

**Beta maritima Bitkisinde Tuz Toleransında Rol Oynadığı Düşünölen Üç Genin  
Karakterizasyonu**

**Program Kodu: 1002**

**Proje No: 115Z694**

Proje Yürütücüsü:

**Doç.Dr. Hüseyin Çağlar KARAKAYA**

EYLÜL 2016

İZMİR

## ÖNSÖZ

Tuz stresi bitki büyümesini etkileyen başlıca negative etkenlerdendir. Tuzun oluşturduğu bu stres bitkide homeostasisi ve bitkinin gelişimini etkiler. Esansiyel olmayan iyonların hücre içine alımı ozmotik dengeyi değiştirir ve büyük oranda dehidrasrasyona sebep olur. Dehidrasrasyondan korunmak için gelişmiş bitkiler çeşitli tuz tolerans mekanizmaları geliştirmişlerdir.

Bu projede, tuz stresine dayanıklı olduğu bilinen *Beta maritima* bitkisi kullanılmıştır. Bitkinin stres koşullarına dayanıklı olması ve çok yıllık olması nedeniyle fitoremidasyon çalışmaları için uygun bir bitkidir. Ancak bitki moleküler genetik düzeyde çalışmalarda çok fazla çalışılmamış ve bitkinin genom sekansı henüz yapılmamıştır. Bu nedenle proteomik, mikroaray gibi çalışmalar ile gen izolasyonu yapmak verimli değildir. Bu nedenle, projede tuz toleransında rol oynayan cDNA ları mayada ekspres edip, tarayarak fonksiyonel genomik metodu kullanılarak gen izolasyonu yoluna gidilmiştir.

Çalışmalar sonunda 2 gen izole edilmiştir. Genlerden birisi S-adenozil metionin (SAM) sentaz dir. Bu enzim, SAM üreterek ROS (Reactive Oxygen Species) türlerine karşı antioksidant olarak görev yapan bir molekül olup, bitkiyi tuz stresi sebebiyle oluşan ROS lara karşı koruma amacıyla sentezlenmektedir.

Diğer gen B1 olarak isimlendirilmiş ve fonksiyonu tam olarak açıklanmamış bir gendir. Karakterizasyonu ve fonksiyonu bilinmeyen B1 genininin *Beta maritima* bitkisinde tuz toleransında rol oynadığını bu çalışmada gösterilmiştir. Çalışma 115Z694 nolu proje olarak TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

KAPAK	i
ÖNSÖZ	ii
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
1.GİRİŞ	1
2. GEREÇ YÖNTEM	2
2.1 Bitki materyali, büyüme koşulları ve örnekleme	2
2.2 Maya suşları ve cDNA kütüphane taraması	2
2.3 Hücre içi NaCl seviyesinin tespiti	3
2.4 Hücre içi protein lokalizasyon (GFP)	4
2.5 cDNA'ların RT- PZR analizi	4
3. BULGULAR	4
3.1 B1 ve Sah7 Genlerinin İzolasyonu	4
3.2 Büyüme Testi	6
3.3 Gen İfadeleme Analizi	7
3.4 B1 geninin ifadeleme analizleri	7
3.5 SAM geninin ifadeleme sonuçları	9
3.6 Hücre içi sodyum konsantrasyonu	11
3.7 B1 proteinin hücre içi lokalizasyonu	12
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	13
KAYNAKLAR	16

## TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ

Şekil 1. B1 protein sekansında çoklu amino asit sekans benzerlikleri	5
Şekil 2. B1 geni içeren maya hücrelerinin katı büyüme testi	6
Şekil 3. B1 ve Sah7 geni içeren maya hücrelerinin katı büyüme testi.	7
Şekil 4. B1 geninin saatlik ifadelenme seviyeleri.	8
Şekil 5: B1 geninin günlük ifadelenme seviyeleri.	9
Şekil 6. SAM geninin saatlik ifadelenme seviyeleri	10
Şekil 7. SAM geninin günlük ifadelenme seviyeleri	11
Şekil 8. B1 geni aktarılmış Ab11c suşunda hücre içi sodyum konsantrasyonu	12
Şekil 9. B1 geninin maya hücrelerindeki lokalizasyonu	12
Şekil 10. SAH7 proteininin Arabidopsisdeki hücre içi lokalizasyonunu gösteren şema	13

## ÖZET

Tarım alanlarındaki aşırı tuz birikimi bitki büyümesini etkileyen başlıca negative etkenlerdendir. Tuzun oluşturduğu stres, bitkide homeostasisi ve gelişimi etkiler. Bazı bitkiler tuzun meydana getirdiği strese karşı dayanıklılık mekanizmaları geliştirmiştir.

Bu projede, tuza dayanıklı olduğu bilinen *Beta maritima* bitkisinden tuz tolerans genlerinin karakterizasyonu ve izolasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla, bitki cDNA'ları mayada ekspres edildi ve koloniler toksik tuzlu ortamda büyütüldü. . Elde edilen 3 kolonideki genlerden biri S-adenosyl methionine (SAM), diğer ikisinde fonksiyonu bilinmeyen ve B1 olarak isimlendirdiğimiz bir gen olduğu görüldü. B1 in Arabidopsis homoloğu olan Sah7 genide klonlanıp karakterizasyon işlemleri yapıldı. mRNA transkript analizlerinde, B1 ve Sah7 mRNA seviyeleri yaprakta ve kökte tuz stresi altında indüklenmiştir. B1'i aşırı ifade eden maya hücrelerinin tuzlu ortamda yetiştirildikten sonraki tuz seviyeleri yabani tip mayayla karşılaştırıldıklarında, hücre içi tuz düzeyinde değişiklik olmadığı ve B1 proteininin sodyumun hücre içinde depolanmasında rol oynadığı düşünülmektedir. B1 ve Sah7 proteinleri, hücre içinde endomembran sistemlerinde lokalize olmuştur ve fazla tuzu golgi, endoplasmik retikulum gibi endomembran sistemlerinde depolayarak tuz toleransına yardımcı olma olasılıkları bulunabilir. Sonuçlarımız, fonksiyonu daha önce araştırılmamış olan B1 genininin *Beta maritima* bitkisinde tuz toleransında rol oynadığını göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Tuz stresi, deniz pancarı, maya

## **ABSTRACT**

High amount of salt accumulation in agricultural area is one of the factor affects plant growth. Salt stress affects homeostasis and development of plant. Some plants overcome salt stress by developing different mechanisms. In this project, *Beta maritima* plant, known to be a salt tolerant, used to isolate and characterize salt tolerant genes. For this purpose, cDNAs of plant expressed in yeast and grown in media with high amount of salt. There are 3 colonies obtained. One of the gene express in one colony was S-adenosyl methionine (SAM), and other genes were with unknown function named as a B1. Arabidopsis homolog of B1 reported as a Sah7 gene is also cloned and characterized. mRNA transkript of B1 ve Sah7 increased in leaves and root under salt treatment. B1 overexpressed yeast cells' salt concentration showed no difference with wild type suggesting that B1 protein might sequesterate salt in cell compartments. B1 and Sah7 protein localized in endomembrane system in cell and possibly help the cell to accumulate excess amount salt in golgi and ER. Our result shows that, B1 gene, with unknown function, might have a role in salt tolerance in *Beta maritima*.

**Keywords:** salt stress, sea weet, yeast

## GİRİŞ

Normal seviyelerin üzerindeki tuz, bitkilerde homeostaziye, büyümeyi ve üretkenliği etkileyen abiyotik streslerden biridir. Bitkilerde esansiyel olmayan tuz iyonlarının alımı, hücrelerin osmotik dengesini değiştirerek ve aşırı susuzluğa neden olarak, bitkilerin anatomisini, fizyolojisini ve metabolizmasını olumsuz yönde etkiler. Bu durumda yüksek bitkiler ilgili sinyal yollarını uyarmak, tuz iyonlarını dışarı atmak, bu toksik iyonları vakuollerinde biriktirmek, detoksifikasyon mekanizmalarını aktive etmek ya da osmoprotektan üretmek gibi tuz tolerans mekanizmaları geliştirirler.

*Beta maritima*, şeker pancarının yabani bir türü olup deniz pancarı olarakta bilinir, taksonomide *Beta vulgaris* in alt sınıfı olarak sınıflandırılır. Deniz pancarının yüksek tuz gibi abiyotik strese dirençli olması sebebiyle bu projede kullanılması amaçlanmıştır. Daha önceki çalışmalarımızda, deniz pancarı bitkisinden mangan ve nikel toleransında rol oynayan genlerin izolasyonu amacıyla cDNA kütüphanesi hazırlanmıştı. Bu projede de var olan cDNA kütüphanesi toksik seviyede tuz içeren besiyerinde transforme maya hücreleri ile test edilmiştir. Projede, elde edilen bu kolonilerdeki genlerin tuz homeostasis mekanizmasındaki rolleri karakterize edilmiştir.

