

Kübra BUDAK^{1a}

M. Aydın AKBUDAK^{1b*}

¹Akdeniz Üniversitesi, Ziraat
Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji
Bölümü Antalya

^{1a}ORCID: 0000-0001-9075-1817

^{1b}ORCID: 0000-0002-1397-4678

*Sorumlu yazar (Corresponding
author):

akbudak@akdeniz.edu.tr

DOI

<https://doi.org/10.5281/zenodo.73095>

43

Alınış (Received): 04/07/2022

Kabul Tarihi (Accepted): 10/08/2022

Anahtar Kelimeler

Puccinellia distans, selenyum
toksikitesi, cDNA, maya tarama testi

Keywords

Puccinellia distans, selenium toxicity,
cDNA, yeast functional screen

Maya Fonksiyonel Tarama Yöntemiyle Selenyum (Se) Toksikitesine Dayanıklılık Sağlayan Ayrık Tuz Çimi (*Puccinellia distans*) cDNA'larının Tespiti

Özet

Bir metaloid olan selenyum (Se) insanlar ve hayvanlar için esansiyel olmakla birlikte fazlalığı bitkiler dahil tüm canlılarda toksisiteye neden olmaktadır. Yapılan çalışmalar ayrık tuz çimi (*P. distans*) gibi bazı yabancı bitkilerin, kültür bitkilerine kıyasla metal / metaloid toksisitesine karşı çok daha dayanıklı olduklarını göstermiştir. Özellikle ağır metal toksisitesinin neden olduğu problemleri çözmek için bu tür dayanıklı bitkilerdeki ilişkili genlerin tanımlanması oldukça önemlidir. Bu çalışmada, *Puccinellia distans* kök ve yapraklarından hazırlanan cDNA kütüphaneleri Se stresine karşı test edilmek üzere maya (*Saccharomyces cerevisiae*) hücrelerine transforme edilmişlerdir. Transforme edilen maya hücreleri toksik dozda (15 mM) sodyum selenit içeren besiyerlerinde büyütülmüş ve hayatta kalan dayanıklı koloniler belirlenmiştir. Seçilen kolonilerdeki cDNA kaynaklı dayanıklılık, re-transformasyon ve damlatma testleriyle doğrulanmıştır. Yapılan analizler kök ve yapraklardan elde edilen ve maya hücrelerine dayanıklılık veren cDNA'ların birbirinden farklı olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçlarının metal / metaloid toksisitesine dayanıklılık sağlayan genlerin ve dayanıklılık mekanizmalarının ortaya konulmasında faydalı olacağı düşünülmektedir.

Yeast Functional Screen to Determine cDNAs of European Alkali Grass (*Puccinellia distans*) Conferring Selenium (Se) Toxicity

Abstract

Selenium (Se), a metalloid, is essential for humans and animals, but its excess causes toxicity in all living organisms, including plants. Studies have shown that some wild plants such as European alkali grass (*P. distans*) are much more resistant to metal / metalloid toxicity than crop plants are. Identification of related genes in such resistant plants is very important to solve the problems caused by heavy metal toxicity especially. In the present study, the cDNA libraries were prepared from the roots and leaves of *P. distans* and transformed into yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells to be tested against Se stress. The yeast cells were grown on medium containing a toxic dose of sodium selenite (15 mM), and the resistant colonies were determined. The cDNA-induced resistance in the selected colonies was also confirmed by re-transformation and drop tests. The analyzes showed that obtained from roots and leaves, the cDNAs conferring resistance to yeast cells were different from each other. The findings of this study should provide a useful scientific basis for future studies concerning investigation of genes conferring resistance to metal / metalloid toxicity and revealing the resistance mechanism.

GİRİŞ

Tarımsal üretimde verimliliği ve sürdürülebilirliği tehdit eden birçok stres faktörü bulunmaktadır. Kuraklık, tuzluluk ve ağır metaller, bitkisel üretimi ve biyolojik çeşitliliği tehdit eden önemli abiyotik stres faktörleridir. Bu stres faktörleri içerisinde yer alan ağır metal stresi çoğunlukla; madencilik ve endüstriyel faaliyetlerinin sonucunda toprağın ağır metaller ile kontamine olmasından kaynaklanmaktadır. Bu kontaminasyon, ekosistem içerisinde yer alan diğer canlılarda olduğu gibi, bitkilerde de toksik etkilere neden olmaktadır (Tiwari ve Lata, 2018). Özellikle son yıllarda, dünya çapında önemli bir çevre sorunu haline gelen ağır metaller tarımsal üretimi olumsuz yönde etkilemektedir (Shahid ve ark., 2015). Ağır metallerin, bitkiler tarafından yüksek miktarda alınması, bitki hücrelerinde H₂O₂ (hidrojen peroksit) gibi reaktif süperoksitlerin (ROS) artışına ve hücre redoks homeostazisinin bozulmasına neden olur. Bundan dolayı metal toksisitesi, bitkilerdeki metabolik yolların işleyişinin bozulmasına ve morfolojik anormalliklere neden olmaktadır (Amari ve ark., 2017). Selenyum insanlar ve karasal hayvanlar için temel bir mikro elementtir. Bitkiler için ise mutlak gerekli elementlerden olmayan Se, yüksek konsantrasyonlarda diğer canlılarda olduğu gibi bitkilerde de toksisiteye sebep olmaktadır. Selenyumun Cys ve Met gibi aminoasitlere bağlanması sonucunda SeCys ve SeMet içeren proteinler oluşmaktadır ki bu durum proteinlerin hatalı olarak üretilmesine ve fonksiyonlarını yerine getirememesine sebep olmaktadır. Yine, yüksek konsantrasyonlarda Se pro-oksidan görevi görerek, bitkilerde oksidatif strese sebep olan reaktif oksijenlerin üretilmesine neden olmaktadır (Gupta ve Gupta, 2017). Selenyum ayrıca toksik konsantrasyonlarda diğer metal / metaloidler ile etkileşime girerek bu elementlerin toksik etkilerini hızlandırmaktadır. Doğada metal / metaloidleri tolere edebilen bitkilerin tanımlanması oldukça önemlidir. Böylelikle, transkriptomik, proteomik ve

