	2012
Üniversite	İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Beyazıt, İstanbul Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Meram, Konya	2016
Yüksek Lisans	Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Meram, Konya	--
Doktora	--	--

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2018-Halen	Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü	Araştırma Görevlisi

UZMANLIK ALANI

Moleküler Biyoloji

YABANCI DİLLER

İngilizce

YAYINLAR

Aasim M, Sameeullah M, Bakhsh A, Sevinç C, Day S, Khawar K.M, 2018, Plant tissue culture and genetic transformation studies of poor man crop cowpea (*Vigna unguiculata* L.). In: Nikolić BA (Ed). Cowpea: Research Progress and Management Challenges, Nova Publications, USA, 65-96.

Aasim M, Kahveci B, Korkmaz E, Doğanay F, Bakırcı Ş, Sevinc C, 2018, TDZ-IBA induced adventitious shoot regeneration of water balm (*Melissa. officinalis* L.), *Journal of Global Innovation in Agriculture and Social Sciences*, 6:35-39.

Aasim M, Karataş M, Bakirci S, Sevinc C, 2018, In vitro adventitious shoot regeneration of water hyssop (*Bacopa monnieri* L. Pennel) under light emitting diodes, *Journal of Global Innovation in Agriculture and Social Sciences*, 6:129-133.

Aasim M, Karataş M, Sevinç C, 2018, Light Emitting Diodes (LEDs) induced multiple shoot regeneration of Coontail (*Ceratophyllum demersum* L.). *II. International Plant Science and Technology Congress*, 07-10 October 2018, Bodrum, Turkey.

Sevinc C, Aasim M, Karataş M, 2018, Biotechnological Approches For Genetic Improvement of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.), *7th International Molecular Biology and Biotechnology Congress*, 25-27 April 2018, Konya, Turkey.

Aasim M, Usta A, Sevinc C, Karataş M, 2019, An insight into *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Genetic Transformation studies in Mungbean (*Vigna radiata* L.Wilczek), *Glob. Innov. Agric. Soc. Sci.*, 7:47-51 (Review Article).

Asim M, Aydın S, Karataş M, Aydın M.E, Soğukpınar C, Sevinc C, 2019, A Lab Study about Phytoremediation Potential of Aquatic Macrophyte *Ceratophyllum demersum* against Chromium, *5th International Agriculture Congress*, August 21-24, 2019, Istanbul, Turkey.

Sevinc C, Asim M, Bakhsh A, 2019, Optimization of Genetic transformation studies for aquatic plant-Coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) used for Phytoremediation, *Eurasian Congress on Molecular Biotechnology (ECOMB2019)*, September, 19-21, 2019, Trabzon, Turkey. (Yüksek Lisans tezinden yapılmıştır)