## Literatür Özeti

Tuz dünya üzerinde 800 milyon ha üzerinde toprağı etkilemektedir ( Teakle vd., 2010). Bütün kirlilikler farklı tuz içeriklerine sahiptir. Kalsiyum, magnezyum, demir, aliminyum, fosfat ve sodyum bütün toprak tiplerinde görülen katyonlardır. Dünyada bir çok toprak çeşidinde bu katyonlar aşırı miktarda çözünen tuz formlarıyla sodyum klorür (NaCl) gibi en çok biriken formu birikip bitkilere zarar vermektedir.

Toprakta aşırı tuz birikimi, tarımsal problemlerden biridir. Tuz, tarımsal verimi çimlenme, büyüme ve meyve üretimi yönünden etkilemektedir. Yüksek tuz konsantrasyonları temelde 3 farklı şekilde bitkiyi etkiler; su stresi, tuz stresi ve iyonik dengesizlik stresi. (Mudgal vd.,2000). Su stresi , tuz iyonlarının negative osmotik potansiyel yoluyla suyun alımına engel olduğunda görülür. Çoğu bitki, enerjisinin büyük miktarını büyümeye, çiçeklenmeye ve meyvelenmeye harcar. Fakat tuzlu ortamlarda enerjilerini büyümek yerine yeterli su almak için kullanırlar (Parida, 2005). Tuz stresi, sodyum, chloride ve bor gibi bazı tuz iyonlarının bitki üzerindeki toksik etkisini tanımlar. En yaygın fitotoksik tuz, sodyum klorür (NaCl) dür ve bitki metabolizmasında superoksit radikalleri( $\bullet O_2$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikalleri ( $OH\bullet$ ) ve singlet oksijen ( $^1O_2$ ) gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimiyle oksidatif hasara sebep olur. Bu radikal gruplar membran lipidlerinin peroksidasyonuna , iskelet yapısının tahribatına ve hücrenin fonksiyon bozukluğuna sebep olur (Hu vd., 2011).

İyonik dengesizlik stresi ise esansiyel olmayan iyonların esansiyel iyonlarla rekabete girmesi (başka bir deyişle monovalent katyonlar sodyum) ve onların alınması ya da biyokimyasal reaksiyonlarda kullanılması gibi durumlarda nutrisyonel dengesizliğe sebep olur olur (Chinnusamy vd., 2006; Blaylock, 1994). Buna ek olarak, tuz iyonlarının fazla alınımı bitkideki ozmotik potansiyeli artırır. Bu artış paralel olarak ksilemdeki gerginliği etkiler ve bitki ozmotik potansiyeli dengeleyebilmek için daha çok su alır. Uzun vadede, bitkinin daha çok su alması turgor basıncını artırır. Bu sebeple yüksek tuzluluk su stresinin yanı sıra ozmotik stresede sebep olur (Parida vd., 2005). Halofitler tuz stresi altında glikofitlerin hayatta kalmasından itibaren evrilmiştir. Bu fikre kanıtta, yüksek glikofitik arabidopsisin bazı ekstrem halofitik yakın akrabalara sahip olmasıdır (Zhu, 2000).

Tuza toleranslı (halophytic) bitkiler tuz stresine karşı pek çok alternatif yolak geliştirebilirler. Bu tolerans üç farklı karakteristikle açıklanabilir: 1- Bitki sitoplazmadan iyonları dışarı verebilir ya da spesifik membrane transportörler aracılığıyla vakuollerinde biriktirebilir, 2- Morfolojik özellikleri, biyoağırlıklarının bölünmesi, terleme oranının stomaların kapanması ile kontrol edilmesi ve böylece adaptasyonun sağlayabilir, 3-Metabolik ve fizyolojik regülasyon ile hücre içi iyon seviyesini stabilize edebilir (Winicov, 1998).

Tuza tolerans mekanizmaları ise şunları kapsamaktadır. Genetik temelli stratejiler, DNA metilasyonu yoluyla meydana gelen epigenetik modifikasyonlar, poliploidi, spesifik sekansların amplifikasyonu veya eliminasyonu gibi kromozomal değişimleri içermesinin yanı sıra ABF3 ve ABF4 (Absisik asit yanıt elementi bağlanma faktörü 3 ve 4) gibi spesifik transkripsiyon faktörlerinin indüklenmesi sonucu meydana gelen transkripsiyonel regülasyonları kapsamaktadır (Wang vd., 2003; Parida vd., 2005).

Buna ek olarak, halofitler hücredeki spesifik bölgelerde iyon birikimi, plazma membranındaki transportörlerinde ve/veya su kanal proteinlerinde aktiviteyi kontrol etmek, karbon metabolizması ve enerji üretimi gibi karbon metabolizması içeren, fotosentetik yollarda farklılaşmak, hücre çeper/membran kompozisyonunun modifikasyonu, osmoprotektantların indüksiyonu, bitkide tuzluluk stresine uyum sağlayan moleküler şaperonlar veya savunma moleküllerinin artırılması (antioksidantlar, detoksifik enzimler, proteazlar ve hormonlar) gibi birçok biyokimyasal regülasyon noktalarının da kullanılır (Parida vd., 2005; Winicov, 1998).

## **2.GEREÇ VE YÖNTEM**

### **2.1 Bitki materyali, büyüme koşulları ve örnekleme**

Beta vulgaris subspecies maritima TR 51196 çeşitleri Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Menemen, İzmir'den Dr. Ayfer Tan' dan temin edilmiştir. Fideler, yarı oranda seyreltilmiş



Hoagland bitki büyüme solüsyonunda 25 °C'de 12 saat karanlık - 12 saat aydınlık, %50 nem ve 400 µmol m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> ışık yoğunluğunda büyütülmüştür. Uygun büyüme sağlandığında, son konsantrasyonu 250 mM olacak şekilde NaCl büyüme solüsyonu eklenip ve çeşitli zamanlarda (1, 3, 12 saat ve 1, 3, 5, 7 gün) tuza maruz bırakılarak, örnek alınıp sıvı azot ile muamele edilip saklanmıştır.

## 2.2 Maya suşları ve cDNA kütüphanesi taraması

Elimizde var olan *Beta maritima* cDNA kütüphanesi tarafımızdan oluşturulmuştu (Bozdağ G. 2009 İYTE kütüphanesi Tez T000198 QH433.B79). Bu kütüphane ön çalışmada kullanılmıştır.

Yabani maya suşu, *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A (MATa; his3; leu2; met15; ura3) ve onun 3 transportir delesyon mutanları olan AB11c Olga Zimmermannova' dan (Academy of Sciences of the Czech Republic, Department of Bioenergetics Hlavni mesto Praha, Czech Republic) temin edilmiştir. Mayaların büyütülmesinde, YPD besi yeri (%2 glikoz, %2 pepton, %1 maya özütü ve %2 agar (katı besi yeri için) ve SD besi yeri (%2 glikoz, %0.7 aminoasit içermeyen YNB ve urasil markörü içermeyen %0.3 oranında uygun aminoasitler) kullanılmıştır. Transformasyonlarda Lityum Asetat metodu kullanılmıştır (Burke, Dawson, and Stearns 1994). Spot testi için, gece boyunca büyüyen kültürler (180 rpm, 30 °C'de), 600 nm'deki optik yoğunlukları göre, 0.2; 0.02; 0.002; 0.0002 oranlarında distile suyla seyreltilmiş ve bu kültürlerden beş mikrolitre alınarak farklı tuzlarla da muamele edilerek (800mM NaCl, 10mM LiCl, 1800mM KCl, veya tuzsuz ) SD katı besi yerlerine spotlanmıştır. Maya hücreleri beş gün boyunca 30°C' de petri kaplarında inkübe edilerek ve fotoğraflanmıştır.

## 2.3 Hücre içi NaCl seviyesinin tespiti

Maya hücrelerinin hücre içi NaCl konsantrasyonları, Mulet vd., (1999) den yararlanılarak ölçülmüştür. Gece boyunca büyüyen kültürler 1/1000 oranında seyreltilmiş ve son konsantrasyonu 800 mM olacak şekilde NaCl eklenerek ve hücreler büyüme konsantrasyonları göre 48 – 60 saat arasında büyütülmüştür. Daha sonra, hücreler 10 mM EDTA ile 3 kez yıkanıp 70 °C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Beş mg.'lık maya hücreleri % 65 HNO<sub>3</sub> ile parçalanıp, filtrelenmiştir. Özütlerin, NaCl miktarları Agilent 7500ce İndüktif Eşleşmiş Plazma - Kütle Spektrometre Cihazı (ICP-MS) ile belirlenmiştir (Agilent Teknolojileri).