metabolomik yaklaşımlar kullanılarak, metal stresine karşı toleranslıkla ilişkilendirilmiş olan genler ve bu genlerin fonksiyonlarının anlaşılması sağlanabilir (Singh ve ark., 2016). Transkriptomik çalışmalarda gen karakterizasyonu için; stres uygulanması sonrasında, bitkilerden mRNA izole edilir ve bu mRNA'lardan cDNA sentezlenir. Sentezlenen cDNA ile rekombinant vektörler oluşturulduktan sonra elde edilen cDNA kütüphaneleri, test edilecek hücrelere aktarılır (Liu ve Bretscher, 1992; Clemens ve ark., 1999). Strese karşı reaksiyonların belirlenmesinde ve cDNA'ların ifadenmesinde ökaryotik model bir organizma olan maya (*S. cerevisiae*) yaygın olarak kullanılmaktadır. Yerkürede Se dağılımı birçok faktöre göre değişmektedir ve eksikliği yanında toksisitesi de yaygın olarak görülür. Toksik miktardaki boru tolere edebilen, *Puccinellia distans* (*Poaceae*)'ın toksik miktardaki selenyumunu da tolere edebildiği bildirilmiştir (Babaoglu ve ark., 2004; Kök ve ark., 2020). Bu çalışmada, *P. distans* yaprak ve kök cDNA kütüphaneleri, maya fonksiyonel tarama yöntemiyle, selenyum toksisitesine dayanıklılık ile ilişkili olan genleri belirlemek amacıyla fonksiyonel olarak taranmıştır. cDNA kütüphanelerini taramak için yabani tip maya hücrelerinde (Irk: BY4741) belirtildiği üzere toksik doz olarak belirlenmiş olan 15 mM sodyum selenit (Na₂SeO₃) içeren YNB besiyeri kullanılmıştır (Budak ve Akbudak, 2021). Toksik dozda Na₂SeO₃ içeren YNB besiyerinde gelişebilen maya hücreleri seçildikten sonra damlatma testi ile selenyuma karşı dayanıklılıkları doğrulanmıştır. Dayanıklılıkla ilgili maya hücrelerindeki cDNA'lar arasındaki polimorfizm PCR ile ortaya konulmuştur. Farklılık gösteren cDNA'ları içeren plazmitler maya hücrelerine re-transforme edilmiş ve selenyum dayanıklılığı için doğrulama işlemi damlatma testiyle gerçekleştirilmiştir. Böylelikle, *P. distans*'ta Se toksisitesine dayanıklılık sağlayan cDNA'ların varlığı maya tarama yöntemi kullanılarak ortaya konulmuştur.

MATERYAL ve YÖNTEM

cDNA kütüphanelerinin çoğaltılması

P. distans yaprak ve kök cDNA kütüphanelerini içeren plazmitler elektroporasyon yöntemiyle ile *E. coli* hücrelerine (ElecroMAX DH10B T1, Thermo, ABD) aktararak çoğaltılmışlardır (Larson ve Baker, 2019). Elektroporasyon işlemini takiben küvetlere 1 ml sıvı LB besiyeri (Luria-Bertani Broth) eklenmiş ve hücreler Eppendorf tüplere aktarıldıktan sonra 37 °C’de 225 rpm hızda 1 saat inkübe edilmişlerdir. Hücreler 100 µg/ml ampisilin içeren LBA (Luria-Bertani Agar) içeren petri tabaklarına yayıldıktan sonra 37 °C’de 16 – 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmışlardır. Petrilere toplanan hücreler 5 ml LB içerisinde birleştirilmiş ve Plasmid Mini Kit (Qiagen, ABD) yardımıyla plazmitler hücrelerden izole edilerek -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

cDNA kütüphanelerinin maya hücrelerine transformasyonu

İzole edilen plazmitler, maya (*S. cerevisiae*, ırk: BY4741) hücrelerine elektroporasyon yoluyla aktarılmıştır (Benatuil ve ark., 2010). S288C maya ırkından türetilmiş olan BY4741, MATa his3, leu2, met15 ve ura3 mutasyonlarına sahiptir. Elektroporasyon işlemi sonrasında, maya hücreleri, 1/10¹, 1/10² ve 1/10³ oranında seyreltikten sonra urasil içermeyen YNB besi ortamına yayılmıştır. Oluşan koloniler petrilere sıyırılarak 25 ml sıvı YNB-URA besiyeri içeren Falcon tüplerde toplanmıştır. İçerisinde cDNA kütüphaneleri veya cDNA taşımayan vektörü (EV) bulduran maya maya hücrelerine, gliserol (%40) eklenerek -80 °C’de kullanılıncaya kadar muhafaza edilmişlerdir.

