



## Expression of Some Metal Transporter ATPases in *Brassica rapa* Grown under Cadmium Stress<sup>#</sup>

Merve Sahan<sup>1,a</sup>, Nuriye Meraklı<sup>1,b</sup>, Abdulrezzak Memon<sup>1,c,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Arts and Sciences, Usak University, 64000 Usak, Türkiye

\*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><sup>#</sup>This study was presented at the 6th International Anatolian Agriculture, Food, Environment and Biology Congress (Kütahya, TARGID 2022)</p> <p>Research Article</p> <p>Received : 22.10.2022 Accepted : 18.12.2022</p> <p>Keywords: Heavy metal ATPases HMA2 HMA4 Cd <i>Brassica rapa</i></p>	<p>Cadmium (Cd) is one of the toxic heavy metals not essential for the growth and development of plants and other organisms. <i>Brassica rapa</i> accumulates several heavy metals in its leaves and is reportedly suitable for phytoremediation. In this study, Cd uptake and accumulation in the leaves of <i>B. rapa</i> exposed to different cadmium levels (0, 5, 10, 20, 50, 100 µM CdSO<sub>4</sub>) were analyzed, as well as the effect of Cd stress on HMA2 and HMA4 genes expression were investigated. The qRT-PCR results showed that HMA2 and HMA4 play a vital role in cadmium uptake and translocation in <i>B. rapa</i> at low Cd levels (5-20 µM). However, exposure to high Cd levels (50 and 100 µM) significantly reduced the growth and biomass of <i>B. rapa</i>. Furthermore, high levels of Cd inhibit the expression of HMA2 and HMA4 genes in <i>B. rapa</i>. Our data show a multigenetic (co-acting of many transporter gene clusters) response in the signaling pathway associated with Cd accumulation and tolerance mechanism in <i>B. rapa</i>.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 10(sp1): 2685-2690, 2022

## Kadmiyum stresi altında yetiştirilen *Brassica rapa*'da bazı metal taşıyıcı ATPaz'ların anlatımı

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p>Araştırma Makalesi</p> <p>Geliş : 22.10.2022 Kabul : 18.12.2022</p> <p>Anahtar Kelimeler: Heavy metal ATPases HMA2 HMA4 Cd <i>Brassica rapa</i></p>	<p>Kadmiyum (Cd), bitkilerin ve diğer organizmaların büyümesi ve gelişmesi için biyolojik olarak gerekli olmayan toksik ağır metallere birisidir. <i>Brassica rapa</i> yapraklarında bazı ağır metalleri biriktirebilme yeteneği sergilediği ve fitoremediasyon için uygun bir bitki olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, farklı kadmiyum seviyelerine (0, 5, 10, 20, 50, 100 µM CdSO<sub>4</sub>) maruz kalan <i>B. rapa</i> yapraklarında Cd alımı ve birikimi analiz edilmiş; Cd stresinin HMA2 ve HMA4 genlerinin ekspresyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. qRT-PCR sonuçları, HMA2 ve HMA4'ün düşük Cd seviyesinde (5-20 µM) <i>B. rapa</i>'da kadmiyum alımı ve translokasyonunda önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Bununla birlikte, yüksek Cd seviyelerine (50 ve 100 µM) maruz kalma, <i>B. rapa</i>'nın büyümesini ve biyokütlesini önemli ölçüde azaltmıştır. Ayrıca, yüksek Cd seviyeleri, <i>B. rapa</i>'da HMA2 ve HMA4 genlerinin ekspresyonunu inhibe etmiştir. Verilerimiz, <i>B. rapa</i>'da Cd birikimi ve tolerans mekanizması ile ilişkili sinyal yolağında multigenetik (birçok taşıyıcı gen kümesinin birlikte etkisiyle) bir yanıt olduğunu göstermektedir.</p>

<sup>a</sup> [merve.nur.sahan@gmail.com](mailto:merve.nur.sahan@gmail.com)  
<sup>c</sup> [armemon@usak.edu.tr](mailto:armemon@usak.edu.tr)

<sup>b</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3124-5185>  
<sup>d</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9447-6453>

<sup>b</sup> [nuriye.merakli@gmail.com](mailto:nuriye.merakli@gmail.com) <sup>d</sup> <https://orcid.org/0000-0001-5454-7149>



## Giriş

Kadmiyum (Cd) doğaya doğal veya antropojenik kaynaklar (örneğin metal içeren gübrelerin, kanalizasyon çamuru ve mantar öldürücülerin kullanımı) ile salınan en toksik ağır metallere biridir (Marschner, 1995; Alloway ve Steinnes 1999; Li ve ark., 2021). Bitkide Cd, fizyolojik ve biyokimyasal değişimler üzerinde doğrudan veya dolaylı etkileri bulunmaktadır. Bitki büyüme ve gelişimi için kadmiyum kadmiyum esansiyel bir element değildir; ancak, bitki kökleri tarafından kolayca absorbe edilebilmekte ve toprak üstü kısımlarda birikebilmektedir. Besin zinciri yoluyla da başta insan olmak üzere canlı organizmaların sağlığını tehdit eden toksik seviyelere ulaşmaktadır. Özellikle topraktaki Cd tarım ürünlerinin (tahıllar gibi) yenilebilir kısımlarında birikerek ürün verimini ve gıda güvenliğini riske atmaktadır (Clemens ve ark., 2013). Bitkide kadmiyum alınımı ve buna bağlı olarak gıdadaki artan düzeyinin en aza indirgenmesi oldukça önemlidir.