## 2.4 Hücre içi protein lokalizasyon (GFP)

pAG415GFP vektörü kullanarak proteinlerin mayadaki lokalizasyon işlemleri Gateway klonlama tekniği ile yapılmıştır.

## 2.5 cDNA'ların gerçek zamanlı PZR analizi

Toplanan kök ve yaprak örneklerinden toplam RNA, RNA izolasyon kiti (Invitrogen) kullanılarak elde edilmiş ve Genomik DNA kalıntıları, Dnase (Fermentas) enzimi muamelesiyle uzaklaştırılmıştır. RNA'lardan cDNA eldesi için cDNA sentez kiti (Fermentas) kullanılmıştır. Üç tekrarlı bağımsız gerçek zamanlı PZR analizi için Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas) ve iQ5 RT-PCR cihazı (Bio-rad) kullanılmıştır. Referans gen olarak Beta actin kullanılmıştır. Primer dizileri aşağıdaki gibidir. Beta vulgaris actin primerler dizileri: BvACT1RTF- AGACCTTCAATGTGCCTGCT ve BvACT1RTR-TCAGTGAGATCACGACCAGC. B1 primer dizileri: B1RTF 5'-GTAGACCAGAGAAGAAGCCATAC-3', B1RTR 5'-GGCATTCCAACCTTCACCTTTAC-3'. Sah7 primer dizileri: AtSAH7F5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGTCTAAAGCAGTTCTATTGGTCG-3' ve AtSAH7R5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGCCTAGTCCTCG GTTTCTTGG T ATAGC-3'. Karşılaştırmalı gen ekspresyonları Beta actine göre normalize edilmiştir. Sonuçların analizi için, Pfaffl modeli kullanan Bio Rad iQ5 cihazının programı kullanılmıştır. Sıfırıncı saat gen ekspresyonları, referans noktası olarak alınarak, her uygulama saattindeki karşılaştırmalı gen ekspresyon seviyeleri de bu referans noktasına göre (1'e sabitlenerek) hesaplanmıştır. Relatif sinyal değeri, üç bağımsız deney için ortalama  $\pm$  standart hata değerini göstermektedir. P-değerleri iki kuyruklu t-testi ile hesaplanmıştır.

## 3. BULGULAR

*Beta maritima* cDNA kütüphanesi Ab11c (tuza hassas) suşuna aktarıldı ve Ab11c hücreleri için toksik olan 800 mM NaCl konsantrasyonu içeren besiyerinde 4 gün büyümeye bırakıldı ve 3 maya kolonisinin büyüdüğü gözlemlendi. Bu büyüyen kolonilerden plazmid izolasyon işlemi gerçekleştirildi ve gen bankasında taramalar yapıldı. Yapılan taramalarda bulunan 3 koloniden gelen cDNA'nın, birisinin *Arabidopsis thaliana* S-adenozil metionin (SAM) sentaz proteinine benzer olduğu görüldü. S-adenozil metionin sentaz ROSs (Reactive Oxygen Species) türlerine karşı antioksidant olarak görev yaptığı bilinen bir protein olduğu ve stres toleransındaki rolü daha önceden bilindiği için çalışmalar diğer genlere yoğunlaştırıldı. Diğer 2 gende, *Arabidopsis* POLEN-E1 genine benzerlik göstermiştir ve B1 olarak

isimlendirilmiştir. B1 (AtPOLEN-E1 ) geni ilk defa pollen dokusundan izole edildiği için literatürde bu isimle adlandırılmış olup, fonksiyonunun henüz tanımlanmadığı görüldüğünden dolayı çalışmalar bu gene yoğunlaştırılmıştır.

### 3.1 B1 ve Sah7 genlerinin izolasyonu

B1 geni (ORF) 662 baz çiftine sahiptir ve 61 amino asitten oluşur. Teorik moleküler ağırlığı 17666.13674 Da'dur ve izoelektrik noktası 6,45 tir. B1 'in homolojisini ve çoklu sekans benzerliklerini bulmak için BLAST (X) veritabanı programı kullanıldı (Şekil 1a, b). B1 proteinleri, *Arabidopsis thaliana* Sinapsis Arabidopsis Homolog 7 adı verilen Sah7 (NP\_567338.1) proteinleri ile %57 lik bir benzerlik göstermektedir. B1 geni Sah7 genine homoloji gösterdiği için Arabidopsis den bu gende izole edilip tuz toleransındaki rolü araştırılmıştır.

```

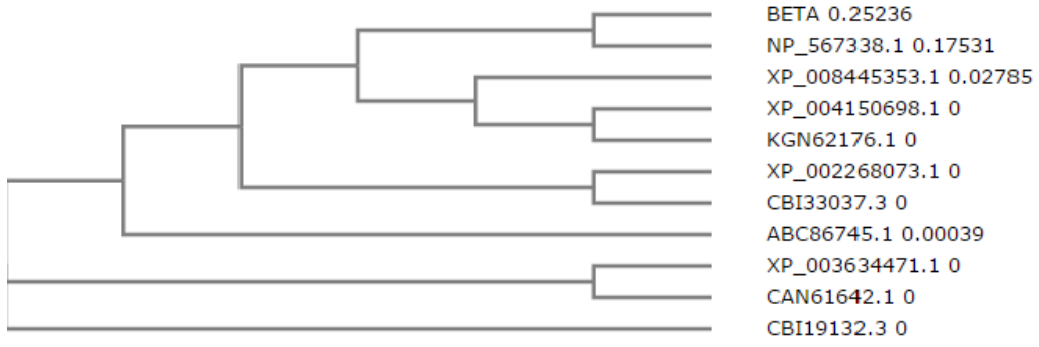
BETA          MAKIAGILFLLCVLPVLAMAGRPEKKPYCVRGKVYCDTCRAGFETPASTYLEGVKVKLEEC
NP_567338.1   MSK-AVLLVALCFLPALAIAARPKNKPFVVRGRVYCDTCLAGFETPASTYISGAVVRLLEC
XP_008445353.1 MAR-LVILFALIMLPALAVASRPVRTPFVVRGKVFCDTCLAGFETSATTYIPGAKVRIEC
XP_004150698.1 MAR-VIILFALIMLPALALASRPVRTPFVVRGKVFCDTCLAGFETSATTYIPGAKVRIEC
KGN62176.1    MAR-VIILFALIMLPALALASRPVRTPFVVRGKVFCDTCLAGFETSATTYIPGAKVRIEC
XP_002268073.1 MAK-LLMSIALCLLLVYVSEARPMRKPFVLHGRVYCDTCRAGFETSATTYIAGARVRIEC
CBI33037.3    MAK-LLMSIALCLLLVYVSEARPMRKPFVLHGRVYCDTCRAGFETSATTYIAGARVRIEC
ABC86745.1    MGR-LMLLVALCVLPALVSAGRPVSQPFVLQGRVYCDTCRAGFETSATTYIAGAKVRVEC
XP_003634471.1 MGR-LMLLVALCVLPALVSAGRPVSQPFVLQGRVYCDTCRAGFETSATTYIAGAKVRVEC
CAN61642.1    MGR-LMLLVALCVLPALVSAGRPVSQPFVLQGRVYCDTCRAGFETSATTYIAGAKVRVEC
CBI119132.3   MGR-LMLLVALCVLPALVSAGRPVSQPFVLQGRVYCDTCRAGFETSATTYIAGAKVRVEC
*.: . : * . * . . . ** * : :*:*:**** ***** *:*: * . :*:**

BETA          RHRQTQEVLYSAVATTDRTGSGYKIFVENDQKENICDTMLLSSPHRRCKLADPGRDRSRVV
NP_567338.1   KDRRTMELTYSHEARTDSTGSGYKILVNEHDHEQFCDAMLVRSQRLRCSNVSPGHDRARVT
XP_008445353.1 KDRNSMEVRYTHEATTDSTGSGYKLLVSEDHGDELCDAVLVSSPQEKCSSVAEGRDRARVI
XP_004150698.1 KDRNSMELQYTHEATTDSTGSGYKLLVNEHDHGDELCDAVLVSSPQEKCSSVSEGRDRARVI
KGN62176.1    KDRNSMELQYTHEATTDSTGSGYKLLVNEHDHGDELCDAVLVSSPQEKCSSVSEGRDRARVI
XP_002268073.1 KDRNSLQLVYSVEGVTDSGTGTYKFSIADHDGDMCDAVLVKSPQDCAKVDAGRDRSRLS
CBI33037.3    KDRNSLQLVYSVEGVTDSGTGTYKFSIADHDGDMCDAVLVKSPQDCAKVDAGRDRSRLS
ABC86745.1    KDRNSMQLLYSIEGITDSTGTYKIMVTEDEHQQLCDAVLVSSPQSDCASVDPGRDRAAVI
XP_003634471.1 KDRNSMQLLYSIEGITDSTGTYKIMVTEDEHQQLCDAVLVSSPQSDCASVDPGRDRAAVI
CAN61642.1    KDRNSMQLLYSIEGITDSTGTYKIMVTEDEHQQLCDAVLVSSPQSDCASVDPGRDRAAVI
CBI119132.3   KDRNSMQLLYSIEGITDSTGTYKIMVTEDEHQQLCDAVLVSSPQSDCASVDPGRDRAAVI
:.*: : : * : . ** ***: : : :*: : :*:*:*: * : * . *:*: :

BETA          LTSNNGVVSNDRYANNMGFTVEEPMYSYCAQLMQQYQLTEDEV
NP_567338.1   LTRFNGLIASDDRFANNMGFLRDAAMPGCADIMKLYQETED--
XP_008445353.1 LTRYNGIASNDRYVNAMGFIDEPMSSGCNQVMSQYQDIED--
XP_004150698.1 LTRYNGIASNERVYNAMGFAMDEPMSSGCNQVMSQYQDIED--
KGN62176.1    LTRYNGIASNERVYNAMGFAMDEPMSSGCNQVMSQYQDIED--
XP_002268073.1 LTRSNGLVSDTRFANAMGFMKDEPASGCTQLLKKQYQESDD--
CBI33037.3    LTRSNGLVSDTRFANAMGFMKDEPASGCTQLLKKQYQESDD--
ABC86745.1    LTRYNGIVSDNRYANSMGFLKDHMPSECTQLLQQYQEFED--
XP_003634471.1 LTRYNGIVSDNRYANSMGFLKDHMPSECTQLLQQYQEFED--
CAN61642.1    LTRYNGIVSDNRYANSMGFLKDHMPSECTQLLQQYQEFED--
CBI119132.3   LTRYNGIVSDNRYANSMGFLKDHMPSECTQLLQQYQEFED--
** ***:*: * : . * ** * : * : : : . ** :*