cDNA Kütüphanelerinin Taranması

cDNA kütüphanelerini taşıyan maya hücreleri buz üzerinde çözündürüldükten sonra, YNB besiyeri üzerine yayılarak önce canlılıkları test edilmiştir (pozitif kontrol). Selenyuma dayanıklı hücreleri belirlemek üzere cDNA kütüphanelerini taşıyan maya hücrelerinden 150 µl alınarak 15 mM Na₂SeO₃ içeren YNB besiyeri üzerine

yayılmıştır (Budak ve Akbudak, 2021). cDNA içermeyen boş vektörle (EV) transforme edilmiş maya hücreleri de aynı işleme tabi tutulmuşlardır (negatif kontrol). Petrilere 30 °C’de inkübe edilmiş ve koloni oluşumları günlük takip edilerek negatif kontrol ile kıyaslanmıştır.

Damlatma Testi

Seçilen dayanıklı koloniler, sıvı YNB besiyerinde 30 °C sıcaklıkta 225 rpm hızda 24 saat süre ile sallanarak büyütülmüştür. Hücre yoğunlukları OD₆₀₀= 0.2 ulaştığında her bir koloniden 5 µl maya hücresi 0 (kontrol), 5 mM, 10 mM ve 15 mM Na₂SeO₃ içeren YNB besiyerine aktarılmıştır. 30 °C’de inkübe edilen petrilere, koloni gelişimi 5 gün boyunca gözlemlenmiştir. cDNA taşıyan dayanıklı koloniler, EV taşıyan koloniler ile karşılaştırılmıştır.

Dayanıklılık sağlayan cDNA’lar arasındaki polimorfizmin belirlenmesi

Damlatma testi sonucunda EV taşıyanlara göre farklı gelişim gösteren dayanıklı kolonilerin taşıdıkları cDNA’ların boyutunu belirlemek amacıyla koloni PCR yapılmıştır (Smolke, 2013). Koloni PCR’da cDNA plazmitlerini taşıyan maya hücreleri için seçilen tek koloniler kullanılmıştır. PCR, vektöre özgü ve konumları rekombinasyonla aktarılan cDNA’ların uçlarına konumlanan GDP-F (5’ - CGGTAGTATTGATTGTAATTCTG - 3’) ve CYC1 (5’ - GCGTGAATGTAAGCGTGAC - 3’) primerleri ile yapılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri %1’lik agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutularak cDNA boyutları karşılaştırılmıştır.

Re-Transformasyon

Farklı cDNA’lar taşıdıkları belirlenen maya kolonilerinden plazmitler Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep (Zymo Research, ABD) kit kullanılarak izole edilmiştir. İzole edilen plazmitler, yabancı tip BY4741 içerisine elektroporasyon ile aktarılmıştır. Transforme edilen maya hücreleri toksik selenyum dozları ve damlatma işlemleri ile kontrol amaçlı olarak ikinci kez test edilmişlerdir.

BULGULAR

P. distans kök ve yaprak kütüphanelerinin taranması

P. distans kök ve yaprak cDNA kütüphaneleri, *E. coli* hücreleri içerisinde

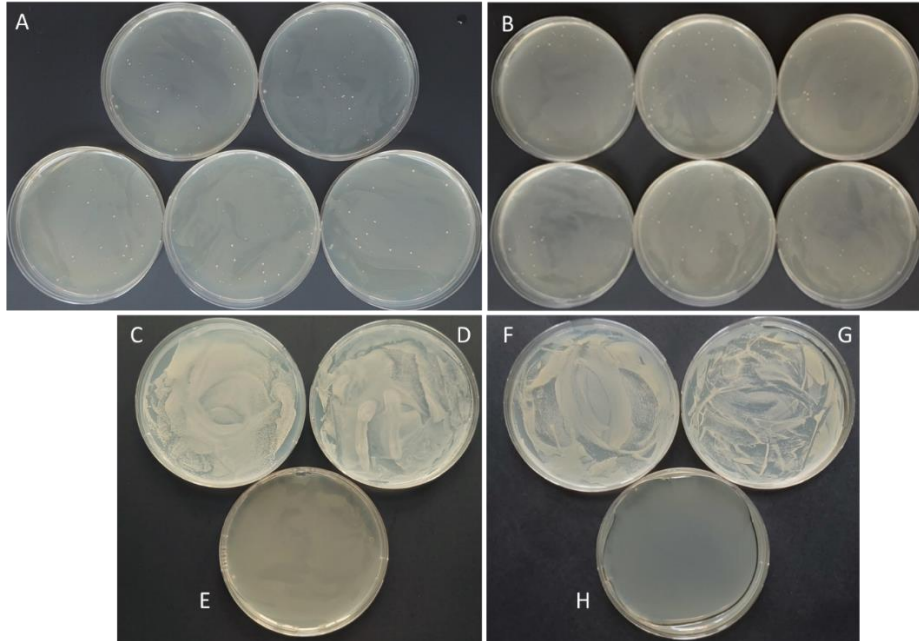
başarılı bir şekilde çoğalmıştır (Şekil 1). Bu durum kütüphaneleri oluşturan plazmitlerin saklama koşulları altında zarar görmediğini göstermesi ve deneylere devam edilebilmesi açısından önemlidir.