Brassicaceae familyasına ait olan yem şalgamı (*Brassica rapa* L. *rapa*) yemeklik yağın ana kaynağıdır ve dünya çapında sebze olarak tüketilmektedir. (Gill ve ark., 2014). *B. rapa* L. ağır metal toksisitesine karşı toleransı yüksek bir tür olarak kabul edilmekte; ancak, bu türde yüksek miktarda bazı metaller toksisiteye neden olabileceği vurgulanmıştır (Meng ve ark., 2009; Gill ve ark., 2015). *Brassica* cinsinin içerisinde bulunan *B. rapa* (2n) gibi bazı türlerin, ağır metal stresine karşı sahip oldukları tolerans mekanizmaları nedeniyle fitoremediasyon amaçlı deneysel araştırmalarda model bitkiler olarak kullanıldığı bilinmektedir (Ali-Zade ve ark., 2010; Navarro-León ve ark., 2019). Fitoremediasyon araştırmalarının temel amaçlarından biri, ağır metal kirleticilerinin birikimi için uygun akümülatör türlerin tespit edilmesidir (Navarro-León ve ark., 2019;). Son yıllarda araştırmacılar, ağır metalleri yüksek miktarda depolama kapasitesine sahip yeni genotiplerin araştırılmasına yönelik giderek artan bir ilgi göstermektedir (Ali-Zade ve ark., 2010). Bu stratejiyi geliştirmek için son zamanlarda farklı türlerde metal alım ve taşıma mekanizması ile ilişkili bir grup metal taşıyıcının aracılık ettiği bildirilmiştir (Kraemer ve ark., 2007; Zhang ve ark., 2018). Bu taşıyıcılar arasında P-tipi ATPaz üyesi taşıyıcıların hücre içi bazı organellerin zarında lokalize oldukları ve Cd, Pb ve Zn gibi bazı ağır metallerin taşınımında ve detoksifikasyonunda fonksiyon gösterdikleri tespit edilmiştir (Ueno ve ark., 2008). Bu taşıyıcılar, ATP moleküllerinin hidrolizi tarafından salınan enerjiyi kullanarak katyonların zar boyunca taşınmasında rol oynayan önemli taşıyıcı proteinlerdendir (Verret ve ark., 2005; Memon ve Schröder, 2009; Memon ve Zahirović, 2014). Örneğin, HMA (P<sub>1B</sub>-ATPaz olarak da bilinir), P-tipi ATPaz protein ailesinin üyelerinden biridir. HMA2 ve HMA4, ağır metal ATPaz veya HMA (Heavy Metal Associated) olarak da adlandırılan P<sub>1B</sub>-ATPaz grubunun üyesidirler. Bu taşıyıcıların hücrede Cd-toleransında ve hücredeki metabolik faaliyetlerden Cd'in uzaklaştırılmasında (örn., vakuolde Cd depolanması) önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir (Hussain ve ark., 2004; Østerberg ve Palmgren, 2018).

Yapılan genetik araştırmalarda, model bitki *Arabidopsis thaliana*'da HMA2 ve HMA4'ün kökten-

toprak üstü kısımlara Zn ve Cd taşınımında aktif olduğu ortaya konmuştur (Wong ve Cobbett, 2008; Nocito ve ark., 2011). HMA4, bitkide Cd'in ksilem ile taşınımı ve Cd-stresine karşı toleransın sağlanmasında ve böylece Cd'in toksik etkisinin indirgenerek toprak üstü kısımlara iletiminden sorumlu taşıyıcılardan biri olduğu vurgulanmıştır (Verret ve ark., 2005; Hanikenne ve ark., 2008; Mills ve ark., 2010). Bu çalışmada, Cd stresi altında *Brassicaceae* familyası üyesi olan yem şalgamının (*B. rapa* L. var. *rapa*) Cd toleransı ve birikimi incelenmiş ve HMA2 ve HMA4 genleri ile Cd arasındaki ilişki araştırılmıştır