```

a.



b.

Şekil 1. B1 protein sekansında çoklu amino asit sekans benzerlikleri. A) Aynı renkler, *Beta vulgaris subsp. Vulgaris* , XP\_010676978.1) *Vitis pseudoreticulata* (ABC86745.1), *Vitis vinifera* (XP\_003634471.1), *Vitis vinifera* (CBI19132.3), *Vitis vinifera* (XP\_002268073.1), *Vitis vinifera*(CBI33037.3), *Cucumis melo* (XP\_008445353.1), *Cucumis sativus* (XP\_004150698.1), *Cucumis sativus*(KGN62176.1), *Arabidopsis thaliana* (NP\_567338.1) arasındaki korunmuş amino asitleri göstermektedir. B) Proteinlerin filogenetik ağacı.

### 3.2 Büyüme testleri

B1 ve Sah7 genlerinin tuz toleransındaki rollerini test etmek için öncelikle, YNB-Ura besiyerinde NaCl tolerans spot deneyi gerçekleştirildi. B1 genini içeren kolonilerin 800 mM NaCl konsantrasyonunda büyüyebildikleri görüldü (Şekil 2).

	CONTROL YNB-Ura				800mM NaCl			
	0,2	0,02	0,002	0,0002	0,2	0,02	0,002	0,0002
W303								
AB11c								
B1								

Şekil 2. B1 geni içeren maya hücrelerinin katı büyüme testi. O.D 600= 0,2 den O.D. 600 = 0,0002'e kadar minimal mediyumda 4 seri dilüsyon gerçekleştirildi. W303, pAG426GPD plazmidini içeren yabancı tip suştur. Ab11c , pAG426GPD plazmidini içeren mutant suştur. B1, Ab11c içinde B1 geni taşıyan mutant hücrelerdir.

*B1* ve *Arabidopsis*te homoluğu olan *Sah7*'nin tuz tolerans seçiciliğini anlayabilmek için, 1M, 40 mM ve 800mM gibi farklı konsantrasyonlarda KCl, LiCl ve NaCl kullanılarak tuz

tolerans deneyi gerçekleştirildi. Maya için toksik seviyeler olan 1M KCl , 40 mM LiCl ve 800 mM NaCl içeren besiyerlerindeki, Sah7 ve B1 cDNA sı olan maya kolonileri aynı büyümeyi gösterirken, boş vektöre sahip Ab11c (pAG426GPD)'nin aynı koşullarda büyüme göstermediği belirlendi (Şekil 3). Bu sonuçlar bize B1 ve Sah7 nin mayada tuz toleransında rollerinin bulunduğunu göstermektedir.

	CONTROL YNB-ura				1M KCl				40mM LiCl				800mM NaCl			
	0,2	0,02	0,002	0,0002	0,2	0,02	0,002	0,0002	0,2	0,02	0,002	0,0002	0,2	0,02	0,002	0,0002
W303																
AB11c																
B1																
SAH7																

Şekil 3. B1 ve Sah7 geni içeren maya hücrelerinin katı büyüme testi.

### 3.3 Gen ifadenme analizleri

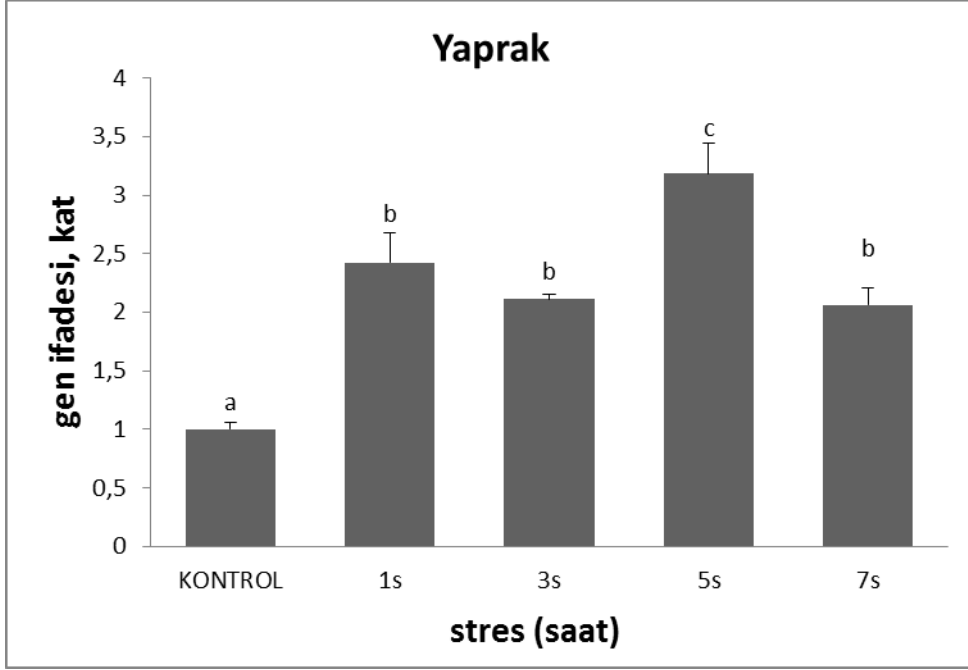
*Beta maritima* bitkisi 400 mM NaCl içeren koşulda büyütüldü. Yapraklar ve kökler tuz stresine maruz kalmadan önce ve NaCl indüksiyonundan sonra 1, 3, 5 ve 7. saatte olmak üzere toplandı. Ayrıca 1, 3, 5 ve 7 günlük olarakda yaprak ve kök örnekleri toplandı. Toplam RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirildi ve gerçek zamanlı PZR (RT-PCR) ile gen ifadenmesi analizi yapıldı.