Şekil 1. LB + Ampisilin besi ortamında cDNA kütüphanelerini içeren *E. coli* hücreleri

E. coli hücrelerinde çoğaltıldıktan sonra izole edilen cDNA kütüphanelerinin maya hücrelerine elektroporasyon yöntemiyle aktarımının başarılı olduğu, maya hücrelerinin urasil içermeyen seçici YNB besiyerinde büyütülmesiyle doğrulanmıştır. Sonrasında selenyum stresine karşı

taranmak üzere 15 mM Na_2SeO_3 içeren YNB besiyerlerinde büyütülen maya hücrelerinden, üçüncü günün sonunda yaprak ve kök cDNA kütüphanelerine ait plazmitleri taşıyan her bir kütüphane için yaklaşık 200 adet dayanıklı koloni tespit edilmiştir (Şekil 2A ve 2B).



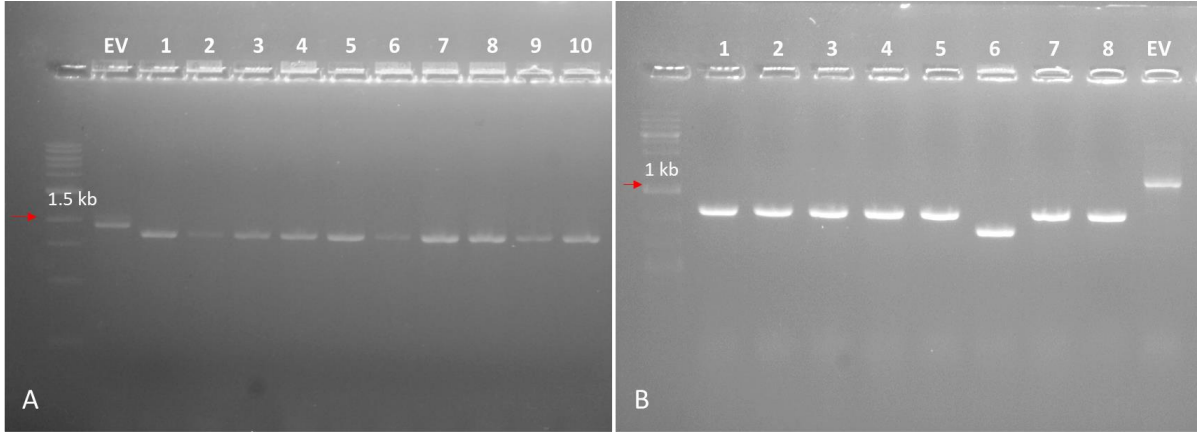
Şekil 2. Yaprak (A) ve kök (B) cDNA içeren kütüphanelerini taşıyan maya hücrelerinin YNB + 15 mM Na_2SeO_3 içeren besiyerinde gelişimi, (C) YNB besiyerinde EV taşıyan maya hücreleri (pozitif kontrol) (D) YNB besiyerinde yaprak kütüphane hücreleri (pozitif kontrol) (E) YNB+15 mM Na_2SeO_3 içeren besiyerinde EV kolonileri (negatif kontrol) (F) YNB besiyerinde EV taşıyan maya hücreleri (pozitif kontrol) (G) YNB besiyerinde kök kütüphane hücreleri (pozitif kontrol) (H) YNB+15 mM Na_2SeO_3 içeren besiyerinde EV kolonileri (negatif kontrol)

Şekil 2C ve 2D'deki pozitif kontroller, kütüphaneleri veya kontrol olarak kullanılan boş vektörü taşıyan maya hücrelerinin toksik Na_2SeO_3 içermeyen YNB ortamında başarılı bir şekilde geliştiklerini göstermektedir. Diğer taraftan beklenildiği gibi, boş vektörü taşıyan (EV) **cDNA Polimorfizminin Belirlenmesi**

Toksik konsantrasyonda Na_2SeO_3 içeren besin ortamında seçilen kolonilerin cDNA insersiyon bölgeleri PCR yardımıyla

maya hücreleri toksik miktarda Na_2SeO_3 içeren YNB ortamında büyüyememişlerdir (Şekil 3E). Bu durum kolonilerdeki selenyum dayanıklılığının (Şekil 3A ve 3B) transforme edilen vektörlerdeki *P. distans* cDNA'larından kaynaklandığını göstermektedir.