## Materyal ve Yöntem

### Bitki Materyali ve Yetiştirme Koşulları

Bu çalışmada kullanılan *B. rapa* L. var. *rapa* tohumları Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Tandojam, Sindh, Pakistan'dan temin edilmiştir. Tohumlar Tween-20 içeren % 5'lik sodyum hipoklorit (NaClO) çözeltisi ile 15 dakika boyunca yüzey sterilizasyonuna tabi tutulduktan sonra deiyonize su altında yıkanmıştır. İmbibisyonu sağlamak amacıyla 2 saat boyunca deiyonize suda bekletilen tohumlar çimlenme kurutma kâğıdı (Whatman no:42) yerleştirilen için 2 lt'lik polietilen kaplara (her bir kaba 50 tohum) ekilmiştir. 3. gün sonunda çimlenen tohumlar bir hafta boyunca güneşli 1/4 oranında seyreltilen Hoagland besi çözeltisi (Hoagland ve Arnon, 1938) ile sulanmıştır. Ekimden on gün sonra, bitkilere güneşli olmak üzere farklı Cd seviyeleri (0, 5, 10, 20, 50 ve 100 µM CdSO<sub>4</sub>) iki hafta boyunca muamele edilmiştir. Bitkiler % 60 nem ve 16 sa ışık (25 ± 2 °C)/ 8 sa karanlık (20 ± 2 °C) fotoperiyodunda 150 µmol/m<sup>2</sup>s ışık şiddeti altında iklim odasında yetiştirilmiştir.

### Bitkide Biriken Cd Miktar Tayini

Farklı Cd seviyeleri ile muamele edilen her bir bitkinin yaprak dokularında biriken Cd miktarının belirlenmesi için kuru örnekler asit ile yağ yakma yöntemi uygulanmıştır (Memon ve ark., 1979). Kısaca; hasat işleminden sonra, örnekler, 82°C'ye ayarlanmış etüvde 72 saat boyunca kurutulmuştur. Akabinde öğütülen kuru örnekler (0,5 g), nitrik asit (HNO<sub>3</sub>) ve perklorik asit (HClO<sub>4</sub>) (5:2) ile yağ yakma yöntemine tabi tutulmuştur. Yağ yakma metoduna göre solüsyon haline getirilen örneklerin Cd miktar tayini Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre (AAS)-Varian SpectraAA 220 cihazında tespit edilmiştir (Memon ve ark., 1979).

### RNA izolasyonu

Cd tayininden sonra, her bir bitkinin yapraklarından RNA izolasyonu RNeasy Plant kiti (ThermoFisher Scientific, GeneJet Plant R.N.A. Purification Mini Kit, #K0801) kullanılarak üretici firmanın protokolüne uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir. İzolasyon aşamasında elde edilen total RNA örneklerinden genomik DNA'nın uzaklaştırılması için RNase-Free DNase kullanılmıştır. İzole edilen RNA'ların (genomik DNA içeren ve içermeyen) saflığını ve miktarını belirlemek için NanoDrop spektrofotometresinde (Thermo Scientific 8000) 260 nm ve 280 nm dalga boylarında okumalar yapılmıştır.

### cDNA sentezi

qRT-PCR'da kullanım için RNA izolatlarından cDNA sentezi yapılmıştır (Cevher-Keskin ve ark., 2019; Meraklı ve ark., 2022). İzole RNA'lardan (1 µg) komplementer DNA (cDNA) sentezi Maxima First Strand cDNA (Thermo Scientific™, U.S.A., #K1641) sentez kiti üreticinin protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için Maxima First Strand cDNA sentez kiti içerisindeki tamponlar ve enzimler kullanılmıştır. cDNA sentezi; 4 µl 5X reaction mix, 2 µl maxima enzyme mix, 1-5 µl template RNA ve toplam hacim 20 µl olacak şekilde nuclease-free su ilave edilmiştir. Hazırlanan örnekler, 25°C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra enzim inhibisyonu için 50°C'de 15 dakika bekletilmiş ve akabinde 85°C'de 5 dk inkübasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra reaksiyon sonlandırılmıştır.

### Gerçek Zamanlı PCR (Real Time/ qRT-PCR)

qRT-PCR denemeleri BioRad CFX96 cihazında gerçekleştirilmiştir. Cd ile muamele edilen her bir bitkinin yapraklarından elde edilen cDNA'lar ve HMA2 ve HMA4 genleri için tasarlanan primerler kullanılarak qRT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Primerler, Primer3 programında tasarlanmıştır. Floresan boya olarak SYBR-Green I boyası ve referans gen olarak ubiquitin geni kullanılmıştır (Memon ve ark., 2019). Gen anlatım analizi; 1 µM forward primer, 1 µM revers primer, 4 µg cDNA, 13 µg 2X Maxima SYBR Green qPCR master karışımı, 6 µl H<sub>2</sub>O ve toplam hacim 25 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. HMA2, HMA4 ve ubiquitin primerleri Çizelge 1'de verilmiştir.

### Veri değerlendirme ve istatistiksel analiz

Deneme sonuçları ortalama değerler ± üç tekrarın standart sapmaları olarak ifade edilmiştir. HMA2 ve HMA4 genlerinin nispi ekspresyon seviyeleri  $2^{-\Delta\Delta CT}$

metodu kullanılarak hesaplanmıştır (Cevher-Keskin ve ark., 2019). Ubiquitin geni analizlerde referans gen olarak kullanılmıştır (Memon ve ark., 2019). Hedef ve standart kontrol genleri için  $\Delta CT$  değerleri qRT-PCR'den elde edilmiştir. İstatistiksel analiz IBM SPSS 25.0 programı ile  $P < 0.05$  anlamlılık düzeyinde Tukey testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### Sonuçlar