### 3.4 B1 Geninin ifadenme sonuçları

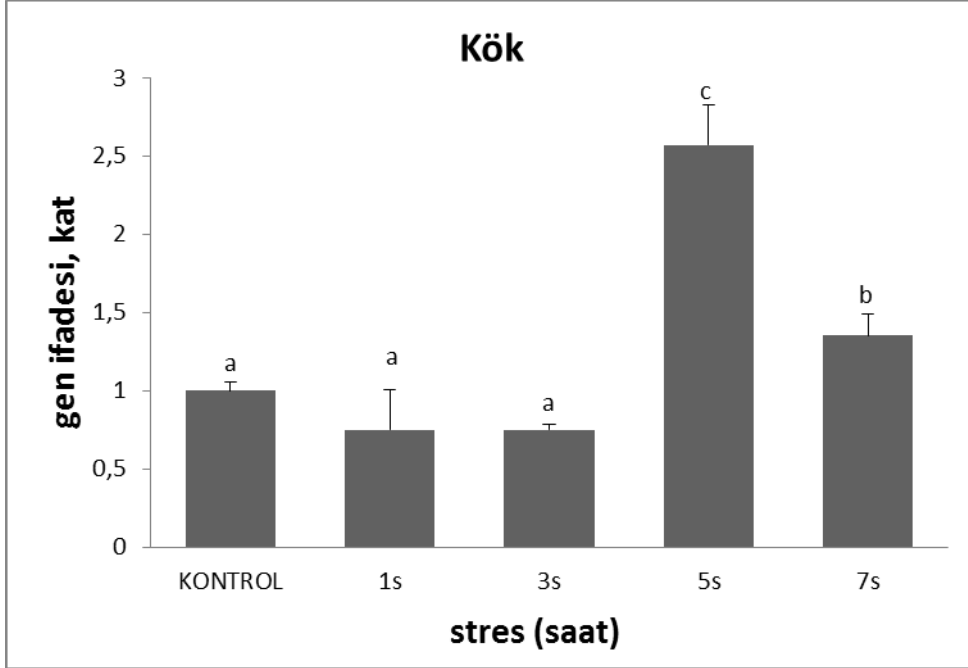
Tuz muamelesinin 1, 3, 5 ve 7. saatlerinde toplanan yapraklardaki B1 mRNA seviyesi, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde (yaklaşık 2 kat) artarak değişiklik göstermiştir (Şekil 4.a). Bu sonuç B1 geninin, *B. maritima* yapraklarında erken safhalarda tuz stresine karşı fonksiyonel bir etkisinin olabileceğini göstermektedir.

Kökte, B1 mRNA miktarı, tuz muamelesinin 1 ve 3 saatleri arasında alınan örneklerdeki miktarla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemektedir. Gen ifadenmesi tuz muamelesinin 5. saatinde (yaklaşık 2,5 kat) yükseldiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.b). Bu sonuç, B1 mRNA 'in tuz muamelesinin erken safhaları olan 5. saatinden sonra bir etkisi olduğunu göstermiştir.

B1 mRNA miktarının 1, 3, 5, 7 günlük olarak bakılan ifadeneme analizlerinde ise örnekler arasında bir fark görülmemiştir (Şekil 5 a, b).

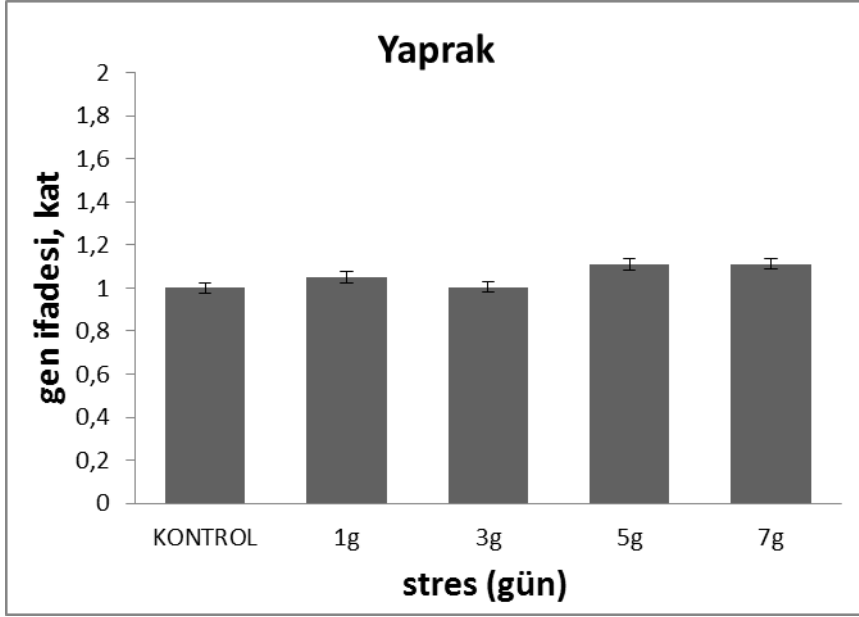


a)

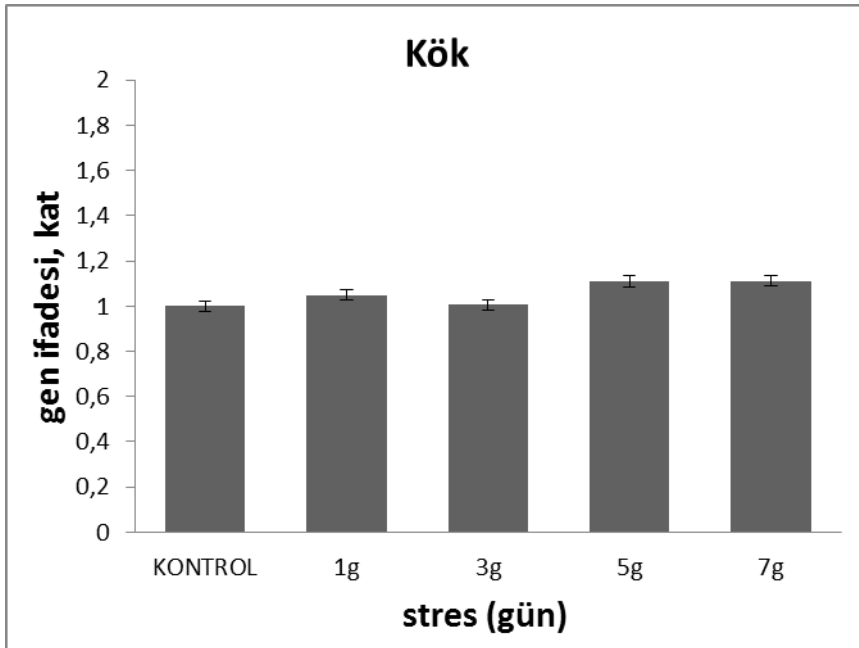


b)

Şekil 4. B1 geninin saatlik ifadeneme seviyeleri. (A) NaCl'e maruz bırakılmış yaprakların B1 cDNA ifadenemesi (B) NaCl'e maruz bırakılmış köklerin B1 cDNA ifadenemesi. Bitkiler 400 mM NaCl 'e maruz bırakıldı. Ölçümler üçlü tekrarlar halinde yapıldı. Dikey çubuklar standart hatayı ifade etmektedir. Aynı harf ile gösterilen değerler arasında belirgin bir fark yoktur ( $p < 0.005$ ).



a)



b)

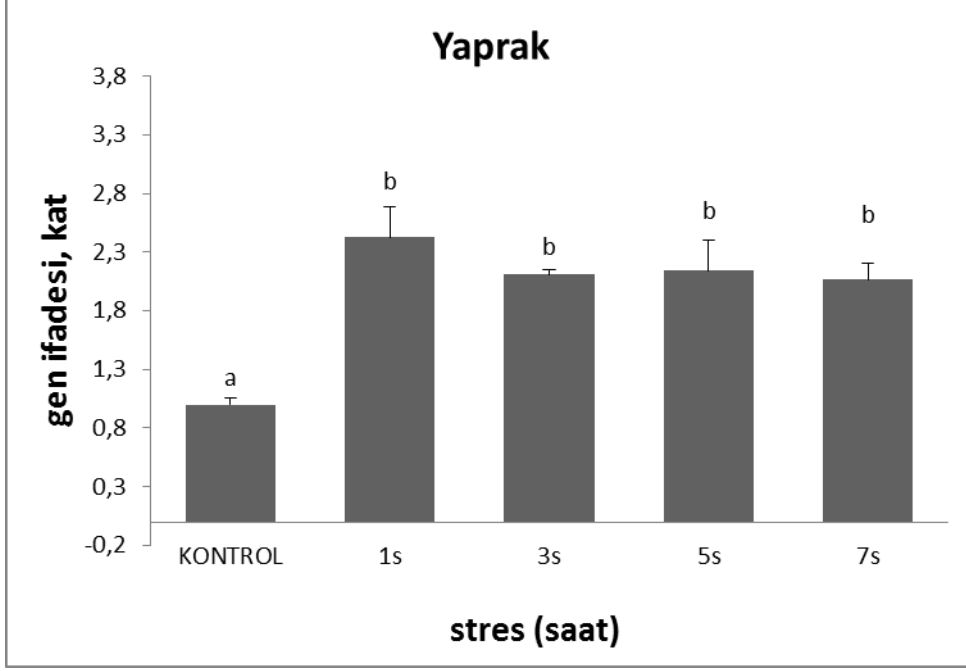
Şekil 5.B1 geninin günlük ifadelene seviyeleri. (A) NaCl'e maruz bırakılmış yaprakların B1 cDNA ifadelene (B) NaCl'e maruz bırakılmış köklerin B1 cDNA ifadelene. Bitkiler 400 mM NaCl 'e maruz bırakıldı ve ölçümler üçlü tekrarlar halinde yapıldı.