GDP-F / CYC1 primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır. Amplikonlar agaroz jelde yürütülerek cDNA'lar arasındaki polimorfizm belirlenmiştir (Şekil 3).

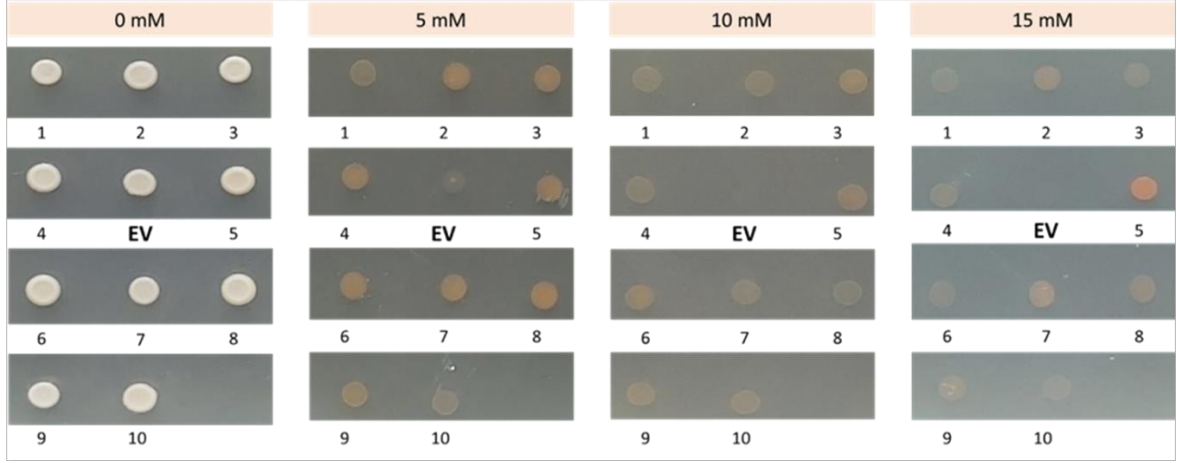


Şekil 3. Dayanıklı kolonilerden izole edilen vektörlerdeki cDNA boyutlarının karşılaştırılması. Yaprak cDNA'ları (A) ve kök cDNA'ları (B).

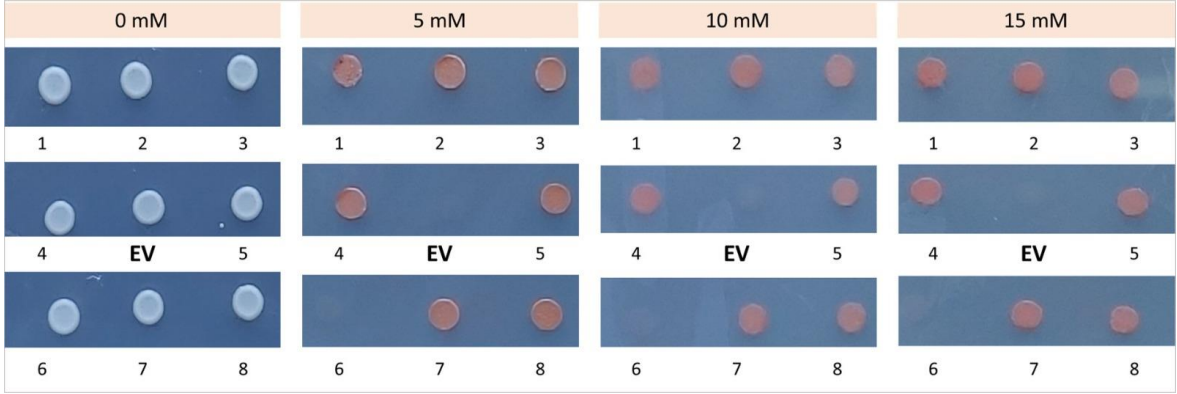
Yaprak cDNA kütüphanesini taşıyan selenyuma dayanıklı maya hücrelerinden rastgele seçilen 10 adet koloninin hepsinden ~1300 bp boyutunda amplikonlar elde edilmiştir (Şekil 3A). Kök cDNA kütüphanesini taşıyan kolonilerden seçilen yedisinde ise amplikon boyutu ~800 bp olarak tespit edilmiştir. Yalnızca altı numaralı kolonide cDNA bölgesinin boyutu ~700 bp olarak tespit edilmiştir. Ancak bu koloni damlatma testinde dayanıklılık göstermediği için elenmiştir. Bu durum, selenyuma dayanıklılık sağlayan kök ve yaprak cDNA'larının boyutlarının kendi içlerinde aynı, fakat organlar arasında farklı olduğunu göstermektedir.