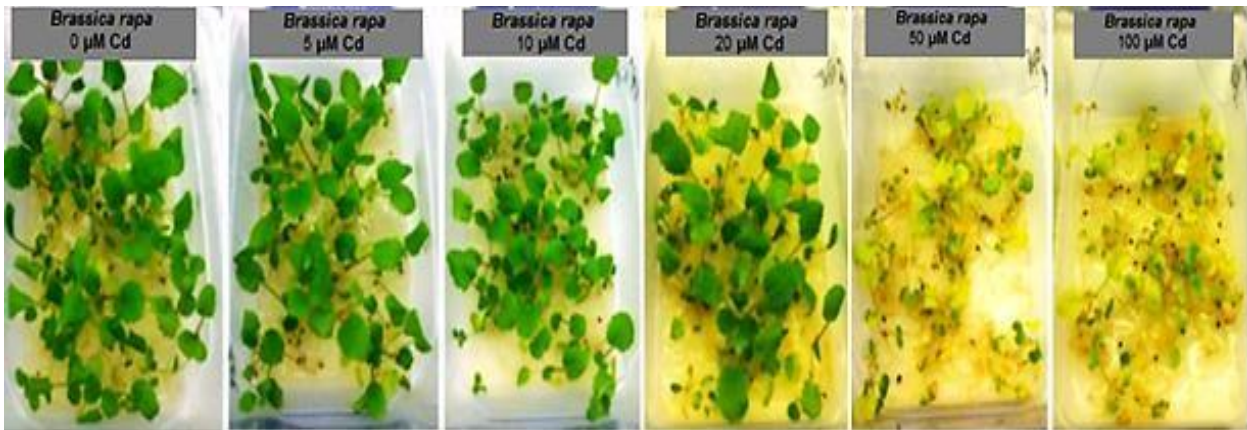
#### Farklı Cd seviyelerinde yetiştirilen *B. rapa* L. var. *rapa* Cd içeriği

Toksik seviyeye ulaştığında kadmiyum (Cd), birçok bitki türünde besin ve su alınımını engelleyerek bitkinin büyüme ve gelişimini yavaşlatmaktadır. Bu çalışmada, iki hafta boyunca farklı Cd seviyelerinde (0, 5, 10, 20, 50, 100 µM) yetiştirilen *B. rapa* L. var. *rapa*'nın çimlenme sürecindeki kök ve gövde gelişimi incelenmiştir (Şekil 1,2). İki haftalık Cd muamelesinden sonra, düşük Cd seviyelerinde (5-20 µM) yetiştirilen bitkilerin sağlıklı olduğu ve herhangi bir toksisite göstermediği gözlemlenirken; yüksek Cd seviyelerinde (50 ve 100 µM) yetiştirilen bitkilerde toksisite belirtilerinin olduğu Şekil 1'de açıkça görülmektedir. Cd ile muameleden sonra, bitkilerin kök ve gövde boy uzunluk ölçümleri Çizelge 2'de verilmiştir. *B. rapa* L. var. *rapa*'da kontrol (0), Cd5, Cd10, Cd20, Cd50 ve Cd100 seviyelerinde sırasıyla kök boyu uzunlukları 16.8, 15.7, 14.0, 6.95, 6.40, 6.60 cm olarak ölçülmüş iken; gövde boyu gelişimi sırasıyla 2.2, 2.45, 3.0, 2.05, 2.5, 2.3 cm olarak ölçülmüştür (Çizelge 2). Artan Cd seviyelerinin bitkilerin kök boyu gelişimini azalttığı, özellikle yüksek Cd seviyelerinde (50 ve 100 µM) yetiştirilen bitkilerin kök oluşumunun en düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, bitkilerin gövde uzamasında herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Çizelge 2).

Çizelge 1. HMA2 ve HMA4 genlerinin qRT-PCR analizleri için kullanılan primerler

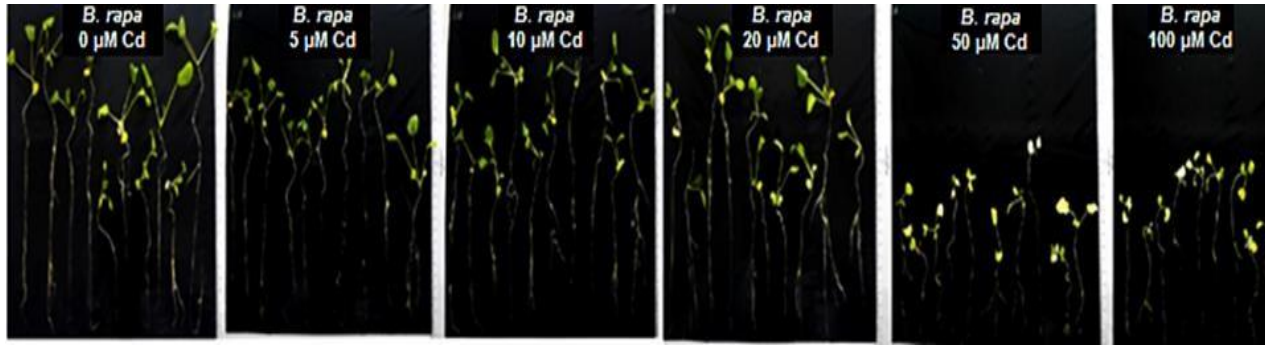
Table 1. Primers used for qRT-PCR analysis of HMA2 and HMA4 genes

Primer Adı	Primer Dizisi	% GC
BR-HMA2-F	5'- GGAGCGATTCTTGCTTTGGC-3'	62
BR-HMA2-R	5'- CCTGACTTGCAATGCTTCGG-3'	62
BR-HMA4-F	5'-AGCAATGCATGCTCAAGAAC-3'	58
BR-HMA4-R	5'-GCATCATTCACACCATCTCC-3'	60
BR-UBQ9-F	5'- GAAGACATGTTTCATTGGCA-3	54
<b>BR-UBQ9-R</b>	<b>5'- ACACCTTAGTCCTAAAAGC-3'</b>	<b>54</b>



Şekil 1. Farklı Cd seviyelerinde yetiştirilen *B. rapa* L. var. *rapa* bitkilerinin gelişimi

Figure 1. Development of *B. rapa* L. var. *rapa* plants grown at different Cd levels



Şekil 2. Farklı Cd seviyelerinde yetiştirilen *B. rapa* L. var. *rapa* bitkilerinin morfolojik görüntüleri. Sol üstten sağa:0,5, 10, 20, 50, 100  $\mu$ M

Figure 2. Morphological images of *B. rapa* L. var. *rapa* plants grown at different Cd levels. Treatments from upper left to right are: 0,5, 10, 20, 50, 100  $\mu$ M

Çizelge 2. Farklı Cd seviyelerinde yetiştirilen *B. rapa* L. var. *rapa* bitkilerinin kök ve gövde uzunlukları (cm)

Table 2. Root and stem lengths (cm) of *B. rapa* L. var. *rapa* plants grown at different Cd levels

Parametreler	Kök	Gövde
0 $\mu$ M	16,80 $\pm$ 5,57	2,20 $\pm$ 0,91
5 $\mu$ M	15,70 $\pm$ 4,47	2,45 $\pm$ 1,09
10 $\mu$ M	14,00 $\pm$ 3,16	3,00 $\pm$ 1,05
20 $\mu$ M	6,95 $\pm$ 3,07	2,05 $\pm$ 0,59
50 $\mu$ M	6,40 $\pm$ 2,36	2,50 $\pm$ 0,70
100 $\mu$ M	4,05 $\pm$ 1,21	1,55 $\pm$ 0,49

Çizelge 3. Farklı Cd seviyelerinde yetiştirilen *B. rapa* L. var. *rapa* bitkisinin yaprak dokusunda biriken Cd miktarı (ppm)

Table 3. The amount of Cd accumulated in the leaf tissue of *B. rapa* L. var. *rapa* plants grown at different Cd levels

Parametreler	Yaprak (ppm)
0 $\mu$ M	0,0146
5 $\mu$ M	1,9212
10 $\mu$ M	2,1696
20 $\mu$ M	3,5424
50 $\mu$ M	5,5332
100 $\mu$ M	8,5266

#### Farklı Cd seviyelerinde yetiştirilen *B. rapa* L. var. *rapa* bitkilerinde biriken Cd miktarı

Cd ile muamele edilen *B. rapa* L. var. *rapa* bitkisinin yaprak dokusunda biriken Cd miktarı Çizelge 3'de verilmiştir. Kadmiyum muamelesi sonunda, kontrole kıyasla artan Cd seviyelerine paralel olarak bitkilerin yapraklarında biriken Cd miktarının arttığı ve ayrıca en yüksek Cd birikiminin 100  $\mu$ M Cd seviyesinde olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3).

#### Kadmiyumun transkripsiyonel seviyede HMA2 ve HMA4 ifadesi üzerine etkisi

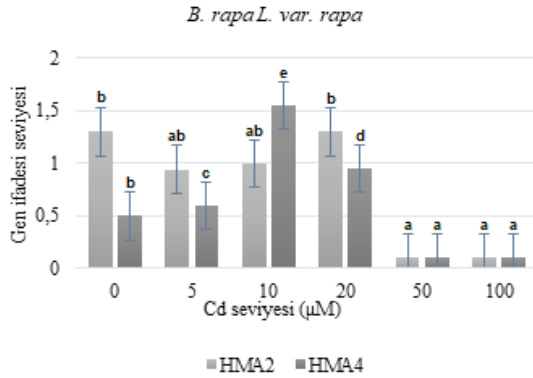
İki hafta boyunca farklı Cd seviyeleri *B. rapa* L. var. *rapa* bitkisinin yaprak dokusunda HMA2 ve HMA4 genlerinin nispi anlatımı qRT-PCR kullanılarak kontrol edilmiştir. qRT-PCR çalışması, Cd ile muamele edilen bitkilerin yapraklarından izole edilen RNA'lerden sentezlenen cDNA'lar ve HMA2 ve HMA4 genlerine göre tasarlanan primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hedef genin anlatım seviyelerinin normalleştirilmesi için bir iç kontrol geni olarak ubiquitin kullanılmıştır. Kantitasyon reaksiyondaki (Applied Biosystems) başlangıç profilinin miktarı ile ters orantılı olduğundan numunelerin  $\Delta$ Ct değerlerine dayanmaktadır. Beklendiği gibi, negatif kontrol herhangi bir ürün oluşturmamıştır.

Şekil 3'te, kontrole kıyasla artan Cd seviyelerine bağlı olarak HMA2 ve HMA4'ün anlatım seviyesindeki farklılıklar gösterilmiştir. Bu sonuçlar, HMA2 ve HMA4 genlerinin ekspresyonunun düşük ile orta Cd (5-20  $\mu$ M) seviyeleri arasında tetiklendiğini göstermektedir. Diğer bir yandan, yüksek Cd (50 ve 100  $\mu$ M) seviyelerinin bu genlerin aktivitesinde saptanabilir bir inhibisyonu neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3).

#### Tartışma

Brassicaceae familyası, çeşitli tarımsal iklim koşulları altında ekim için geniş kapsamlı adaptasyona sahip ekonomik açıdan önemli bazı türleri içermektedir. Bilinen metal hiperakümülatör türlerin yaklaşık % 25'i Brassicaceae üyesidir ve bunların çoğunluğu metal ile kirlenmiş topraklarda yetişebilmektedir. *B. rapa* L., ağır metallerin toksik etkisini tolere edebilen bir tür olarak bilinmesine rağmen, yüksek metal seviyeleri bu bitkide toksisiteye neden olabilmektedir (Meng ve ark., 2009; Gill ve ark., 2015). *B. rapa* (2n) gibi *Brassica*'nın bazı türleri, ağır metallerin toksik etkisine karşı sergiledikleri tolerans yeteneklerinden dolayı fitoremediasyon amaçlı deneysel araştırmalarda model bitkiler olarak kullanılmaktadırlar (Ali-Zade ve ark., 2010; Navarro-León ve ark., 2019). Fitoremediasyon araştırmalarının temel amaçlarından biri,

ağır metal gibi toksik kirleticilerin birikimi için uygun aday türlerin tespit edilmesidir (Navarro-León ve ark., 2019). Bu çalışmada, *B. rapa* L. var. *rapa*'nın yaprak dokusunda Cd toleransı ve birikimi belirlenmiş ve Cd-stresi altında bitkinin yapraklarında HMA2 ve HMA4 genlerinin ifade seviyesindeki değişiklikler tespit edilmiştir. Sonuçlara göre, bitkiler düşük Cd seviyelerinde (5-20 µM) herhangi bir toksisite belirtisi olmadan sağlıklı şekilde büyüme göstermiştir; ancak, yüksek Cd seviyelerinde (50 ve 100 µM) yetişen bitkilerde toksik etkiler tespit edilmiştir (Şekil 1;2). Bu da ortamdaki ortalamanın üzerindeki kadmiyum seviyelerinin *B. rapa*'da toksisiteye neden olduğunu doğrulamaktadır. Benzer bir şekilde, gen ekspresyon analizi, *B. rapa*'nın yapraklardaki artan metal seviyeleri ile paralel bir şekilde HMA2 ve HMA4 genlerinin ekspresyonun tetiklediğini göstermiştir; bu da, bu taşıyıcıların hücre altı düzeyde Cd detoksifikasyonunda ve sekestrasyonunda önemli bir rol oynadıklarını doğrulamaktadır.



Şekil 3. Farklı Cd seviyelerinde yetiştirilen *B. rapa* L. var. *rapa* yapraklarında meydana gelen HMA2 ve HMA4 genlerinin ifadesinin değişim seviyesi. Bitkilere iki hafta boyunca farklı Cd konsantrasyonları içeren 1/4'üncü Hoagland solüsyonu verildi. Barlar üç replikasyonun standart sapmasını temsil eder. Farklı harfler göster Tukey testine göre gruplar arasında önemli farklılıklar ( $P < 0.05$ ).

Figure 3. Level of expression change of HMA2 and HMA4 genes occurring in *B. rapa* L. var. *rapa* leaves grown at different Cd levels. Plants were supplied with 1/4th Hoagland solution for two weeks containing different Cd concentrations.

Bars represent the standard deviation of three replicates. Different letters show significant differences between groups ( $P < 0.05$ ) based on the Tukey test.

HMA2 ve HMA4, esas olarak, plazma zarına lokalize olan ve birbirlerinin fonksiyonunu tamamlayan ağır metal taşıyıcılarıdır (Wu ve ark., 2015). ATP hidrolizinin enerjisini, iyonların zar boyunca taşınmasına izin veren konformasyonel değişimi sağlamak için kullanılmaktadırlar (Bublitz ve ark., 2011). Bazı araştırmacılar, *Arabidopsis thaliana*'da HMA2 ve HMA4'ün aşırı ifadesinin bitkide metal toleransını arttırdığını ve daha spesifik olarak, birincil aktif metal iyon pompası olarak hareket ederek çinko ve kadmiyumun kökten-toprak üstü kısımlarına translokasyonuna katkı sağladığını bildirmişlerdir (Verret ve ark., 2005; Memon ve Schroder, 2009; Memon, 2016). Benzer şekilde, sonuçlarımıza dayanarak, *B. rapa*'da kökten-yapraklara Cd taşınımının ve birikiminin gerçekleştiği ve Cd taşınımında HMA2 ve HMA4'ün

önemli bir rol oynayabileceği gen ekspresyon analizleri sonucunda tespit edilmiştir (Çizelge 3). Ayrıca, sonuçlarımıza göre, ortamdaki düşük Cd seviyelerinde (5-20 µM) *B. rapa*'da HMA2 ve HMA4'ün aktif rol oynadıkları; ancak, yüksek Cd seviyelerinde (50-100 µM) önemli ölçüde inhibe oldukları tespit edilmiştir (Şekil 3). Bu da yüksek Cd seviyelerinde hücredeki diğer bazı taşıyıcılar (örn., NRAMP, ZIP) ile birlikte hareket ettiğini düşündürmektedir. Önceki interaktom çalışmalarımızda, HMA'ların diğer bazı taşıyıcılar (örn., NRAMP, ZIP) ile yakın ilişki içerisinde bulunduğu tespit edilmiştir (yayınlanmamış veriler). Ayrıca, bitkiler gibi diğer organizmalarda da HMA2 ve HMA4'ün ağır metal toleransında aktif rol oynadığı rapor edilmiştir. Mills ve ark. (2010), HMA4 ekspresyonunun *Saccharomyces cerevisiae*'ye Cd toleransı sağladığını ve *Escherichia coli* zntA mutantının Zn toleransını geri kazandırdığını ortaya koymuştur. Diğer bir yandan, HMA'lar diğer metal (Cu, Zn, Fe vs.) taşıyıcılar ile ilişki içerisindedir. Örneğin, mikrodizi ve gen ekspresyon analizi sonuçlarımız, Zn ve Cu'da yetiştirilen *B. nigra* Diyarbakır ve *B. juncea* L. yaprak dokusunda metal ATPazlar da dâhil olmak üzere birçok genin (örn., NRAMP, ZIP) ifadesinde birkaç yüz kat artış olduğunu göstermiştir (Memon ve Zahirović, 2014; Memon, 2016; Cevher-Keskin ve ark., 2019; Meraklı ve ark., 2022). Dahası, Courbot ve ark. (2007), *A. halleri*'de Cd ve Zn toleransını iyileştirdiğini rapor etmiştir.

Sonuç olarak, *B. rapa*'da HMA2 ve HMA4 genlerinin anlatım profilinin düşük ve orta Cd seviyelerinde tetiklendiği ve bunların hücre altı düzeyde Cd detoksifikasyonunda ve sekestrasyonunda aktif bir rol oynadıkları belirlenmiştir. Ayrıca, verilerimiz, *B. rapa*'da Cd birikimi ve tolerans mekanizması ile ilişkili sinyal yolağında multigenetik (birçok taşıyıcı gen kümesinin birlikte etkisiyle) bir yanıt olduğunu göstermektedir.

## Teşekkür

Bu çalışma, Uşak Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) tarafından Prof. Dr. Abdülrezzak Memon'a verilen hibe ile desteklenmiştir (Proje no: 2017/TP042).

## Kaynaklar

- Ali-Zade V, Alirzayeva E, Shirvani T. 2010. Plant resistance to anthropogenic toxicants: approaches to phytoremediation. In: Plant Adaptation and Phytoremediation. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 173–192. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-9370-7\\_9](https://doi.org/10.1007/978-90-481-9370-7_9).
- Alloway BJ, Steinnes E. 1999. Anthropogenic additions of cadmium to soils. In: McLaughlin MJ, Singh BR (eds) Cadmium in Soils and Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 97–123.
- Bublitz M, Morth JP, Nissen P. 2011. P-type ATPases at a glance. Journal of Cellular Science, 124(22):2515–2519. <https://doi.org/10.1242/jcs.088716>.
- Cevher-Keskin B, Yıldızhan Y, Yüksel B, Dalyan E, Memon AR. 2019. Characterization of differentially expressed genes to Cu stress in *Brassica nigra* by *Arabidopsis* genome arrays. Environmental Science and Pollution Research, 26(1):299–311. doi:10.1007/s11356-018-3577-7.
- Clemens S, Aarts MGM, Thomine S, Verbruggen N. 2013. Plant science: the key to preventing slow cadmium poisoning: 92–99. Trends Plant Sci., 18:92–99.

- Courbot M, Willems G, Motte P, Arvidsson S, Roosens N, Saumitou-Laprade P, Verbruggen, N. 2007. A major quantitative trait locus for cadmium tolerance in *Arabidopsis halleri* colocalizes with HMA4, a gene encoding a heavy metal ATPase. *Plant Physiol.*, 144(2):1052-1065. doi: 10.1104/pp.106.095133.
- Gill RA, Hu XQ, Ali B, Yang C, Shou JY, Wu YY, Zhou WJ. 2014. Genotypic variation of the responses to chromium toxicity in four oilseed rape cultivars. *Biol Plant*, 58:539–550.
- Hanikenne M, Talke IN, Haydon MJ, Lanz C, Nolte A, Motte P, Kroymann J, Weigel D, Krämer U. 2008. Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. *Nature*, 453(7193):391-395. <https://doi.org/10.1038/nature06877>.
- Hoagland DR, Arnon DI. 1938. The water culture method for growing plants without soil. *Cal. Agri. Exp. Station Circular*, 347(2nd edit):1-39.
- Hussain D, Haydon MJ, Wang Y, Wong E, Sherson SM, Young J, Camakaris J, Harper JF, Cobbett CS. 2004. P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, 16(5):1327–1339. <https://doi.org/10.1105/tpc.020487>.
- Krämer U, Talke IN, Hanikenne M. 2007. Transition metal transport. *Febs Letters*, 581:2263–2272.
- Li G, Shah AA, Khan WU, Yasin NA, Ahmad A, Abbas M, Safdar N. 2021. Hydrogen sulfide mitigates cadmium induced toxicity in *Brassica rapa* by modulating physiochemical attributes, osmolyte metabolism and antioxidative machinery. *Chemosphere*, 263:127999.
- Marschner H. 1995. In mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London, pp 314– 379.
- Memon AR, Schroder P. 2009. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation, *Environmental Science Pollution Rest Int.*, 16(2):162-175.
- Memon AR, Zahirovic E. 2014. Genomics and Transcriptomics Analysis of Cu Accumulator Plant *Brassica nigra* L. *Journal of Applied Biological Science*, 8(2):1-8.
- Memon AR, Itô S, Yatazawa M. 1979. Absorption and accumulation of iron, manganese and copper in plants in the temperate forest of central Japan. *Soil Science and Plant Nutrition*, 25(4):611-620. doi:10.1080/00380768.1979.10433201.
- Memon AR, Schwager CK, Niehaus K. 2019. Expression of small GTPases in the roots and nodules of *Medicago truncatula* cv. Jemalong. *Acta Bot Croat*, 78(1):1-8. doi:10.2478/botcro-2019-0008.
- Memon AR. 2016. Metal hyper-accumulators: Mechanism of hyperaccumulation and metal tolerance. *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants*. Springer-Verlag, 3:239-268. doi:10.1007/978-3-319-40148-5\_8.
- Meng H, Hua S, Shamsi IH, Jilani G, Li Y, Jiang L. 2009. Cadmium induced stress on the seed germination and seedling growth of *Brassica napus* L. and its alleviation through exogenous plant growth regulators. *Plant Growth Regul.*, 58:47–59.
- Meraklı N, Bulduk İ, Memon AR. 2022. Identification of Genes Regulated in Response to Cu Exposure in *Brassica nigra* L. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 23(1):15- 27.
- Mills RF, Valdes B, Duke M, Peaston KA, Lahner B, Salt DE, Williams LE. 2010. Functional significance of AtHMA4 C-terminal domain in planta. *PLoS One* 5, e13388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013388>.
- Navarro-León E, Oviedo-Silva J, Ruiz JM, Blasco B. 2019. Possible role of HMA4a TILLING mutants of *Brassica rapa* in cadmium phytoremediation programs. *Ecotoxicology and environmental safety*, 180:88-94.
- Nocito FF, Lancilli C, Dendena B, Lucchini G, Sacchi GA. 2011. Cadmium retention in rice roots is influenced by cadmium availability, chelation and translocation. *Plant Cell Environ*, 34: 994–1008.
- Østerberg JT, Palmgren M. 2018. Heavy Metal Pumps in Plants: Structure, Function and Origin. *Advances in Botanical Research*, 87:57-89.
- Ueno D, Iwashita T, Zhao FJ, Ma JF. 2008. Characterization of Cd translocation and identification of the Cd form in xylem sap of the Cd-hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Physiol*, 49: 540–548.
- Verret F, Gravot A, Auroy P, Preveral S, Forestier C, Vavasour A, Richaud P. 2005. Heavy metal transport by AtHMA4 involves the N-terminal degenerated metal binding domain and the C-terminal His<sub>11</sub> stretch. *FEBS Lett*, 579(6):1515–22. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.065>.
- Zhang XD, Meng JG, Zhao KX. vd. 2018. Annotation and characterization of Cd-responsive metal transporter genes in rapeseed (*Brassica napus*). *Biometals*, 31:107–121. <https://doi.org/10.1007/s10534-017-0072-4>
- Wong CKE, Cobbett CS. 2008. HMA P-type ATPases are the major mechanism for root-to- shoot Cd translocation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 181:71–78. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02638.x>
- Wu Z, Zhao X, Sun X, Tan Q, Tang Y, Nie Z, Hu C. 2015. Xylem transport and gene expression play decisive roles in cadmium accumulation in shoots of two oilseed rape cultivars (*Brassica napus*). *Chemosphere*, 119(2015):1217-1223. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.09.099>.