### 3.5 SAM geninin ifadelene sonuçları

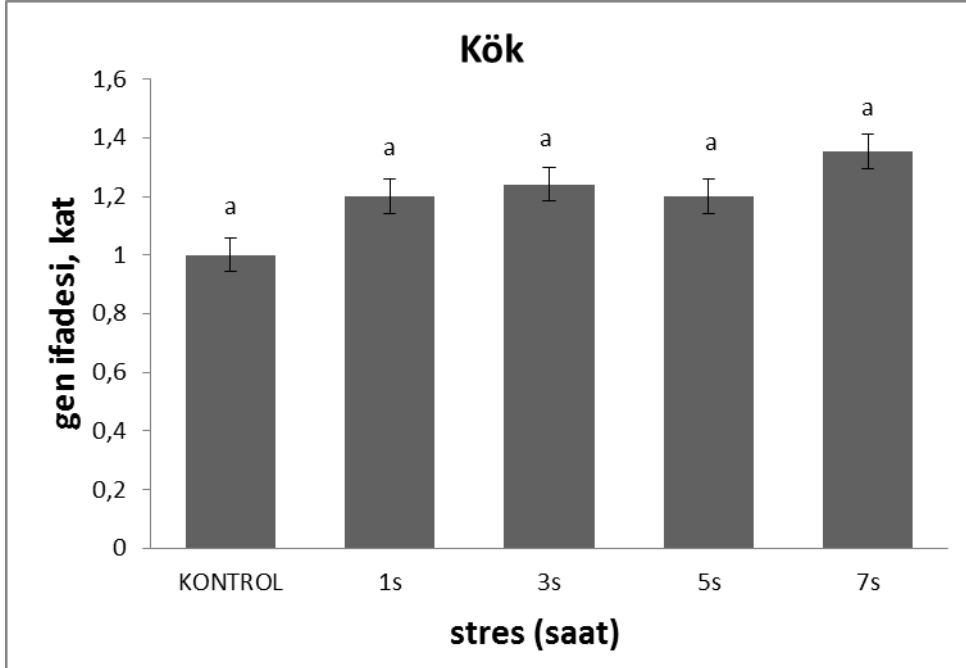
Tuz muamelesinin 1, 3, 5 ve 7. saatlerinde toplanan yapraklardaki SAM mRNA seviyesi kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde (yaklaşık 2 kat) değişiklik göstermiştir (Şekil 6a). SAM geninin, *B. maritima* yapraklarında erken devrede tuz stresi altında düzenleyici

etkisi olduğunu göstermektedir. Kökte, SAM mRNA miktarı anlamlı bir değişiklik görülmemiştir (Şekil 6b).

SAM mRNA miktarının 1, 3, 5, 7 günlük olarak bakılan yaprak ve kökteki ifadenme analizlerinde ise bir fark görülmemiştir (Şekil 7a, b).



a)

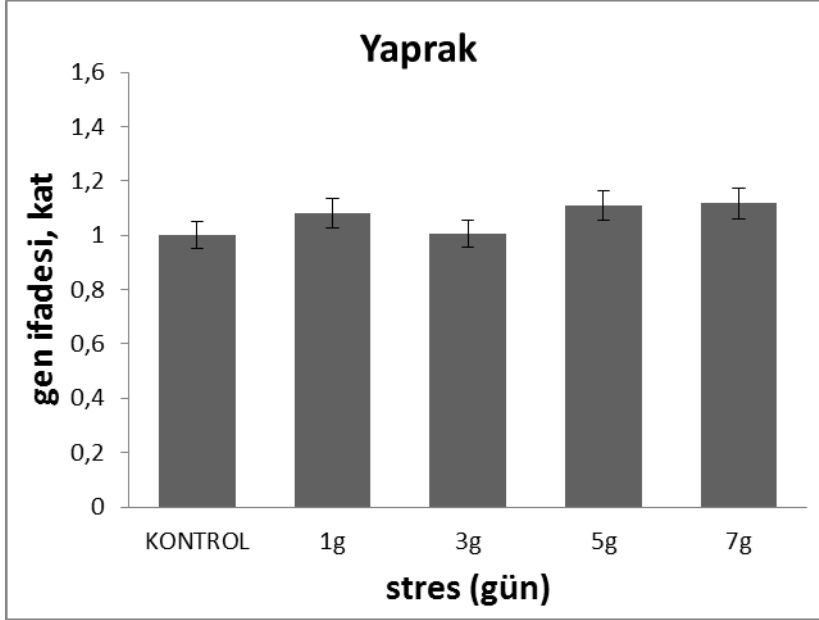


b)

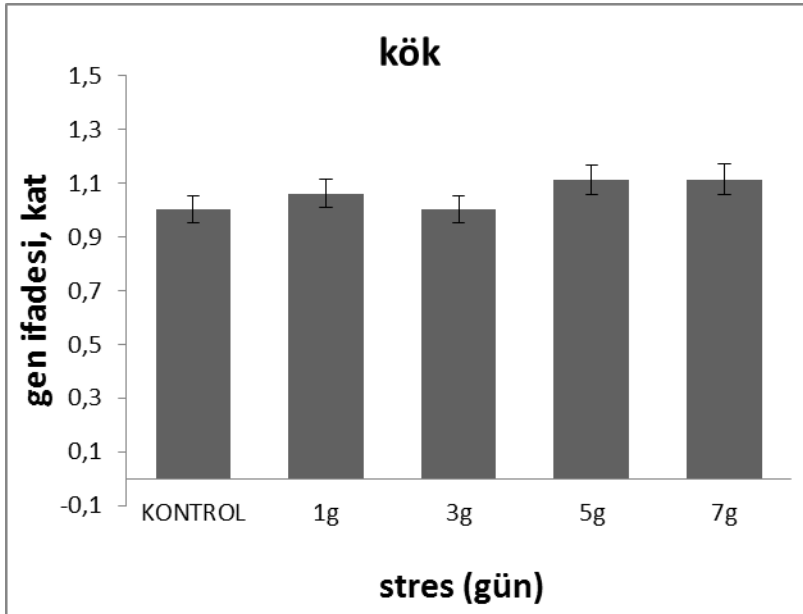
Şekil 6. SAM geninin saatlik ifadenme seviyeleri. (A) NaCl'e maruz bırakılmış yaprakların



B1 cDNA ifadenmesi (B) NaCl'e maruz bırakılmış köklerin SAM cDNA ifadenmesi. Bitkiler 400 mM NaCl 'e maruz bırakıldı ve ölçümler üçlü tekrarlar halinde yapıldı. Dikey çubuklar standart hatayı ifade etmektedir. Aynı harf ile gösterilen değerler arasında belirgin bir fark yoktur ( $p<0.005$ ).



a)



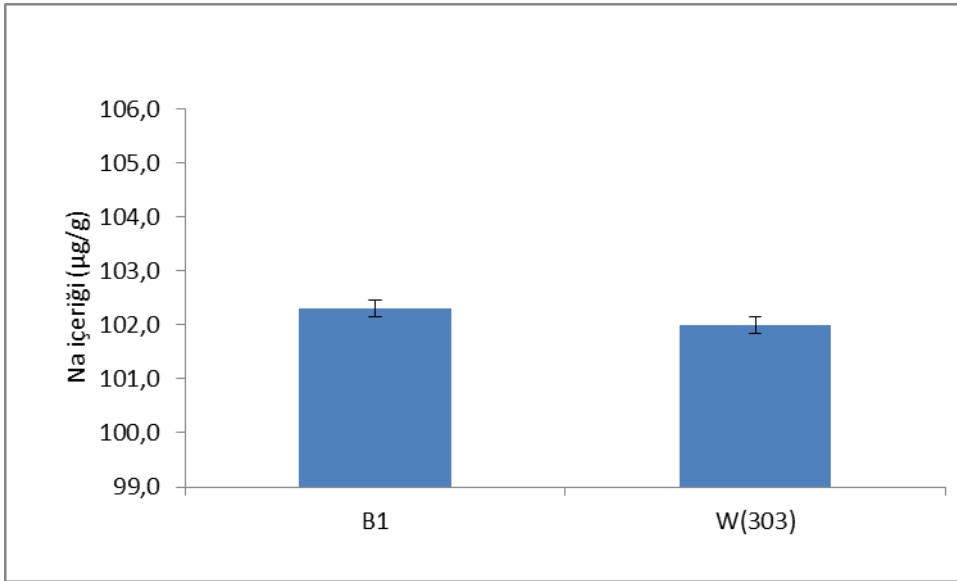
b)

Şekil 7. SAM geninin günlük ifadenme seviyeleri. (A) NaCl'e maruz bırakılmış yaprakların SAM cDNA ifadenmesi (B) NaCl'e maruz bırakılmış köklerin SAM cDNA ifadenmesi. Bitkiler 400 mM NaCl 'e maruz bırakıldı ve ölçümler üçlü tekrarlar halinde yapıldı

### 3.6 Hücre içi sodyum konsantrasyonu

B1 proteininin hücre içindeki sodyumun dışarı atılımında rolü olup olmadığını anlayabilmek için maya hücrelerinde sodyum konsantrasyonu ölçüldü.