Toksik selenyum konsantrasyonuna karşı dayanıklılığın damlatma testi ile doğrulanması

Toksik selenyum konsantrasyonunu tolere edebilen kolonilerin farklı Na_2SeO_3 konsantrasyonlarındaki gelişimlerini ve dayanıklılık seviyelerini kıyaslamak amacıyla, dayanıklı maya kolonilerinden (Şekil 3A ve 3B) plazmitler izole edilmiştir. Yapılan damlatma testinde, maya hücrelerine re-transforme edilen plazmitlerin selenyuma farklı seviyelerde dayanıklılık sağladığı tespit edilmiştir (Şekil 4 ve Şekil 5).



Şekil 4. *P. distans* yaprak cDNA'larını taşıyan plazmitlerle transforme edilmiş ve seleniyuma dayanıklılık gösteren maya hücrelerine yapılmış damlatma testi. EV: Boş vektör



Şekil 5. *P. distans* kök cDNA'larını taşıyan plazmitlerle transforme edilmiş ve seleniyuma dayanıklılık gösteren maya (BY4741) hücrelerine yapılmış damlatma testi. EV: Boş vektör

Yaprak ve kök cDNA'larını taşıyan dayanıklı kolonilerin tamamı 5 mM, 10 mM ve 15 mM Na_2SeO_3 içeren ortamda dayanıklılıklarını korurken, EV vektörünü taşıyan kolonilerin ise canlılıklarını kaybettikleri görülmektedir. EV (boş vektör) taşıyan maya hücrelerinin bu dozlarda gelişmemesi, toksik miktarda seleniyuma dayanıklılığın kök ve yaprak cDNA'larından kaynaklandığı doğrulanmıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Metal toksisitesi bitkiler de dahil olmak üzere birçok canlının yaşamını olumsuz yönde etkilemektedir (Shahid ve ark., 2015). Bazı metaller (örneğin bakır, selenyum, çinko) iz element olarak insanların vücudunda çok önemli

fonksiyonlara sahip olmalarına karşın yüksek konsantrasyonları zehirlenmelere yol açmaktadır. Bitkilerde ise metal toksisitesi nedeniyle verim ve kalite kayıpları görülmektedir. Bitkiler genel olarak kuru ağırlıkta 25 $\mu\text{g/g}$ Se biriktirebilirken, bu miktarın üzerindeki Se birikimi tolere edememekte ve bu durum pek çok bitki türünde selenyum toksisitesi ile sonuçlanmaktadır (Freeman ve ark., 2010). Bazı yabancı bitkilerin kültür bitkilerine kıyasla metal / metaloidlere çok daha toleranslı oldukları bilinmektedir. Bu bitkilerde birçok metal iyonunun topraktan alınması ve taşınmasında ortak gen ailelerinin görev aldığı yapılan farklı çalışmalarla ortaya konulmuştur. Örneğin ZIP genleri; Cd, Mn, Fe ve Zn taşıyan proteinleri kodlayan bir gen ailesidir ve

bitkilerin bu metallerin toksisitesinden korunmasında önemli işlevlere sahiptirler (Corso ve ark., 2020). Ayrıca, bitki bünyesine alınan yüksek miktardaki selenyumun diğer toksik metal/metaloidler ile etkileşime girerek bunların toksik etkilerini artırdığı da belirlenmiştir (Hasanuzzaman ve ark., 2020). Se toksisitesi, tuzluluğa benzer şekilde kloroz, solma, bodur sürgün ve kök oluşumuna neden olmakta ve bitkilerin fotosentetik enzim aktivitelerini azaltmaktadır (Kolbert ve ark., 2019). Ayrıca selenyum toksisitesi nedeniyle oluşan SeCys ve SeMet gibi aminoasitlerin protein zincirinde Cys ve Met'in yerini alması sonucunda proteinlerde fonksiyon bozuklukları meydana gelmektedir (Gupta ve ark., 2017). Stres tolerans mekanizmalarının aydınlatılmasında ve stres koşullarında dayanıklılık sağlayan genlerin tespit edilmesinde cDNA kütüphanelerinden sıklıkla faydalanılmaktadır. Bu kütüphaneler stres altında ifade edilen mRNA'ların cDNA'ya dönüştürülerek depolanmalarına imkân vermektedirler. Kütüphanelerdeki cDNA'ların aktif (constitutive) bir promotor altında maya (*S. cerevisiae*) hücrelerinde sürekli ifade edilmeleri sayesinde de strese dayanıklılık sağlayan gen(ler) belirlenebilmektedir (Liu ve ark., 2002; Wang ve ark., 2020). Bu çalışmalarda *S. cerevisiae*'nin tercih edilme nedeni; ökaryotlarda bulunan hemen hemen tüm biyolojik işlevlere sahip olması, kolay çoğaltılabilirliği ve genetik manipülasyona imkân tanınmasıdır (Duina ve ark., 2014; Parapouli ve ark., 2020). Literatürde cDNA kütüphaneleri ve *S. cerevisiae*'nin stres şartlarına dayanıklılık genlerinin tanımlanmasında faydalandığı pek çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde; halofit bir tür olan *Paspalum vaginatum* cDNA kütüphanelerinin, maya hücrelerinde tuzluluk ve Cd stresi altında taranmasıyla tuzluluğa karşı tolerans sağladığı düşünülen 18 adet ve Cd stresi karşı da beş adet gen belirlenmiştir (Chen ve ark., 2016). Porcel ve ark. (2018), şeker pancarı cDNA'larını mayada test etmek

suretiyle bitkide bor homeostasisini sağlayan ve abiotik stres dayanımıyla ilişkili olduğunu gösterdikleri yeni bir aquaporin genini, BvCold1'i tanımlamışlardır. *P. distans*'ın bor ve selenyum streslerine karşı tolerans sağladığını gösteren çalışmalar literatürde yer almasına karşın, moleküler çalışmalar transkriptom farklılıklarının gösterilmesiyle sınırlıdır (Öztürk ve ark., 2017; Kök ve ark., 2020). *P. distans*'ta toksik seviyelerde metal / metaloid içeren ortamlarda yaşayabilmesine imkân sağlayan gen(ler)in hangileri olduğu halen net bir şekilde ortaya konulamamıştır. Bu nedenle, *P. distans*'ın yüksek B ve Se içeren ortamlarda yaşamasına imkân veren mekanizma ve dayanıklılık gen(ler)inin hangilerinin olduğunu ortaya konulmasına yönelik çalışmalara ihtiyaç vardır. Metal / metaloid streslerine karşı toleranslıkta, birçok fizyolojik ve moleküler mekanizma bulunduğu (Kumar ve ark., 2015), bunun yanı sıra, farklı bitkilerde, metal stresine karşı toleranslıkla ilişkili genlerin kök veya yaprakta ifade olduğu doğrulanmıştır (Zhou ve ark., 2007; Pourrut ve ark., 2011; Rao ve ark., 2011; Dubey ve ark., 2014). Bu genlerin fonksiyonları oldukça çeşitlidir. Metal stresine karşı bitkilerdeki savunma mekanizmasına ilişkin bilgiler hala daha sınırlıdır. Çünkü birçok sinyal yolağının (ROS, TF, fitohormon vb.) bu streslere karşı savunma mekanizmasında rol oynadığı düşünülmektedir (Verma ve ark., 2016; Helleday ve ark., 2000). Çalışmamız sonucunda, *P. distans*'da selenyuma karşı toleranslıkla ilişkilendirilmiş olan iki farklı cDNA tespit edilmiştir. Bu cDNA'ların farklı dokularda ifade olması sağladıkları dayanıklılık mekanizmalarının farklı olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Belirlenen cDNA'ların sekanslanarak kodlandıkları genlerin karakterize edilmesi ve fonksiyonlarının aydınlatılması, bitkilerde metal / metaloid toksisitesine ilişkin problemlerin çözümüne ve verim kayıplarının önlenmesine katkı sunacaktır.

AÇIKLAMA

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: FYL-2021-5747.

KAYNAKLAR

- Amari, T., Ghnaya, T., Abdelly, C. 2017. Nickel, cadmium and lead phytotoxicity and potential of halophytic plants in heavy metal extraction. *S. Afr. J. Bot.*, 111: 99–110.
- Babaoglu, M., Gezgin, S., Topal, A. 2004. *Gypsophila sphaerocephala* Fenzl ex Tchihat.: A Boron Hyperaccumulator Plant Species That May Phytoremediate Soils with Toxic B Levels *Gypsophila sphaerocephala* Fenzl ex Tchihat: Toksik Seviyede Bor çeren Toprakların Bitkisel. *Turk J. Bot.* 28, Turkey.
- Benatuil, L., Perez, J. M., Belk, J., Hsieh, C. M. 2010. An improved yeast transformation method for the generation of very large human antibody libraries. *Protein engineering, design & selection* : PEDS, 23(4): 155–159.
- Budak, K., Akbudak, M.A. 2021. *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 Irkının Gelişimini Sınırlayan Toksik Selenyum Dozunun Belirlenmesi. A. Gümrah (Ed.), 7th International Mardin Artuklu Scientific Researches Conference Bildiriler Kitabı içinde (542-548).
- Corso, M., García De La Torre, V.S. 2020. Biomolecular approaches to understanding metal tolerance and hyperaccumulation in plants. *Metallomics*, 12(6): 840–859
- Chen, Y., Chen, C., Tan, Z., Liu, J., Zhuang, L., Yang, Z., Huang, B. 2016. Functional identification and characterization of genes cloned from halophyte seashore *Paspalum* conferring salinity and cadmium tolerance. *Frontiers in plant science*, 7: 102.
- Clemens, S., Kim, E.J., Neumann, D., Schroeder, J.I. 1999. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *The EMBO journal*, 18(12): 3325–3333.
- Dubey, S., Shri, M., Misra, P., Lakhwani, D., Bag, S. K., Asif, M.H., Trivedi, P.K., Tripathi, R.D., Chakrabarty, D. 2014. Heavy metals induce oxidative stress and genome-wide modulation in transcriptome of rice root. *Functional & integrative genomics*, 14(2): 401–417.
- Duina, A.A., Miller, M. E., Keeney, J.B. 2014. Budding yeast for budding geneticists: A primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics*, 197(1): 33–48.
- Gupta, M., Gupta, S. 2017 An Overview of Selenium Uptake, Metabolism, and Toxicity in Plants. *Front. Plant Sci.* 7:2074.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M., Raza, A., Hawrylak-Nowak, B., Matraszek-Gawron, R., Nahar, K., ve Fujita, M. 2020. Selenium Toxicity in Plants and Environment: Biogeochemistry and Remediation Possibilities. *Plants (Basel, Switzerland)*, 9(12): 1711.
- Helleday, T., Nilsson, R., Jenssen, D. 2000. Arsenic (III) and heavy metal ions induce intrachromosomal homologous recombination in the hprt gene of V79 Chinese hamster cells. *Environ. Mol. Mutagen*, 35: 114–122.
- Freeman, J. L., Tamaoki, M., Stushnoff, C., Quinn, C.F., Cappa, J.J., Devonshire, J., Pilon-Smits, E.A.H. 2010. Molecular mechanisms of selenium tolerance and hyperaccumulation in *Stanleya pinnata*. *Plant Physiology*, 153(4): 1630–1652.

- Kolbert, Z., Molnár, Á., Feigl, G., Van Hoewyk, D. 2019. Plant selenium toxicity: Proteome in the crosshairs. *Journal of plant physiology*, 232: 291–300.
- Kök, A.B., Mungan, M.D., Doğanlar, S., Frary, A. 2020. Transcriptomic analysis of selenium accumulation in *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl., a boron hyperaccumulator. *Chemosphere*, 245: 125665.
- Kumar, S., Dubey, R. S., Tripathi, R. D., Chakrabarty, D., ve Trivedi, P. K. 2015. Omics and biotechnology of arsenic stress and detoxification in plants: current updates and prospective. *Environ. Int.*, 74: 221–230.
- Larson, J.D., Baker, S.J. 2019. Engineering Inducible Knock-In Mice to Model Oncogenic Brain Tumor Mutations from Endogenous Loci. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1869: 207–230.
- Liu, H., Krizek, J., Bretscher, A. 1992. Construction of a GAL1-regulated yeast cDNA expression library and its application to the identification of genes whose overexpression causes lethality in yeast. *Genetics*, 132(3): 665–673.
- Liu, H. 2002. Constructing yeast libraries. In *Methods in enzymology*, 350: 72–86.
- Öztürk, S.E., Göktay, M., Has, C., Babaoğlu, M., Allmer, J., Doğanlar, S., Frary, A. 2017. Boron Hyperaccumulation Mechanisms in *Puccinellia distans* as Revealed by Transcriptomic Analysis. *BioRxiv*, 110403.
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A. S., Hatziloukas, E. 2020. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. AIMS Microbiology. AIMS Press.
- Porcel, R., Bustamante, A., Ros, R., Serrano, R., Mulet Salort, J.M. 2018. BvCOLD1: A novel aquaporin from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) involved in boron homeostasis and abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 41(12): 2844–2857.
- Pourrut, B., Jean, S., Silvestre, J., Pinelli, E. 2011. Lead-induced DNA damage in *Vicia faba* root cells: potential involvement of oxidative stress. *Mutat. Res.*, 726: 123–128.
- Rao, K. P., Vani, G., Kumar, K., Wankhede, D.P., Misra, M., Gupta, M., Sinha, A. K. 2011. Arsenic stress activates MAP kinase in rice roots and leaves. *Archives of biochemistry and biophysics*, 506(1): 73–82.
- Shahid, M., Khalid, S., Abbas, G., Shahid, N., Nadeem, M., Sabir, M., ark. 2015. “Heavy metal stress and crop productivity,” in *Crop Production and Global Environmental Issues*, ed. K. R. Hakeem (Cham: Springer International Publishing): 1–25.
- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V. P., ve Prasad, S. M. 2016. Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Front. Plant Sci.*, 6:1143.
- Smolke, 2013. Subject: Protocols/Yeast Colony PCR. http://openwetware.org/mediawiki/index.php?title=Smolke:Protocols/Yeast_Colony_PCR&oldid=699084. Erişim: Eylül, 2022.
- Tiwari, S., Lata, C. 2018 Heavy Metal Stress, Signaling, and Tolerance Due to Plant-Associated Microbes: An Overview. *Front. Plant Sci.*, 9:452.
- Verma, S., Verma, P.K., Meher, A.K., Dwivedi, S., Bansawal, A.K., Pande, V., ve ark. 2016. bioremediation. *Metallomics*, 8: 344–353.
- Yan, A., Wang, Y., Tan, S.N., Mohd-Yusof, M.L., Ghosh, S., ve Chen, Z. 2020 Phytoremediation: A Promising Approach for Revegetation of Heavy Metal-Polluted Land. *Front. Plant Sci.*, 11:359.

Zhou, Z. S., Huang, S. Q., Guo, K., Mehta, S. K., Zhang, P. C., ve Yang, Z. M. 2007. Metabolic adaptations to

mercury-induced oxidative stress in roots of *Medicago sativa* L. *J. Inorg. Biochem*, 101, 1–9.