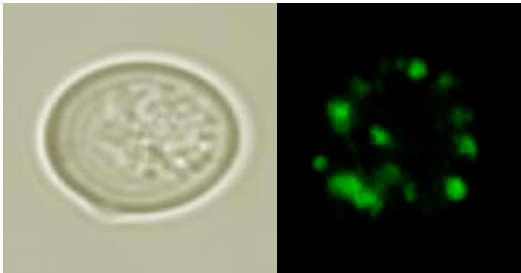
Hücre içi Na<sup>+</sup> seviyesi İndüktif Olarak Eşleştirilmiş Plazma - Kütle Spektrometresi (ICP-MS) kullanılarak ölçülmüştür. B1 geni aktarılmış olan Ab11c suşunda hücre içi sodyum konsantrasyonunda, yabani tip W303 suşuna göre bir fark görülmemiştir. Bu sonuçlar, aşırı miktardaki tuzun hücre içinde diğer organellere zarar vermeyecek şekilde depolandığını göstermektedir (Şekil 8).



Şekil 8. B1 geni aktarılmış Ab11c suşunda hücre içi sodyum konsantrasyonu. W303 kontrol grubunu temsil etmektedir. Hücreler 400 mM NaCl içeren YNB-Ura mediyumunda, 30 C'de 36 saat büyütüldü.

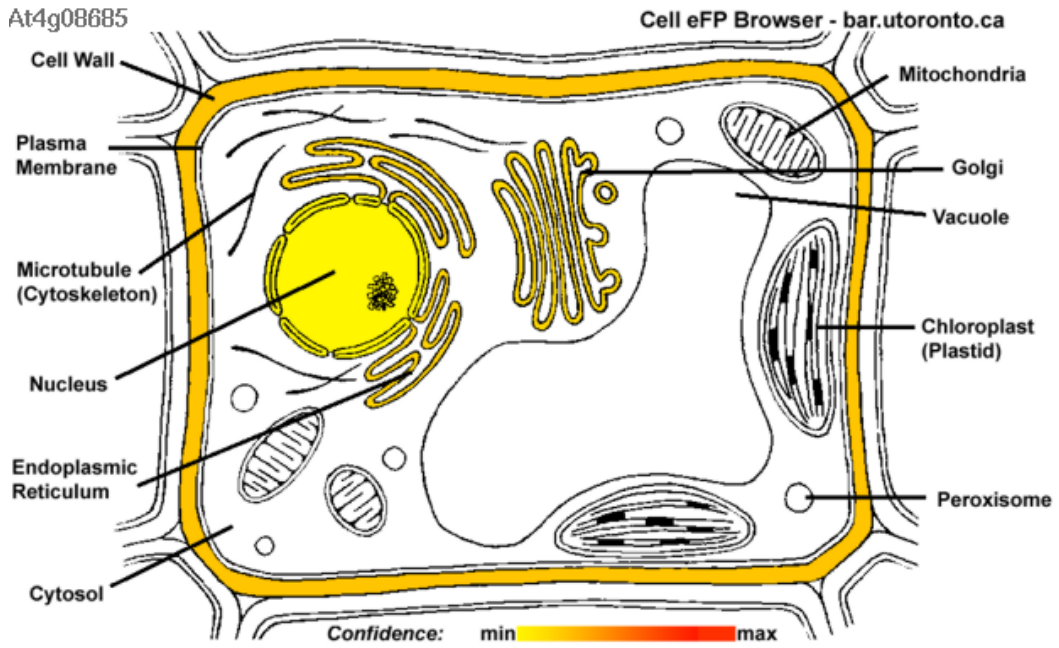
### 3.7 B1 proteinin hücre içi lokalizasyonu

B1 geni pAG415GFP plazmidine aktarıldıktan sonra hücreler YNB-Leu mediyumunda büyütüldü ve konfokal mikroskop ile gözlemlendi. B1 proteinini hücre zarında lokalize olmadığı sitoplazmada lokalize olduğu görülmüştür.



Şekil 9. B1 geninin maya hücrelerindeki lokalizasyonu. pAG415GFP plazmidine aktarılan B1 geni ve proteinleri hücre içinde noktalı desenler şeklinde lokalize olmuştur. B1 proteinlerinin maya hücrelerinde hücre içi zarlarda lokalize olduğunu göstermektedir.

SAH7 proteininin Arabidopsis deki lokalizasyonu “Arabidopsis eFP Browser data” sayfasında gösterilmiş olup proteinin endoplasmik retikulum, golgi ve çekirdekde lokalize olduğu gösterilmiştir (Şekil 10). B1 genine benzer olarak protein hücre membranında değil hücre içi membranlarda lokalize olmaktadır.



Drawn by T. Ampofo. Data from SUBA (Heazlewood et al, 2007).

Şekil 10. SAH7 proteininin Arabidopsisdeki hücre içi lokalizasyonunu gösteren şema (Heazlewood vd., 2007)

#### 4. TARTIŞMA

Deniz pancarı bitkisinin cdna kütüphanesi, tuz tolerans genlerini belirlemek için *Saccharomyces cerevisiae* ab11c mutant suşunda tarandı. Katı büyüme test sonuçlarında SAM ve B1 geninin maya hücrelerine belirgin bir tuz toleransı sağladığı gösterildi.

Sekans ve homoloji analizlerine göre, *Arabidopsis thaliana* da bulunan Sah7 geninin *Beta maritima* bitkisindeki polen-E1 geninin homologu olduğu belirlendi. Sah7, sinapsis arabidopsis homolog 7 olarak adlandırılan ve ilk olarak polen tüpünde bulunan ve fonksiyonu henüz belirlenmemiş bir gen olup, tuz ve antioksidant stress altında aşırı ifadelenen bir gen olduğu bildirilmiştir (Zhou vd., 2013).

“Arabidopsis eFP Browser data” sonuçlarına göre Arabidopsis de sah7 geni 1 saatlik tuz uygulaması altında 1,5 kat artmakta ve 12 saatde 2 katına çıkmaktadır. (Winter vd., 2007). B1 genide kısa süreli tuz uygulaması altında ifadelenmesini 2 kat arttırmıştır. Bu sonuçlar, B1 ve Sah7 nin tuz stresine cevap olarak ekspresyonlarını artırdığı ve mayada tuz toleransı sağladıkları içinde bitkilerde tuz toleransında bir mekanizmaya dahil olabileceklerini göstermektedir.

Sah7 proteininin Arabidopsis’de ER, golgi ve çekirdek te lokalize olduğu bildirilmiştir (Hooper vd., 2014; Tanz vd., 2013). B1 proteinide benzer şekilde hücre sitoplazmasında lokalize olmuştur. Bitkilerde, endomembranda bulunan N-glycosylation proteinleri tuz toleransını regüle etmede, hücre biyosentezinde ve protein kalite kontrolünde etkilidir (Kang vd., 2008). Araştırmalar, Arabidopsiste N-glicanların olgunlaşmasının tuz stresi adaptasyonu için gerekli olduğunu göstermiştir. Golgi aygıtında N-glican olgunlaşması tuz hassasiyetini sağlamaktadır (Kang vd., 2008; Von Schaewen vd., 2008). Bu sonuçlara göre, B1 ve Sah7 proteini büyük olasılıkla toksik seviyedeki tuzu ER yada Golgiye gönderilmesini sağlamak gibi bir fonksiyona sahip olabilir. İleriki çalışmalarda bu konu üzerinde çalışmalar yapılabilir.

Katı besiyeri büyüme testine göre, B1 ve Sah7 toksik seviyelerdeki KCl, LiCl ve NaCl içeren besiyeri ortamında aynı büyüme sonuçlarına sahip olduğu görülmüştür. Bu sonuçlarda B1 ve Sah7 proteininin sadece sodyum değil diğer iyonlara karşıda fonksiyonel bir rollerinin olduğunu tek substratının sodyum olmadığını göstermektedir.

S-adenozil metionin sentaz, ROS (Reactive Oxygen Species) türlerine karşı antioksidant olarak görev yaptığı bilinmektedir (Lieber, 2002). Başka bir çalışmada da SAMDC enziminin tütünde polyamine seviyesini yükselterek abiyotik stres toleransında önemli rolünün olduğu bildirilmiştir (Wi vd., 2006). Bu gen, *B. maritima* tarafından tuz stresine karşı oluşan ROS ları yok etmek için fazla şekilde ifadelemeye gitmiş olması bitkinin tuza tolerans mekanizmalarından biri olduğunu düşündürmektedir.

## 5. SONUÇ

Bu çalışmada, *Beta maritima* cDNA kütüphanesi, tuz toleransında rol alabilecek genlerin bulunması amacıyla *Saccharomyces cerevisiae* maya suşu kullanılarak tarandı.

Tarama deneylerinden sonra, maya hücrelerine tuz toleransı sağlayan iki gen bulundu. İlk genin S-adenozil metionin sentaz olduğu diğerinde, B1 olarak isimlendirdiğimiz fonksiyonu henüz karakterize edilmemiş bir gen olduğu görüldü. B1 proteininin, hücre içindeki sodyumu hücre dışına taşımak yerine hücre içinde depolamaya yardımcı olduğu gösterildi. B1 proteini, maya hücrelerinde endomembran sistemlerde lokalize olmaktadır. mRNA ifadelenmesi analizlerinde, B1 mRNA seviyelerinin tuz stresi altında yapraklarda ve kökte ifadelerinin arttığı tesbit edildi. B1 geninin Arabidopsis deki homologu olan Sah7 genide

klonlanıp karakterize edildiğinde, B1 proteininin fonksiyonlarına benzer sonuçlar verdiği görüldü. Bu iki gen grubunun dahil olduğu gen ailesi içinde diğer bitkilerde bulunmakta olup fonksiyonları henüz bilinmemektedir. Sonuçlarımız, B1 geninin fonksiyonu bilinmeyen ve henüz karakterize edilmemiş bir gen olarak *Beta maritima* da tuz toleransını regüle etmede rolü olduğunu ilk defa göstermiştir. Bundan sonraki çalışmalarda, B1 homologu olan diğer bitkilerdeki genlerde klonlanıp, aynı fonksiyonları gösterip göstermediği, biyoinformatik analizler ile korunmuş bölgelerin iyon toleransındaki rolleri ve B1 geninin ekspres edildiği maya hücrelerindeki mRNA ve protein ekspresyonları (mikroaray ve proteomik analizleri ile) kontrol edilerek, hangi yollar üzerinden tuz toleransı sağladığı çalışılabilir.

## Kaynaklar

Blaylock, A. D. 1994. "Soil salinity, salt tolerance, and growth potential of horticultural and landscape plants": University of Wyoming, Cooperative Extension Service, Department of Plant, Soil, and Insect Sciences, College of Agriculture.

Chinnusamy, V., Jagendorf, A., & Zhu, J.-K. 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*, 45(2), 437-448.

Hooper, C. M., Tanz, S. K., Castleden, I. R., Vacher, M. A., Small, I. D., & Millar, A. H. 2014. "SUBAcon: a consensus algorithm for unifying the subcellular localization data of the *Arabidopsis* proteome". *Bioinformatics*, 30(23), 3356-3364. doi:10.1093/bioinformatics/btu550

Hu, T., Li, H.-y., Zhang, X.-z., Luo, H.-j., & Fu, J.-m. 2011. "Toxic effect of NaCl on ion metabolism, antioxidative enzymes and gene expression of perennial ryegrass". *Ecotoxicol Environ Saf*, 74(7), 2050-2056

Lange, W, Brandenburg, W, Bock, TSD. 1999. "Taxonomy and cultonomy of beet (*Beta vulgaris* L.)." *Botanical journal of the Linnean Society*, 130(1), 81-96.

Kang, J. S., Frank, J., Kang, C. H., Kajiura, H., Vikram, M., Ueda, A. Fujiyama, K. 2008. "Salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* requires maturation of N-glycosylated proteins in the Golgi apparatus". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(15), 5933-5938.

Lieber, C.S. 2002. "S-Adenosyl-L-methionine: its role in the treatment of liver disorders". *Am J. Clin. Nutr.* 76:1183-1187.

Mudgal, V., Madaan, N., & Mudgal, A. 2010. "Biochemical mechanisms of salt tolerance in plants: a review". *International Journal of Botany*, 6(2), 136-143.

Parida, A. K., & Das, A. B. 2005. "Salt tolerance and salinity effects on plants: a review". *Ecotoxicol Environ Saf*, 60(3), 324-349.

Teakle, N. L., & Tyerman, S. D. 2010. "Mechanisms of Cl(-) transport contributing to salt tolerance". *Plant Cell Environ*, 33(4), 566-589.

Von Schaewen, A., Frank, J., & Koiwa, H. 2008. "Role of complex N-glycans in plant stress tolerance". *Plant signaling & behavior*, 3(10), 871-873.

Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. 2003. "Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance". *Planta*, 218(1), 1-14.

Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., & Provart, N. J. 2007. "An Electronic Fluorescent Pictograph browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets". *PLoS One*, 2(8), e718.

Wi, S.J., T. K., K.Y. Young. 2006. "Overexpression of carnation Sadenosylmethionine decarboxylase gene generates a broad-spectrum tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants". *Plant Cell Rep.* 25: 1111–1121.

Winicov, I., 1998. "New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants". *Ann Bot*, 82(6), 703-710.

Zhou, C.-P., Qi, Y.-P., You, X., Yang, L.-T., Guo, P., Ye, X., Chen, L.-S. 2013. "Leaf cDNA-AFLP analysis of two citrus species differing in manganese tolerance in response to long-term manganese-toxicity". *BMC genomics*, 14(1), 621

Zhu, J.-K. 2000. "Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*". *Plant Physiology*, 124(3), 941-948.

**TÜBİTAK  
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. HÜSEYİN ÇAĞLAR KARAKAYA
Proje No:	115Z694
Proje Başlığı:	Beta maritima Bitkisinde Tuz Toleransında Rol Oynadığı Düşünülen Üç Genin Karakterizasyonu
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. FEN F. MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/08/2015 - 01/08/2016
Onaylanan Bütçe:	30000.0
Harcanan Bütçe:	26331.05
Öz:	<p>Tuz stresi bitki büyümesini etkileyen başlıca negative etkenlerdendir. Tuz stresi bitkide homeostasisi ve bitkinin gelişimini etkiler. Esansiyel olmayan iyonların hücre içine alımı ozmotik dengeyi değiştirir ve büyük oranda dehidrasasyona sebep olur. Dehidrasasyondan korunmak için gelişmiş bitkiler çeşitli tuz tolerans mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu projede, tuz stresine dayanıklı olduğu bilinen Beta maritima bitkisinden muhtemel tuz tolerans genlerinin karakterizasyonu ve izolasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla, bitki cDNAları mayada ekspres edildi ve koloniler toksik tuzlu ortamda büyütüldü. Elde edilen 3 koloniden biri S-adenosyl methionine (SAM), diğer ikisinde fonksiyonu bilinmeyen ve B1 olarak isimlendirdiğimiz bir gen olduğu görüldü. B1 in Arabidopsis homoloğu olan Sah7 genide klonlanıp karakterizasyon işlemleri yapıldı. mRNA transkript analizlerinde, B1 mRNA seviyeleri yaprakta ve kökte tuz stresi altında indüklenmiştir. B1'i aşırı ifade eden maya hücrelerinin tuzlu ortamda yetiştirildikten sonraki tuz seviyeleri yabani tip mayayla karşılaştırıldıklarında, hücre içi tuz düzeyinde değişiklik olmadığı ve B1 proteininin sodyumun hücre içinde depolanmasında rol oynadığı düşünülmektedir. B1 ve Sah7 proteinleri hücre içinde endomembran sistemlerinde lokalize olmuş olup fazla tuzu golgi, endoplasmik retikulum gibi endomembran sistemlerinde depolayarak tuz toleransına yardımcı olma olasılıkları bulunabilir. Sonuçlarımız, karakterizasyonu ve fonksiyonu bilinmeyen B1 genininin Beta maritima bitkisinde tuz toleransında rol oynadığını göstermiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Tuz stresi, deniz pancarı, maya
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır