

T.C.

UŞAK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜŐÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**KADMİYUMUN BAZI BRASSİCA TÜRLERİNDE HMA4 GEN EKPREZYONU
ÜZERİNE ETKİSİ VE ÇİMLENMEYE ETKİSİNİN ROLÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERVE NUR ŞAHAN

MAYIS 2019

UŞAK

Merve Nur ŞAHAN tarafından hazırlanan “Kadmiyumun Bazı Brassica Türlerinde HMA4 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi ve Çimlenmeye Etkisinin Rolü” adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Abdulrezzak MEMON

Tez Danışmanı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Abdulrezzak MEMON

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi

Doç. Dr. Alper KARAGÖZ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Uşak Üniversitesi

Doç. Dr. Muhammed ASIM

Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Necmettin Erbakan Üniversitesi

Tarih: 25/06/2019

Bu tez ile U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Doç. Dr. Murat Kemal KARACAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Merve Nur ŞAHAN

KADMIYUMUN BAZI BRASSICA TÜRLERİNDE HMA4 GEN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ VE ÇİMLENMEYE ETKİSİNİN ROLÜ

(Yüksek Lisans Tezi)

MERVE NUR ŞAHAN

UŞAK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mayıs 2019

ÖZET

Toprak kirliliği açısından, ağır metaller en önemli kirletici kaynaklar arasında yer almaktadır. Hiperakümülatör olarak belirlenen 450'den fazla bitki çeşidinin aileleri arasında *Brassicaceae* familyası, *Asteraceae* familyası, *Fabaceae* familyası, *Scrophulariaceae* familyası, *Lamiaceae* familyası ve *Euphorbiaceae* familyaları örnek verilebilir. Bu ailelerden biri olan Brassicaceae familyası birçok metal akümüle eden türüne sahiptir. Bu türlerden *Brassica juncea* (kahverengi hardal) bitkisi diğer hiperakümülatör türlere göre daha çok biyokütle üretebilmesi, hızlı büyüme-gelişme oranı, hasat edilebilen kısımlarında ağır metalleri akümülyasyon ve tolerasyon yeteneklerinden, *Brassica rapa* (yem şalgamı) 'da belirli ağır metaller için hiper akümülatör olması, gelişmiş kök sistemine sahip olmalarından tercih edilmişlerdir.

Bu çalışmada, *Brassicaceae* familyasına ait olan *Brassica rapa*, *Brassica campestris var toria* ve *Brassica juncea* (kahverengi hardal) olmak üzere 3 tür ve *Brassica juncea* 'ya ait *Brassica juncea var JS-13*, *Brassica juncea var early raya*, *Brassica juncea var S-9*, *Brassica juncea var sind raya* olmak üzere 4 çeşitinde çalışılmıştır. 0-500 µM parametrelerinde 31 gün boyunca yetiştirilen bitkilerin tohum çimlenme kapasitesi, kök-gövde-yaprak gelişimleri incelenmesi amaçlanmıştır. *Brassica rapa*, *Brassica juncea var early raya* ve *Brassica juncea var sind raya* bitkilerinin 0-100 µM parametrelerinde yetiştirilen yaprak örneklerinden Cd metali ile uyarılan önemli genler olan metal ATPazlar HMA2 ve HMA4 genlerinin Real Time PCR kullanılarak gen ekspresyonlarına, aynı

bitkilerin yaprak numunelerinden Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi (ASS) kullanılarak Cd analizi yapıldı.

Bu çalışmanın amaçları arasında *Brassica rapa*, *Brassica juncea var early raya* ve *Brassica juncea var sind raya* 'nın yapraklarında kadmiyum birikimini tespit etmek ve bu bitkilerin fitoremediasyon için uygunluğunu araştırmak, bu bitkilerin yapraklarında ağır metal ATPazlar HMA2 ve HMA4 genlerinin Cd'a karşı anlatımını tespit etmek, ayrıca bu ATPazların çalışıldığı türlerinde metal akümüasyonu ile alakalı olup olmadığının tespit ederek; bu genlerinin metal akümüasyonunda ne kadar ilişkili olduğunu tespit etmektir.

qPCR çalışması ile HMA2 geninin ekspresyonuna bakıldığında *B. rapa* 'nın 20 µM ve *B. juncea var sind raya* 'nın 20 µM konsatrasyonlarında HMA2 ekspresyonun arttığı saptanmıştır. *B. juncea var early raya* bitkisi için ise bir farklılık gözlenmemiştir.

HMA4 geni için ise *B. juncea var early raya* 'nın 10 µM, *B. rapa* 'nın 10 µM ve *B. juncea var sind raya* 'nın 20 µM konsatrasyonlarında ekspresyonun arttığı tespit edilmiştir.

Atomik absorpsiyon spektrometresi (ASS) sonuçlarıyla HMA4 gen ekspresyonu sonuçları birbiriyle paralellik göstermiştir. Ancak HMA2 geni için bu paralellik saptanamamıştır

Tüm bu sonuçlara bakılarak *B. rapa*, *B. juncea var sind raya* ve *B. juncea var early raya* bitkilerinin Cd hiperakümülatörü olabileceği ve bunu da HMA4 geninin ekspresyonuyla gerçekleştirebileceği görülmüştür.

Bilim Kodu :

Anahtar Kelimeler : *B.rapa*, *B. campestris var toria*, *B. juncea var JS-13*, *B. juncea var early raya*, *B. juncea var S-9*, *B. juncea var sind raya*, Cd, qPCR, HMA2, HMA4, Fitoremidasyon, Gen Ekspresyonu

Sayfa Adedi : 117

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Abdulrezzak MEMON

THE EFFECT OF CADMIUM ON HMA 4 GENE EXPRESSION IN SOME BRASSICA SPECIES AND THE ROLE OF EFFECT ON GERMINATION

(M.Sc. Thesis)

MERVE NUR ŞAHAN

UŞAK UNIVERSITY

INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

May 2019

ABSTRACT

In terms of soil pollution, heavy metals are among the most important sources of pollutants. Around 450 plant species in *Brassicaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Scrophulariaceae*, *Lamiaceae* and *Euphorbiaceae* families have been identified as metal hyper accumulators. Among them, majority of the accumulator plants have been discovered in *Brassicaceae* family. *Brassica juncea* (brown mustard) in *Brassicaceae* is a major oilseed crop and is also identified as a metal tolerant and metal accumulator plant. This plant species is able to produce more biomass than other hyperaccumulative species, due to its rapid growth. Another plant species *Brassica rapa* (fodder turnip) has elaborated root system and is reported to be a hyper accumulator for certain heavy metals. In this study, four varieties of *B. juncea*, *B. rapa*, *B. campestris* var. *toria* were studied.

The aim of this study was to investigate the seed germination rate and plant growth and development in *Brassica rapa*, *Brassica juncea early raya* and *Brassica juncea sind raya* grown at different levels of Cd (0, 5, 10, 20, 50 and 100 uM Cd). Leaf samples were dried at 72°C for 72 hrs and then digested with HNO₃ acid and HClO₄ acid mixture (3:1). Cd content in this diluted acid mixture was analyzed by Atomic Absorption Spectrophotometry. Gene expression pattern of metal ATPases HMA2 and HMA4 in the leaves of these *Brassica* spp. grown at different Cd levels were analyzed by R-T qPCR. The data was analysed in order to understand the role of these heavy metal ATPases in Cd accumulation and their role in phytoremediation.

When the expression of HMA2 gene was examined, it was found that HMA2 expression was increased in the leaves of *B. rapa* and *B. juncea* var *sind raya* grown at 20 μ M Cd compared to control. *B. juncea* early raya leaves showed no any increase in gene expression at 20 μ M Cd compared to control. For the HMA4 gene, expression was increased in the leaves of *B. juncea* var *early raya* and *B. rapa* when grown at 10 μ M Cd but *B. juncea* var *sind raya* showed high expression when plants were treated with 20 μ M Cd. The results of atomic absorption spectrometry (ASS) and HMA4 gene expression correlated with each other. It is concluded that *B. rapa*, *B. juncea* var *sind raya* and *B. juncea* var *early raya* plants accumulated Cd and this accumulation pattern was correlated with high HMA4 gene expression.

Science Code :

Key Words : : *B.rapa*, *B. campestris* var *toria*, *B. juncea* var *JS-13*, *B. juncea* var *early raya*, *B. juncea* var *S-9*, *B. juncea* var *sind raya*, Cd, qPCR, HMA2, HMA4, Phytoremediation, gene expression

Page Number : 117

Adviser : Prof. Dr. Abdulrezzak MEMON

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocam Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Prof.Dr. Abdulrezzak MEMON'a,

Tez çalışmamın anatomik kısmında vermiş olduğu desteği, fikirleri, bilgi ve deneyimleriyle katkılarını esirgemeyen değerli hocam Doç.Dr. Ahmet KAHRAMAN'a,

Laboratuvarda birlikte çalıştığım her türlü destek ve bilgi alıverşinde bulunduğum tez arkadaşım Merve ÇETİNDÖĞAN'a ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Tez çalışmamın moleküler çalışmalarını ve incelemeleri boyunca yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren çok kıymetli sevgili Enver SEÇER'e

Tez çalışmamda maddi kaynaklar sunarak tezime destek veren MstLab şirketi sahibi sayın Bülent KOCAMAN'a,

Tez çalışmamın anatomik analizler kısmını tamamladığım Uşak Üniversitesi Eğitim ve Araştırma hastanesinin Patoloji Laboratuvar'ının her türlü desteği veren çok değerli personel ve doktorlarına,

Araştırmamın laboratuvar aşamasındaki RNA miktar tayini ölçümünde IBG Doktora öğrencisi Muhammed Memon' a destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Sonsuz sevgi ve desteklerini her zaman hissettiğim bugünlere gelmemde büyük emeği olan sevgili annem Rabia ŞAHAN ve sevgili babam İsmail ŞAHAN'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| İçindekiler | Sayfa |
|--|-------|
| ÖZET..... | iii |
| ABSTRACT..... | v |
| TEŞEKKÜR..... | vii |
| İÇİNDEKİLER.. | viii |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ..... | x |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ..... | xi |
| RESİMLERİN LİSTESİ..... | xiv |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | xvi |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1.Ağır Metaller | 2 |
| 1.2.Kadmiyum | 2 |
| 2. GENEL KISIMLAR | 7 |
| 2.1.Bitkiler ve Ağır Metaller | 7 |
| 2.1.1. Metale Karşı Tolerans Gösteren Bitki Grupları | 8 |
| 2.1.2. Metal İndikatör Bitkiler | 9 |
| 2.1.3. Metal Akümülatör Bitkiler | 9 |
| 2.2.Fitoremiasyon | 10 |
| 2.2.1. Fitoremiasyon Teknikleri | 10 |
| 2.2.1.1.Fitoekstraksiyon | 10 |
| 2.2.1.2.Fitotrasformasyon..... | 11 |
| 2.2.1.3.Fitodegradasyon | 11 |
| 2.2.1.4.Fitostimülasyon | 11 |
| 2.2.1.5.Fitovolatilizasyon | 11 |
| 2.2.1.6.Rizofiltrasyon | 12 |
| 2.3.Bitkilerde Ağır Metal Alınımı ve Moleküler Mekanizması | 12 |
| 3. MATERYAL ve METOT | 21 |
| 3.1.Bitkisel Materyal | 21 |
| 3.2. Hedef Bitki Belirlenmesi | 21 |
| 3.3.Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Ağır Metal Uygulaması | 21 |

| | |
|--|----|
| 3.3.1. Tohum Sterilizasyonu | 21 |
| 3.3.2. Tohumların Tabaklara Ekim İşlemi | 23 |
| 3.3.3. Bitkilerin Hasatı | 24 |
| 3.4.Bitkilerde HMA2 ve HMA4 Genlerinin Analizi İçin Yapılan Moleküler Yöntemler..... | 24 |
| 3.4.1. Total RNA İzolasyonu | 24 |
| 3.4.2. Total RNA Miktar Tayini..... | 26 |
| 3.4.3. Komplementer (Tamamlayıcı) DNA Sentezi | 26 |
| 3.4.4. Primer Tasarımı | 28 |
| 3.4.5. Real Time PCR Çalışması | 29 |
| 3.5. Atomik Absorpsiyon Spektrometresi | 32 |
| 3.5.1. Nitrik-Perklorik Asit Karışımı ile Yaş Yakma | 33 |
| 3.6. Histolojik (anatomik) Analiz | 34 |
| 3.6.1. Örneklerin tespiti (Fixing) | 35 |
| 3.6.2. Gömme (Embedding) | 35 |
| 3.6.3. Kesit alma (Sectioning) | 36 |
| 3.6.4. Boyama (Staining) | 37 |
| 3.6.5. Bitki Dokularının Ölçümü..... | 38 |
| 4. BULGULAR | 40 |
| 4.1.Hasat Edilen Bitkilerin Kök-Gövde Uzunlukları | 56 |
| 4.2.Total RNA Miktar Tayini | 64 |
| 4.3.Real Time PCR Çalışması..... | 66 |
| 4.3.1. Gen Ekspresyonu | 66 |
| 4.4.Atomik Absorpsiyon Spektrometri ile Metal Tayini..... | 72 |
| 4.5.Anatomik Analizler | 74 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ | 83 |
| 6. KAYNAKLAR..... | 88 |
| 7. ÖZGEÇMİŞ..... | 99 |

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge | Sayfa |
|--|-------|
| Çizelge 3.1. cDNA sentezi için PCR cihazında kurulan program..... | 27 |
| Çizelge 3.2. <i>B. rapa</i> ve <i>B. juncea</i> türleri için tasarlanan primerlerin baz dizilimleri ve Guanin-Sitozin bazları oranları | 29 |
| Çizelge 3.3. Real time PCR reaksiyon basamakları | 30 |
| Çizelge 3.4. Real Time PCR da kurulan reaksiyonun tablosu..... | 31 |
| Çizelge 4.1. <i>B. rapa</i> , <i>B. campestris</i> var <i>toria</i> , <i>B. juncea</i> var <i>JS-13</i> , <i>B. juncea</i> var <i>early raya</i> , <i>B. juncea</i> var <i>S-9</i> , <i>B. juncea</i> var <i>sind raya</i> bitkilerinin 0 µM'daki ıslak ağırlıkları (gr) | 46 |
| Çizelge 4.2. <i>B. rapa</i> , <i>B. campestris</i> var <i>toria</i> , <i>B. juncea</i> var <i>JS-13</i> , <i>B. juncea</i> var <i>early raya</i> , <i>B. juncea</i> var <i>S-9</i> , <i>B. juncea</i> var <i>sind raya</i> bitkilerinin 5 µM'daki ıslak ağırlıkları (gr) | 46 |
| Çizelge 4.3. <i>B. rapa</i> , <i>B. campestris</i> var <i>toria</i> , <i>B. juncea</i> var <i>JS-13</i> , <i>B. juncea</i> var <i>early raya</i> , <i>B. juncea</i> var <i>S-9</i> , <i>B. juncea</i> var <i>sind raya</i> bitkilerinin 10 µM'daki ıslak ağırlıkları (gr)..... | 47 |
| Çizelge 4.4. <i>B. rapa</i> , <i>B. campestris</i> var <i>toria</i> , <i>B. juncea</i> var <i>JS-13</i> , <i>B. juncea</i> var <i>early raya</i> , <i>B. juncea</i> var <i>S-9</i> , <i>B. juncea</i> var <i>sind raya</i> bitkilerinin 20 µM'daki ıslak ağırlıkları (gr).... | 47 |
| Çizelge 4.5. <i>B. rapa</i> , <i>B. campestris</i> var <i>toria</i> , <i>B. juncea</i> var <i>JS-13</i> , <i>B. juncea</i> var <i>early raya</i> , <i>B. juncea</i> var <i>S-9</i> , <i>B. juncea</i> var <i>sind raya</i> bitkilerinin 50 µM'daki ıslak ağırlıkları (gr) | 48 |
| Çizelge 4.6. <i>B. rapa</i> , <i>B. campestris</i> var <i>toria</i> , <i>B. juncea</i> var <i>JS-13</i> , <i>B. juncea</i> var <i>early raya</i> , <i>B. juncea</i> var <i>S-9</i> , <i>B. juncea</i> var <i>sind raya</i> bitkilerinin 100 µM'daki ıslak ağırlıkları (gr) | 48 |
| Çizelge 4.7. <i>B. rapa</i> , <i>B. campestris</i> var <i>toria</i> , <i>B. juncea</i> var <i>JS-13</i> , <i>B. juncea</i> var <i>early raya</i> , <i>B. juncea</i> var <i>S-9</i> , <i>B. juncea</i> var <i>sind raya</i> bitkilerinin RNA izolasyonu için tartılan ağırlıkları | 49 |
| Çizelge 4.8. Farklı Cd konsantrasyonlarında yetiştirilen bitkilerin kök ve gövde uzunlukları (ort±stdsapma, cm) | 62 |
| Çizelge 4.9. NanoDrop spektrofotometre cihazında ölçülen RNA'ların saflıkları ve miktarları | 64 |
| Çizelge 4.10. Real time PCR gen ekspresyonu değerleri (RQ, CT, ΔCT ve ΔΔCT) | 70 |

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil | Sayfa |
|--|-------|
| Şekil 2.1. Apoplast ve simplast yollarla elementlerin yaprak üzerinde dağılımı | 13 |
| Şekil 2.2. Elementlerin bitkiler üzerindeki taşınım mekanizmaları | 14 |
| Şekil 2.3. Cd ağır metalinin bitki içindeki muhtemel taşınımı ve lokalizasyonu | 15 |
| Şekil 4.1. <i>B. rapa</i> bitkisinin 0-200µM parametrelerindeki kök uzunlukları | 56 |
| Şekil 4.2. <i>B. rapa</i> bitkisinin 0-200 µM parametrelerindeki gövde uzunlukları..... | 56 |
| Şekil 4.3. <i>B. juncea</i> var <i>early raya</i> bitkisinin 0-200 µM parametrelerindeki kök uzunlukları | 57 |
| Şekil 4.4. <i>B. juncea</i> var <i>early raya</i> bitkisinin 0-200 µM parametrelerindeki gövde uzunlukları | 57 |
| Şekil 4.5. <i>B. juncea</i> var <i>sind raya</i> bitkisinin 0-100 µM parametrelerindeki kök uzunlukları | 58 |
| Şekil 4.6. <i>B. juncea</i> var <i>sind raya</i> bitkisinin 0-100 µM parametrelerindeki gövde uzunlukları | 58 |
| Şekil 4.7. <i>B. juncea</i> var <i>JS-13</i> bitkisinin 0-200 µM parametrelerindeki kök uzunlukları..... | 59 |
| Şekil 4.8. <i>B. juncea</i> var <i>JS-13</i> bitkisinin 0-200 µM parametrelerindeki gövde uzunlukları | 59 |
| Şekil 4.9. <i>B. campestris</i> var <i>toria</i> bitkisinin 0-100 µM parametrelerindeki kök uzunlukları | 60 |
| Şekil 4.10. <i>B. campestris</i> var <i>toria</i> bitkisinin 0-100 µM parametrelerindeki gövde uzunlukları.... | 60 |
| Şekil 4.11. <i>B. juncea</i> var <i>S-9</i> bitkisinin 0-200 µM parametrelerindeki kök uzunlukları | 61 |
| Şekil 4.12. <i>B. juncea</i> var <i>S-9</i> bitkisinin 0-200 µM parametrelerindeki gövde uzunlukları | 61 |
| Şekil 4.13. Application plot- Logaritmik reaksiyon artış grafiği | 65 |
| Şekil 4.14. SYBR boyasının reaksiyondaki spektral grafiği | 66 |
| Şekil 4.15. Melt Curve grafiği | 68 |
| Şekil 4.16. HMA2 ve HMA4 genlerin çalışılan örneklerdeki ekspresyon grafiği..... | 69 |
| Şekil 4.17. <i>B. juncea</i> var <i>sind raya</i> , <i>B. juncea</i> var <i>early raya</i> , <i>B. rapa</i> bitkilerinin yaprak kısımlarının atomik absorpsiyon spektrometri cihazı ile Cd derişimleri (Y eksen: ppm, X eksen: µM) | 72 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4.18. <i>B.juncea</i> var <i>sind raya</i> bitkisinin yaprak kısımlarının atomik absorpsiyon spektrometri cihazı ile Cd derişimleri (Y eksen: ppm, X eksen: 0-100µM değerleri) | 73 |
| Şekil 4.19. <i>B. juncea</i> var <i>early raya</i> bitkisinin yaprak kısımlarının atomik absorpsiyon spektrometri cihazı ile Cd derişimleri (Y eksen: ppm, X eksen: 0-100µM değerleri) | 73 |
| Şekil 4.20. <i>B. rapa</i> bitkisinin yaprak kısımlarının atomik absorpsiyon spektrometri cihazı ile Cd derişimi (Y eksen: ppm, X eksen: µM) | 74 |
| Şekil 4.21. <i>B. juncea</i> var <i>sind raya</i> bitkisinin kök kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşığı olacak şekilde 0-100 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri | 75 |
| Şekil 4.22. <i>B. juncea</i> var <i>sind raya</i> bitkisinin gövde kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşığı olacak şekilde 0-100 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri | 75 |
| Şekil 4.23. <i>B. juncea</i> var <i>sind raya</i> bitkisinin yaprak kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşığı olacak şekilde 0-100 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri | 76 |
| Şekil 4.24. <i>B. rapa</i> bitkisinin kök kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşığı olacak şekilde 0-500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri..... | 76 |
| Şekil 4.25. <i>B. rapa</i> bitkisinin gövde kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşığı olacak şekilde 0-500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri..... | 77 |
| Şekil 4.26. <i>B. rapa</i> bitkisinin yaprak kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşığı olacak şekilde 0-100 µM ve 500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri | 77 |
| Şekil 4.27. <i>B. juncea</i> var <i>early raya</i> bitkisinin kök kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşığı olacak şekilde 0-500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri | 78 |
| Şekil 4.28. <i>B. juncea</i> var <i>early raya</i> bitkisinin gövde kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşığı olacak şekilde 0-500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri | 78 |
| Şekil 4.29. <i>B. juncea</i> var <i>early raya</i> bitkisinin yaprak kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşığı olacak şekilde 0-500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri | 79 |
| Şekil 4.30. <i>B. juncea</i> var <i>JS-13</i> bitkisinin kök kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşığı olacak şekilde 0-500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri | 79 |
| Şekil 4.31. <i>B. juncea</i> var <i>JS-13</i> bitkisinin gövde kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşığı olacak şekilde 0-500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri | 80 |
| Şekil 4.32. <i>B. juncea</i> var <i>JS-13</i> bitkisinin yaprak kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşığı olacak şekilde 0-500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri | 80 |
| Şekil 4.33. <i>B. campestris</i> var <i>toria</i> bitkisinin kök kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşığı olacak şekilde 0-500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri | 81 |
| Şekil 4.34. <i>B. campestris</i> var <i>toria</i> bitkisinin gövde kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşığı olacak şekilde 0-500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri | 81 |

Şekil 4.35. *B. campestris* var *toria* bitkisinin yaprak kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşağı olacak şekilde 0-500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri 82

Şekil 4.36. *B. juncea* var *S-9* bitkisinin gövde kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşağı olacak şekilde 0-500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri 82



RESİMLERİN LİSTESİ

| Resim | Sayfa |
|---|-------|
| Resim 3.1. RNA izolasyonu çalışması | 26 |
| Resim 3.2. cDNA sentezi için PCR cihazında kurulan program..... | 28 |
| Resim 3.3. Real time PCR çalışmasında plate'in seal ile kapatılması | 32 |
| Resim 3.4. Real time PCR çalışması reaksiyon basamakları | 32 |
| Resim 3.5. Öğütülmüş bitki numuneleri..... | 33 |
| Resim 3.6. Numunelerin kahverengiden açık sarı ve beyaz duman vermesi | 34 |
| Resim 3.7. Erlenmeyerde son aşamada oluşan şeffaf beyaz renkteki sıvı | 34 |
| Resim 3.8. Embedding Center cihazı | 36 |
| Resim 3.9. Mikrotom ve su banyosu cihazları | 37 |
| Resim 3.10. Bitkilerin farklı parametrelerdeki kök, gövde ve yaprak kesitlerinin ışık mikroskobu altında LAS EZ programıyla incelenmesi | 39 |
| Resim 4.1. Değişik Cd konsantrasyonlarında yetiştirilen <i>B.juncea</i> var <i>early raya</i> bitkisinin 31 günün sonundaki gelişimi | 40 |
| Resim 4.2. Değişik Cd konsantrasyonlarında yetiştirilen <i>B.rapa</i> bitkisinin 31 günün sonundaki gelişimi | 41 |
| Resim 4.3. Değişik Cd konsantrasyonlarında yetiştirilen <i>B. juncea</i> var <i>S-9</i> bitkisinin 31 günün sonundaki gelişimi | 42 |
| Resim 4.4. Değişik Cd konsantrasyonlarında yetiştirilen <i>B. campestris</i> var <i>toria</i> bitkisinin 31 günün sonundaki gelişimi | 43 |
| Resim 4.5. Değişik Cd konsantrasyonlarında yetiştirilen <i>B. juncea</i> var <i>sind raya</i> bitkisinin 31 günün sonundaki gelişimi | 44 |
| Resim 4.6. Değişik Cd konsantrasyonlarında yetiştirilen <i>B. juncea</i> var <i>JS-13</i> bitkisinin 31 günün sonundaki gelişimi | 45 |
| Resim 4.7. <i>B.juncea</i> var <i>early raya</i> bitkisinin 31 günün sonundaki morfolojisi | 50 |

| | |
|---|----|
| Resim 4.8. <i>B. rapa</i> bitkisinin 31 günün sonundaki morfolojisi | 51 |
| Resim 4.9. <i>B. juncea</i> var <i>S-9</i> bitkisinin 31 günün sonundaki morfolojisi | 52 |
| Resim 4.10. <i>B. campestris</i> var <i>toria</i> bitkisinin 31 günün sonundaki morfolojisi | 53 |
| Resim 4.11. <i>B. juncea</i> var <i>sind raya</i> bitkisinin 31 günün sonundaki morfolojisi | 54 |
| Resim 4.12. <i>B. juncea</i> var <i>JS-13</i> bitkisinin 31 günün sonundaki morfolojisi | 55 |



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

| Simgeler | Açıklama |
|----------------------|--|
| cDNA | Komplementer (tamamlayıcı) DNA |
| K_a | İyonlaşma sabiti |
| Cd | Kadmiyum |
| µl | Mikrolitre |
| µM | Mikromolar |
| ml | Mililitre |
| mg | Miligram |
| Kısaltmalar | Açıklama |
| AAS | Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi |
| HMA | Ağır metal ATPaz |
| WHO | Dünya Sağlık Örgütü |
| PC | Fitoşelatin |
| MT | Metalotionein |
| PCR | Polimeraz zincir reaksiyonu |
| AtATM | Mitokondriyal ABC taşıyıcı |
| ZIP | Çinko-Demir Permeaz |
| Nramp | Doğal Dirençle İlişkili Makrofaj Protein |
| CDF | Kasyon-Difüzyon Hızlandırıcı |



il : h...our.s...

nk University Molek... Biyolo...e Genetik

ersite... molek... biyolo... Genetik Böl... 2012

e Sü... adolm... 200...

1. GİRİŞ

Metaller kimyasal olarak “bazik oksitlere sahip olan, elektriği iletebilen, metalik parlaklığa sahip olanlar, katyon formdakiler, dövülebilir ve işlenebilir elementler” olarak tanımlanmaktadır [1].

Ağır metaller ise yaygın olarak yoğunluğu 5g/cm^3 'den çok olan metaller şeklinde adlandırılmaktadır. Tıbbi kaynaklarda ise atom kütlesi dikkate alınmadan tamamı toksik özellikteki metaller olarak geçmektedir. 60'ı geçen sayıda element ağır metal kategorisine sokulmaktadır. Kurşun, bakır, civa, kadmiyum, çinko, demir, kobalt, mangan, selenyum, arsenik gümüş, nikel ve krom çoğunlukla bilinen ve sıkça rastlanan ağır metallerdir [1-4]. Ağır metaller, potansiyel toksisiteleri ve buldukları ortamdaki kalıcılıkları sebebiyle antropojenik kökenli en tehlikeli çevresel kirleticilerden biri sayılmaktadır [5].

Yirminci yüzyılda yaşanan birçok bilimsel ve teknolojik gelişmelerin en önemlilerinden birisi de sanayileşmedir. Sanayileşmenin artmasıyla iş imkânları ve üretim artmış, yaşam standartları yükselmiştir. Bu durumun insan ve çevre üzerine olumsuz etkileri de artmıştır[6,7]. Sanayinin gelişmesiyle kırsaldan kentlere nüfus göçü ve buna bağlı olarak kentlerdeki nüfusun artmasıyla doğa tahribi hızlanarak çevre kirliliği artmıştır. Bu da canlıların sağlığını kritik bir şekilde etkilemektedir[6]. Havada ve toprakta bulunan ağır metaller toksik olması ve doğada birikmesi nedeniyle en tehlikeli kirleticiler içinde bulunmaktadır [9-11]. Atmosfere geçen bu metaller, doğal su kaynaklarına, karasal alanlara ulaşarak geniş alanlara yayılırlar. Toprakta bitkilere, bitkilerden hayvan ve insanlara, bunlara ek olarak atmosferden solunum ile de canlıların vücuduna alınabilmektedir [12].

Kirleticiler atmosferik hadiselerle buldukları yerden çok uzak mesafelere ve geniş alanlara yayılabilmektedir. Zaman içerisinde yeryüzüne inerek, yaşam alanımız olan karasal ve sulak alanların kirlenmesine ve buna bağlı olarak da bitkisel ve hayvansal kökenli besinlerin kirliliğinde etken rol oynayabilirler [13]. Sanayi atıkları, egzoz dumanları, maden kaynakları ve buraları işleten fabrikalar, volkanik olaylar, tarımda ilaç ve gübre kaynaklı oluşan kirleticiler ağır metal kirliliğine neden olmaktadır. Kirlenen alanların temizlenmesi zor ve zahmetli olup bu kirleticiler canlıların biyolojik sistemlerine negatif etki etmektedir. Çevre koşullarına dayanıklı olduğundan dolayı uzun süre ortamda

kalan ağır metaller doğal yaşam ortamının zarar görmesine ve canlılarda zehir etkisine sebep olmaktadır [14-17].

Kirleticiler su kaynaklarına da karışarak geniş alanlara yayılmakta ve canlı sağlığını tehlikeye sokmaktadır. Topraklar, su ve atmosfere göre dış faktörlere nazaran biriktirme kapasitesi daha çok olan yapılardır. Toprakta oluşan değişiklikler ve bozulmaların eski haline getirilmesi oldukça güçtür ve pahalıya mal olur [18]. Topraktaki ağır metal kirliliğini gerektiğinden fazla yapılan tarımsal gübreleme ve ilaçlama, verimli tarım arazilerinin değişik alanlardaki sanayi kuruluşlarına satılması gibi atkenler artırmıştır [19]. Toprak kirliliğine sebep olan faktörlerin %37'den fazlası ağır metaller kaynaklıdır [20].

1.1. Ağır Metaller

Bitki büyüme ve gelişimi için gerekli olan mikro elementlere demir, çinko, nikel, bakır, mangan gibi ağır metaller örnek olarak verilebilir. Ancak civa, arsenik, kurşun, kadmiyum gibi bazı ağır metaller ise bitki gelişiminde zaruri olmayan hatta gelişimini inhibe eden elementlerdir [21]. Her ne kadar bazı ağır metaller bitkiler için mikro miktarlarda besin elementi olsalar da hava, su ve toprakta bulunan miktarları belirli bir seviyeyi geçtiğinde tam tersi bir şekilde etki ederek bitki büyümesinde ciddi sorunlara yol açmaktadır [22].

Toprağı kirleten etmenler arasında ağır metaller en ciddi kirleticiler arasında bulunmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA)'nın yayınladığı 129 adet öncelikli kirleticiler içinde ağır metaller en ciddi kirleticilerden biri olarak yer almıştır. Toprağa karıştığında birikerek mikroorganizmaların etkinliğine, toprağın verimine ve kalitesine, üretimdeki kayıplara, biyolojik çeşitliliğe, besin zinciri ile zehirlenme gibi canlı sağlığını tehdit etmeye sebebiyet verebilmektedir. Biyotada güçlü seviyede dirençli olması ve toksik etkileri yüzünden ağır metaller en ciddi çevre kirleticilerinden biri seçilmektedirler [23].

1.2. Kadmiyum

Endüstrinin gelişimi ve endüstriyel faaliyetlerin artmasıyla toprakta bulunan ağır metal kirliliği dünyanın en ciddi problemlerinden biri haline gelmiştir. Ağır metaller yalnızca bitkilerin gelişimini ve verimini değil ayrıca mikroorganizmaların etkinliğini, niteliğini ve içeriğini de etkiler. Bu da ağır metallerin toprak kirliliğinin en büyük nedenlerinden biri

olduğunu göstermektedir. Topraktaki ağır metal kirliliğine sebep olan ağır metallerin içinde Cu, Ni, Cd, Zn, Cr ve Pb en ön sıralarda yer almaktadır [24].

Kadmiyum, Pb, Zn elementlerinin sanayide kullanım alanları oldukça yaygın olup genellikle Cd, stabilizer olarak plastik ve sentetik elyaf sanayisinde, nükleer reaktör kontrol sistemlerinde ve alaşımlarda kullanılmaktadır. Kurşun oksitini çelik konstrüksiyonlarda kullanılması korozyonun önüne geçmektedir. Çinko metali olarak çoğunlukla galvanizlemede, çinko oksitler ise yağlı boya ve lastik üretiminde kullanılmaktadır. Metallerin bu kullanım alanlarına sahip olması metal geri kazanımında elektrokimyasal yöntemin kullanılmasına öncü olmaktadır [24].

Kadmiyum toprakta çözünürlüğü az olan bir ağır metaldir [25]. Kadmiyumun kullanım alanları içerisinde metal polimerlerin sabitleştirilmesi, nikel ve kadmiyum pili üretiminde, korozyonu engellediği için bilhassa gemi endüstrisinde çelik kaplamada, alaşımlarda ve elektronik sanayisinde kullanımı bulunmaktadır [26].

Bitkilerde bulunan kadmiyum miktarının %90'ını bitki topraktan alırken, kalan %10'luk kısım havadan alınmaktadır. Sanayi bölgelerine yakın yerlerde yaşayan ve trafik yoğunluğu fazla olan bölgelerde yetişen bitkilerin sahip olduğu Cd'un %40'dan çoğu atmosferden alınmaktadır. Bitkilerde bulunan Cd miktarı birçok enzimlerin aktivitesini etkilemesi sonucunda stomalar kapanır böylece terleme ile su kaybedilmesi azalarak klorofil biyosentezinin bozulmasına sebebiyet vermektedir [27]. Cd ağır metali bitkilerin kök büyümesi ve gelişimini önlediğinde topraktan alınan su ve iyonların alımını engellemektedir. Değişik dozajlardaki Cd metalinin bezelye bitkisinin Mn ve Fe metalleri alınımındaki etkilerinin incelendiği bir araştırmada kadmiyum dozajının artmasıyla bitkinin kök ve sürgünlerinde tutulan Mn ve Fe miktarlarının düştüğü tespit edilmiştir [28].

Kadmiyum ağır metalinin biyolojik yarılanma ömrünün toprakta ortalama olarak 18 sene, insan vücudunda ise Cd'un biyolojik yarılanma ömrünün 10 sene olduğu söylenmektedir [29]. Toksik ağır metaller insanlara ve hayvanlara beslenme yoluyla alınarak birikirler ve mutajen özellikleri sebebiyle DNA yıkımına ve karsinogenik etkilere yol açabilmektedir [30]. Topraktaki Cd'un kilogram başına 3 mg, bitki kuru maddesindeyse kilogram başına 1 mg'den çok olması toksik etkiye neden olmaktadır [31]. Toprakta devinimli bir element olan kadmiyumu bitkiler kolayca bünyelerine katabilmektedirler. Bu da besin olarak

canlılar tarafından alınımına ya da topraktan suya karışmasına neden olmaktadır [32]. Bunlara ilaveten kadmiyumun yarılanma ömrünün 15-1100 sene gibi uzun bir süre olması Cd kirliliğinin ne kadar ciddi bir sorun olduğunu ve önlemlerin alınmasının elzem olduğunu göstermektedir [33]. Topraktaki insanlardan kaynaklı oluşan Cd kirliliğinin %50'den fazlası fosfor içeren gübrelere, yaklaşık %40 kadarı atmosferde birikmesinden, %5 kadarı ise atık çamur ve çiftlik gübrelere dolaylı olarak oluşmaktadır [34]. Kadmiyum kanserojendir ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Cd alınımının geçici olarak haftalık tolere olabilen miktarının 50 µg olarak sınırlandırmış ve 0.007 mg/kg vücut ağırlığı şeklinde önermiştir [35].

Toprağa ve buradan da bitkilere geçen Cd'un çoğu, kadmiyum ağır metali içeren toz partiküllerinin havadan çökmesiyle oluşmaktadır. Otoban gibi yoğun trafiği olan yerlerdeki yol kenarlarında bulunan topraklara toz çökmesiyle bir yılda 0,2-1,0 mg/ m² Cd miktarının eklendiği saptanmıştır [36]. Kadmiyumun toprakta birikimin en önemli sebeplerinden biri de arıtım çamurlarıdır. Bu çamurların toprağa karışabilmesi için kadmiyum sınır değerinin kilogram başına 10 mg' den az olmalıdır. Ayrıca fosfor içeren gübreler ve arıtım çamurlarının dışında motorlu taşıtlardan atmosfere salınan gazlar, 20-90 mg Cd/kg içeren araç lastiklerinin aşınımı, dizel yakıtların kadmiyum içeren atıklarının karayollarına yakın mesafelerdeki (yaklaşık 10 metre) toprakların Cd ile kirlenmesine sebep olmaktadır [31]. Dünyada bulunan toprakların jeolojik olarak konumu, organik yapısı ve farklı etmenlere bağlı olarak Cd derişimi değişmektedir. Ancak dünyadaki yüzeydeki toprakların kadmiyum derişimi 0.06-1.1 mg kg⁻¹ aralığında bulunmaktadır [37].

Ağır metallerin temizlenmesi için çeşitli, etkili ve az masraf gerektiren yöntemler kullanılmış ve bunların dışında başka teknikler de geliştirilmiştir [38]. Çok fazla kirlenmiş suların bulunduğu yerde ya da farklı bir ortamda yapılan arıtmalarda fizikokimyasal arıtım metotları kullanılan ana yöntemlerin başında gelmektedir. Ancak bu yöntemler az miktarlardaki kirlenmeye sahip olan ve kirliliğe sebep olan etmenlerin yapay ya da dağınık bir şekilde bulunduğu geniş kirlenmiş alanlar için çok fazla etkili olmamaktadır [39]. Dünyanın çeşitli yerlerinde insan kaynaklı tahribatların yanı sıra farklı metalleri barındıran tabii maden kaynakları bulunmaktadır. Büyük ve zengin maden yataklarının bulunduğu alanlarda varlığını sürdürebilen özel bitki türleri yaşamamaktadır [40]. Bu bitkilerin çoğunluğu metalce zengin topraklardaki ağır metalleri bünyelerine almaktan kaçınırken

bazıları ise herhangi bir zarar görmeden ağır metalleri yüksek konsantrasyonda akümülederler. Ağır metalleri bünyelerine herhangi bir hasara uğramadan toprak üstü organlarında biriktirebilen bu karakteristik bitkilere hiperakümülatör bitkiler denir. Ağır metallerce kirlenmiş su ve topraklardaki metallerin giderimi çalışmalarında hiperakümülatör bitkilerin kullanımı ehemmiyet arz etmektedir. Ağır metallere tahrip olmuş alanların temizlenmesinde bitki kullanarak doğal bir şekilde iyileştirmesi işlemine de fitoremediasyon denir. Doğayı doğal yollarla eski haline getiren bu yöntem diğer ıslah yöntemlerine göre doğal olması, ekonomik olması, görüntü kirliliğine neden olmadan geniş alanlara kolaylıkla uygulanabilmesinden dolayı üstünlük sağlamaktadır [39].

Bitkiler sahip oldukları geniş kök sistemleri sayesinde toprakta en derin bölgelere ilerleyerek, geniş alanlara yayılabildikleri için toprakta ve suda bulunan elementleri alarak ve biriktirebilmektedirler. Metalleri bünyelerinde depo edebilme özelliğine sahip olan bitkiler hasat edilerek zehirli atıklar için ayrılmış yerlere gömülmekte ya da biriken metallerin geri kazanımı yapılmaktadır [42]. Bitkilerin klasik yöntemler veya transgenik (gen aktarımlı) teknolojiler ile geliştirilerek fitoremediasyon çalışmaları için kullanımı pek çok kuruluşun fitoremediasyon teknolojisine ilgisini arttıracaktır. Fakat bu çalışmalar bitkilerdeki metal toleransı, akümülyasyonu ve translokasyon mekanizmalarının daha iyi bir şekilde aydınlatılmasıyla tümüyle kullanılabilir olacaktır. Bu sebeplerden dolayı bitkilerdeki ağır metal akümülyasyonu ve tolerans mekanizmalarının nasıl çalıştığı ile ilgili bilgilerin artmasıyla var olan remediasyon teknolojilerinin geliştirilmesi açısından oldukça önemlidir [43].

Bu tez çalışmasında, *Brassicaceae* familyasına ait metale karşı toleranslı ve metal akümülatör bitkiler olan *Brassica rapa*, *Brassica campestris var toria* ve *Brassica juncea* olmak üzere 3 tür ve *Brassica juncea* 'ya ait *Brassica juncea var JS-13*, *Brassica juncea var early raya*, *Brassica juncea var S-9*, *Brassica juncea var sind raya* olmak üzere 4 genotip çalışılmıştır. Ancak bu türlerin sadece *Brassica rapa*, ve *Brassica juncea* (kahverengi hardal) ve *Brassica juncea* 'ya ait *Brassica juncea var early raya* ve *Brassica juncea var sind raya* bitkilerinin yapraklarından metal tayini analizi ve moleküler analizler yapılabilmektedir. Anatomik analizler tüm tür ve genotipler için çalışılabilir. Bu tez çalışmasında birden fazla amaç hedeflenmiştir. Bu amaçların başında doğal yollarla ya da antropojenik etkilerle kadmiyumla kirlenmiş alanların fitoremediasyon

çalışmalarıyla temizlemesi ve geri kazanımı gelmektedir. Doğada ve birçok sanayi ürününde bulunan kadmiyumun zamanla kirliliğinin artması ile insan ve hayvan sağlığı açısından büyük risk oluşturmasından dolayı Cd 'u yüksek miktarlarda akümüle edebilen bitkilerin geliştirilmesiyle fitoremediasyon çalışmalarına katkı sağlamak amaçlanmıştır.

Bu çalışmada *B. rapa*, *B. juncea var sind raya* ve *B. juncea var early raya* bitkilerinde ağır metal ATPaz olan HMA4 geninin ekspresyonu yanı sıra daha çalışmayı desteklemek ve karşılaştırma yapabilmek amacıyla daha sonradan eklenerek HMA2 genin de ekspresyonuna bakılmıştır.

Bu tez çalışmasının amaçları; *B. rapa*, *B. juncea var early raya* ve *B. juncea var sind raya* 'nın yapraklarında Cd birikimini tespit ederek ve bu bitkilerin fitoremediasyon için uygunluğunu araştırmak,

HMA2 ve HMA4 genlerinin bu bitkilerde metal akümüasyonu ile alakalı olup olmadığının tespit ederek; HMA2 ve HMA4 genlerinin bu bitkilerin yapraklarındaki metal akümüasyonunda ne kadar alakalı olduğunu tespit etmek,

Farklı Cd konsantrasyonlarında yetiştirilerek bu bitkilerin çimlenme, büyüme ve gelişimine zarar vermeyen en yüksek ve en uygun konsantrasyonu bulmak şeklinde özetlenebilir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. Bitkiler ve Ağır Metaller

Metaller elektrik iletkenliğine sahip, parlak olanlar, pozitif yükle yüklü olanlar, şekil verilebilen ve işlenebilen, herhangi bir asit ile reaksiyona girmesi sonucu tuz ve su oluşturabilen elementler olarak kimyasal olarak tarif edilmektedirler. Buna tanımlamaya göre periyodik tablodaki çoğu element metal olarak adlandırılabilir. Bundan dolayı her bir metali tek tek inceleyerek emniyetle kullanılmaları için her birinin kendine ait özelliklerini bilmek gerekmektedir [1]. Ağır metaller periyodik tabloda üçüncü ya da daha yukarı periyotlarında yer alan metaller için kullanılan bir tanımdır. Yüksek yoğunluktaki metallerin düşük derişimleri dahi çevre problemlerine yol açmaktadır ve canlılar üzerinde birikerek toksik etkilere sebep olmaktadır. Ağır metal grubunda kurşun, kadmiyum, demir, bakır, çinko, kobalt, civa, krom ve nikel gibi elementlerinde içinde bulunduğu 60'dan çok metal bulunmaktadır. Bu elementler silikat mineral grubu içerisinde ya da toprakta genellikle karbonat, oksit, silikat ve sülfür halinde kararlı bileşikler halinde bulunabilmektedirler. Metallerin özgül ağırlık değerinden yola çıkarak ekolojik sistem üzerinde bıraktıkları etkileri ifade edilip sınıflandırılmaya çalışılsa da esasında metallerin özgül ağırlıkları ekolojik sistem üzerinde bıraktıkları biyolojik etkilerini ifade etmek için yeterli değildir. Örnek olarak özgül ağırlığı sırasıyla 3,65 g/cm³ ve 4,51 g/cm³ olan baryum (Ba) ve titanyum (Ti) elementlerinin biyolojik sistem içerisinde kadmiyum (8,65 g/cm³), kurşun (11,34 g/cm³) veya lantanit grubu metallerinden (5,25 - 9,84 g/cm³) daha farklı etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Esasında bir elementin özgül ağırlığını periyodik tablodaki grup ve bulunduğu gruptaki sıra yeri ifade ederken kimyasal özellikleri, elementin ait olduğu grubun fonksiyonudur [12].

Ağır metal canlılar için toksik etkili olduklarından oldukça tehlikeli maddelerdir. Sanayi atıkları, fitre kullanılmadan yakımı yapılan fosil yakıtlar, atık yakımı gibi yetersiz ve bilinçsiz uygulamalardan dolayı canlılar yüksek oranlarda ağır metal etkisiyle karşı karşıya kalmıştır. Bu etkiler sonucunda canlılarda çeşitli genetik hastalıklar, büyüme ve gelişim bozuklukları, erken yaşlılık gibi olumsuz etkiler oluşmuştur [44]. Ağır metaller hava, su ve toprakta farklı oranlarda bulunurlar. Belirli bir seviyenin üzerine çıkan ağır metal oranları çevre kirliliğine yol açar. Ağır metal kaynaklı çevre kirliliğinin doğal ve insan kaynaklı

birçok etkeni bulunmaktadır. Endüstriyel faaliyetler, fosil yakıt tüketimi, maden yatakları ve işletmeleri, volkanik hareketler, pil üretimi ve kullanımı, demir çelik sanayi ve atıkları, petrol rafinerisi, boyalar, elektronik sanayi ve ölçü aletleri, tarımda gübreleme ve ilaçlama gibi pek çok etken, ağır metal kirliliğinin nedenleri arasında yer almaktadır. Ağır metallerin toprağa karışmasında hava yolu, arıtım çamurlarının boşatımı, hayvan dışkıları, evsel atıkların yok edilmesi gibi sebepler de etkili olmaktadır [45].

Ağır metal konsantrasyonlarının belirli seviyedeki değerleri aşmasından sonra bitkilerin fizyolojik ve biyokimyasal sistemlerini bozduğunu ve bu bozulmalardan bitkilerin doğrudan yada dolaylı bir şekilde etkilediği bilinmektedir. Eğer bitki dokularında ağır metallerin birikimi kritik seviyeyi aşarsa, minerallerin ve bitki için gerekli besinlerin alınımının, bitkilerin terleme mekanizmasının ve buna bağlı olarak topraktan su emiliminin engellenmesine, fotosentez reaksiyonundaki sorunlara, enzim aktivitesinin bozulmasına, klorofil sentezinin inaktivasyonu ve kök yapılarının bozunumu ile çimlenme kapasitesinin azalması hatta inhibe olmasına bunlara ek olarak da zar yapısında hasar ve hormonal dengenin bozulmasına neden olabilmektedir [46-52].

Ağır metallere karşı verdikleri cevaba göre bitkiler 3 ana başlıkta toplanabilir. Bunlardan ilk grup ağır metalleri hiçbir şekilde bünyelerine alamayan bitkiler, ikinci olarak toprakta bulunduğu konsantrasyon kadarını bünyelerine alabilen indikatör ya da belirteç bitkiler ve son olarak da toprakta bulunan ağır metal konsantrasyonundan daha fazlasını bünyelerinde alabilen ve biriktirebilen bitkiler şeklindedir. Üçüncü grupta bulunan bitkiler fitoremediasyon ile ağır metal kirliliğinin temizlenmesinde rol oynayan hiperakümülatör denen bitki grubudur [53]. Ağır metalleri hiçbir toksik etki göstermeden yaprak gibi toprak üstü organlarında başka bitkilere nazaran 100-1000 kat daha çok biriktirebilme kapasitelerine sahiptirler [54]. Ortalama olarak 450'den fazla bitki türü hiperakümülatör bitki olarak tarif edilmiştir. Bunlara *Brassicaceae* familyası, *Asteraceae* familyası, *Fabaceae* familyası, *Scrophulariaceae* familyası, *Lamiaceae* familyası ve *Euphorbiaceae* familyaları örnek verilebilir [55].

2.1.1. Metale Karşı Tolerans Gösteren Bitki Grupları

Bu tür bitkilerde köklerden metal alımı ve/veya köklerden toprak üstü organlara metal taşınması sınırlanmaktadır. Bu nedenle, topraktaki metal konsantrasyonu yüksek olsa bile bitkinin toprak üstü organlarındaki metal konsantrasyonu düşüktür. Bu bitkiler membran

permeabilitesini ya da hücre duvarına metal bağlama kapasitesini değiştirebilmekte ya da daha fazla şelatlayıcı madde (hücre içi metal bağlayıcı bileşikler) yaymaktadır [56, 57]. *Silene vulgaris* bu stratejiyi izleyen bitki türlerinden biridir [58, 59].

2.1.2. Metal İndikatör Bitkiler

İndikatör bitkilerin toprak üstü organlarında bulunan metal miktarı, topraktaki metal miktarını yansıtmaktadır. Bu türler, toprakta var olan metal konsantrasyonlarını şelatlar üreterek tolere etmekte ya da vakuol gibi duyarlı olmayan kısımlarında depo ederek metallerin hücre içi bölümlendirilmesini değiştirmektedir [57]. *Populus alba* toprakta metal kirliliğini takip etmek için kullanılan Cd/Zn indikatör bitkisidir [60, 61].

2.1.3. Metal Akümülatör Bitkiler

Akümlatör bitki türleri toprak üstü organlarında, toprakta bulunan metal miktarından daha fazlasını konsantre edebilmektedir. Hiperakümülatörler olarak adlandırılan bu bitkiler, kirleticilerin çok yüksek seviyelerdeki konsantrasyonlarını kök, gövde ve/veya yapraklarında absorbe edebilmektedir [57, 64].

Baker ve Brooks (1989) [40] Cd için 100 µg/g K_a (iyonlaşma sabiti); Ni, Cu, Co, Pb için 1,000 µg/g K_a ; Zn ve Mn için 10,000 µg/g K_a olacak şekilde bitkilerde hiperakümüle edilen metal konsantrasyonlarını sınırlandırmıştır. Bu elementler için tanımlanan seviyeler, akümülatör olmayan türlerde bulunan miktarlardan daha fazladır [65, 66]. Dünya çapında 22 familyadan yaklaşık 400 tane hiperakümülatör bitki türü tanımlanmıştır. Tanımlanan hiperakümülatör bitkilerden 87 tanesi *Brassicaceae* familyasına üye 11 cinse aittir [40, 57].

Buğday üzerine yapılan bir çalışmada buğday fideleri yetiştirilirken kadmiyum eklenmesi sonucunda bitkide potasyum ve nitrat alımının düştüğü ve büyümenin durduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bitkilerdeki kadmiyum stresinde su ve iyon alımının azalmasındaki en büyük faktör kök büyümesi ve gelişiminin inhibe edilmesidir. Kadmiyum stresinden kaynaklı olarak bitkiler stomalarını kapatır bu sebepten dolayı da transpirasyonla su kaybı azaltılarak Cd taşınımı durdurulmaktadır [67].

Elementler bitki köklerindeki hücreler tarafından tutulurarak hücre duvarına bağlanır ardından taşıyıcı sistemler ve intersellüler bağlanma bölgeleriyle düzenlenerek plazma zarından geçerler. Element iyonlarının hücre içine girişinin kanal proteinleri ve/veya

taşıyıcı proteinler aracılığıyla yapıldığı varsayılmaktadır. Plazma zarı negatif yüke sahip olduğundan pozitif yüklü iyonların alımında öncelik tanımaktadır [68].

2.2. Fitoremediasyon

Fitoremediasyon tanımı ilk defa 1991 yılında bitki anlamındaki “phyto” ile ıslah-iyileştirme anlamındaki “remediation” kelimelerinden oluşturulmuştur. Doğayı doğa ile iyileştirme yöntemi olmasından dolayı fitoremediasyon, botonik ıslah, bitkisel arıtım ve yeşil ıslah gibi farklı isimlerle adlandırılmaktadır [104].

Fitoremediasyon toprakta, tortularda (sediment) ya da suda mevcut olan ağır metal, yağ atıkları, çözücüler, canlının normal metabolizmasında ihtiyacı olmayan yabancı kimyasallar (ksenobiyotikler), pestisitler gibi birçok kirletici ajanların akümülatör bitkiler-algler kullanımıyla kirliliğin önlenmesi ve temizlenmesi olayıdır [105]. Biyoremediasyon mikroorganizmalar, algler ve makrofitler gibi biyolojik yöntemlerin kullanılarak ağır metal gibi birçok diğer kirleticilerin yok edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Fitoremediasyon çalışmalarında yararlanılan bitkiler fitoekstraksiyon, fitotransformasyon, rizofiltrasyon, fitovolatizasyon, fitodegradasyon ve fitostimülasyon gibi çeşitli mekanizmalar kullanılmaktadır [106, 107].

2.2.1. Fitoremediasyon Teknikleri

2.2.1.1. Fitoekstraksiyon

Fitoakümülyasyon olarak da adlandırılan fitoekstraksiyon yöntemi bitkinin topraktaki kirletici maddeleri kökleri ile alıp hasat edilebilir kök dokusunda, yaprak ve gövdesinde depolayarak uzaklaştırılmasında kullanılan bir yöntemdir. Bitki hasat zamanına kadar depolama yapabilmektedir. Toprakta hasattan sonra da kirleticiler kalabileceğinden dolayı toprağa gelişim ve hasat zamanları farklı bitkilerin birbirinin ardı sıra getirilmesi önerilmektedir [108].

Fitoekstraksiyon yoluyla bakır ve çinko gibi etkin bir şekilde alınan mikro besinler ve kadmiyum, nikel ve kurşun gibi besin olarak kullanılmayan ağır metaller uzaklaştırılabilmektedir. Ancak bu yöntem ile sadece kirliliğinin az ya da orta düzeyde olan yerlerde kullanılabilir. Çünkü haddinden fazla ağır metal kirlenmesine uğramış alanlarda bitki büyüme ve gelişimi inhibe olmaktadır [109].

Fitoelekstraksiyon yönteminin başarılı olması bitkilerin hızlıca büyümesi ve kirleticileri dokularında yüksek oranlarda biriktirebilme kapasitelerine bağlı olarak değişmektedir [110].

2.2.1.2. Fitotransformasyon

Fitotransformasyon yönteminde hiperakümülatör bitkilerdeki metabolik fonksiyonlar ve toprakta bulunan mikroorganizmalar arasındaki rizosferik birliktelikle organik kirleticiler parçalanırlar. Kirleticilerin fitotransformasyonu bitki bünyesinde ya da rizosferde olabilmektedir [111]. Kenevir bitkisi (*Cannabis sativa* L.) gibi bazı bitkiler kirliliğe sebep olan değişik faktörleri metabolizmalarına alarak onları toksik olmayan şekillere dönüştürebilmektedirler. Bazen de bitkilerin köklerinde bulunan mikroorganizmalarla kirliliğe sebep olan etmenleri topraktan ya da sudan metabolize ederler [110].

2.2.1.3. Fitodegradasyon

Rizodegradasyon olarak da adlandırılan fitodegradasyon yöntemi kirletici etmenleri bitkilerde bulunan enzimlerle ya da enzimlerin kofaktörleriyle ıslah etme işlemidir [112].

Fitodegradasyon yöntemi bitki organlarında ya da toprakta bulunan bakteri, mantar gibi mikroorganizmalar tarafından üretilen protein ve enzimlerle yapılmaktadır. Bu yöntemle simbiyotik bir ilişki oluşur: bitkiler mikroorganizmaların büyümesi ve gelişimi için gerekli olan besinleri sağlarken, mikroorganizmalar da bitkilere sağlıklı ve temiz bir toprak alanı sunarlar [112].

2.2.1.4. Fitostimülasyon

Fitostimülasyon yöntemi yalnızca bakterilerin aktivitesiyle enzimatik parçalanma reaksiyonunu içermektedir [114].

2.2.1.5. Fitovolatilizasyon

Fitovolatilizasyon yöntemiyle remidasyon işleminde ortamdaki kirliliğe sebep olan etmenlerin alınımının önce bitki kökleriyle alınarak daha sonra kök ve gövde ile kirletici ajanların uçucu maddeler şeklinde ortama verilmesi şeklinde oluşmaktadır. Organik kirleticiler ve selenyum, civa ve arsenik gibi ağır metallerin ıslahında kullanılmaktadır

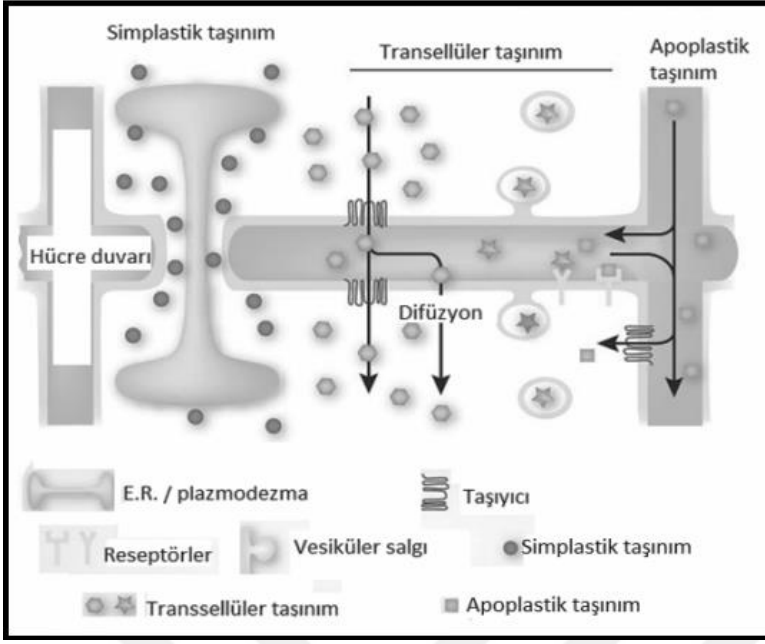
[115]. Bitkileri kullanarak zehirli kirleticileri alarak daha az zehirli bir hale getirerek havaya serbest bırakma işlemidir [116].

2.2.1.6. Rizofiltrasyon

Çevre kirliliğine sebep olan derişik haldeki ağır metallerin bitkinin kökleri kullanılarak emilmesi yöntemidir [112]. Coğunlukla *Azolla spp.*, *Elodea spp.*, *Lemna spp.*, *Eichhornia crassipes*, *Myriophyllum spp.*, *Typha spp.* ve *Vallisneria spp* gibi su bitkileri ile sucul alanlardaki metaller ve diğer kirleticilerin absorpsiyonu rizofiltrasyon yöntemiyle sağlanmaktadır [115]. Rizofiltrasyon yönteminde bitkiler biyokimyasal fitre görevi görek ekosistemi temizlemektedir [116].

2.3. Bitkilerde Ağır Metal Alınımı ve Moleküler Mekanizması

Topraktan bitki köklerine metal taşınımı difüzyon ve konveksiyon yollarıyla olmaktadır. Toprak içerisinde metallerin çözünmesiyle birlikte metal derişimi artmakta ve bunun sonucu olarak da kompleks yapılar oluşmaktadır. Oluşan bu kompleks yapıların bitkinin kökleri tarafından hücre içerisine alınmaması durumunda bile bitkinin köküne doğru difüzyon aracılığı ile gerçekleştirilen taşınımları etken bir miktarda artırdığı tespit edilmiştir. Bitkilerde metal birikimini etkileyen birçok faktörler göze çarpmaktadır. Bu faktörler içerisinde elementlerin toprak içerisindeki hareketlikleri, kökler tarafından emilimi, kök hücrelerinde depolanması ve kök içerisinde bulunan boşluklara taşınımı ve ksilem borusu ile toprak üstü yapılara taşınımı ve bu kısımlarda metallerin dağılımı en belirgin faktörler olarak ortaya çıkmaktadır [68]. Topraktan alınan metaller ilk olarak bitkinin köklerinde depolanmaktadır. Daha sonra bu metaller köklerden ksilem öz suyuna geçerek ve terleme gücünün de etkisiyle bitkinin toprak üstü kısımlarına taşınmaktadır. Yaprağa kadar ulaşan metaller burada apoplast ve simplast yoluyla yaprak hücrelerine dağılım yapmaktadır.

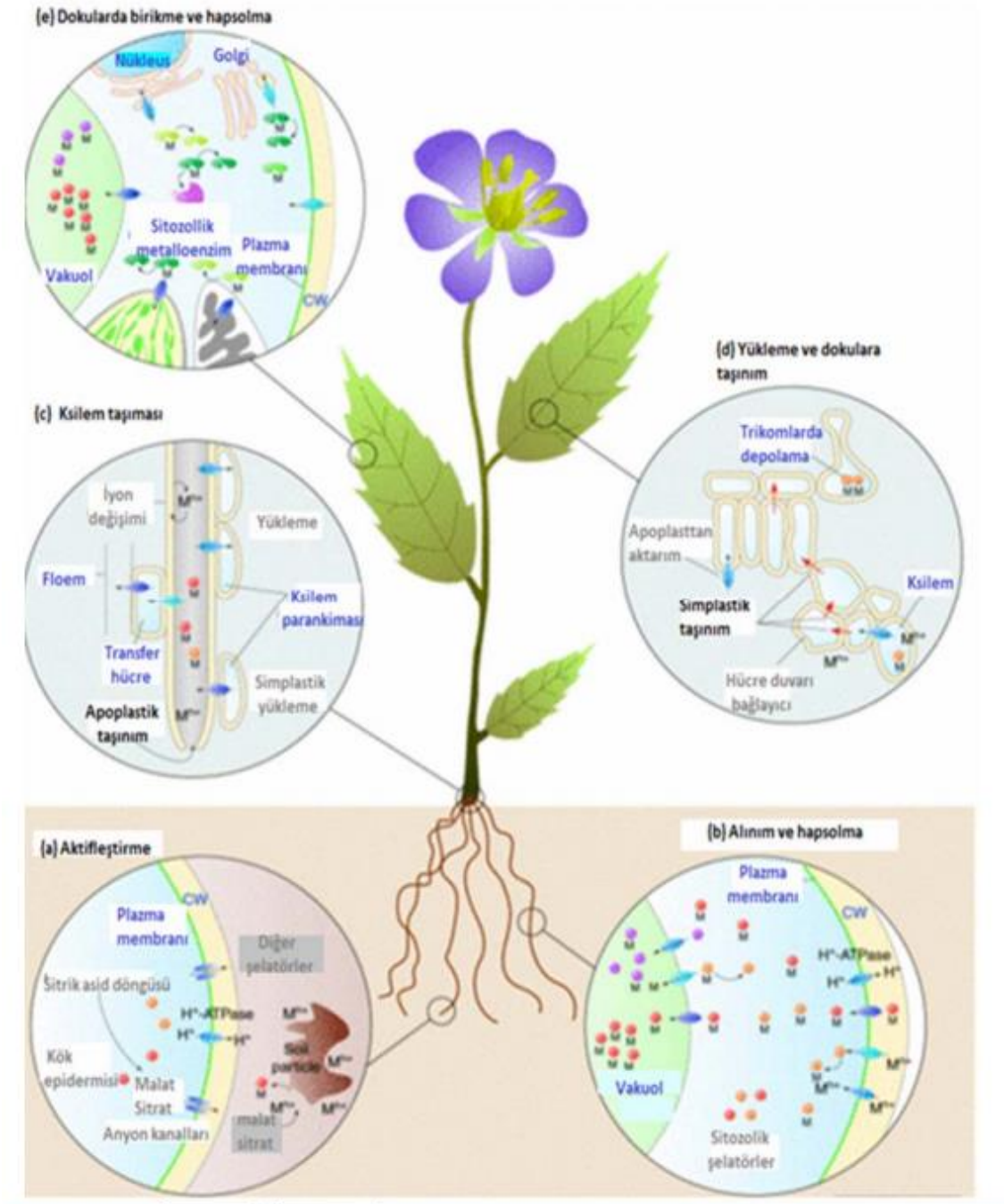


Şekil 2.1. Apoplast ve simplast yollarla elementlerin yaprak üzerinde dağılımı [69]

Elementlerin apoplast ve simplast yoluyla yaprakta dağılımı dokularda hapsedilen kirletici metaller şelatörler tarafından bağlanırlar. Fitoşelatinler (PC) ve metalotioneinler (MT) metallerin tutulmasında rol oynayan temel şelatörlerdir. Bu şelatörler ağır metal iyonlarına bağlanıp onları hapsederek kararlı kompleksler oluşturacak olan fazla miktarda sistein sülfhidril grubu içerirler [70]. Bitkiler tarafından ağır metal alımı ve taşınımı süreci, metal iyonlarının kökler tarafından tutulmasını, köklere girişini ve sonrasında kütle akışı ve difüzyon yoluyla toprak üstü organlara translokasyonunu kapsamaktadır [71]. Bitkiler de metallerin olumsuz etkilerini ortadan yok eden veya tolere edebilen moleküller bulunmaktadır. Bu moleküllerden bilinenleri fitoşelatinler, metalothioneinler, organik asitler, aminoasitler ve metal şelatörlerdir [72]. Bitkiler de en güçlü metal bağlayıcı ve ağır metallerin olumsuz etkilerini ortadan kaldıran fitoşelatinlerdir. Fitoşelatinlerin peptid yapısında olduğu ve Cd^{+2} , fitoşelatin sentazın en kuvvetli metal aktivatörü olduğu birçok çalışmada kanıtlanmıştır [73].

Metalothioneinler (MT) düşük moleküler ağırlığa sahip, yapısında yüksek miktarda sistein grupları barındıran aromatik aminoasit bulundurmeyen ve ağır metal bağlama kapasitesi olan bileşiklerdir [74]. Ayrıca aminoasitlerin yapısında bulunan amino ve karboksil yapıları da metal iyonlarını bağlama özelliği taşımaktadır. Metallerin olumsuz etkilerine karşı koyma tepkimelerine ise malat, oksalat ve sitrat gibi organik asitler katılmaktadır

[75]. Bitkiler toprakta bulunan metali hücre içerisine alabilmesi için ilk olarak metalleri hareketli bir forma dönüştürmeleri gerekmektedir. Bitkiler bu hareketli forma ise birçok yöntem kullanarak ulaşmaktadır. Bir örnek vererek açıklamak gerekirse bitkiler metal şelatlayıcı moleküller aracılığıyla toprakta bulunan metali çözmek ve şelat yapmak için rizosfere salgılayabilmektedir (Bknz. Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Elementlerin bitkiler üzerindeki taşınım mekanizmaları [68]

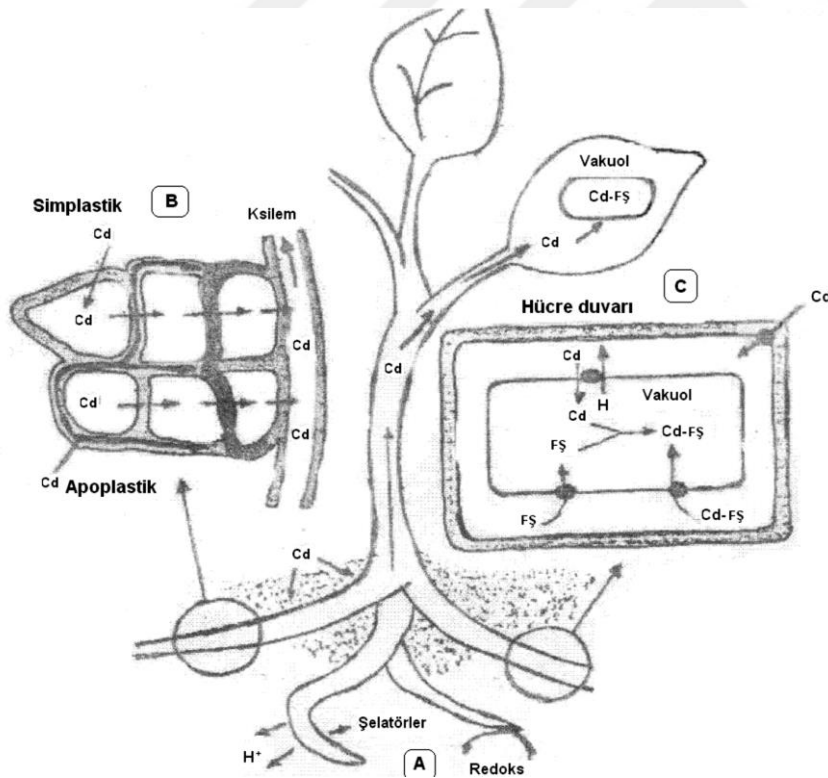
Bitkilerin ağır metal alınımı üç bölüme ayrılabilir [76].

1.Bitkilerde sideroforez görevini metal şelatlayıcı moleküller fitoşelatinler ve metalothioneinler aracılığı ile yapabilmektedirler [77].

2.Plazma zarının yapısın da bulunan metal redüktazları kullanarak iyon yapıdaki metalleri indirgeyebilmektedirler.

3. Bitki köklerden toprağa proton atarak asitleştirip ağır metalleri çözebilmektedirler.

Bu üç mekanizma kök mantarları veya kökte kolonileşmiş bakteriler tarafından da uygulanabilmektedir. Bir bitki ağır metallerin olumsuz etkilerini hücrenin içerisine girişini engelleyerek ve engelleyemediği durumda ise hücreden detoksifiye ederek ya da ağır metal metabolizmasını geliştirerek yapabilmektedir [78]. Kadmiyumun içerisinde fitoşelatinlerinde yer aldığı vakuollerde depolandığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur [79].



Şekil 2.3. Cd ağır metalinin bitki içindeki muhtemel taşınımı ve lokalizasyonu [67]

Cd gibi toksik ağır metaller, mikro elementler tarafından kullanılan transmembran taşıyıcılar için etkin bir şekilde rekabet etmektedir. Yapılan çalışmalar neticesinde Cu^{+2} ve Zn^{+2} 'nin, Ni^{+2} ve Cd^{+2} ile aynı transmembran taşıyıcılar için rekabete girdiği tespit edilmiştir [80]. Yüksek yapılı bitkiler Cd'yi toprakta bulunan diğer metallerin yoğunluğuna göre hücre içerisine alabilmektedirler. Metallerin bitkiler tarafından alınabilmesi için birtakım etmenler gerekmektedir. Bunlardan bazıları ise; ortamda bulunan element yoğunluğu, ortam pH, metalin redoks potansiyeli, sıcaklığı ve ortamda bulunan organik madde derişimi olarak sayılabilmektedir [81, 82]. Bir bitkinin ağır metallere karşı oluşturduğu tolerans mekanizması kirlenmiş olan alanların fitoremediasyonu ve bu ortam şartlarına uygun bitkilerin geliştirilebilmesi açısından önem teşkil etmektedir. Bu tolerans ise bitkilerde birbiriyle bağlantısı olan fizyolojik ve moleküler mekanizmalar aracılığıyla sağlanabilmektedir [83]. Bitkilerin yapısında bulunan ve birbiriyle ilişkisi bulunan moleküler mekanizmalar ile bitkiler ağır metallere karşı tolerans gösterebilmektedir. Bitkilerde artan toksik metal seviyelerine karşı tolerans, toksik yapıdaki elementlerin bitki hücre içerisine alınmamasından ya da metabolik dirençten kaynaklanmaktadır. Hiperakümülatör bitkiler için detoksifikasyon ve içsel alıkoyma ile toprak üstü yapılarında fitotoksik etki göstermeden ağır metalleri depolayabilmesi önemli bir özellik olarak gösterilebilmektedir. Bu bitkilerde alıkoyma ve detoksifikasyon mekanizmaları genellikle aktif yapıdaki sitoplazmadan hücre duvarı ve vakuol inaktif yapıdaki alanlara taşınımını kapsamaktadır [84].

Hiperakümülatör ve hiperakümülatör olmayan bitkilerin içsel alıkoyma mekanizmasının transkriptom analizleri kullanılarak karşılaştırıldığında, tonoplast veya plazma membranında bulunan ve ağır metallerin transportunda görev alan proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonunda farklılık olduğu gösterilmiştir. Hiperakümülatör bitkiler de bu genlerin ekspresyonunda artış olduğu çalışmalarda ortaya konulmuştur [85]. Metal iyonlarının kök yüzeyine tutunmasıyla kök hücreleri tarafından hücre içerisine alınması kütle akışı ve difüzyon ile gövdeye olan transportu bitkilerde metal iyonlarının alınımının basamakları olarak sayılabilmektedir. Toprak içerisinde bulunan metallerin alınımı ise kök tarafından rizosfere salgılanan metal şelatlayıcı moleküller aracılığıyla, proton salınımı ve plazma membranında yer alan metal redüktaz enzimi vasıtasıyla gerçekleştirilebilmektedir [67].

Hiperakümülatörleri, hiperakümülatör olmayan taksonlardan ayıran üç temel özellik yüksek oranda artan bir ağır metal alımı, daha hızlı bir kök-gövde translokasyonu ve yapraklarda büyük oranda ağır metal biriktirme yeteneğidir. Hiperakümülatörler ve hiperakümülatör olmayan bitkilerin karşılaştırmalı fizyolojik ve moleküler analizlerinden ortaya çıkan ilginç sonuç, hiperakümülatörün en önemli basamaklarının her iki bitki çeşidinde de bulunan genlerin farklı düzenlenmesine ve ifadesine dayanmasıdır. Özellikle, ağır metallerin alınımının sürdürülmesinde, yapraklara translokasyonunda ve son olarak vakuollerde ve hücre duvarlarında büyük miktarlarda biriktirilmesinde ZIP, HMA, MATE, YSL ve MTP ailesinin üyesi olan transmembran taşıyıcı proteinleri kodlayan genlerin aşırı ifade edilmesi önemli rol oynar [84]. Bitkilerde bilinen birkaç protein ailesi ağır metal transportunda görev almaktadır. Ayrıca bitkilerin yapısında bulunan ağır metal ATPaz (CPx-tip), doğal dirençle ilişkili makrofaj protein (Nramp) ailesi, çinko-demir permeaz (ZIP) ailesi ve katyon-difüzyon hızlandırıcı (CDF) protein ailesi metal taşıyıcı sınıfları olarak deneylerde ortaya konulmuştur. Çevrede bol miktarda bulunan ve toksik etki gösteren Zn, Cu, Pb ve Cd metallerin hücre içerisine alınımında CPx-tip ağır metal ATPaz ailesinin görev aldığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir [86]. CPx-ATPaz ailesi ağır metal taşıyıcıları ismini yapısında bulunan membran içi sistein-prolin-sistein, sistein-prolin-serin veya serin-prolin-histidin yapısındaki korunmuş motiflerden almaktadır. Yüksek bitkilerde ortaya konulan ilk CPx-ATPaz *Arabidopsis* bitkisine ait P-tip ATPaz'dır (PAAI) [87].

Sistein, fitoşelatinler gibi proteinlerin ve GSH gibi protein olmayan peptitlerin yapısında yer alan bir aminoasittir. GSH (γ -Glu-Cys-Gly)'ın bitkilerde strese karşı koymada önemli rolleri vardır. Ayrıca Cd ve diğer ağır metal etkisindeki bitkilerde metal detoksifikasyonunda rol oynayan fitoşelatinlerin öncü molekülü de GSH'tır [88].

Fitoşelatinler in vitro ortamda çok sayıda ağır metal indükleyebilirler. GSH'dan sentezlenen γ -Glu-Cys dipeptididyl transpeptidase enzimi (EC 2.3.2.15), genel olarak PC sentaz olarak isimlendirilir. *Arabidopsis* mutantlarında meydana gelen fitoşelatin sentaz (PC-synthase) eksikliği, Cd/Hg'ye aşırı duyarlı hale gelir ve fitoşelatin sentaz enziminin sentezlenmesi gerçekleştirilemez. *Arabidopsis thaliana heynh*'deki Cd'a duyarlı olan cad1 mutantları ve bunların GSH seviyeleri yabani tip ile birbirine benzerlik göstermekle birlikte, in vitro ortamda PC ve PC sentaz aktiveleri her ikisinde de yine benzer şekilde eksiklik göstermektedir. Farklı bitkilerde de PC sentaz oluşumu tespit edilmiştir ve cad1'in PC sentaz için yapısal gen olduğu tahmin edilmektedir. Bitki hücresinin sitozol kısmına

giren bu ağır metal iyonlarının son depolama bölgesi vakuollerdir. PC moleküllerinin metal şelat zincir uzunluklarının değişime uğraması ve GSH'ın sentezlenmesi ile birlikte bu iyonlar PC sentazı aktive ederler. Metal-PC kompleksi daha sonra aktif olarak sitozolden vakuole taşınır. PC sentaz aktivitesi, farklı metal iyonlarının varlığı ile hemen aktifleşir ve bu aktif PC sentazlar fitoşelatin sentez oranının en önemli belirleyicisidir. Milimolar konsantrasyonunda sitozolde mevcut olan GSH substrat gibi kullanılır. Metal bağlayan peptidler sentezlendikten sonra kenetlenirler ve bütün metal iyonlarının sitozole girmesinden önce temel metabolik yollarının enzimleri ile etkileşim halinde bulunabilirler. Detoksifikasyon dışında, PC'ler bitkilerde ağır metallerin homeostazisinde önemli rol alırlar. Bu da bitki hücrelerinde metal iyonlarının durumunu düzenleyen bir mekanizmadır. P-tipi metal ATPazlar, hücre zarlarında katyon çeşitlerini taşımakla görevli enzimlerdir. Bu tip ATPazlar, hem DNA dizisi hem de fonksiyonel protein benzerliklerine göre birçok alt-familiyalar halinde sınıflandırılabilirler [89]. Bu proteinlerin plazma zarında bulunduğu ve sitoplazmadan toksik metallerin uzaklaştırılmasında rol aldığı veya çeşitli hücre içi membranlarda bulunabildiği ve ağır metallerin kompartımanlaşmasından sorumlu olabileceği öne sürülmüştür [30].

Ağır metal taşıyıcı olarak P-tipi metal ATPazları da kapsayan PIB alt familyası hem ökaryot hem de prokaryotlarda tespit edilmiştir. Bu enzimler genellikle plazma zarında bulunurlar ve fonksiyonlarını gerçekleştirmek için ATP'ye bağımlıdırlar [90]. Metal iyonlarının ATP hidrolizi sonucu elektrokimyasal gradiyente karşı transportu oldukça önem teşkil etmektedir. *Arabidopsis* ve *Oryza sativa* bitkileri 8 HMA (ağır metal ATPaz) genine sahiptir. Bu genlerden ağır metal taşıyıcı ATPaz4 (HMA4) olarak da isimlendirilen PIB-tip ATPaz'lar bitkide metal taşınmasında önemli bir rol üstlenmektedir. *Arabidopsis* bitkilerinde yapılan genom analizleri çalışmalarında, HMA genlerinin bir grubu olan HMA1-4'ün Zn, Co, Cd ve Pb transportu ve diğer grubu olan HMA5-8'in ise Cu ve Ag transportunda rol aldığı yapılan deneylerle ortaya konulmuştur. Ayrıca, *Arabidopsis* bitkilerinde HMA4 geninin işlevinin Zn homeostazisi ve Cd detoksifikasyonunda rol oynadığı ve bu metallerin kökten gövdeye taşınmasında görev aldığı bildirilmiştir [91- 94].

HMA1 kloroplast membranının üzerinde bulunur ve kloroplasta bakır yüklenmesinde, çinko detoksifikasyonunda ayrıca bakır, çinko, kadminyum, kobalt ve kalsiyum taşınmasından sorumludur. Hücrelerdeki ağır metallerin kompleks oluşturmasında AtHMA2, AtHMA3 ve

AtHMA4 önemli rol oynamaktadır. AtHMA3 metal taşıyıcısının, Ycf1 maya mutantlarındaki heterolojik anlatımı, bu taşıyıcının kadmiyum iyonlarının vakuoler ayrılmasında önemli bir rolünün olduğunu kanıtlamıştır. AtHMA2, AtHMA3 ve AtHMA4 ekspresyonlarındaki farklılıklar, hücredeki rollerinin farklılık göstermesinden oluşmaktadır. AtHMA3 vakuoler membranda bulunur iken, AtHMA2 ve AtHMA4 plazma zarında bulunur. Bu da AtHMA3'ün vakuollerdeki toksik ağır metal iyonlarının depolama işlemine dahil olduğunu net bir göstergesidir. AtHMA2, AtHMA3 ve AtHMA4 genlerinin büyük oranda anlatımı ile, bitki kök iletim demetleri hücrelerinde, yaprakta stomal hücrelerde ve hidatodlarda varlığı kanıtlanmıştır. Bu hücrelerin ağır metallere maruz kalması; metal içeren toprakların bitki kökleri ile buluşması ve ağır metaller ile kirlenmiş olan havanın hidatodlar ve stomalar ile temas haline geçmesi ile iki şekilde gerçekleşir. Ek olarak, bu dokular fizyolojik fonksiyonların onarımı için gereklidir. Bu yüzden bu dokulardaki ağır metallerin detoksifikasyonu esastır. AtHMA2 ve AtHMA4'ün temel görevleri, ksileme çinko iyonlarının taşınmasını sağlamaktır. Ayrıca kadmiyum iyonlarına karşı önemli bir afiniteye sahiptirler ve köklerden kendi translokasyonunu yürütmeleri mümkündür. Bu durum HMA4 mutantları (köklerde kadmiyum miktarı artmış, gövde de taşıma azalmış), HMA2 ve HMA4 (Cd akümüasyonu yabancı tip ile karşılaştırıldığında, Cd iyonlarına 2-3 kat duyarlılıkları artar) kullanılarak teyit edilmiştir. HMA2 ve HMA4 ksileme Cd taşınmasındaki ana mekanizmayı temsil etmektedir. HMA2, HMA4 ve cad1 mutantlarının karşılaştırılması yapıldığında, Cd iyonlarının cad1 mutantına olan duyarlılığı HMA2 ve HMA4'e oranla 10-20 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [96,97]. HMA2, HMA3 ve HMA4 metal taşıyıcıları aynı iyon seçiciliğini tam olarak göstermezler[98]. Örneğin, AtHMA2 ve AtHMA4 çinko ve kadmiyum taşırken, AtHMA3 kadmiyum, kurşun ve kobalt taşımaktadır. *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis halleri*, *B.rapa* ve *B. juncea* türlerinde HMA1-HMA4 ile yapılan ayrıntılı biyoinformatik ve karşılaştırmalı yapısal analizler, bu bitkilerin diğer proteinlerle etkileşiminde ve bu taşıyıcıların kimyasal bileşenlerinde benzerliklerinin ve farklılıklarının olduğunu kanıtlamıştır. Bu bitki türleri arasındaki proteinlerin hücre içi lokalizasyonu ve farklılıkları etki analizinde gösterilmiştir [99].

Bitkilerde bulunan ABC taşıyıcıları içerisinde Cd taşınmasında rol aldığı ileri sürülen AtMRP3 ve AtATM3 adında iki taşıyıcı tespit edilmiş ek olarak AtATM3 taşıyıcısının *Arabidopsis* bitkilerinde Pb ve Cd toleransında artışa neden olduğu çalışmalarda ortaya

ıkarılmıştır [100]. Hiperakümülatör bitkilerde ağır metallerin taşınmasında rol aldığı bilinen MATE (Multidrug And Toxin Efflux) isminde protein ailesi de mevcuttur. Bu protein ailesi bitkide sekonder metabolitlerin sitosolden hücre dışına çıkartılması veya metal toleransı için önem arz eden vakuollerde alıkonulması mekanizması içerisinde kasyon antiportları olarak işlev gördüğü tespit edilmiştir [101]. MATE protein ailesinin bir üyesi olan FDR3 kök dokularında sitratın vaskular dokulara salınmasında işlev görmektedir. FDR3 geninin *Thlaspi caerulescens* ve *Arabidopsis halleri* köklerinde yapısal olarak aşırı eksprese edildiği bildirilmiştir [102,103].

Moleküler temelli seçicilikteki bu farklılıklar halen bilinmemekte ve daha ilerideki araştırmalarda bu farklılıkların ayrıca araştırılması gerekmektedir. Bu bağlamda *Brassica* türlerinin (fitoremediasyon için potansiyel hedef bitkiler) gen seviyelerinde metal ATPazların anlatımını analiz etmek hedeflenmiştir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Bitkisel Materyal

3.2. Hedef Bitki Belirlenmesi

Bu çalışmada, deney materyali olarak *Brassicaceae* familyasına ait olan *B. rapa*, *B. campestris* var *toria* ve *B. juncea* (kahverengi hardal) olmak üzere 3 tür ve *B.juncea* 'ya ait *B. juncea* var *JS-13*, *B. juncea* var *early raya*, *B. juncea* var *S-9*, *B.juncea* var *sind raya* olmak üzere 4 çeşit çalışılmıştır.

Tohumlar Agricultural Research Center Oil Crop Research Institute Sindh, (Pakistan)' dan temin edilerek Cd metali için akümülatör bitki olarak belirlenmiştir.

B. juncea bitkisinin seçilme nedenlerinin başında diğer hiperakümülatör bitkilere göre 10 kat daha fazla hızlı bir şekilde büyümeleri, hasat edilebilen toprak üstü organlarında ağır metal birikimi ve toleransındır.

3.3. Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Ağır Metal Uygulaması

3.3.1. Tohum Sterilizasyonu

Her bir tohum sterilizasyonunda:

50 ml'lik sanrifüj tüpüne 400'er tohum konulmuştur.

İşlem;

- 1- Tüplere 1000 µl'lik pipetle 5 ml %70'lik alkol ilave edilerek 5 dakika boyunca çalkalanmıştır.
- 2- Tüpü alkolden arındırmak için 40 ml distile su konup bir süre çalkalanmıştır.

Bleach Solüsyonu Hazırlama

-4 ml NaClO₂

-36 ml ultra saf su

Beher içine hazırlanan Bleach solüsyonuna birkaç damla Tween 20 ilave edilmiştir.

- 3- Hazırlanan Bleach solüsyonundan 12,5 ml tüpe ilave edilip 10 dk boyunca tüp çalkalanmıştır.

- 4- Tüpten karışım dökülüp, tohumları Bleach solüsyonundan arındırmak için 7-8 defa 2'şer dk 30 ml distile suyla tohumlar yıkanmıştır.
- 5- Tamamen köpüklerden arınan tüp 30 ml ultra saf su konularak 3 saat boyunca Vortex'de 600 rpm'de çalkanmıştır.

0 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM , 500 μM olmak üzere 8 ayrı parametrede Cd 10 milimolarlık stok solüsyondan hazırlanmıştır.

Cd 10 mM'lık Stok Solüsyonu Hazırlama

CdCl₂ molekül ağırlığı 183,32

- 1- 250 ml'lik behere manyetik balık koyulur.
- 2- 90 ml ultra saf su eklenir.
- 3- Hassas terazide 183.32 mg CdCl₂ tartılır.
- 4- Tartılan Cd yavaş yavaş behere dökülür.
- 5- Manyetik balıkla saf bir görüntü elde edilene kadar karıştırılır.
- 6- Üzerine 10 ml daha ultra saf su dökülür.
- 7- Manyetik balıkla tekrar karıştırılır ve hazırlanan solüsyon cam şişede buzdolabında +4⁰'de saklanır.

Ultra saf su ile 3 saat boyunca çalkalanan tohumlar tabaklara 50 'şer tohum olmak üzere 8 ayrı parametre için 8 ayrı tabakta ekilmiştir.

0 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM , 500 μM olmak üzere 8 ayrı parametre Cd 10 milimolarlık stok solüsyondan hazırlanmıştır.

Parametreler;

Cd

0 μM —100 ml ultra saf su

5 μM — 100 ml ultra saf su + 50 μl Cd (stok)

10 μM — 100 ml ultra saf su + 100 μl Cd (stok)

20 µM—100 ml ultra saf su + 200µl Cd (stok)

50 µM— 99,5 ml ultra saf su + 500 µl Cd (stok)

100 µM— 99 ml ultra saf su + 1 ml Cd (stok)

200 µM— 98 ml ultra safsu + 2 ml Cd (stok)

500 µM — 95 ml ultra saf su + 5 ml Cd (stok)

3.3.2. Tohumların Tabaklara Ekim İşlemi

Bu çalışmada *B. rapa*, *B. campestris var toria* ve *B. juncea var JS-13*, *B.juncea var early raya*, *B. juncea var S-9*, *B. juncea var sind raya* bitkilerine uygulanmak üzere, Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA) ‘nın açıkladığı “tehlikeli kirletici maddeler” listesinde ilk 10’da yer alan metallere biri olan Cd metali seçilmiştir [117].

Bitkilere 31 gün boyunca yapılan ağır metal uygulaması, her 2 lt’lik polietilen kaba 50’şer tohum olacak şekilde uygulanmıştır. Ağır metal uygulanmayan kontrol bitkileri de her 2 lt’lik polietilen kaba 50’şer tohum olacak şekilde ilk 8 gün sadece ultra saf su ile 8. günden sonra ise sadece % 25 lik Hoagland besi çözeltisi yetiştirme ortamı olarak kullanmıştır.

Ultra saf su ile 3 saat boyunca çalkalanan tohumlar tabaklara 50 ‘şer tohum olmak üzere 8 ayrı parametre için 8 ayrı tabakta ekim yapılmıştır. Bu çalışmada toprak kullanılmamıştır. Tabakların içine uygun boyutta kesilen, steril edilmiş kurutma kağıtları yerleştirilmiştir. Tabakların tabanındaki kurutma kağıdı uygun parametrelerdeki stok Cd çözeltisiyle ıslatıldıktan sonra ekim yapılmıştır. Tabaklara 2 kat kurutma kağıdı koyulduktan sonra üzerine tohumlar belirli hizalarda steril pens yardımıyla tabaklara yerleştirilmiştir. Tohumların üzeri 1 kat steril kurutma kağıdıyla örtülmüştür. Üstteki kurutma kağıdı da uygun belirli parametrelerdeki stok Cd çözeltisiyle ıslatılmıştır. Tohumlar çatladıktan sonraki 1-2 gün içerisinde en üstteki kurutma kağıdı atılmıştır. Tohumlar 2 ve ya 3. günde çatlamışlardır. Tabakalar gün aşırı olmak üzere haftada üç gün belirli parametrelerdeki Cd çözeltisi ile sulanmıştır. Tabaklara % 25 lik Hoagland besi çözeltisi [75] ekim işleminden

sonraki 8. günde verilmiştir. Tabaklara % 25 lik Hoagland besi çözeltisi ve Cd gün aşırı olmak üzere haftada üç gün verilmiştir.

İklim özellikleri

Tohum ekiminden itibaren 31 gün boyunca yetiştirilen bitkiler %60 nem ve 16 sa ışık (25 ± 2 °C) / 8 sa karanlık (20 ± 2 °C) fotoperiyodunda $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ışık şiddeti altında iklim odasında yetiştirilmiştir.

3.3.3. Bitkilerin Hasatı

1 ay (31 gün) boyunca yetiştirilen Cd ağır metali uygulanan ve ağır metal uygulanmayan (kontrol grubu) bitkilerin kök, gövde ve yaprak kısımlarında biriken ağır metal miktarının belirlenmesi, moleküler genetik çalışmalarda kullanılması ve anatomik analizlerinin yapılması amacıyla hasatı yapılmıştır. Hasat edilen bitki kökleri birkaç dakika boyunca ultra saf su ile yıkanmıştır.

Atomik Absorpsiyon Spektroskopik analiz için kullanılacak bitki örnekleri pişirme kağıtlarına konularak etüvde 72^0 C'de kurutulmuştur. Gen ekspresyonu çalışması yapılacak örnekler ise alüminyum folyolarak sarılarak -80 °C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Histolojik (anatomik) çalışmalar için bitkiler %70'lik alkolde saklanmıştır.

3.4. Bitkilerde HMA2 ve HMA4 Genlerinin Analizi için Yapılan Moleküler Yöntemler

3.4.1. Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu veya ekstraksiyonu biyolojik numunelerden RNA saflaştırması işlemine dayanan bir yöntemdir. RNA tek iplikli yapıya sahiptir bu nedenle de kontamine olma olasılığı yüksektir. Bu nedenle RNA izolasyonunu DNA izolasyonundan çok daha fazla hassastır.

RNA izolasyonu yalnızca *B. juncea* var *early raya*, *B. juncea* var *sind raya* ve *B. rapa* bitkilerinin 0-100 μM 'da yetiştirilen örneklerin yaprakları için yapılabilmektedir.

Total RNA Thermo Scientific™ 'in GeneJet Bitki RNA Saflaştırma Kiti kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. -80^0C 'de saklanan bitki örnekleri havan ve tokmak kullanılarak sıvı

azot içinde ögütülmüştür. Daha sonra RNA izolasyonu Kitinde belirtilen talimatlara göre muameleler gerçekleştirilmiştir.

RNA izolasyon kitinde açıklanan yöntem gereği;

1. -20 C'de muhafaza edilen bitki materyali çözünmeden hızlıca hassas terazide tartılmıştır.
2. Numune steril edilmiş havan ve havan tokmağı kullanılarak sıvı azot ile toz haline gelene kadar iyice ezilmiştir.
3. Ezilen bitki materyali steril ependorf (1,5 ml) tüpe aktarılmıştır.
4. Daha sonra tüp üzerine 500 µl Plant RNA Lysis Solution ilave edilerek 15- 20 saniye vorteks yapılmıştır.
5. Vortekslenen örnekler 3 dakika boyunca su banyosunda 56°C'de inkübe edilmiştir.
6. Süre sonunda örnekler 5 dakika boyunca 14.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
7. Santrifüj edilen örneğin süpernatant kısmı atılarak yeni steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
8. 250 µl %96'lık etanol ilave edilerek lizat steril pipet yardımıyla karıştırılmıştır.
9. Hazırlanan karışım pürifikasyon (saflaştırma) tüpüne aktararak 1 dakika 12.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda alttaki kolon atılarak yeni kolon takılmıştır. Fakat kolon atılmamıştır içindeki tekrar döküp kullanılacağı için)
10. Kolondan geçen sıvı atıldıktan sonra kolonda kalan örneği yıkamak için önceden hazırlanan Wash Buffer 1 (40 ml WB 1+ 2,1 ml etanol) 'dan 700 µl pürifikasyon kolonun içine ilave edilmiş ve 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.
11. Kolondan geçen sıvı tekrar atılarak, kolonda kalan örneği yıkamak amacıyla yeni collection tüpüne aktarılmıştır.
12. Aktarılan tüpe önceden hazırlanan Wash Buffer 2 (30 ml WB 2 + 30 ml etanol) tamponu ilave edilmiş ve 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.
13. Aşama tekrarlanmıştır ve 13.500 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Böylece yıkama safhası tamamlanmıştır.
14. Kolon RNaz içermeyen steril ependorf tüpe (1,5 ml) yerleştirilerek üzerine 50 µl nükleaz içermeyen su ilave edilerek 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. 1 dakika inkübasyon için beklenmiştir.

15. Santrifüj sonucunda kolon membranında biriken RNA'lar ependorf tüpe geçmiş ve total RNA izolasyonu tamamlanmıştır.
16. Elde edilen örnekler daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır.



Resim 3.1. RNA izolasyonu çalışması

3.4.2. Total RNA Miktar Tayini

Elde edilen total RNA'ların (genomik DNA içeren ya da içermeyen) saflığını ve miktarını belirlemek üzere NanoDrop spektrofotometresinde (Thermo) 260 nm ve 280 nm dalga boylarında okumalar yapılmıştır.

DEPC'li saf su ile 1/20 oranında sulandırılan total RNA örneklerinin konsantrasyonları ng/µl cinsinden belirlenmiştir.

3.4.3. Komplementer (Tamamlayıcı) DNA Sentezi

Saflaştırılmış olan total RNA'lardan komplementer DNA (cDNA) sentezi işlemi The Maxima First Strand cDNAs Synthesis Kit protokolü dikkate alınarak yapılmıştır. Elde

edilen total RNA'lardan cDNA sentezi için The Maxima First Strand cDNAs Synthesis Kit içerisinde bulunan tampon ve enzimler kullanılmıştır.

First Strand cDNA Sentezi

Buz üzerinde steril ve RNAaz içermeyen bir tüp içerisine sırayla aşağıdakiler eklenir.

5X Reaction mix -----→ 4 µl

Maxima enzyme mix -----→ 2 µl

Kalıp RNA -----→ 100 ng- 4µl

Nükleaz içermeyen su -----→ 20 µl 'ye tamamlanır.

Toplam Hacim -----→ 20µl

1. Toplam hacmi 20 µl olan örnekler yavaşça karıştırılarak santrifüj edilmiştir.
2. 10 dk 25⁰ C 'de inkübe edildi.
3. Ardından 15 dk 50⁰ C 'de inkübe edildi.
4. Son olarak 5 dk 85⁰ C' de cDNA sentezi tamamlandı.
5. Sentezlenen örnekler -20⁰ C' ye kaldırıldı.

Saflaştırılmış olan total RNA'lardan komplementer DNA (cDNA) sentezini gerçekleştirmek için gerekli olan inkübasyon sıcaklıkları ve süreleri, gradiyent polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) (Applied Biosystems) cihazında kurulan program ile sağlanmıştır (Şekil 3.8.).

Çizelge 3.1. cDNA sentezi için PCR cihazında kurulan program

| Sıcaklık | İnkübasyon süresi |
|-------------------|-------------------|
| 25 ⁰ C | 10 dakika |
| 50 ⁰ C | 15 dakika |
| 85 ⁰ C | 5 dakika |
| 4 ⁰ C | ∞ |



Resim 3.2.cDNA sentezi için PCR cihazında kurulan program

3.4.4. Primer Tasarımı

Ağır metal alınımı ve taşınımında görevli olduğu düşünülen genlerin real time PCR metoduyla ekspresyonlarının olup olmadığının kontrol edilmesi için araştırılmak istenen genlere özel primerlerin tasarlanması gerekmektedir.

Bu çalışmada tasarlanan primerlerin *B.rapa*, *B. juncea* var *early raya* ve *B. juncea* var *sind raya* bitkileriyle ortak olarak çalışabilmesi için model bitki olarak seçilen *Arabidopsis* bitkisinin genomu ile *B. juncea* ve bu türe yakınlık gösteren *B. rapa* bitkilerinin NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) EST (Expressed sequence tag) dizileri ve Cluster-X veri tabanından sağlanan gen dizilerinin ortak dizileri seçilerek ve karşılaştırılmıştır. Primer3 programı ile de primer tasarımı yapılmıştır ve Sigma Aldrich® 'ten sipariş edilmiştir.

B. juncea ve *B. rapa* ve EST dizileri ise NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) veri tabanlarından alınmıştır. Tasarlanan 3 adet primer çiftinin (ileri=F ve geri=R) bazuzunluğu 20-24 arasında değişmektedir (Çizelge 3.9.). Primerler tasarlanırken Guanin-Sitozin oranının %45-55 arasında ve erime sıcaklığının %55-60 °C olmasına özen gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. *B. rapa* ve *B. juncea* türleri için tasarlanan primerlerin baz dizilimleri ve Guanin-Sitozin bazları oranları

| Primer Adı | Primer Dizisi 5'-3' | GC(%) |
|------------|--------------------------------|-------|
| BR-HMA2-F | 5'-GGAGCGATTCTTGCTTTGGC-3' | 55 |
| BR-HMA2-R | 5'-CCTGACTTGCAATGCTTCGG-3' | 55 |
| BR-HMA4-F | 5'-AGCAATGCATGCTCAAGAAC -3' | 52 |
| BR-HMA4-R | 5'-GCATCATTACACCATCTCC-3' | 55 |
| BR-UBQ9-F | 5'-GAAGACATGTTTCATTGGCA-3' | 45 |
| BR-UBQ9-R | 5'-ACACCTTAGTCCTAAAAGCCACCT-3' | 46 |

3.4.5. Real Time PCR Çalışması

B. rapa, *B. juncea* var *early raya* ve *B. juncea* var *sind raya* bitkilerinin yaprak örneklerinde Cd metali ile uyarılan önemli genler olan metal ATPazlar (HMA2 ve HMA4)'in Real Time PCR kullanılarak ekspresyonunu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, PCR amplifikasyonu Applied Biosystems® 'in StepOnePlus termal cycler cihazı kullanılarak yapılmıştır.

Reaksiyon Karışımı Hazırlama ve Termal Döngü Protokolü

Real time PCR karışımı Maxima SYBRGreen/ROX qPCR Master Mix (2X) Kiti dikkate alınarak aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

Master Mix karışımının içeriği:

- Polimeraz enzimi

-dNTPler

- SYBR Green floresan boyası

- Pasif referans boya (ROX)

ve Real time PCR için gereken bütün sarfları ve gerekli olan tüm bileşikleri içermektedir.

SYBR Green ortamda bulunan rastgele çift iplikli bir DNA'ya bağlanır. Bu yöntemin seçilme amacı maliyetinin düşük olması ve kolay bir yöntem olduğu için seçilmiştir.

Ancak reaksiyon sonucunda oluşan özgün amplifikonlara da bağlanıp ışığa yapabileceğinden dolayı Melt Curve (erime eğrisi analizi) tavsiye edilmiş ve yapılmıştır.

Ubikuitin geni, önceki çalışmaya istinaden ortaya konulan referans geni olduğundan kontrol geni olarak seçilmiştir [118,119].

Çizelge 3.3. Reaksiyon Basamakları

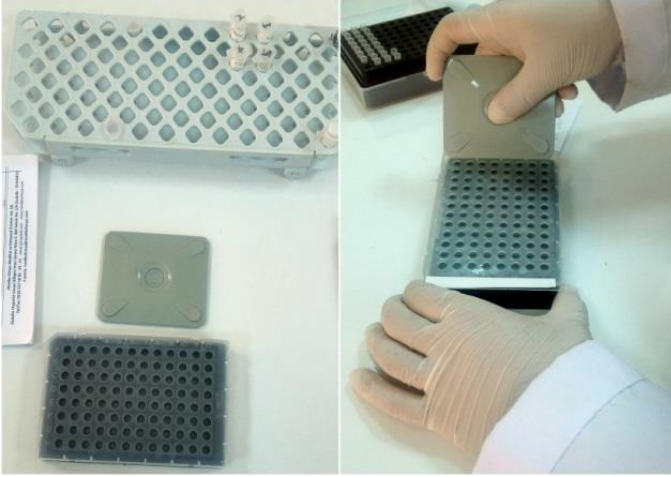
| Bileşenler | 10 µl Reaksiyon başına hacim | Son konsantrasyon |
|---|------------------------------|-------------------|
| Maxima SYBRGreen/ROX qPCR Master Mix (2X) | 5 µl | 1x |
| Forward ve Reverse Primerleri | 0,3- 0,3 | 250-500 nM |
| Kalıp cDNA | 4 µl | 100 ng |
| Nükleaz içermeyen su | 0,4 µl | - |
| Toplam reaksiyon hacmi | 10 µl | - |

Çizelge 3.4. Real time PCR da kurulan reaksiyonun tablosu

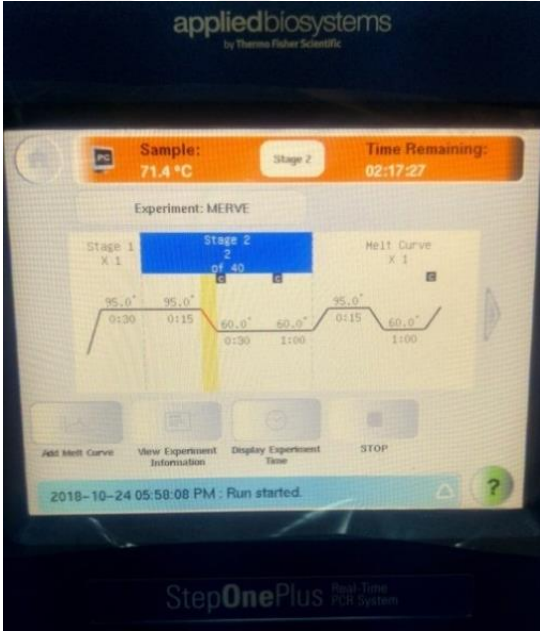
| | | Sind | | | Early | | | Rapa | | |
|---|---------|------|------|-----|-------|------|-----|------|------|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| | Negatif | HMA2 | HMA4 | | HMA2 | HMA4 | | HMA2 | HMA4 | |
| | Kontrol | R1 | R2 | Ubi | R1 | R2 | Ubi | R1 | R2 | Ubi |
| A | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| B | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| C | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| D | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| E | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| F | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

Hazırlanan plate aşağıdaki reaksiyon döngüsüne tabi tutularak gen ekspresyonu analizi yapılmıştır.

- 1- Denaturasyon -----→ 95⁰C ‘de 30 saniye
 - 2- Annaling -----→ 95⁰C ‘de 15 saniye
60⁰C ‘de 30 saniye
 - 3- Extantion -----→ 60⁰C ‘de 60 saniye
- } 40 döngü
- 4- Melt Curve -----→ 95⁰C ‘de 15 saniye
60⁰C ‘de 60 saniye



Resim 3.3. Real time PCR çalışmasında plate'in seal ile kapatılması



Resim 3.4. Real time PCR çalışması reaksiyon basamakları

3.5. Atomik Absorpsiyon Spektrometresi

Atomik absorpsiyon spektrometresi (AAS) elementlerin konsantrasyonlarını tespit eden tekli element metotudur.

Analizi yapılacak elemente özgü olan katot lamba kaynağından çıkan elektromanyetik dalga, örnekte aranan elementin varlığında gaz hâlindeki atomlar tarafından emilir. Bunun sonucunda ışık şiddetinde oluşan azalmanın ölçülmesiyle analiz tamamlanmış olmaktadır. Cd miktar tayini Skyray AA-9000 markalı AAS ile gerçekleştirilmiştir.

3.5.1. Nitrik-Perklorik Asit Karışımı ile Yaş Yakma

Kurutulmuş bitki yaprak numuneleri havanda öğütülürerek tartılmıştır. Tüm bitki örnekleri öğütülerek tartılsa da yalnızca *B. juncea* var *early raya*, *B. juncea* var *sind raya* ve *B. rapa* bitkilerinin yaş yakma metodu ile atomik absorpsiyon spektrofotometresi (AAS) analizi yapılmıştır.

Metot

1. Öğütülmüş bitki numuneleri 125 ml lik erlenmeyere konulur.
2. Erlenmeyer içine 3 tane cam parçası konularak üzerine 5 ml %3'lük Nitrik asit çözeltisi eklenir.
3. Erlenmeyerin üzerine cam huni konularak ısıtıcı tablaya alınır.
4. Isıtıcı tablada yaklaşık olarak 200⁰ C'de 15 dk boyunca bekletilir. Kahverengi dumanlar çıkmaya başlar.
5. Ara ara hafifçe erlenmeyer çalkalanır.
6. Karışımın rengi açık sarı-beyaz olana kadar ve dumanları rengi kahverengiden beyaz olana kadar kadar bekletilir. Bu süre bu çalışma için yaklaşık 15 dk sürmüştür.
7. Daha sonra üzerine 2 ml Perklorik asit eklenir. Cam huni tekrar üzerine konulur.
8. Ara ara hafifçe erlenmeyer çalkalanır.
9. Yaklaşık olarak 200⁰ C'de 20 dk boyunca bekletilir.
10. En son erlenmeyerde yaklaşık 2 ml kadar şeffaf beyaz renkte sıvı kalır.



Resim 3.5. Öğütülmüş bitki numuneleri



Resim 3.6. Numunelerin kahverengiden açık sarı ve beyaz duman vermesi



Resim 3.7. Erlenmeyerde son aşamada oluşan şeffaf beyaz renkteki sıvı

3.6. Histolojik (anatomik) Analiz

Anatomik analizler için Metcalfe ve Chalk (1950) [121]'in vermiş olduğu yöntem dokulara ve çalışılan materyale göre bir miktar değiştirilerek edilerek uygulanmıştır.

Doku takibi de denilen bu yöntem bitki dokularındaki suyun uzaklaştırılması, parafinle doyurulması, parafine doyan bitki materyallerinin parafine gömülmesi, mikrotom ile kesit alınması ve preparatların boyanması şeklinde özetlenebilir.

3.6.1. Örneklerin tespiti (Fixing)

1 ay boyunca belirli parametrelerde yetiştirilen örnekler (*B. rapa*, *B. campestris* var *toria*, *B. juncea* var *JS-13*, *B. juncea* var *early raya*, *B. juncea* var *S-9*, *B. juncea* var *sind raya*) hasat edildikten sonra anatomik çalışmalar için ayrılan bitki materyalleri 50 ml'lik sanrifüj tüplerinde %70 'lik etanol içinde saklanmıştır.

3.6.2. Gömme (Embedding)

%70 lik etanol içinde kök, gövde ve yaprak olarak ayrılan bitki materyallerinin mikrotom cihazında kesitlerinin alınabilmesi amacıyla katı bir ortama gömme işlemi yapılması gerekir. Bunun için bitki dokularındaki alkolün yerini parafin maddesinin içinde çözünebileceği bir çözücü maddeyle yer değiştirmesi gerekmektedir. Bu çalışmada ksilen kullanılmıştır.

Gömme aşamasındaki en önemli nokta parafinin tüm dokuya nüfuz etmesidir.

Gömme İşlemi Hazırlık ve Protokolü

%70'lik etanol içerisinde saklanan bitki materyalleri öncelikle geniş bir kaba boşaltılır. Burada kök, gövde ve yapraklardan 4-5 mm kalınlığında dik açıyla kesitler alınır. Uygun boyutlarda kesitleri alınan bitki materyallerinin parafine doyurma işlemi için aşağıdaki protokol sırasıyla takip edilir.

1. Yeni hazırlanan %70'lik alkol (etanol) içerisinde kesitleri alınan örnekler 1 saat bekletilir.
2. %85 'lik alkolde 1 saat bekletilir.
3. %95 'lik alkolde 1 saat bekletilir.
4. %100 'lik alkolde 1 saat bekletilir.
5. 2 etil alkol + 1 ksilen de 30 dakika bekletilir.
6. 1 etil alkol + 1 ksilen de 30 dakika bekletilir.
7. 1 etil alkol + 2 ksilen de 30 dakika bekletilir.
8. %100 lük ksilen de 1 saat bekletilir.

9. Üzerine 15-20 tane boncuk parafin eklenir.
10. Eğer zaman kısıtlıysa 60 °C deki etüvde ağzı kapalı olarak 11-12 saat bekletilir.
- 11.

Süre sonunda etüvde bu kez ağzı açık olarak 11-12 saat bekletilir. (Koklama sonucu ksilen kokuyorsa koku uçana kadar biraz süre daha bekletilmelidir.)

12. Eğer işlemin acelesi yoksa %100 lük ksilen ve parafin içerisinde 1 gün (ya da 12 saat) oda sıcaklığında bekletilir.
13. Üzerine biraz daha parafin eklenir ve 60 °C de etüvde 1-3 gün bekletilir (kapağı kapalı). 60 °C de etüvde 1 ile 3 gün arasında beklet (kapağı açık).

Bu işlemlerden sonra bitki dokularına sıvı haldeki parafin tamamen geçtiğinde dokuları bir sonraki aşama için kullanabiliriz.

Gömme işlemi Uşak Üniversitesi Eğitim ve Araştırma hastanesinin patoloji laboratuvarında Histo-Line laboratories TEC2900 Embedding Center cihazında gömme işlemi yapılmıştır.



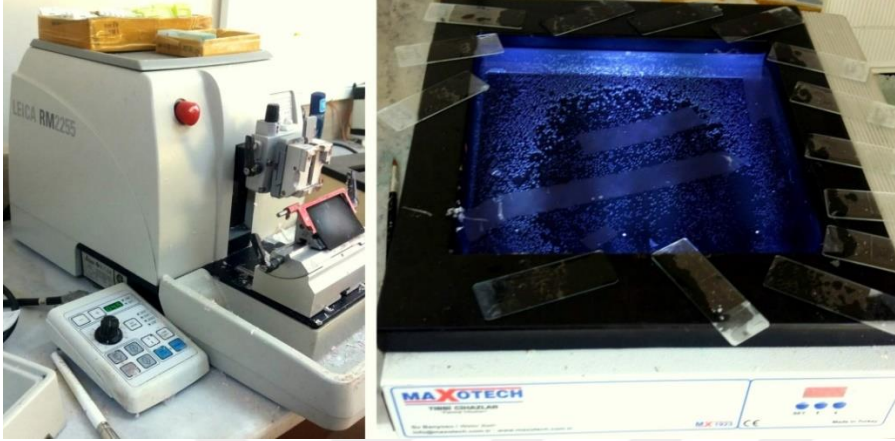
Resim 3.8. Embedding Center cihazı

3.6.3. Kesit alma (Sectioning):

Parafin bloklara gömülen bitki dokularının kesitleri Uşak Üniversitesi Eğitim ve Araştırma hastanesinin patoloji laboratuvarında Leica marka RM2255 model mikrotom cihazında alınmıştır.

Bloklar önce traşlanmıştır (trim) daha sonra 10 mikron kalınlıkta şeritler halinde kesitler alınmıştır. Kesilen şeritler uygun uzunlukta alınarak 46,5 °C'deki içinde distile su bulunan su banyosunda yüzdürülür. Lam su banyosunun içinde şeridin tam altına getirerek kesitin

lamın yüzeyine uygun şekilde yapışması sağlanır. Lam üzerine alınan kesitin üzerinde bulunan suyun buharlaşması ve kesitin lama yapışması için lam su banyosunun kenarında bir süre bekletilir. En son olarak alınan preparatlar etüv cihazında 60⁰C’de 10 dk kadar bekletilmiştir.



Resim 3.9. Mikrotom ve su banyosu cihazları

3.6.4. Boyama (Staining)

Safranin çözeltisi hazırlama

Hassas terazide tartılan toz halindeki 2.5 gr safranin boyası 100 ml %96’lık alkol içerisinde manyetik balık ile iyice çözdürülmüştür. Bu stok çözeltilerdir, kullanım için her 10 ml stok çözeltiliye 90 ml saf su eklenerek kullanılmıştır.

Fast Green çözeltisi hazırlama

Hassas terazide tartılan toz halindeki Fast Green boyasından 1 gr tartılarak 99 ml saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Bu çözeltiler stok değildir direkt olarak kullanılmıştır. Safranin ve Fast Green boya bitki dokularında farklı bölgelere etkileşime girip boyama yaparlar. Fast Green boyası hücre duvarlarını ve sitoplazmayı yeşil, mavi-yeşil renklere boyar. Safranin ise bitki dokularındaki lignin içeren bölgeleri, kütin içeren bölgeleri, kromozomları ve floem proteinlerini koyu kırmızı renge boyamaktadır.

Safranin ve Fast Green boya için öncelikle slayttan parafinin uzaklaştırılması gerekir. Boyama işlemi sonunda örnekler ‘Entellan’ kullanılarak daimi preparat haline getirilir. Preparatların kurumasının ardından mikroskop altında örnekler incelenir.

Safranin/Fast Green Boyama Protokolü

%100'lük ksilen 20 dakika

2 ksilen + 1 etil alkol 5 dakika.

1 ksilen + 2 etil alkol 5 dakika.

%100 etil alkol 5 dakika.

%96 etil alkol 5 dakika.

%70 etil alkol 5 dakika.

%50 etil alkol 5 dakika.

%25 etil alkol 5 dakika.

Safranin

Preparatlar safranin boyası içerisinde 30 sn kadar bekletilmiştir.

Preparatlardan safranin boyası akana kadar su içerisinde hafifçe çalkalama işlemi yapılmıştır.

Fast Green

Preparatlar Fast Green boyası içerisinde 60-80 saniye kadar bekletilmiştir.

Fast Green boyası preparattan temizlenene kadar su içerisinde hafifçe 2-3 kere çalkalama yapılmıştır.

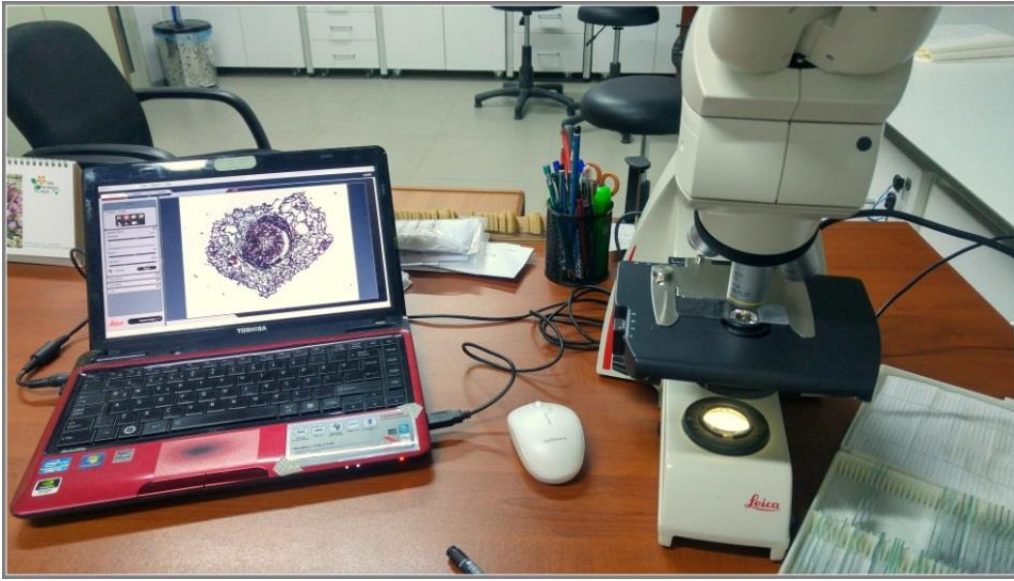
1:1 orandaki etanol-ksilen çözeltisinde preparatlar 1 dk kadar bekletilmiştir.

3.6.5. Bitki dokularının ölçümü

Anatomik incelemelerde bakılması gereken parametreler aşağıdaki gibi belirlenmiştir.

Epidemisin tabaka sayısı, epidemis hücrelerinin çapı, epidemis hücrelerinin cd içerip içermediği, korteksin tabaka sayısı, korteks hücrelerinin çapı, floem tabakasının sıra sayısı, floem hücrelerinin çapı, floemde sklerenkimatik hücrelerin var/yok analizi, floem-ksilem arasında kambiyum var/yok analizi, ksilem tabakasının çapı, trakelerin çapı, trakelerin grup sayısı, trakeidlerin çapı ve metaksilemlerin çapı olarak belirlenmiştir.

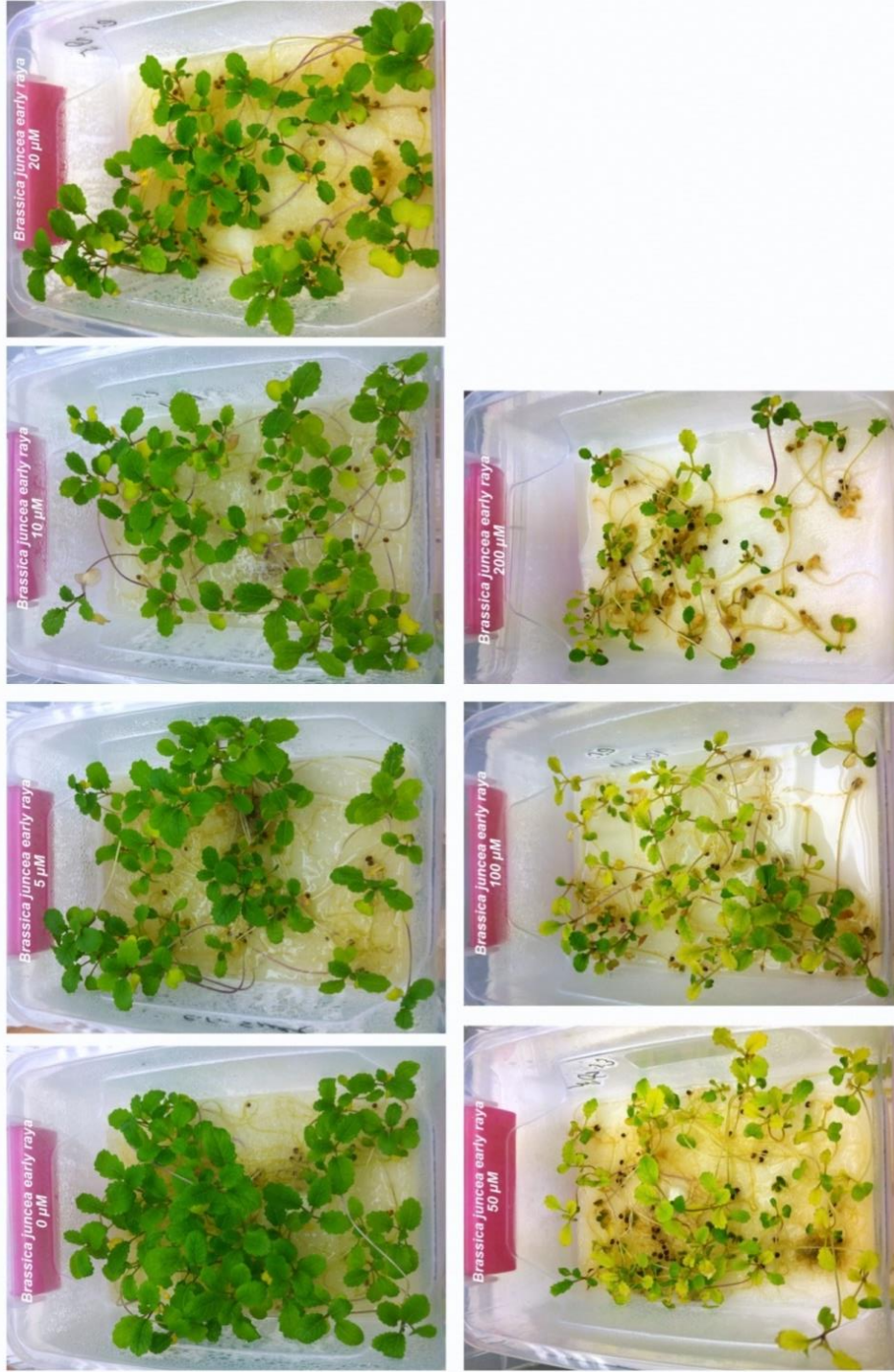
Bu ölçümlerin yapılmasının ardından excel programıyla yukarıdaki parametrelerin en düşük ve en yüksek değerleri, aritmetik ortalamaları ve standart sapmalarının hesaplanması amaçlanmaktadır.



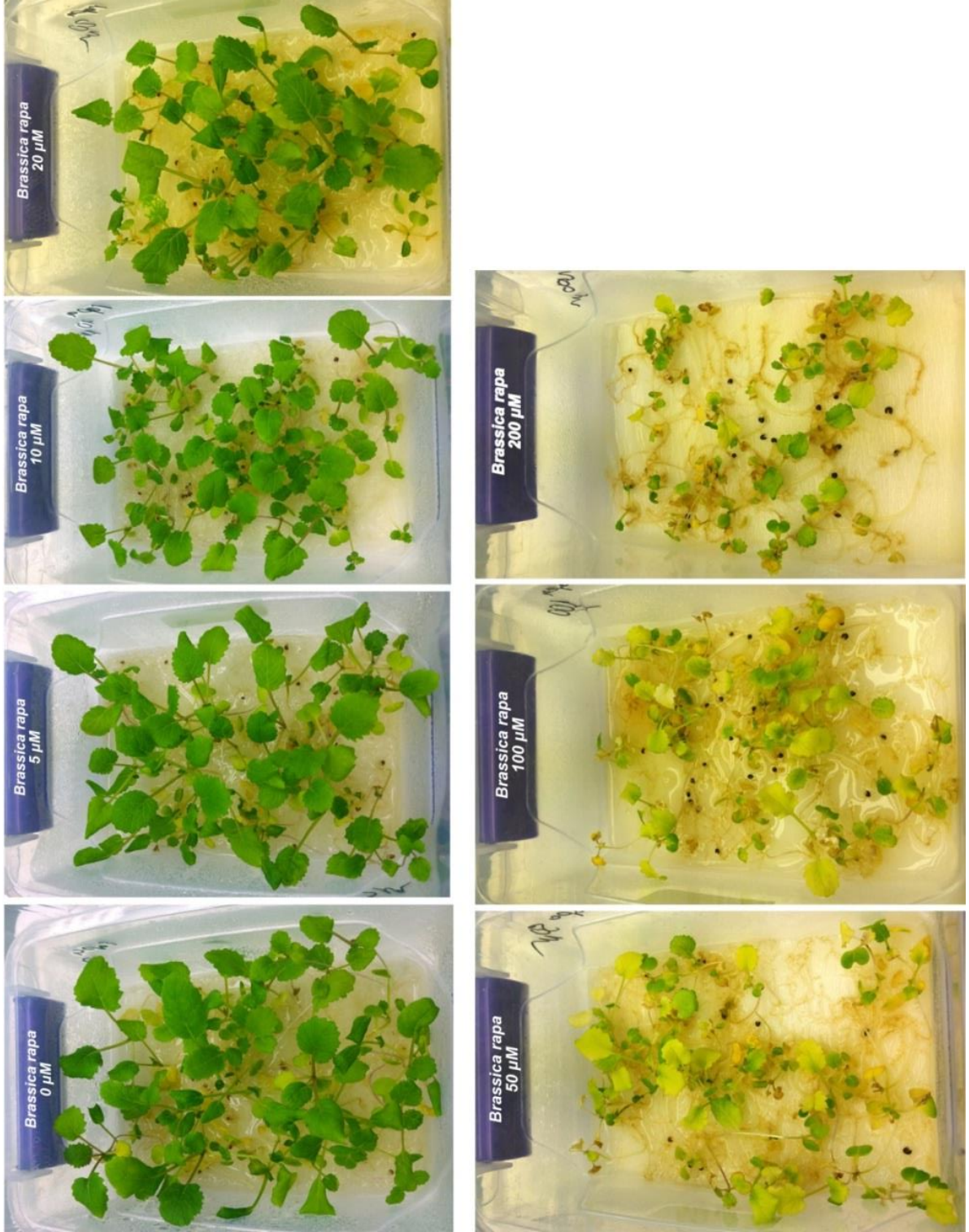
Resim 3.10. Bitkilerin farklı parametrelerdeki kök, gövde ve yaprak kesitlerinin ışık mikroskobu altında LAS EZ programıyla incelenmesi

4. BULGULAR

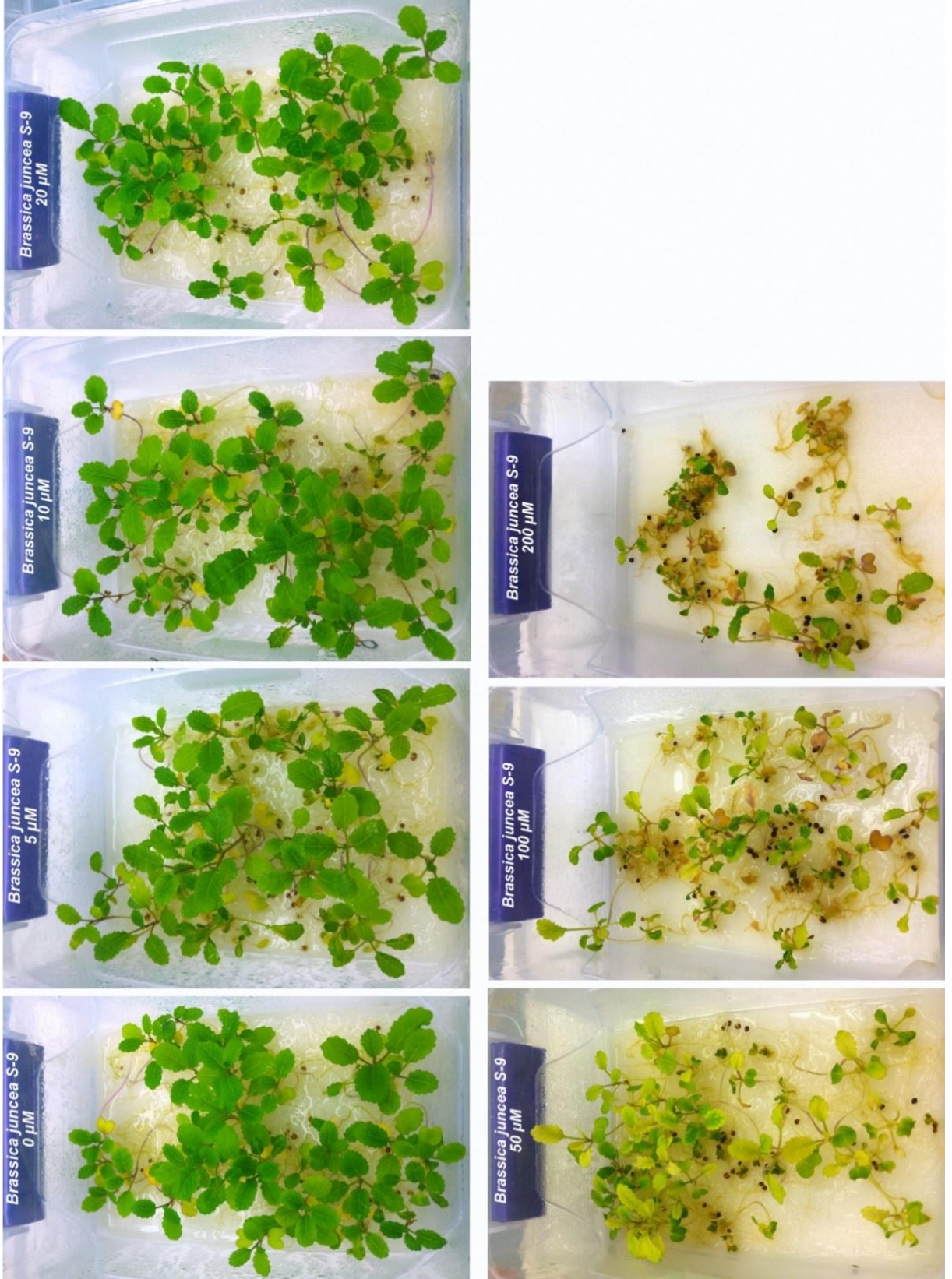
Değişik Cd konsantrasyonlarında yetiştirilen bitkilerin gelişimleri ve hasat resimleri aşağıda verilmiştir.



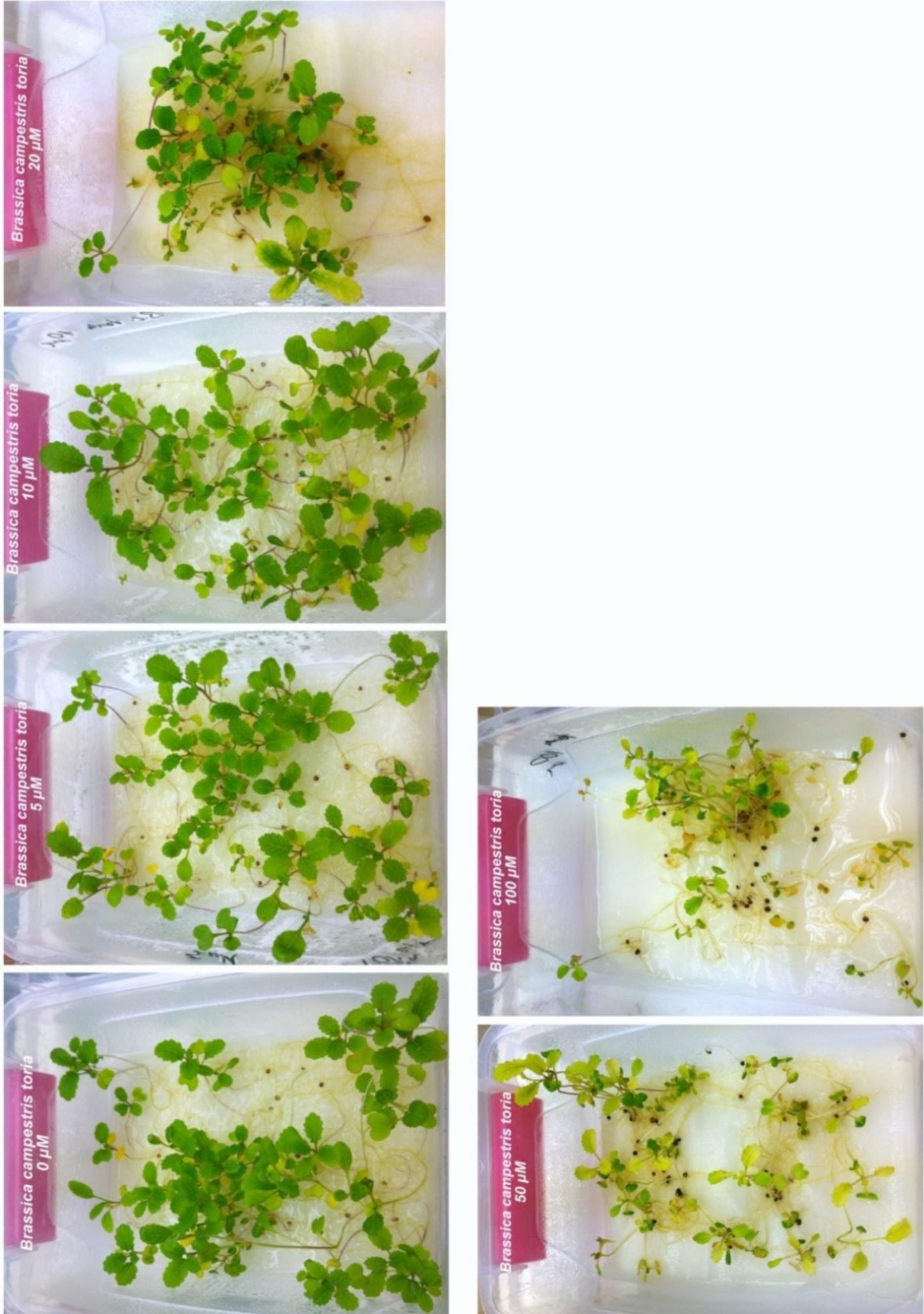
Resim 4.1. Değişik Cd konsantrasyonlarında yetiştirilen *B.juncea* var *early raya* bitkisinin 31 günün sonundaki gelişimi



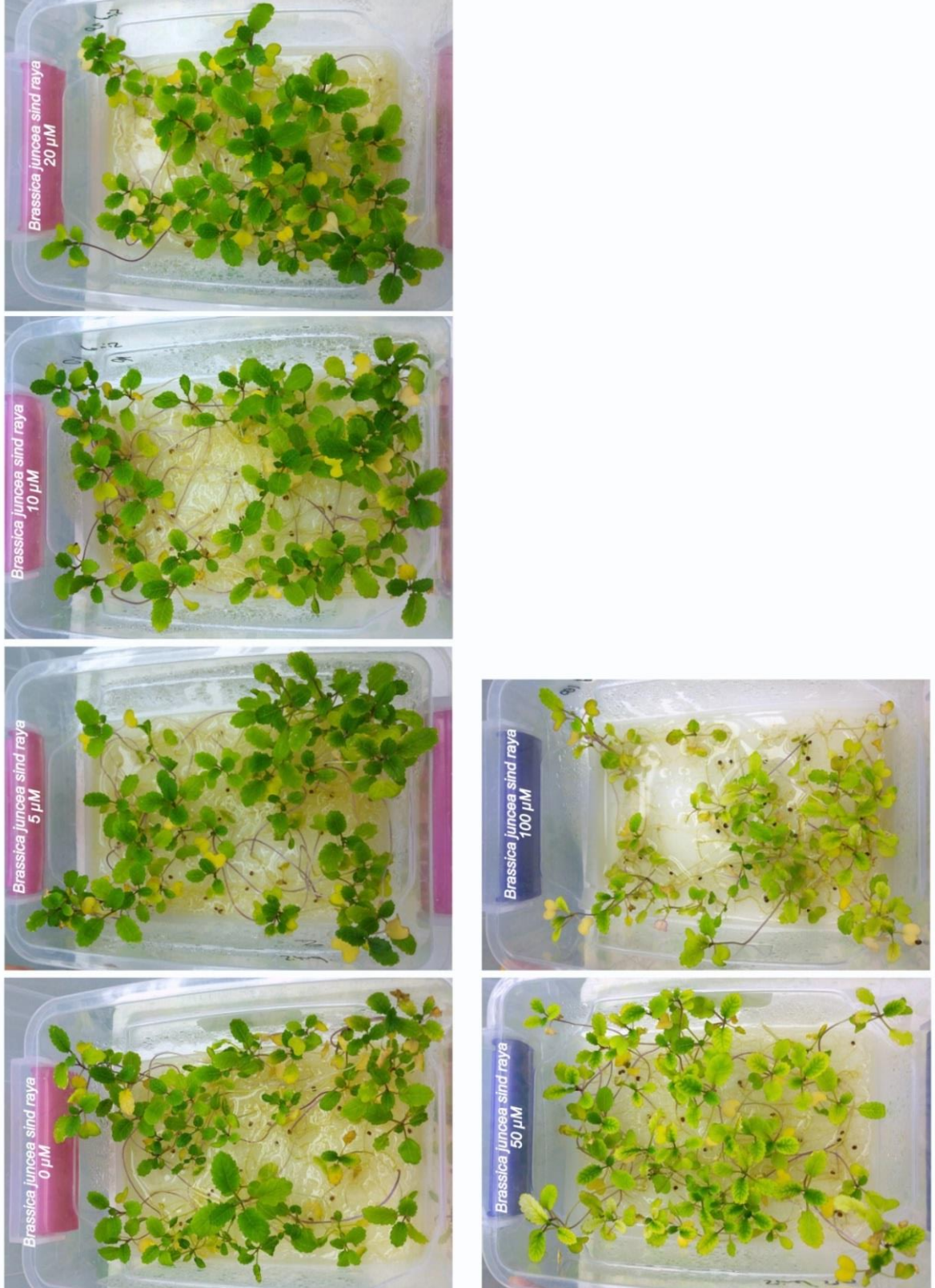
Resim 4.2. Değişik Cd konsantrasyonlarında yetiştirilen *B.rapa* bitkisinin 31 günün sonundaki gelişimi



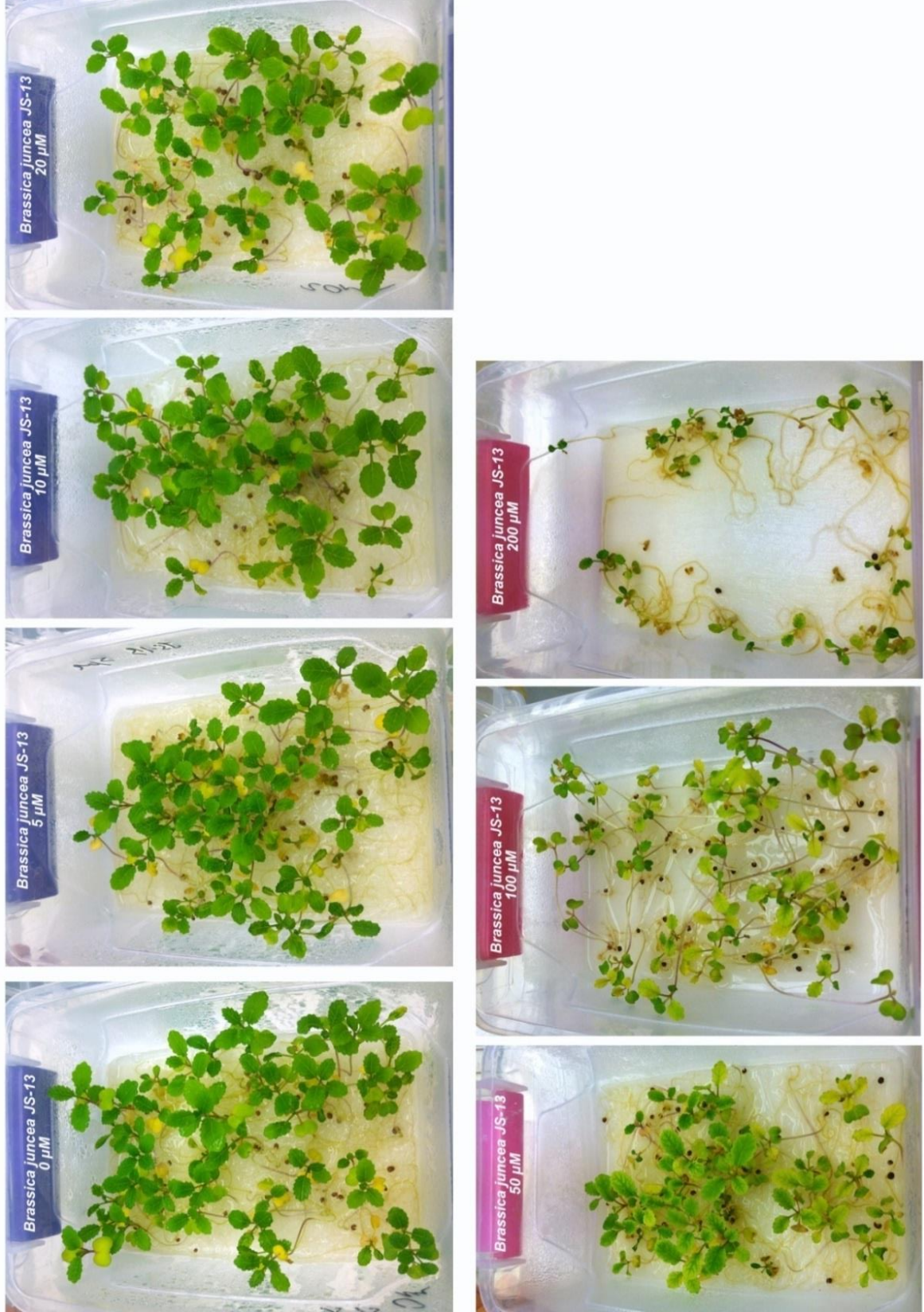
Resim 4.3. Değişik Cd konsantrasyonlarında yetiştirilen *B. juncea* var *S-9* bitkisinin 31 günün sonundaki gelişimi



Resim 4.4. Değişik Cd konsatrasyonlarında yetiştirilen *B. campestris* var *toria* bitkisinin 31 günün sonundaki gelişimi



Resim 4.5. Değişik Cd konsatrasyonlarında yetiştirilen *B. juncea* var *sind raya* bitkisinin 31 günün sonundaki gelişimi



Resim 4.6. Değişik Cd konsantrasyonlarında yetiştirilen *B. juncea* var *JS-13* bitkisinin 31 gün sonundaki gelişimi

-Farklı parametrelerde yetiştirilen bitkilerin hasatı sonrası ıslak ağırlıkları aşağıdaki çizelgelerde verilmiştir.

Çizelge 4.1. *B. rapa*, *B. campestris* var *toria*, *B. juncea* var *JS-13*, *B. juncea* var *early raya*, *B. juncea* var *S-9*, *B. juncea* var *sind raya* bitkilerinin 0 μ M'daki ıslak ağırlıkları (gr)

| Türler 0 μ M | <i>Brassica rapa</i> | <i>Brassica campestris</i> var <i>toria</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>JS-13</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>early raya</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>S-9</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>sind raya</i> |
|---------------------|----------------------|--|--|---|--|--|
| KÖK | 1,40 | 1,69 | 2,10 | 2,90 | 1,57 | 1,28 |
| GÖVDE | 2,66 | 1,74 | 1,68 | 2,21 | 1,65 | 1,81 |
| YAPRAK | 3,60 | 1,64 | 1,90 | 3,37 | 1,90 | 1,72 |

Çizelge 4.2. *B. rapa*, *B. campestris* var *toria*, *B. juncea* var *JS-13*, *B. juncea* var *early raya*, *B. juncea* var *S-9*, *B. juncea* var *sind raya* bitkilerinin 5 μ M'daki ıslak ağırlıkları (gr)

| Türler 5 μ M | <i>Brassica rapa</i> | <i>Brassica campestris</i> var <i>toria</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>JS-13</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>early raya</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>S-9</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>sind raya</i> |
|---------------------|----------------------|--|--|---|--|--|
| KÖK | 1,80 | 2,0 | 2,30 | 2,0 | 1,90 | 2,5 |
| GÖVDE | 2,50 | 1,48 | 1,81 | 1,94 | 1,48 | 2,1 |
| YAPRAK | 3,20 | 1,38 | 1,77 | 2,6 | 1,77 | 2,6 |

Çizelge 4.3. *B. rapa*, *B. campestris* var *toria*, *B. juncea* var *JS-13*, *B. juncea* var *early raya*, *B. juncea* var *S-9*, *B. juncea* var *sind raya* bitkilerinin 10 µM'daki ıslak ağırlıkları (gr)

| Türler 10 µM | <i>Brassica rapa</i> | <i>Brassica campestris</i> var <i>toria</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>JS-13</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>early raya</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>S-9</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>sind raya</i> |
|-----------------|----------------------|--|--|---|--|--|
| KÖK | 1,60 | 1,86 | 2,32 | 2,8 | 2,30 | 2,93 |
| GÖVDE | 2,0 | 1,67 | 1,84 | 1,89 | 1,72 | 2,5 |
| YAPRAK | 3,0 | 1,70 | 1,86 | 3,0 | 2,0 | 1,83 |

Çizelge 4.4. *B. rapa*, *B. campestris* var *toria*, *B. juncea* var *JS-13*, *B. juncea* var *early raya*, *B. juncea* var *S-9*, *B. juncea* var *sind raya* bitkilerinin 20 µM'daki ıslak ağırlıkları (gr)

| Türler 20 µM | <i>Brassica rapa</i> | <i>Brassica campestris</i> var <i>toria</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>JS-13</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>early raya</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>S-9</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>sind raya</i> |
|-----------------|----------------------|--|--|---|--|--|
| KÖK | 1,6 | 1,35 | 2,50 | 2,60 | 2,0 | 3,6 |
| GÖVDE | 2,1 | 1,0 | 1,46 | 1,80 | 1,87 | 2,1 |
| YAPRAK | 2,96 | 1,0 | 1,56 | 2,90 | 2,0 | 2,6 |

Çizelge 4.5. *B. rapa*, *B. campestris* var *toria*, *B. juncea* var *JS-13*, *B. juncea* var *early raya*, *B. juncea* var *S-9*, *B. juncea* var *sind raya* bitkilerinin 50 µM'daki ıslak ağırlıkları (gr)

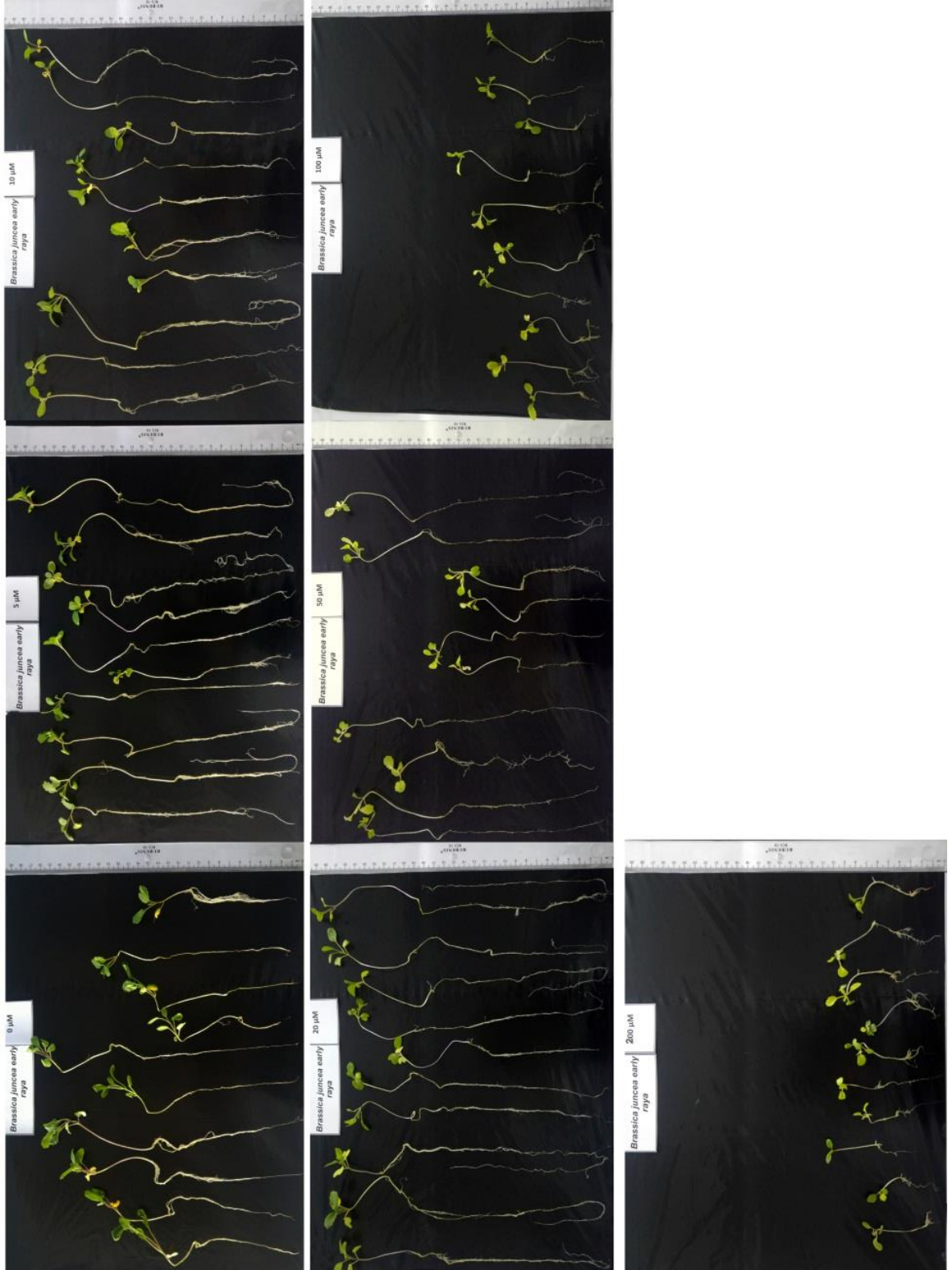
| Türler 50 µM | <i>Brassica rapa</i> | <i>Brassica campestris</i> var <i>toria</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>JS-13</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>early raya</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>S-9</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>sind raya</i> |
|-----------------|----------------------|--|--|---|--|--|
| KÖK | 1,27 | 0,80 | 1,68 | 1,2 | 1,18 | 2,40 |
| GÖVDE | 1,42 | 0,66 | 1,28 | 1,5 | 1,32 | 2,01 |
| YAPRAK | 2,0 | 0,80 | 1,60 | 1,8 | 1,46 | 2,44 |

Çizelge 4.6. *B. rapa*, *B. campestris* var *toria*, *B. juncea* var *JS-13*, *B. juncea* var *early raya*, *B. juncea* var *S-9*, *B. juncea* var *sind raya* bitkilerinin 100 µM'daki ıslak ağırlıkları (gr)

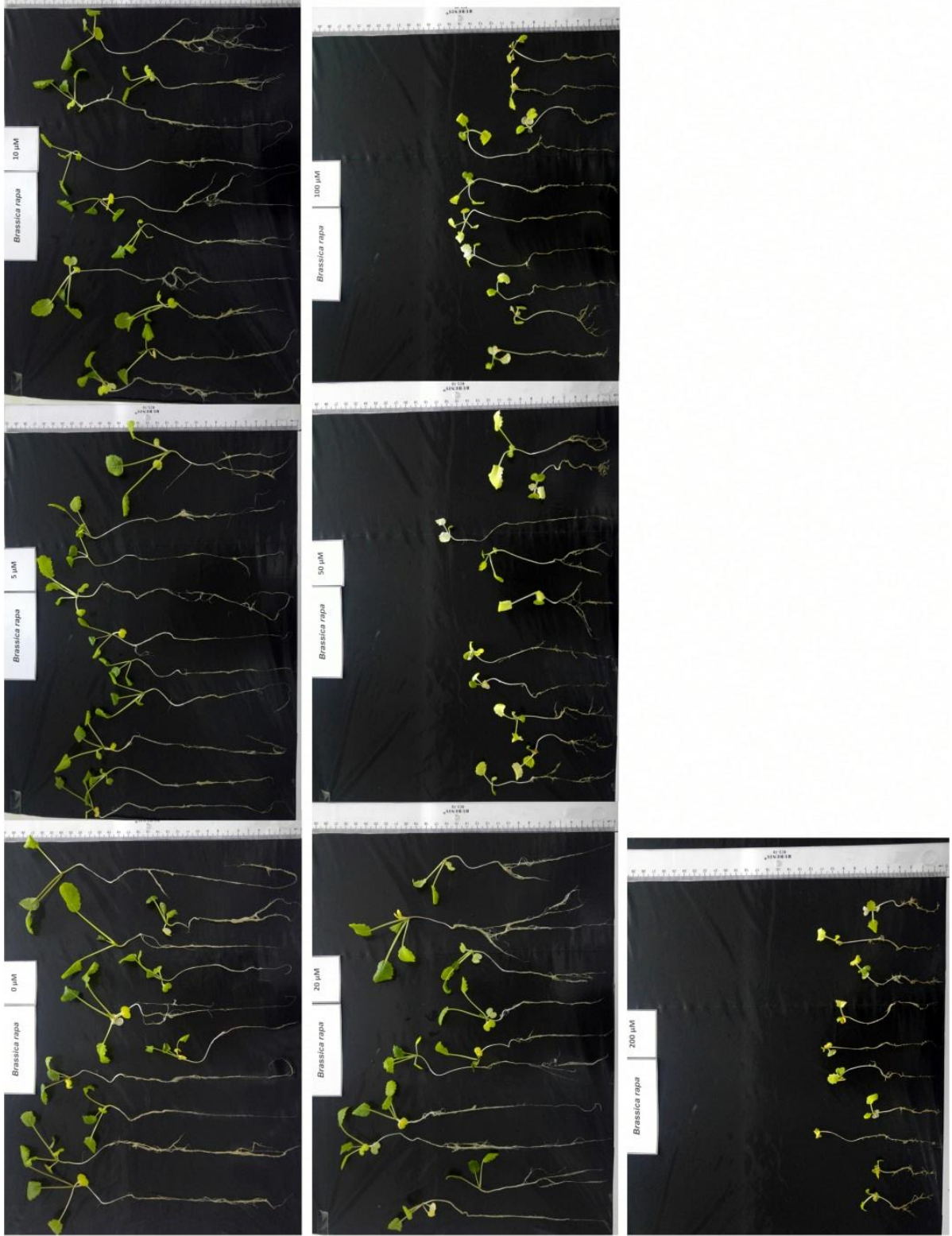
| Türler 100 µM | <i>Brassica rapa</i> | <i>Brassica campestris</i> var <i>toria</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>JS-13</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>early raya</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>S-9</i> | <i>Brassica juncea</i> var <i>sind raya</i> |
|------------------|----------------------|--|--|---|--|--|
| KÖK | 1,16 | 0,40 | 1,25 | 0,9 | 0,68 | 1,26 |
| GÖVDE | 1,16 | 0,50 | 1,46 | 1,36 | 0,76 | 1,34 |
| YAPRAK | 1,65 | 0,55 | 0,72 | 1,65 | 0,70 | 1,32 |

Çizelge 4.7. *B. rapa*, *B. campestris* var *toria*, *B. juncea* var *JS-13*, *B. juncea* var *early raya*, *B. juncea* var *S-9*, *B. juncea* var *sind raya* bitkilerinin RNA izolasyonu için tartılan ağırlıkları

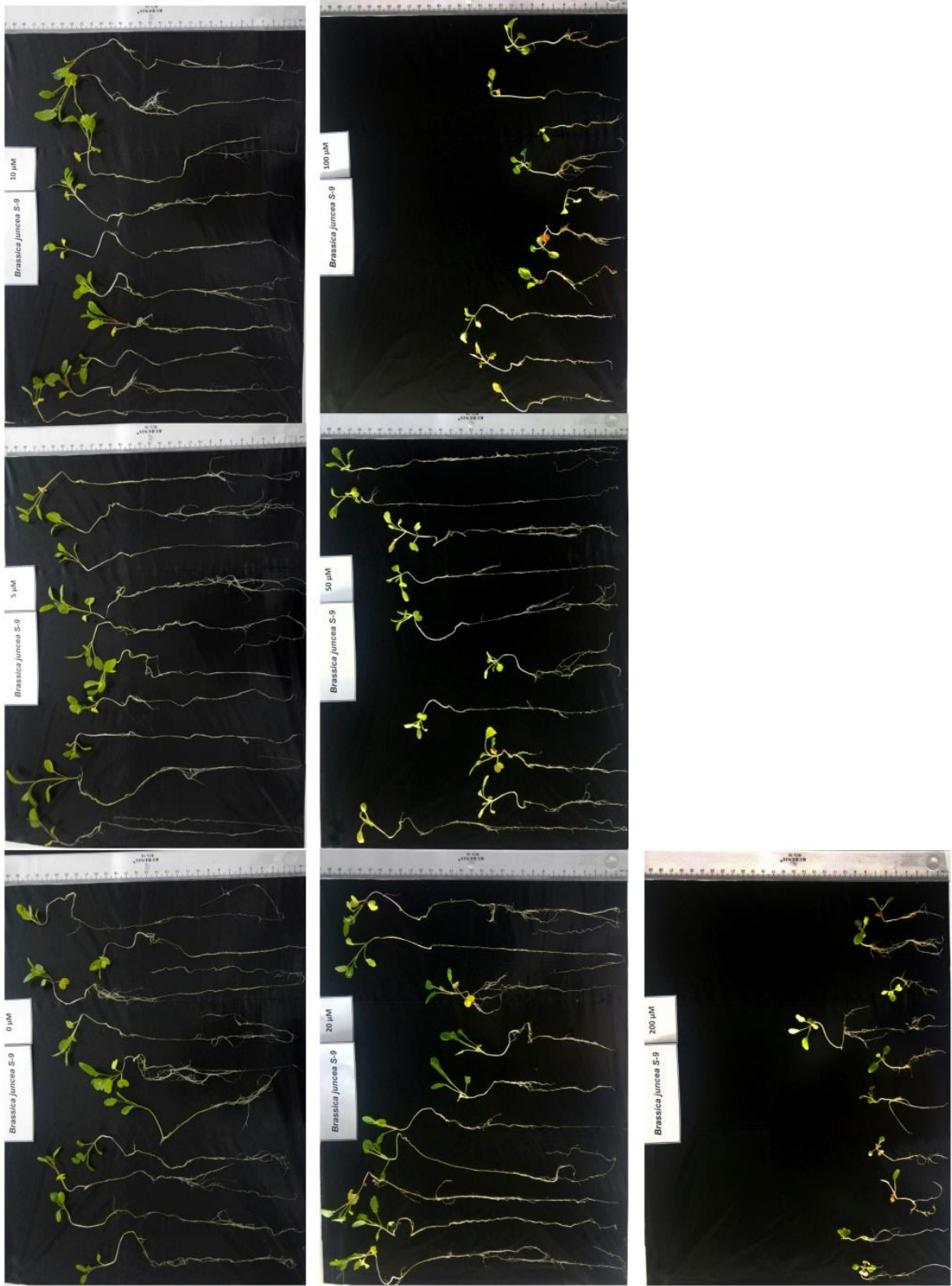
| Türler μM | <i>Brassica</i> <i>rapa</i> | <i>Brassica</i> <i>campestris</i> var <i>toria</i> | <i>Brassica</i> <i>juncea</i> var <i>JS-13</i> | <i>Brassica</i> <i>juncea</i> var <i>early raya</i> | <i>Brassica</i> <i>juncea</i> var <i>S-9</i> | <i>Brassica</i> <i>juncea</i> var <i>sind raya</i> |
|--------------|--------------------------------|--|--|---|--|--|
| 0 μM | 0,172 | 0,097 | 0,111 | 0,171 | 0,123 | 0,119 |
| 5 μM | 0,150 | 0,070 | 0,089 | 0,143 | 0,092 | 0,150 |
| 10 μM | 0,146 | 0,080 | 0,092 | 0,163 | 0,119 | 0,170 |
| 20 μM | 0,100 | 0,060 | 0,080 | 0,136 | 0,099 | 0,177 |
| 50 μM | 0,064 | 0,026 | 0,060 | 0,078 | 0,051 | 0,122 |
| 100 μM | 0,055 | 0,016 | 0,037 | 0,090 | 0,029 | 0,063 |
| 200 μM | 0,034 | 0,029 | - | 0,044 | 0,023 | - |
| 500 μM | 0,005 | - | - | - | - | - |



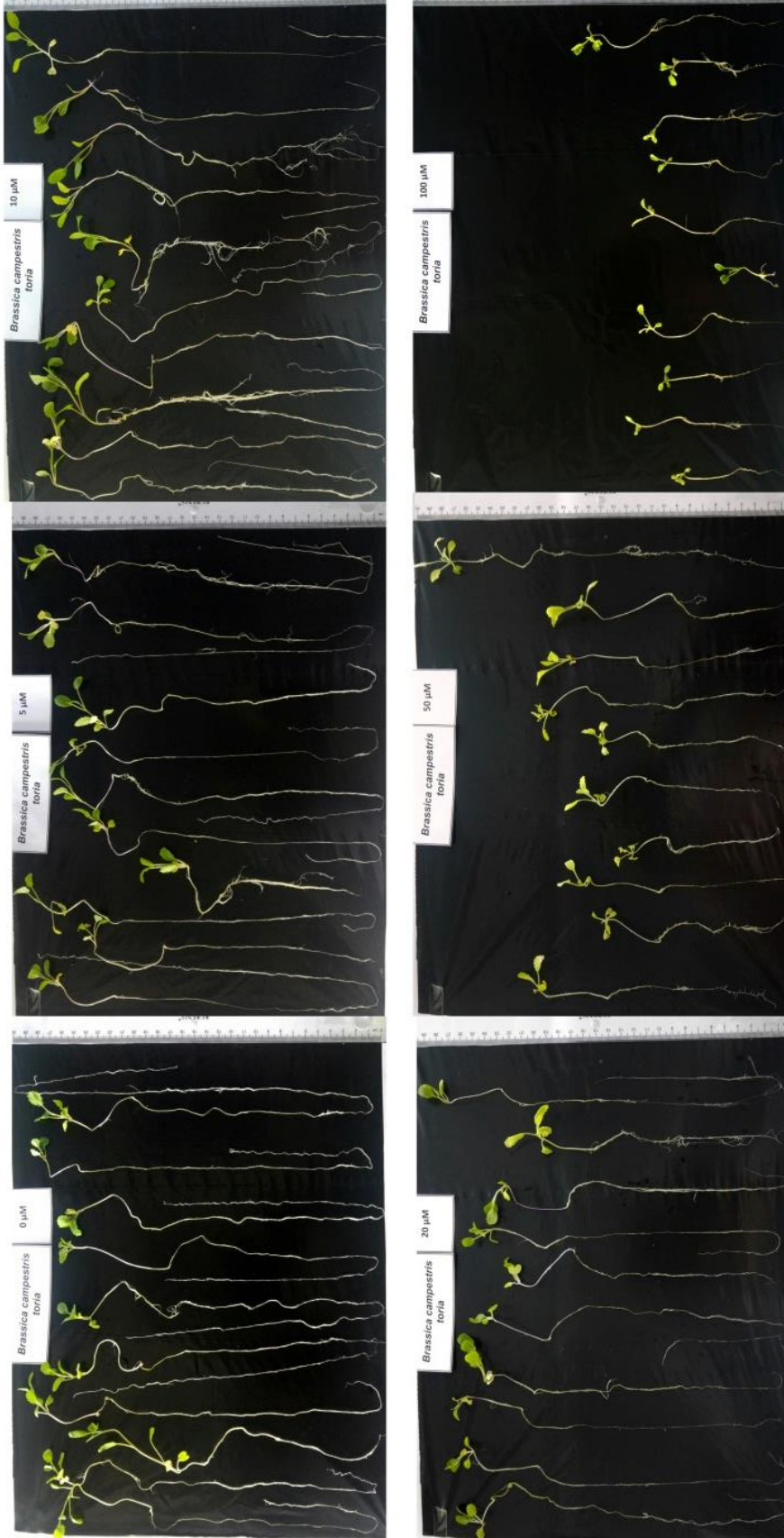
Resim 4.7. *B. juncea* var *early raya* bitkisinin 31 gün sonundaki morfolojisi



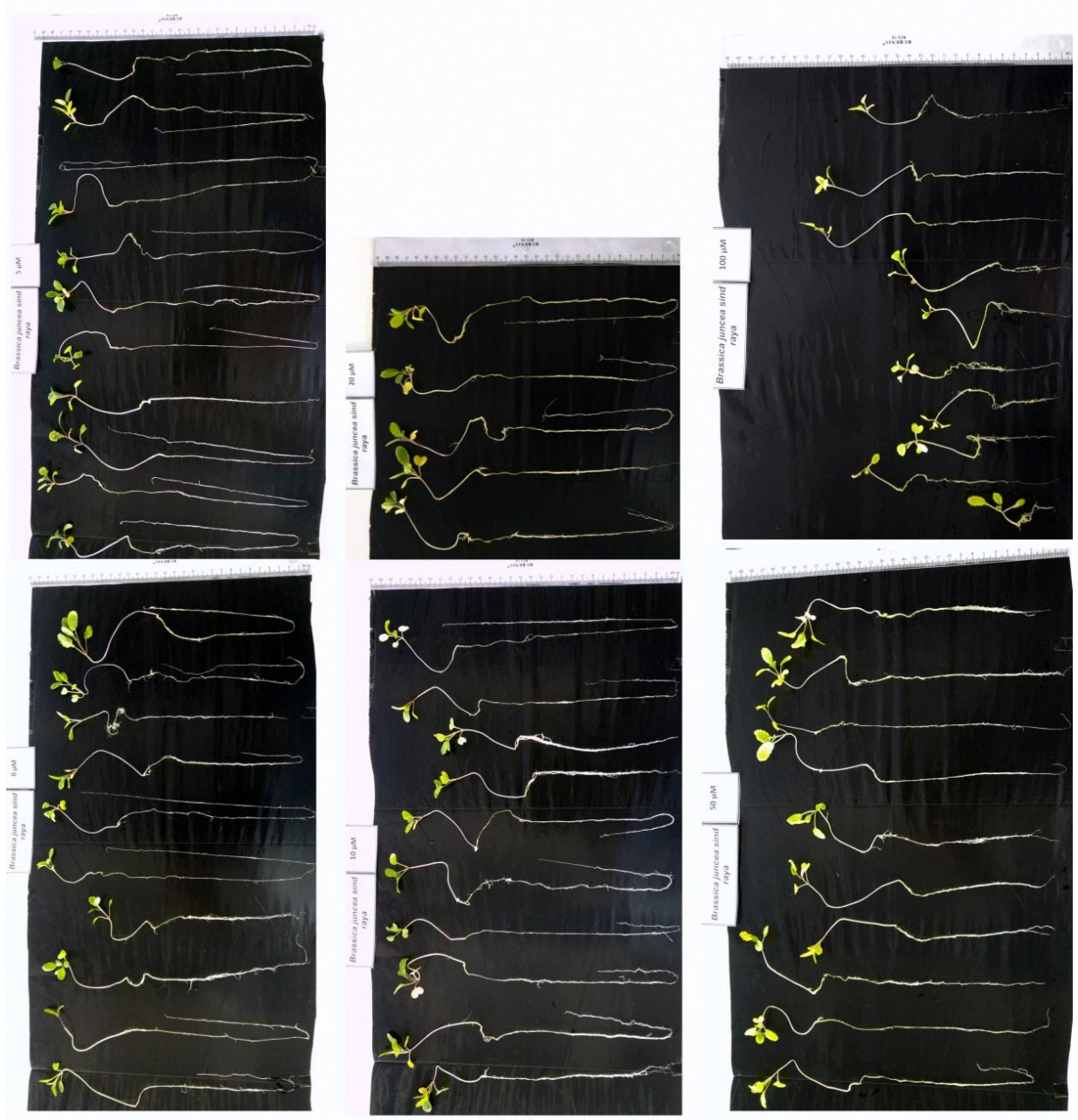
Resim 4.8. *B. rapa* bitkisinin 31 gün sonundaki morfolojisi



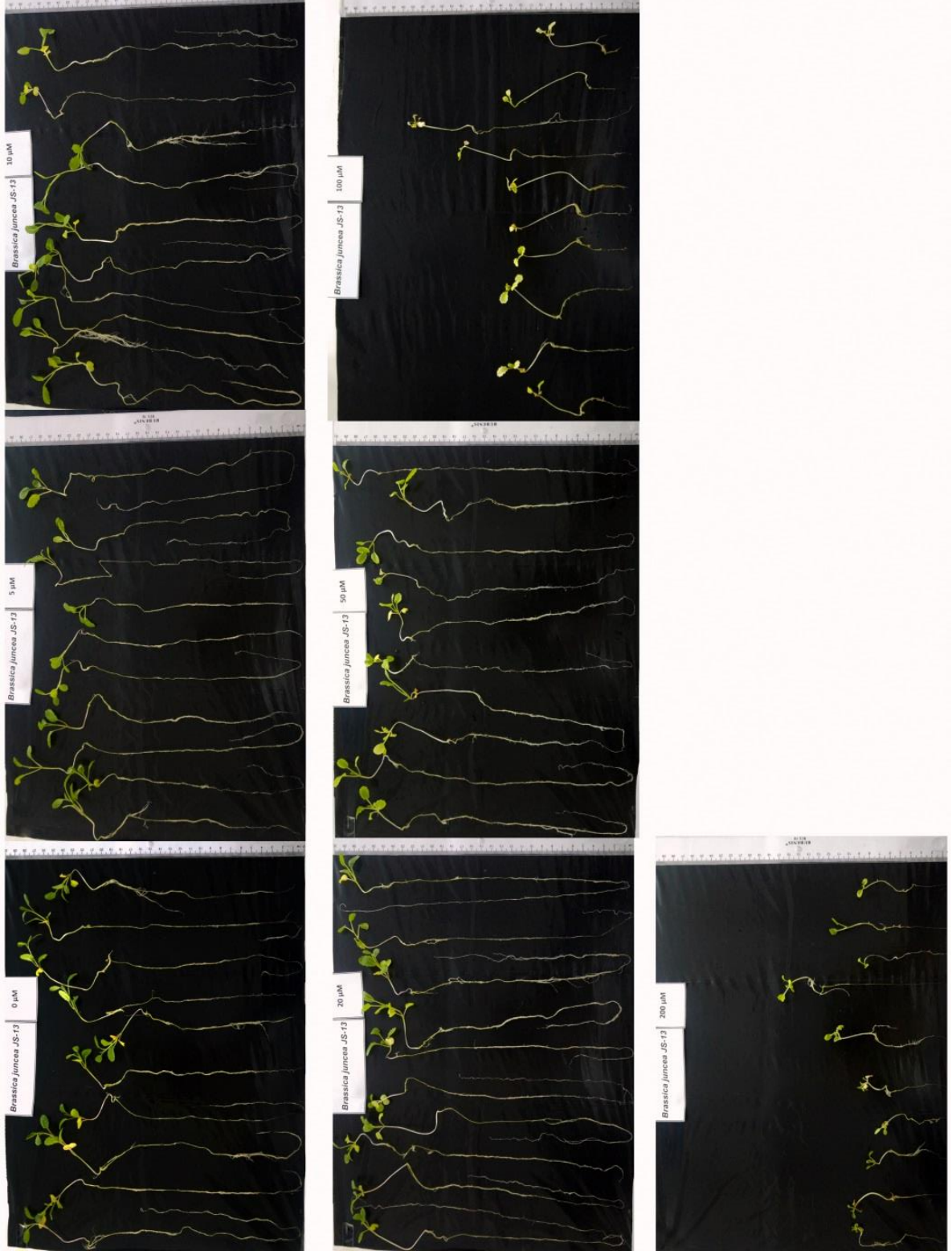
Resim 4.9. *B. juncea* var *S-9* bitkisinin 31 gün sonundaki morfolojisi



Resim 4.10. *B. campestris* var *toria* bitkisinin 31 gün sonundaki morfolojisi



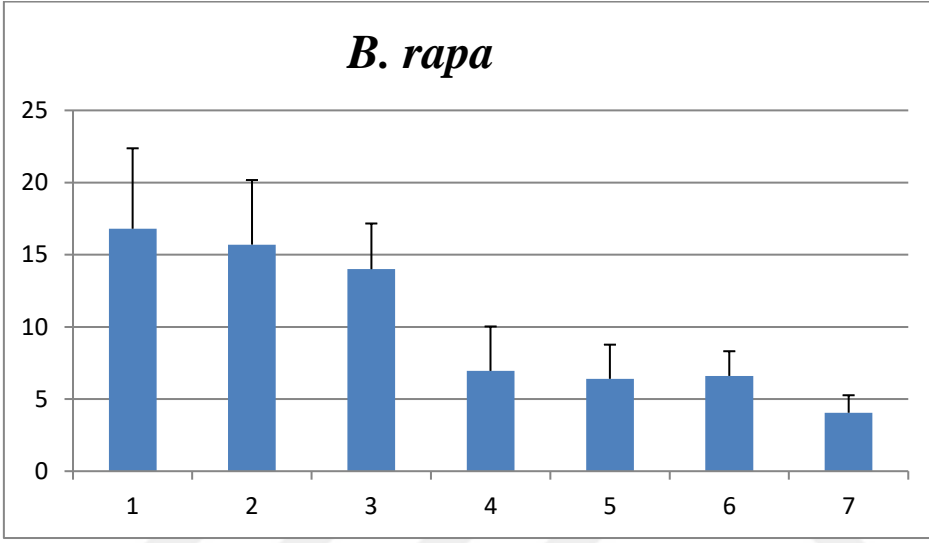
Resim 4.11. *B. juncea* var *sind raya* bitkisinin 31 gün sonundaki morfolojisi



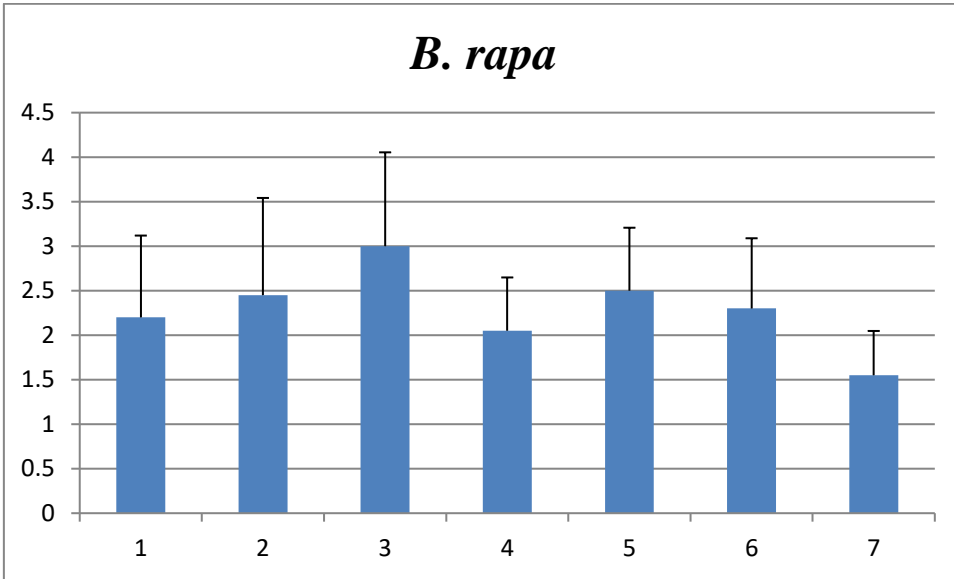
Resim 4.12. *B. juncea* var *JS-13* bitkisinin 31 gün sonundaki morfolojisi

4.1. Hasat Edilen Bitkilerin Kök ve Gövde Uzunlukları

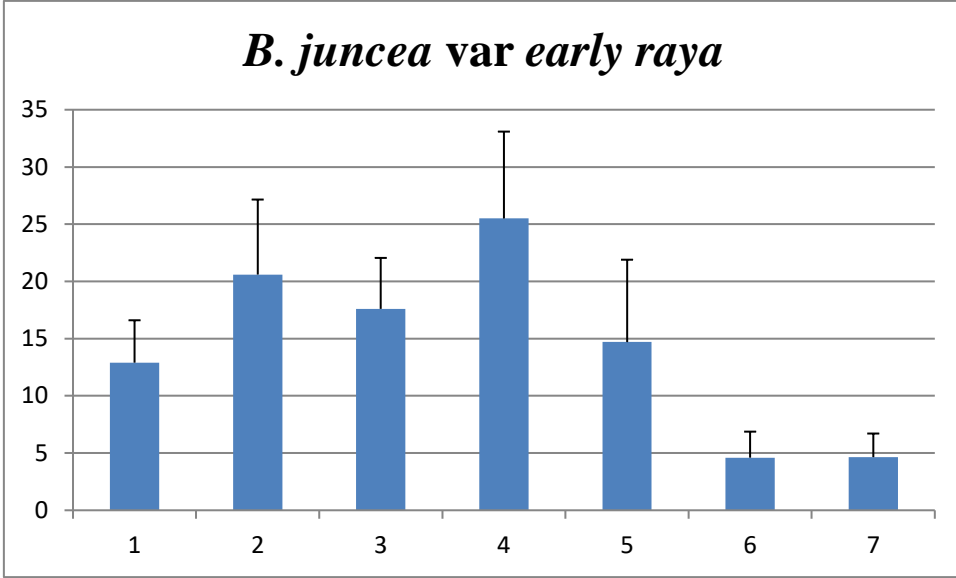
Ölçümler yapılırken bitkilerin her bir parametresi için 10'ar bitki seçilmiştir.. *B. juncea* var *sind raya* bitkisinin 200 μ M parametresi hariç tüm parametreleri 10'ar örnekten ölçülmüştür. Sebebi örnek sayısının azlığından değil çekim sırasındaki karışıklıktan kaynaklıdır. Grafiklerdeki x eksenindeki 1 değeri 0 μ M'ı, 2 değeri 5 μ M, 3 değeri 10 μ M'ı, 4 değeri 20 μ M'ı, 5 değeri 50 μ M'ı, 6 değeri 100 μ M, 7 değeri 200 μ M'ı göstermektedir.



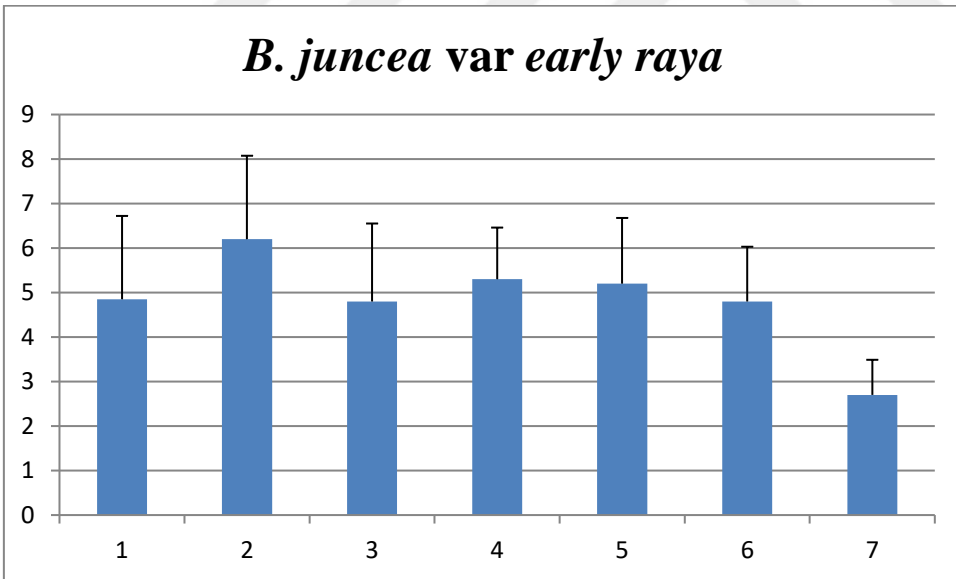
Şekil 4.1. *B. rapa* bitkisinin 0-200 μ M parametrelerindeki kök uzunlukları



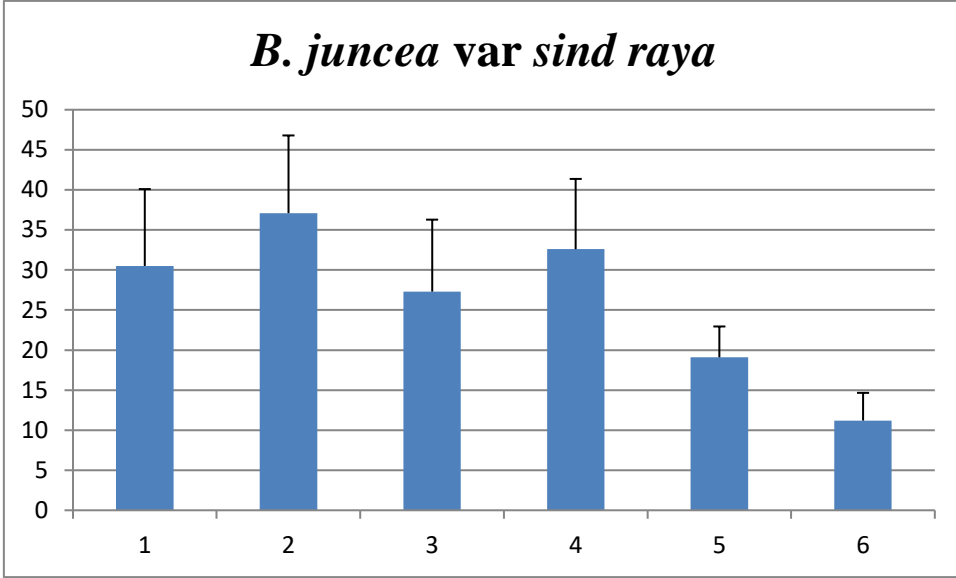
Şekil 4.2. *B. rapa* bitkisinin 0-200 μ M parametrelerindeki gövde uzunlukları



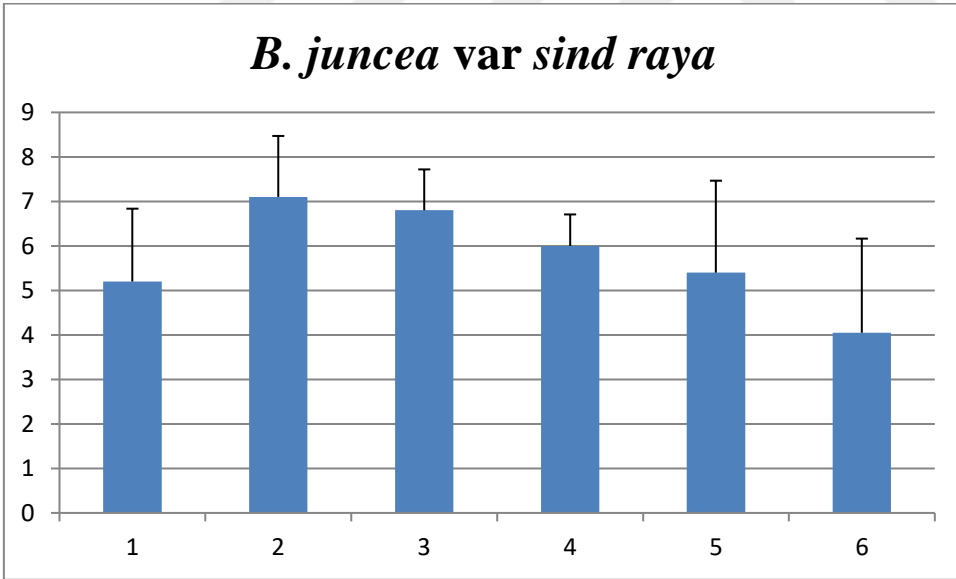
Şekil 4.3. *B. juncea var early raya* bitkisinin 0-200 µM parametrelerindeki kök uzunlukları



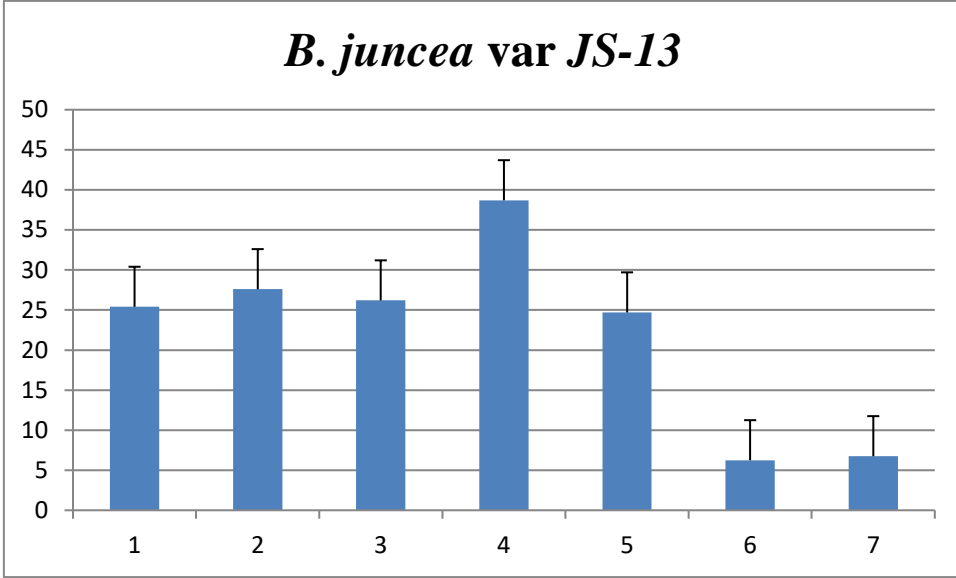
Şekil 4.4. *B. juncea var early raya* bitkisinin 0-200 µM parametrelerindeki gövde uzunlukları



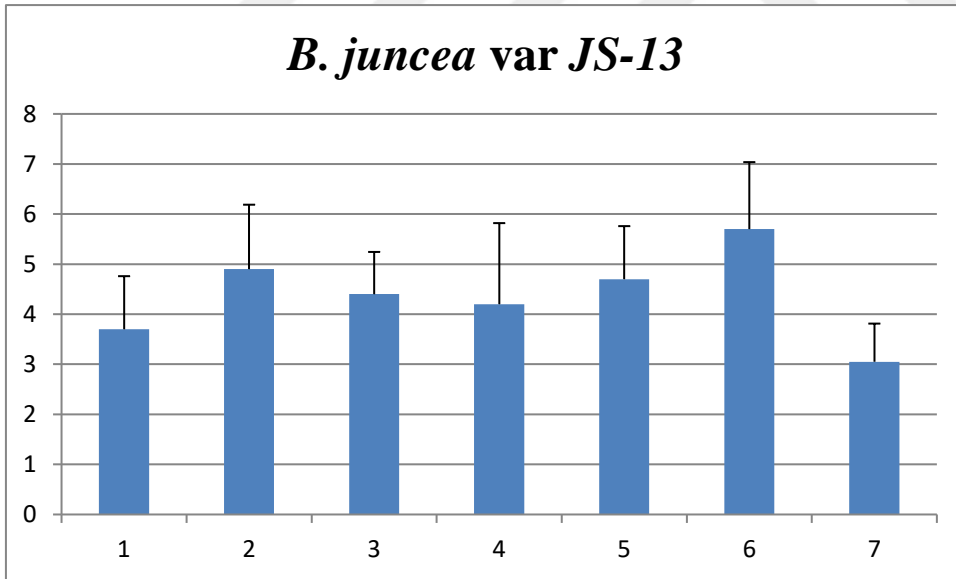
Şekil 4.5. *B. juncea var sind raya* bitkisinin 0-100 μ M parametrelerindeki kök uzunlukları



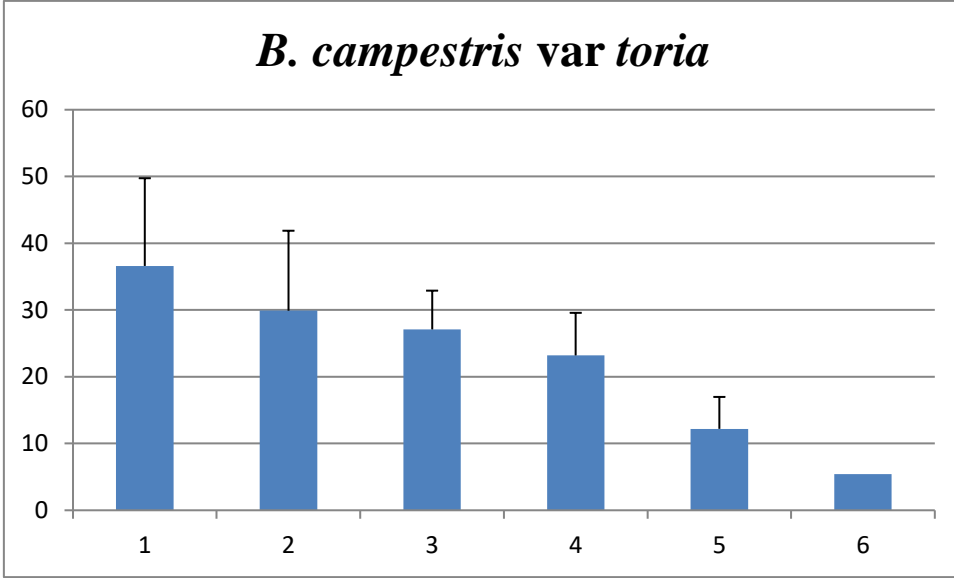
Şekil 4.6. *B. juncea var sind raya* bitkisinin 0-100 μ M parametrelerindeki gövde uzunlukları



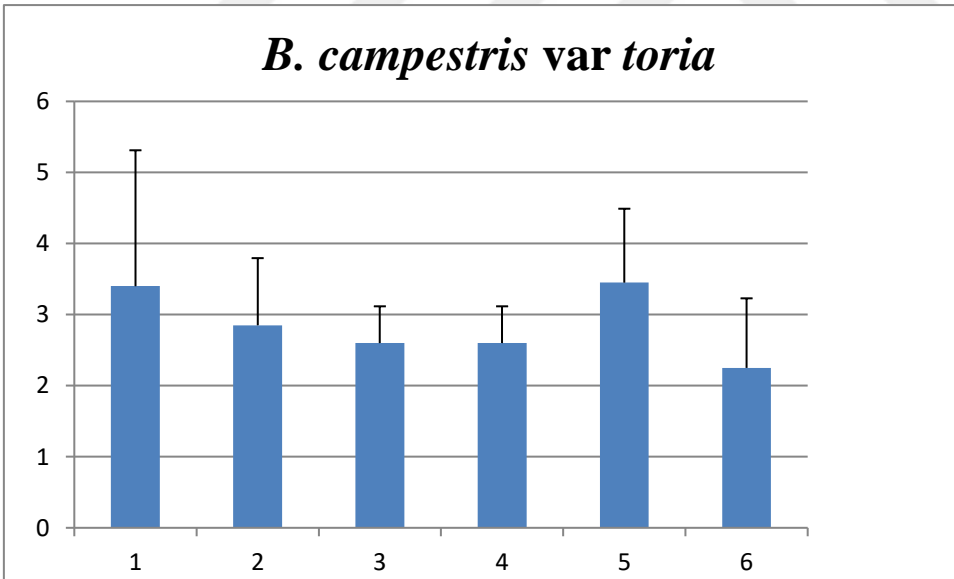
Şekil 4.7. *B. juncea* var *JS-13* bitkisinin 0-200 μ M parametrelerindeki kök uzunlukları



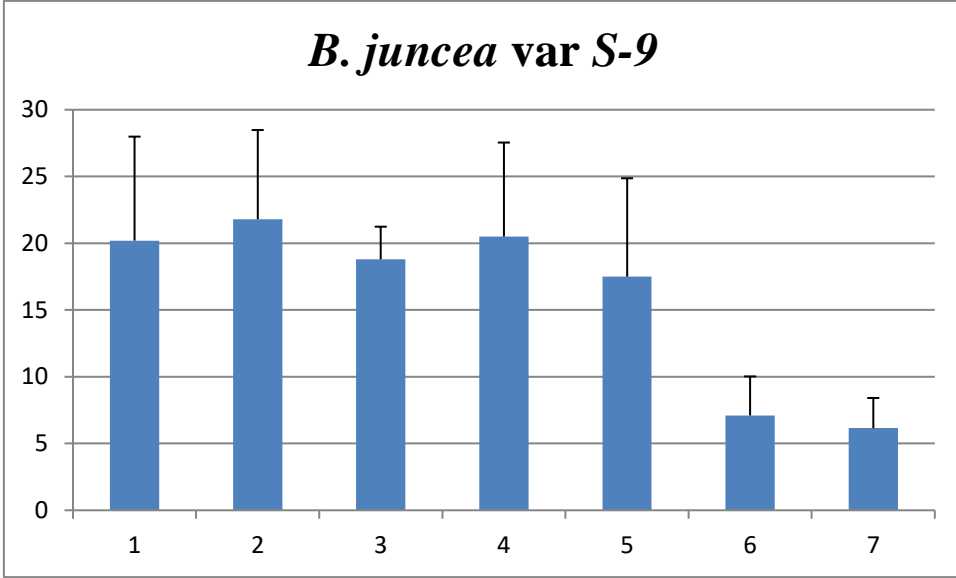
Şekil 4.8. *B. juncea* var *JS-13* bitkisinin 0-200 μ M parametrelerindeki gövde uzunlukları



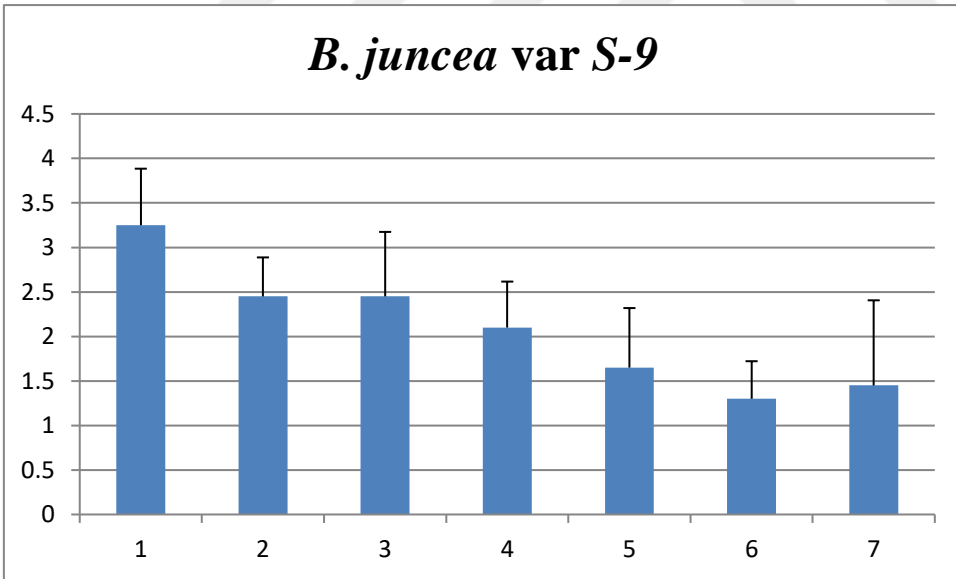
Şekil 4.9. *B. campestris var toria* bitkisinin 0-100 μ M parametrelerindeki kök uzunlukları



Şekil 4.10. *B. campestris var toria* bitkisinin 0-100 μ M parametrelerindeki gövde uzunlukları



Şekil 4.11. *B. juncea* var *S-9* bitkisinin 0-200 μ M parametrelerindeki kök uzunlukları



Şekil 4.12. *B. juncea* var *S-9* bitkisinin 0-200 μ M parametrelerindeki gövde uzunlukları

Çizelge 4.8. Farklı Cd konsantrasyonlarında yetiştirilen bitkilerin kök ve gövde uzunlukları (ort±stdsapma, cm)

| <i>Brassica rapa</i> | | |
|--------------------------------|-------------|-----------|
| Parametreler | Kök | Gövde |
| 0 µM | 16,8 ± 5,57 | 2,2±0,91 |
| 5 µM | 15,7±4,47 | 2,45±1,09 |
| 10 µM | 14±3,16 | 3±1,05 |
| 20 µM | 6,95±3,07 | 2,05±0,59 |
| 50 µM | 6,4±2,36 | 2,5±0,70 |
| 100 µM | 6,6±1,71 | 2,3±0,78 |
| 200 µM | 4,05±1,21 | 1,55±0,49 |
| <i>B. campestris var toria</i> | | |
| Parametreler | Kök | Gövde |
| 0 µM | 36,6±13,14 | 3,4±1,91 |
| 5 µM | 29,9±11,97 | 2,85±0,94 |
| 10 µM | 27,1±5,80 | 2,6±0,51 |
| 20 µM | 23,2±6,37 | 2,6±0,51 |
| 50 µM | 12,2±4,77 | 3,45±1,03 |
| 100 µM | 5,4±2,41 | 2,25±0,97 |
| <i>B. juncea var S-9</i> | | |
| Parametreler | Kök | Gövde |
| 0 µM | 20,2±7,78 | 3,25±0,63 |
| 5 µM | 21,8±6,67 | 2,45±0,43 |
| 10 µM | 18,8±2,44 | 2,45±0,72 |
| 20 µM | 20,5±7,04 | 2,1±0,51 |

| | | |
|--|-----------|-----------|
| 50 µM | 17,5±7,36 | 1,65±0,66 |
| 100 µM | 7,1±2,92 | 1,3±0,42 |
| 200 µM | 6,15±2,26 | 1,45±0,95 |
| <i>B. juncea</i> var <i>sind raya</i> | | |
| Parametreler | Kök | Gövde |
| 0 µM | 30,5±9,59 | 5,2±1,63 |
| 5 µM | 37,1±9,68 | 7,1±1,37 |
| 10 µM | 27,3±8,98 | 6,8±0,91 |
| 20 µM | 32,6±8,76 | 6±0,70 |
| 50 µM | 19,1±3,84 | 5,4±2,06 |
| 100 µM | 11,2±3,45 | 4,05±2,11 |
| <i>B. juncea</i> var <i>JS-13</i> | | |
| Parametreler | Kök | Gövde |
| 0 µM | 25,4±6,97 | 3,7±1,05 |
| 5 µM | 27,6±8,12 | 4,9±1,28 |
| 10 µM | 26,2±4,54 | 4,4±0,84 |
| 20 µM | 38,7±8,95 | 4,2±1,61 |
| 50 µM | 24,7±5,45 | 4,7±1,05 |
| 100 µM | 6,25±4,06 | 5,7±1,33 |
| 200 µM | 6,75±2,87 | 3,05±0,76 |
| <i>B. juncea</i> var <i>early raya</i> | | |
| Parametreler | Kök | Gövde |
| 0 µM | 12,9±3,70 | 4,85±1,87 |
| 5 µM | 20,6±6,55 | 6,2±1,87 |

| | | |
|--------|-----------|----------|
| 10 µM | 17,6±4,45 | 4,8±1,75 |
| 20 µM | 25,5±7,59 | 5,3±1,15 |
| 50 µM | 14,7±7,19 | 5,2±1,47 |
| 100 µM | 4,6±2,27 | 4,8±1,22 |
| 200 µM | 4,65±2,05 | 2,7±0,78 |

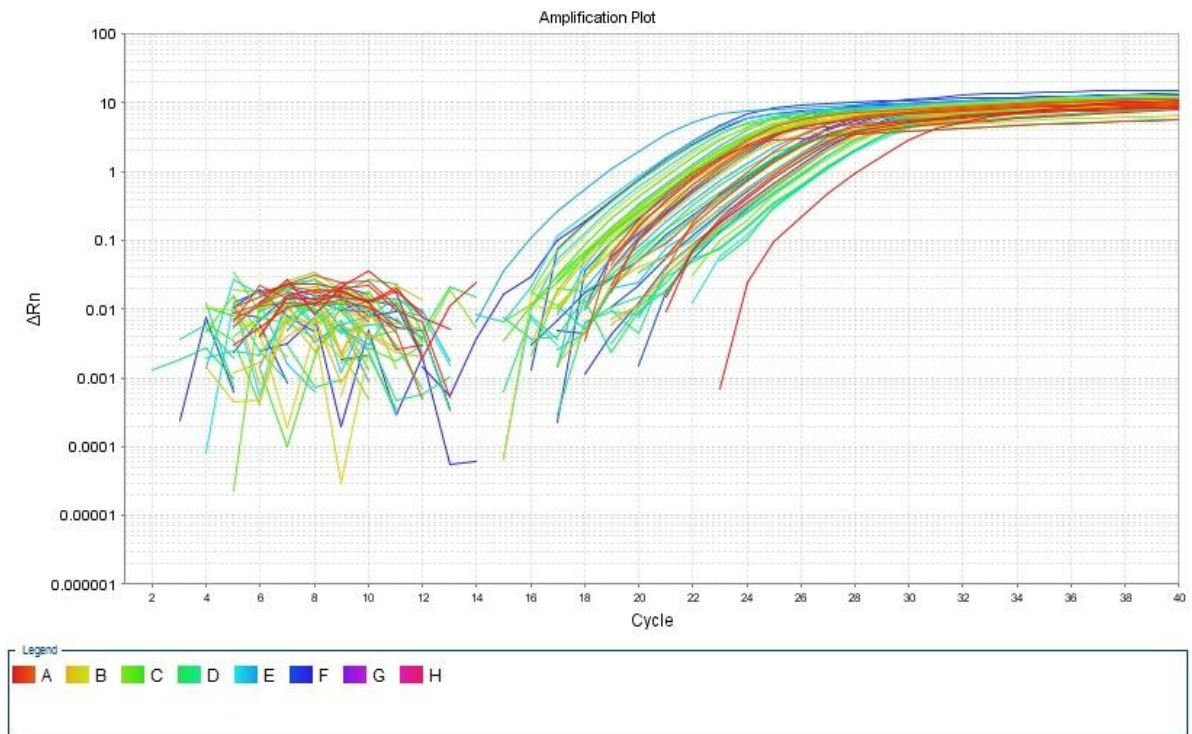
4.2. Total RNA Miktar Tayini

Dokulardan izolasyonu yapılan total RNA'ların saflığının ve miktarının belirlenmesi için Thermo'nun NanoDrop spektrofotometre cihazında 260 nm ve 280 nm dalga boylarında okumalar yapılmıştır. Bu analizlerin sonucunda RNA'ların saflıkları ve miktarları ideal-optimal sonuçlar vermiştir.

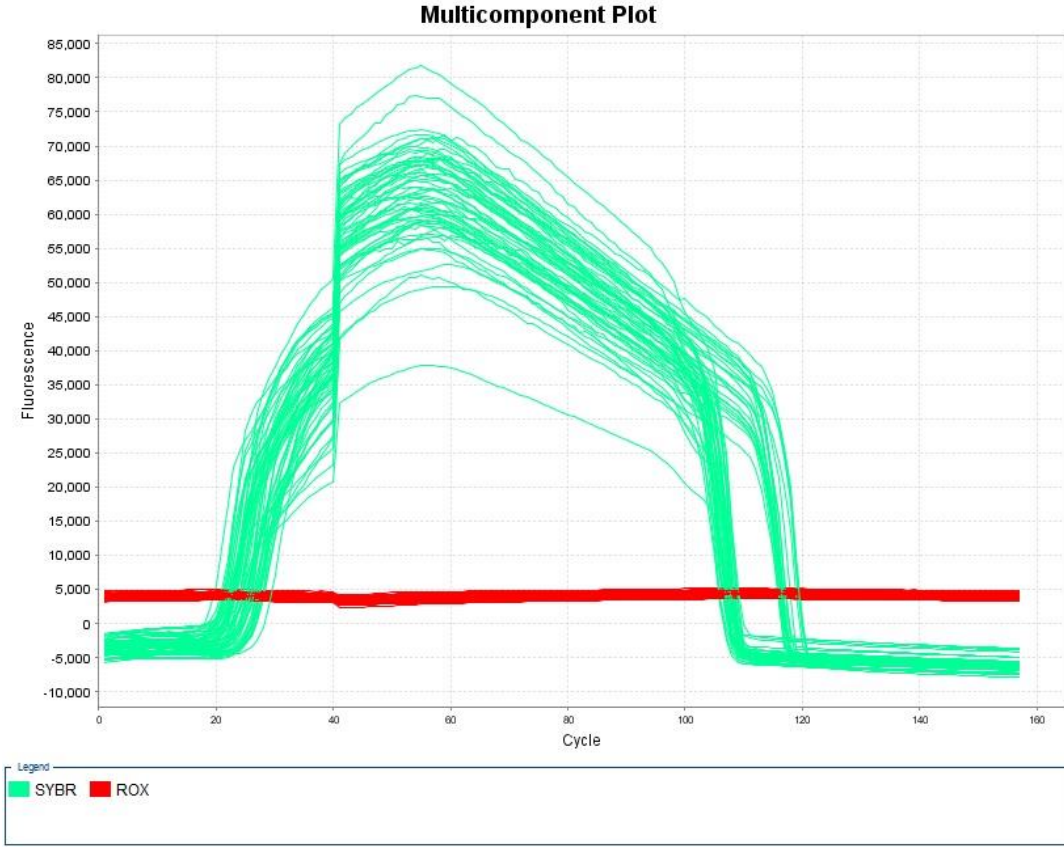
Çizelge 4.9. NanoDrop spektrofotometre cihazında ölçülen RNA'ların saflıkları ve miktarları

| # | Örnek | Nükleik asit konsantrasyonu | Unit | A260 | A280 | 260/280 | 260/230 | Faktör |
|----|-----------|-----------------------------|-------|-------|-------|---------|---------|--------|
| 1 | Sind 0 | 16,7 | ng/µl | 0,418 | 0,220 | 1,90 | 0,10 | 40,00 |
| 2 | Sind 5 | 23,2 | ng/µl | 0,581 | 0,303 | 1,92 | 0,32 | 40,00 |
| 3 | Sind 10 | 14,1 | ng/µl | 0,351 | 0,188 | 1,87 | 0,13 | 40,00 |
| 4 | Sind 20 | 12,4 | ng/µl | 0,311 | 0,162 | 1,92 | 0,26 | 40,00 |
| 5 | Sind 50 | 24,7 | ng/µl | 0,617 | 0,324 | 1,91 | 0,23 | 40,00 |
| 6 | Sind 100 | 79,1 | ng/µl | 1,978 | 0,974 | 2,03 | 0,28 | 40,00 |
| 7 | Early 0 | 18,3 | ng/µl | 0,458 | 0,239 | 1,92 | 0,14 | 40,00 |
| 8 | Early 5 | 15,4 | ng/µl | 0,385 | 0,199 | 1,94 | 0,32 | 40,00 |
| 9 | Early 10 | 23,8 | ng/µl | 0,596 | 0,290 | 2,06 | 0,10 | 40,00 |
| 10 | Early 20 | 17,7 | ng/µl | 0,443 | 0,220 | 2,02 | 0,30 | 40,00 |
| 11 | Early 50 | 26,7 | ng/µl | 0,668 | 0,357 | 1,87 | 0,30 | 40,00 |
| 12 | Early 100 | 32,5 | ng/µl | 0,813 | 0,432 | 1,88 | 0,21 | 40,00 |

| | | | | | | | | |
|----|----------|------|-------------|-------|-------|------|------|-------|
| 13 | Rapa 0 | 12,3 | ng/ μ l | 0,308 | 0,157 | 1,96 | 0,14 | 40,00 |
| 14 | Rapa 5 | 10,4 | ng/ μ l | 0,261 | 0,128 | 2,04 | 0,22 | 40,00 |
| 15 | Rapa 10 | 7,8 | ng/ μ l | 0,196 | 0,095 | 2,07 | 0,12 | 40,00 |
| 16 | Rapa 20 | 37,2 | ng/ μ l | 0,931 | 0,485 | 1,92 | 1,09 | 40,00 |
| 17 | Rapa 50 | 23,9 | ng/ μ l | 0,596 | 0,308 | 1,94 | 0,25 | 40,00 |
| 18 | Rapa 100 | 14,2 | ng/ μ l | 0,355 | 0,172 | 2,06 | 0,25 | 40,00 |



Şekil 4.13. Aplication plot- Logaritmik reaksiyon artış grafiği



Şekil 4.14. SYBR boyasının reaksiyondaki spektral grafiği

4.3. Real Time PCR Çalışması

4.3.1. Gen Ekspresyonu

Bu çalışmada, *Brassicaceae* familyasına ait olan *B. rapa* ve *B. juncea* 'ya ait *B. juncea* var *sind raya* ve *B. juncea* var *early raya* 'nın hiperakümülatör bitki adayları çerçevesinde incelenmek üzere seçilmiştir. *B. juncea* var *sind raya* bitkisinin 0 μ M parametresindeki örneği HMA2 ve HMA4 genleri için kontrol olarak alınmıştır.

Hiperakümülatör bitkilerin yüksek metal toleransı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle seçilen bitkilere 31 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda Cd ağır metali verilerek bitki hücrelerinde biriken Cd miktarı ve bitkinin gelişimi analiz edilmiştir. Ayrıca bu bitkilerin Cd birikimini için rol aldığı düşünülen HMA2 ve HMA4 genlerinin ekspresyon analizi yapılarak sonuçlar ortaya konmuştur. *B. rapa*, *B. juncea* var *sind raya* ve *B. juncea* var *early raya* bitkilerine 0 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M olmak üzere 6 ayrı parametrede Cd uygulanmış olup bitki gelişimine zarar vermeden en yüksek Cd konsantrasyonunun bulunması hedeflenmiştir.

Uygulanan bu 6 farklı konsantrasyonda metal toleransında etkin olduğu düşünölen HMA2 ve HMA4 genlerinin ekspresyonlarına bakılmıştır. Yapılan qPCR çalışması sonucunda bu genlerin farklı Cd konsantrasyonlarında ekspresyonun arttığı görölmüşür.

HMA2 geni için; *B. rapa*'nın 20 µM ve *B. juncea* var *sind raya*'nın 20 µM konsantrasyonlarında ekspresyonun arttığı görölrken, *B. juncea* var *early raya* bitkisinin bütün konsantrasyonları için kontrol grubuna göre ekspresyonunda bir değişiklik gözlenmemiştir.

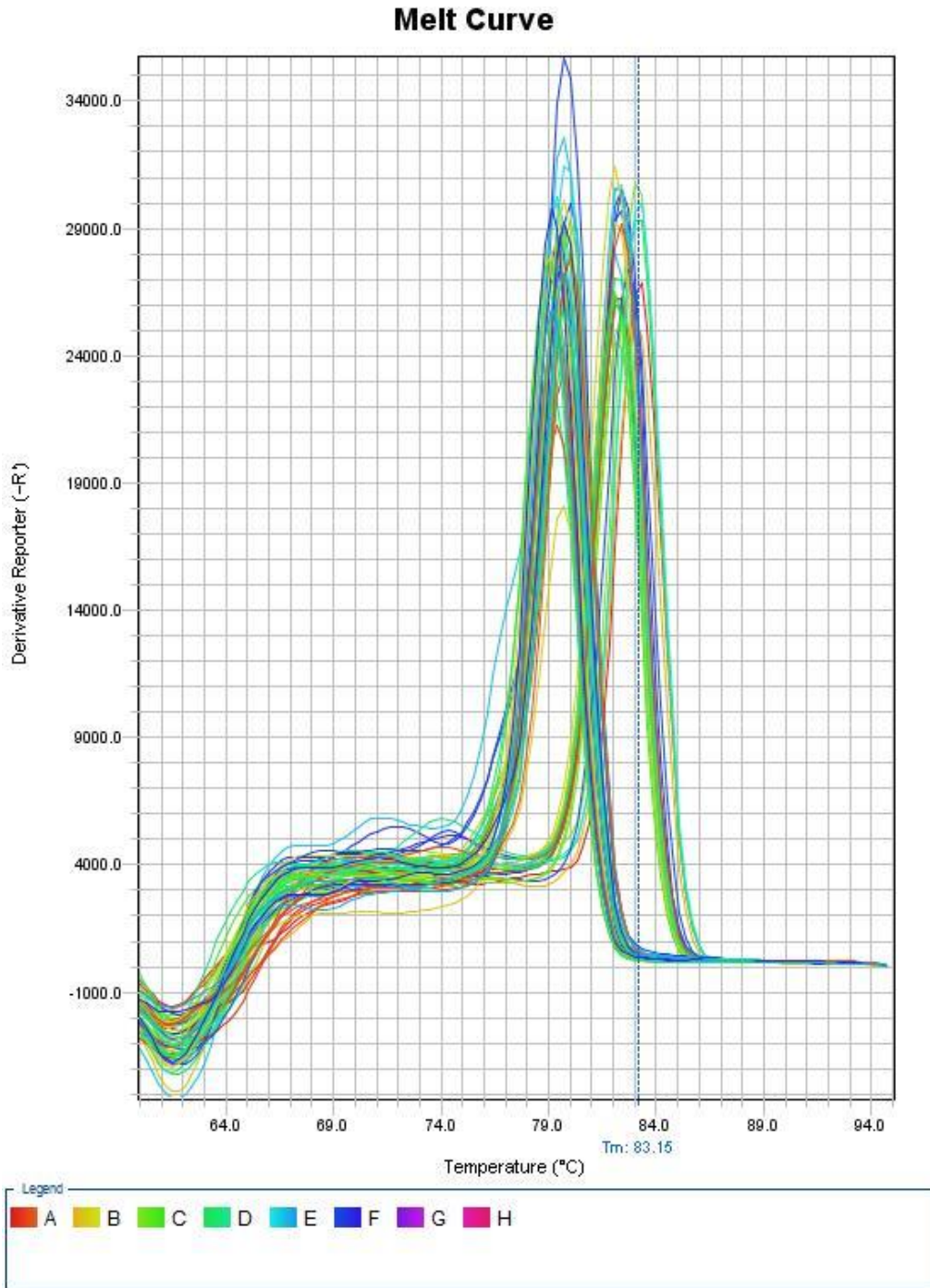
HMA4 geni için; *B. juncea* var *early raya* 'nın 10 µM, *B. rapa* 'nın 20 µM ve *B. juncea* var *sind raya* 'nın 20 µM konsantrasyonlarında ekspresyonun arttığı tespit edilmiştir.

Ekspresyon çalışmaları sonucuyla metal tayini sonuçları HMA4 geni için birbirleriyle paralellik göstermiş olup HMA4 geni için ekspresyonun arttığı konsantrasyonlarda, yaprakta biriken Cd birikimi sonuçları paralellik gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak HMA2 geni için bu paralellik saptanamamıştır.

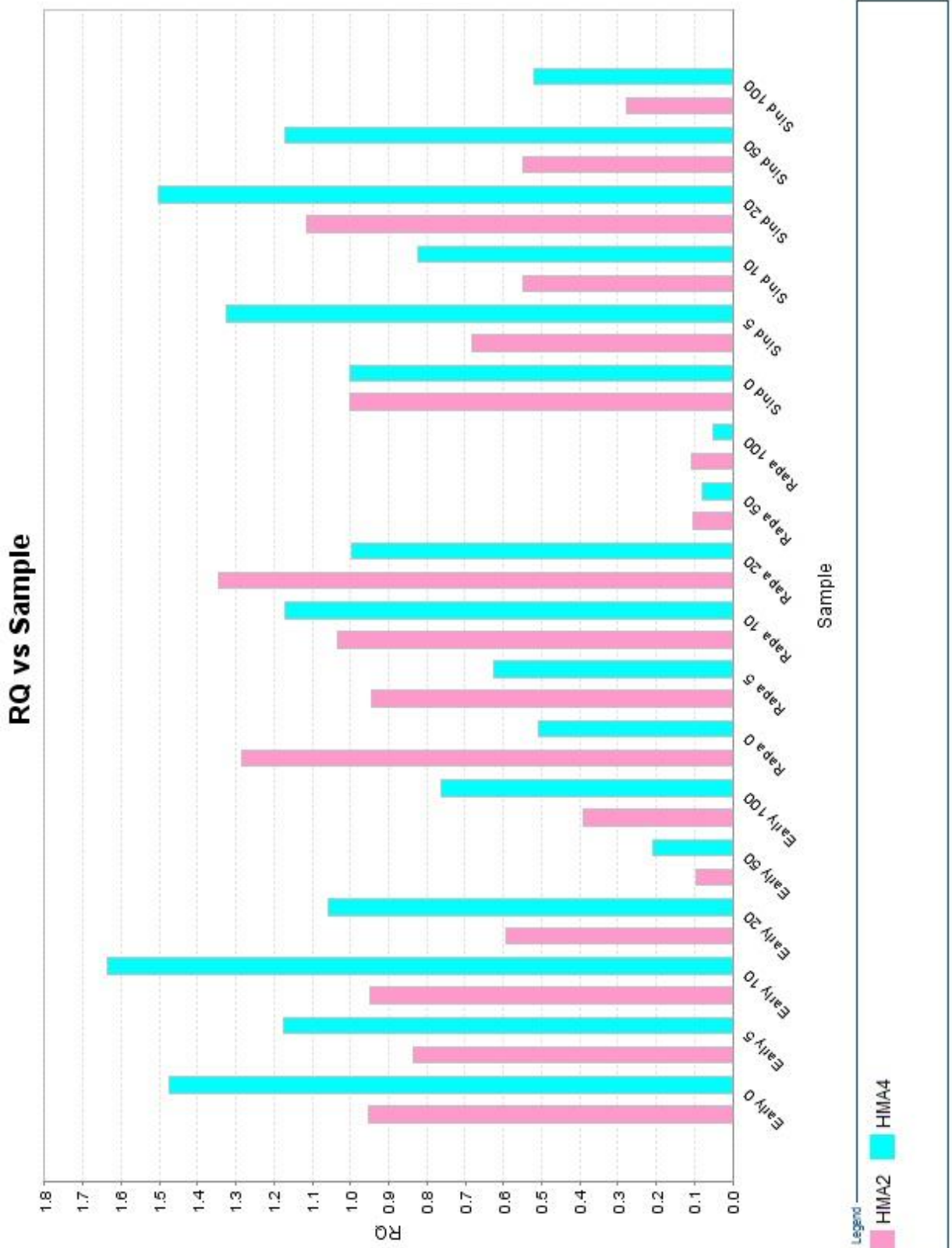
Tüm bu sonuçlara bakılarak *B. rapa*, *B. juncea* var *sind raya* ve *B. juncea* var *early raya* bitkilerinin Cd hiperakümülatörü olabileceği ve bunu da HMA4 geninin ekspresyonuyla gerçekleştirebileceği görölmüşür.

Melt Curve

Çalışma SYBR Green esasına dayandığı için primerlerin hedeflenen genlere bağlandığını ve amplifikasyonun gerçekleştğini görüntölemek amacıyla melt curve analizi yapılmıştır. Melt Curve analizi sonucunda hedeflenen HMA2, HMA4 ve Ubiquitin genlerinin ekspresyonunun doğruluğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.15. Melt Curve grafiği



Şekil 4.16. HMA2 ve HMA4 genlerin çalışılan örneklerdeki ekspresyon grafiği

Çizelge 4.10. Real time PCR gen ekspresyonu değerleri (RQ, CT, ΔC_T ve $\Delta \Delta C_T$)

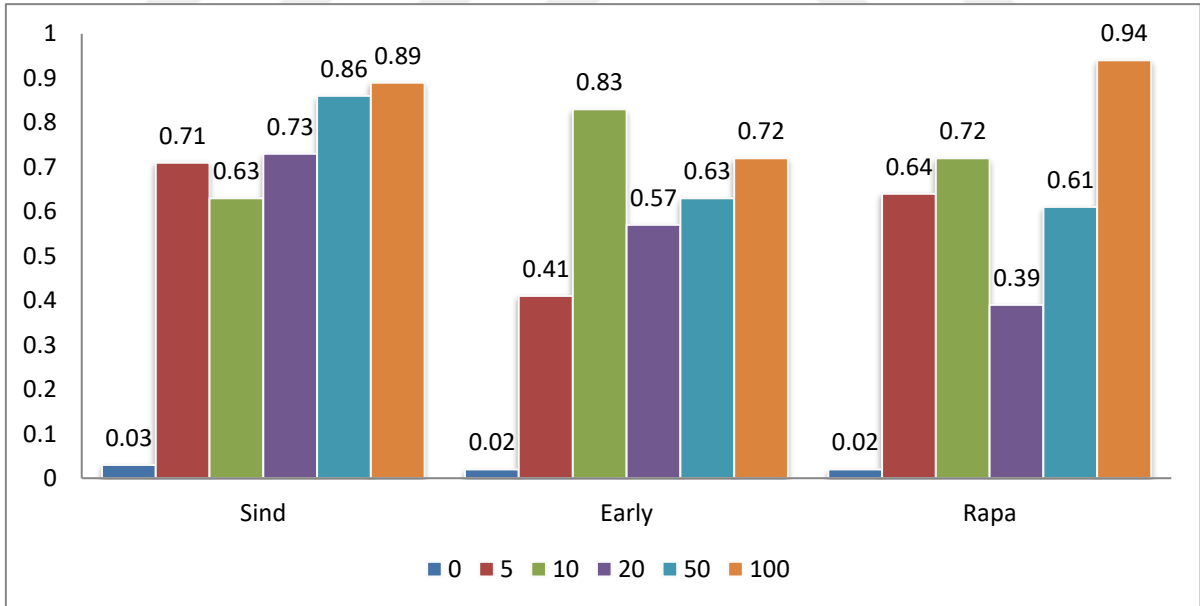
| Örnek Adı | Hedef Gen | RQ | C _T | ΔC_T Mean | $\Delta \Delta C_T$ |
|-----------|-----------|----------|----------------|-------------------|---------------------|
| Sind 0 | HMA2 | 1 | 23,01296 | 0,50514 | 0 |
| Sind 0 | HMA4 | 1 | 23,35287 | 0,845049 | 0 |
| Sind 0 | UBIQUTIN | | 22,50782 | | |
| Early 0 | HMA2 | 0,952135 | 20,7574 | 0,575903 | 0,070763 |
| Early 0 | HMA4 | 1,473854 | 20,46696 | 0,285456 | -0,55959 |
| Early 0 | UBIQUTIN | | 20,1815 | | |
| Rapa 0 | HMA2 | 1,283846 | 20,62149 | 0,144669 | -0,36047 |
| Rapa 0 | HMA4 | 0,508775 | 22,29677 | 1,81995 | 0,974901 |
| Rapa 0 | UBIQUTIN | | 20,47682 | | |
| | | | | | |
| Sind 5 | HMA2 | 0,68153 | 23,41335 | 1,05829 | 0,55315 |
| Sind 5 | HMA4 | 1,326259 | 22,79275 | 0,437687 | -0,40736 |
| Sind 5 | UBIQUTIN | | 22,35506 | | |
| Early 5 | HMA2 | 0,836853 | 20,89743 | 0,762094 | 0,256954 |
| Early 5 | HMA4 | 1,173211 | 20,74992 | 0,614586 | -0,23046 |
| Early 5 | UBIQUTIN | | 20,13533 | | |
| Rapa 5 | HMA2 | 0,945013 | 19,51243 | 0,586735 | 0,081594 |
| Rapa 5 | HMA4 | 0,624674 | 20,44957 | 1,523874 | 0,678825 |
| Rapa 5 | UBIQUTIN | | 18,9257 | | |
| | | | | | |
| Sind 10 | HMA2 | 0,547768 | 19,86617 | 1,373505 | 0,868364 |
| Sind 10 | HMA4 | 0,821893 | 19,62069 | 1,128027 | 0,282978 |
| Sind 10 | UBIQUTIN | | 18,49266 | | |
| Early 10 | HMA2 | 0,948223 | 20,29743 | 0,581842 | 0,076702 |
| Early 10 | HMA4 | 1,636818 | 19,84974 | 0,134155 | -0,71089 |
| Early 10 | UBIQUTIN | | 19,71559 | | |
| Rapa 10 | HMA2 | 1,032983 | 19,71419 | 0,458324 | -0,04682 |

| | | | | | |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Rapa 10 | HMA4 | 1,172275 | 19,8716 | 0,615738 | -0,22931 |
| Rapa 10 | UBIQUTIN | | 19,25586 | | |
| | | | | | |
| Sind 20 | HMA2 | 1,115681 | 21,93027 | 0,347216 | -0,15792 |
| Sind 20 | HMA4 | 1,502269 | 21,84096 | 0,257906 | -0,58714 |
| Sind 20 | UBIQUTIN | | 21,58306 | | |
| Early 20 | HMA2 | 0,5913 | 24,36363 | 1,263178 | 0,758038 |
| Early 20 | HMA4 | 1,057073 | 23,86543 | 0,764975 | -0,08007 |
| Early 20 | UBIQUTIN | | 23,10045 | | |
| Rapa 20 | HMA2 | 1,344689 | 23,73612 | 0,077868 | -0,42727 |
| Rapa 20 | HMA4 | 0,998303 | 24,50575 | 0,8475 | 0,002451 |
| Rapa 20 | UBIQUTIN | | 23,65825 | | |
| | | | | | |
| Sind 50 | HMA2 | 0,546893 | 19,55001 | 1,375809 | 0,870668 |
| Sind 50 | HMA4 | 1,172686 | 18,78943 | 0,615232 | -0,22982 |
| Sind 50 | UBIQUTIN | | 18,1742 | | |
| Early 50 | HMA2 | 0,09749 | 23,48031 | 3,863739 | 3,358599 |
| Early 50 | HMA4 | 0,208542 | 22,72321 | 3,106642 | 2,261593 |
| Early 50 | UBIQUTIN | | 19,61657 | | |
| Rapa 50 | HMA2 | 0,102023 | 20,71123 | 3,798168 | 3,293028 |
| Rapa 50 | HMA4 | 0,081243 | 21,37973 | 4,466669 | 3,62162 |
| Rapa 50 | UBIQUTIN | | 16,91306 | | |
| | | | | | |
| Sind 100 | HMA2 | 0,277167 | 20,80875 | 2,356314 | 1,851173 |
| Sind 100 | HMA4 | 0,520754 | 20,23882 | 1,786375 | 0,941326 |
| Sind 100 | UBIQUTIN | | 18,45244 | | |
| Early 100 | HMA2 | 0,390529 | 22,72428 | 1,861637 | 1,356497 |
| Early 100 | HMA4 | 0,761185 | 22,10138 | 1,238729 | 0,393681 |

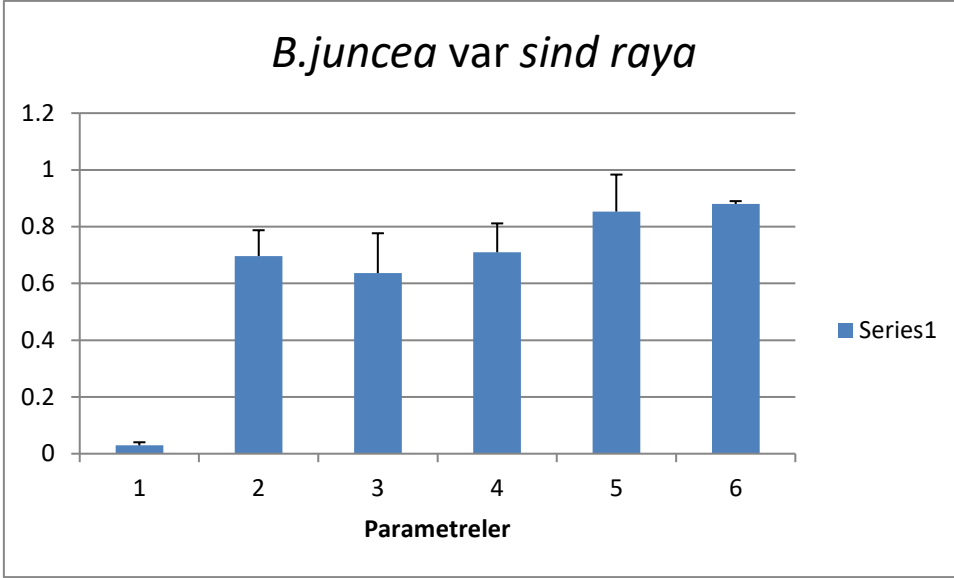
| | | | | | |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Early 100 | UBIQUTIN | | 20,86265 | | |
| Rapa 100 | HMA2 | 0,108861 | 22,11044 | 3,704578 | 3,199438 |
| Rapa 100 | HMA4 | 0,053299 | 23,48066 | 5,074791 | 4,229742 |

4.4. Atomik Absorpsiyon Spektrometri ile Metal Tayini

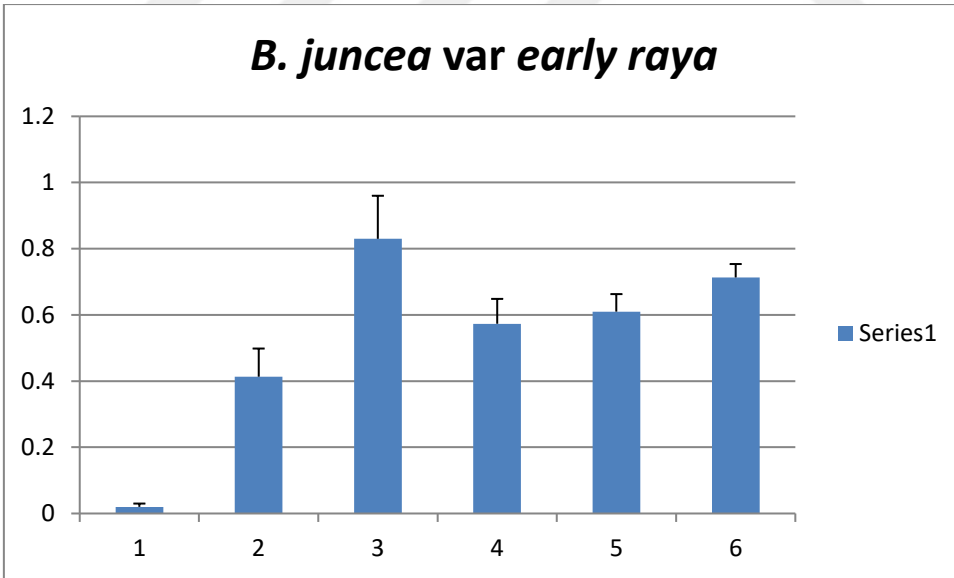
Atomik absorpsiyon spektrometri (AAS) spektrometresi cihazı ile örneklerdeki Cd derişimleri tespit edilmiştir. Alınan sonuçlarla her bir örneğin kuru ağırlığı başına aldığı kadmiyum oranları saptanmıştır. Yaprak numuneleri, 72 °C' de kurutulduktan sonra Memon vd., (1982)' nin [60] asit yaş yakma yöntemi kullanılarak metal tayini için hazırlanmıştır. Öğütülmüş kuru örnekler HNO₃ konsantresi ile sıcak bir plaka üzerinde tüm organik materyalin buharlaşmasına kadar sindirilmiştir. Daha sonra, HClO₄ konsantresi eklenmiştir. Örnekler küçük hacim kalana kadar sıcak bir plaka üzerinde tekrar ısıtılmıştır. HNO₃'ün HClO₄'e olan oranı 2.5:1 'dir. Elde edilen örnekler süzülüp bir cam tüpe aktarılmıştır. Sonra Atomik absorpsiyon spektrometri (AAS) cihazı ile Cd'un analizi yapılmıştır.



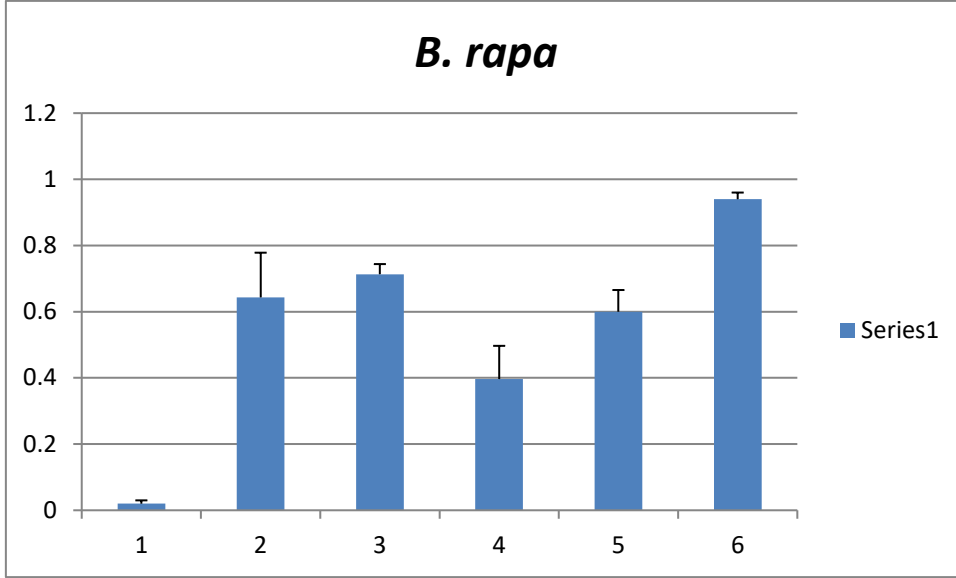
Şekil 4.17. *B. juncea* var *sind* raya, *B. juncea* var *early* raya, *B. rapa* bitkilerinin yaprak kısımlarının atomik absorpsiyon spektrometri cihazı ile Cd derişimleri (Y eksen: ppm, X eksen: µM)



Şekil 4.18. *B. juncea var sind raya* bitkisinin yaprak kısımlarının atomik absorpsiyon spektrometri cihazı ile Cd derişimleri (Y eksen: ppm, X eksen: 0-100 μ M değerleri)



Şekil 4.19. *B. juncea var early raya* bitkisinin yaprak kısımlarının atomik absorpsiyon spektrometri cihazı ile Cd derişimleri (Y eksen: ppm, X eksen: 0-100 μ M değerleri)

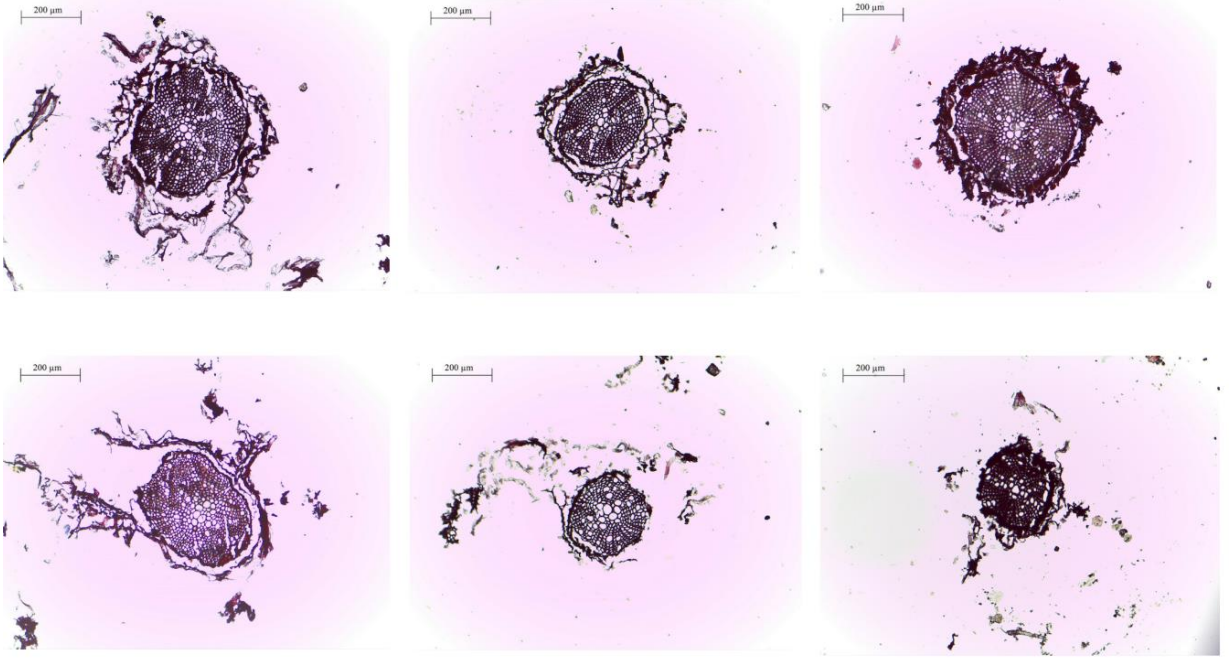


Şekil 4.20. *B. rapa* bitkisinin yaprak kısımlarının atomik absorpsiyon spektrometri cihazı ile Cd derişimi (Y eksen: ppm, X eksen: μM)

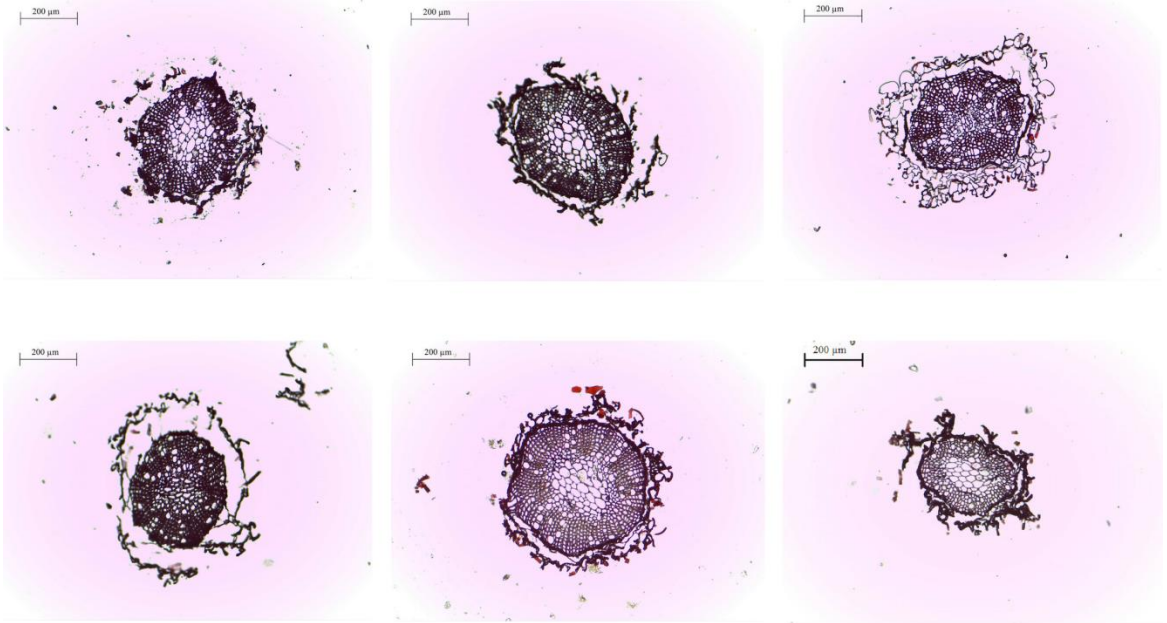
4.5. Anatomik Analizler

B. rapa, *B. campestris* var *toria*, *B. juncea* var *JS-13*, *B. juncea* var *early raya*, *B. juncea* var *S-9*, *B. juncea* var *sind raya*'nın anatomik kesitleri Leica DM 500 model kameralı ışık mikroskobu altında LAS EZ (Leica Application Suite, Version 3.4.0) programıyla incelenmiştir.

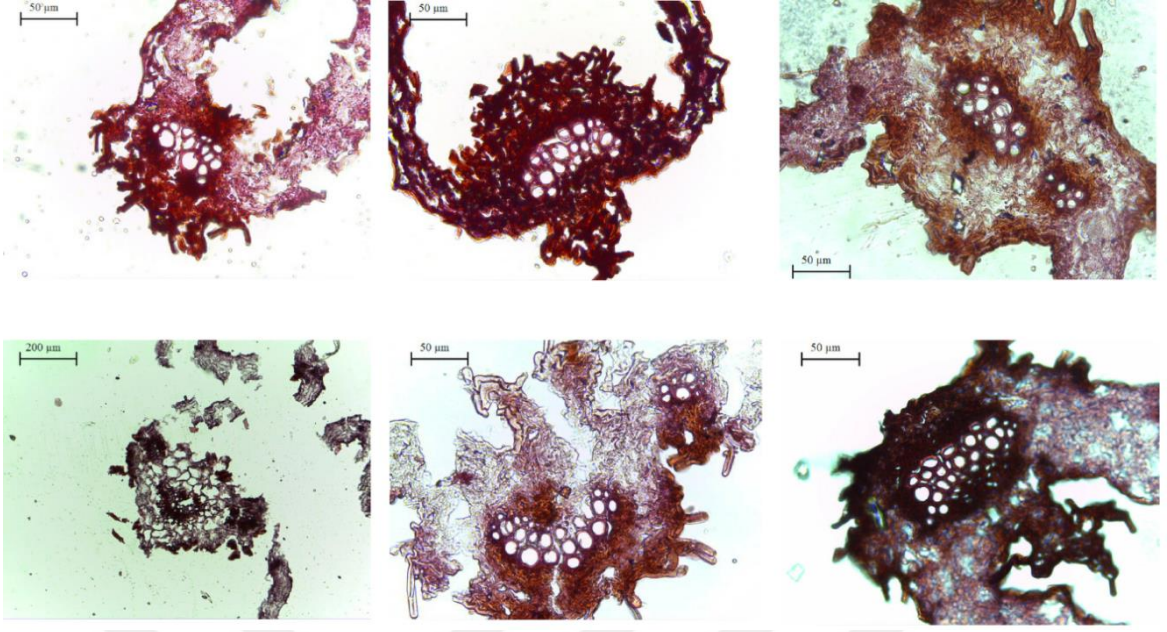
Bu tez çalışmasında maddi kaynakların yetersizliğinden dolayı örnekler daimi preparat haline getirilemeden direkt olarak mikroskop altında incelenmek zorunda kalmıştır. Ayrıca doku takibi işlemlerinin uzun ve meşakkatli olması ve örnek sayısının çok fazla olması nedenlerinden dolayı mikroskopik incelemeler hemen yapılamamıştır. Daha sonra preparatlardaki dokular mikroskop altında incelendiğinde bakılması hedeflenen parametrelerin dokularda oluşan bozulmalar sebebiyle tespiti yapılamamıştır. Ancak yine de amaçlanan örnekler mikroskop altında 40X ve bazı örnekler için 100X de incelenerek fotoğrafları çekilmiştir. Çalışmanın bu kısmının tekrarlanması önerilmektedir.



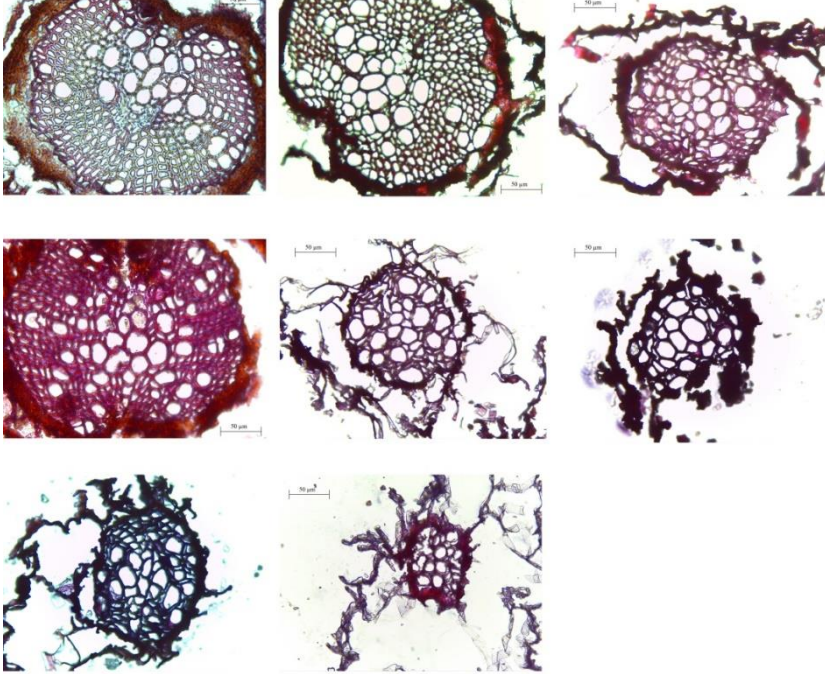
Şekil 4.21. *B. juncea* var *sind raya* bitkisinin kök kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşağı olacak şekilde 0-100 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri



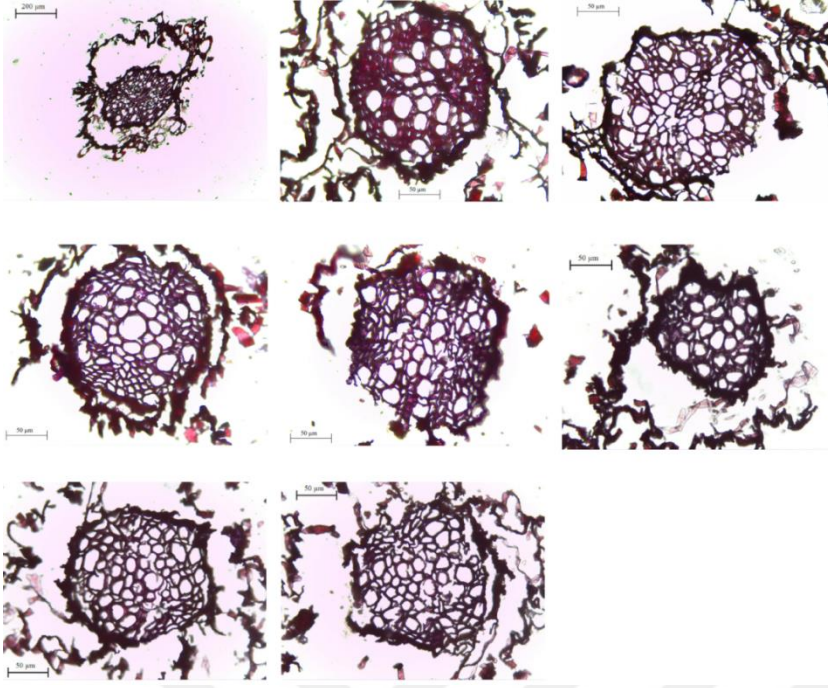
Şekil 4.22. *B. juncea* var *sind raya* bitkisinin gövde kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşağı olacak şekilde 0-100 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri



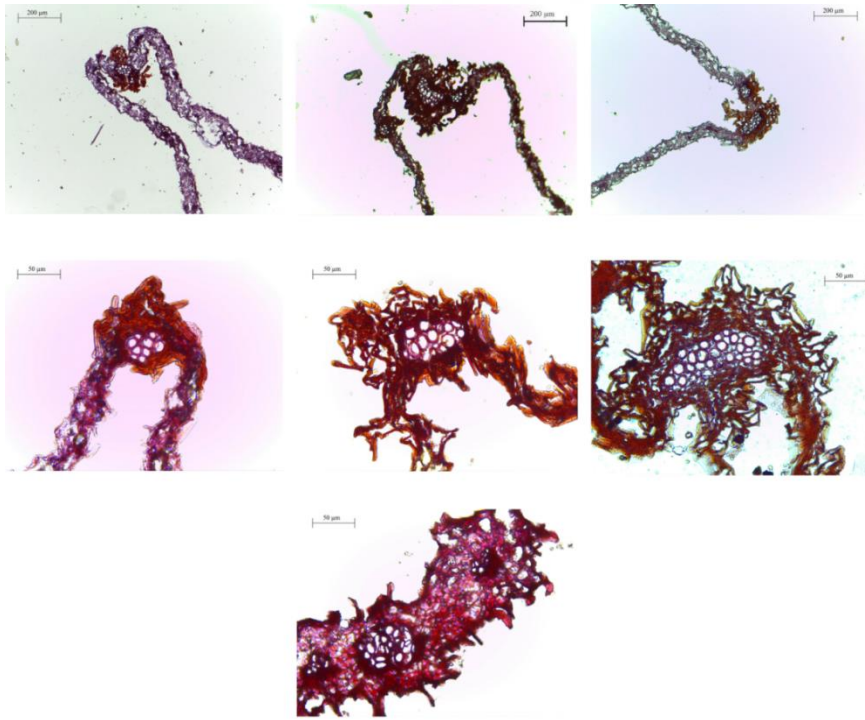
Şekil 4.23. *B. juncea* var *sind raya* bitkisinin yaprak kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşağı olacak şekilde 0-100 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri



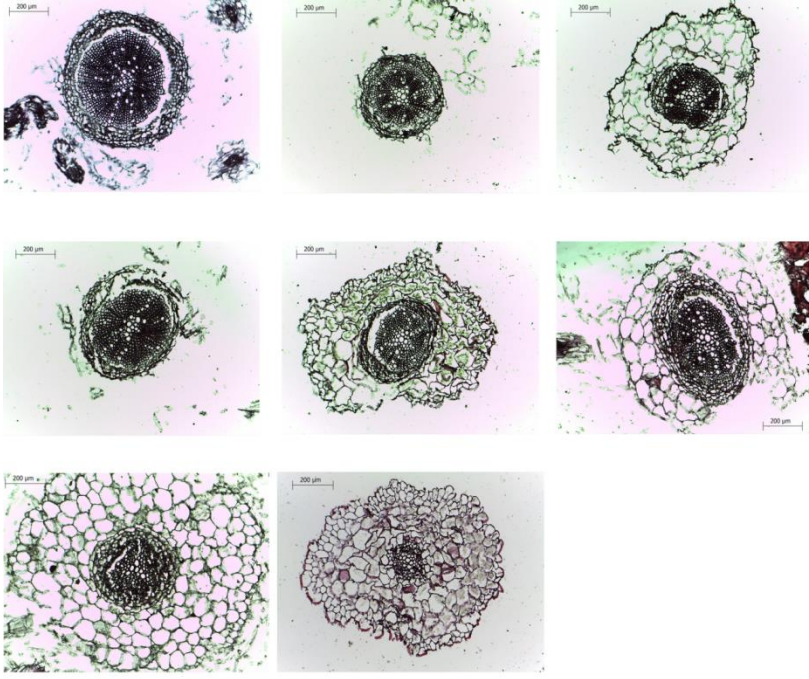
Şekil 4.24. *B. rapa* bitkisinin kök kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşağı olacak şekilde 0-500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri



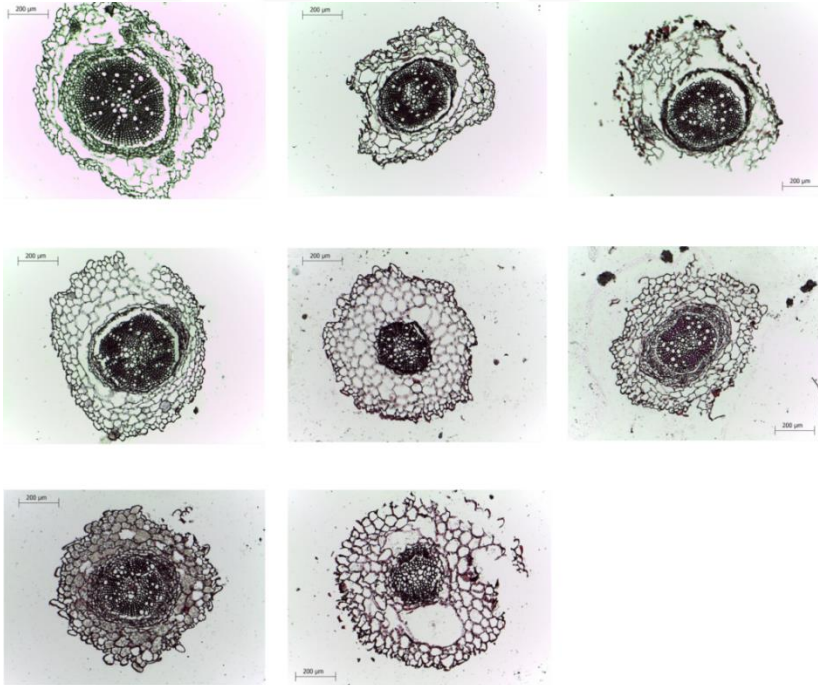
Şekil 4.25. *B. rapa* bitkisinin gövde kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşağı olacak şekilde 0-500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri.



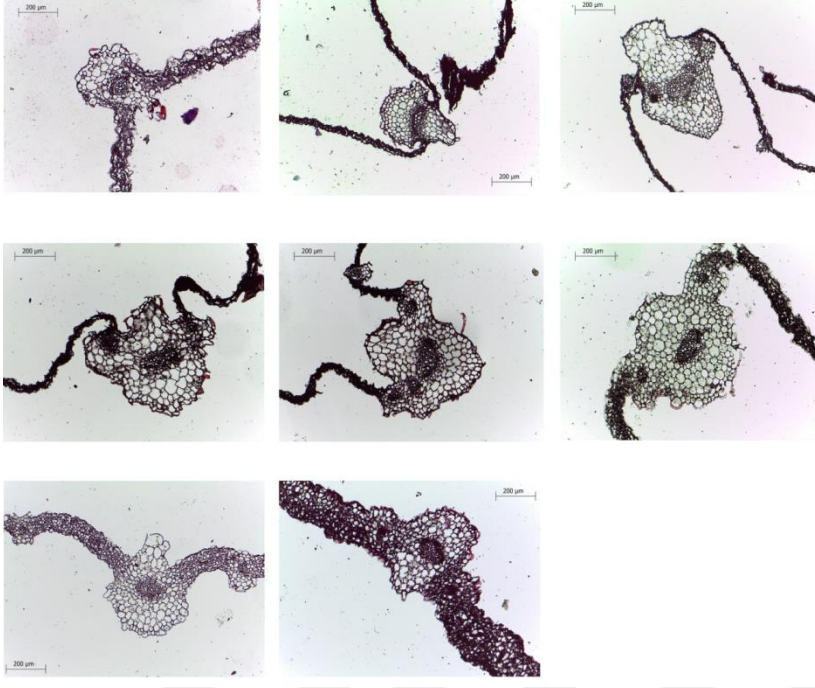
Şekil 4.26. *B. rapa* bitkisinin yaprak kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşağı olacak şekilde 0-100 µM ve 500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri



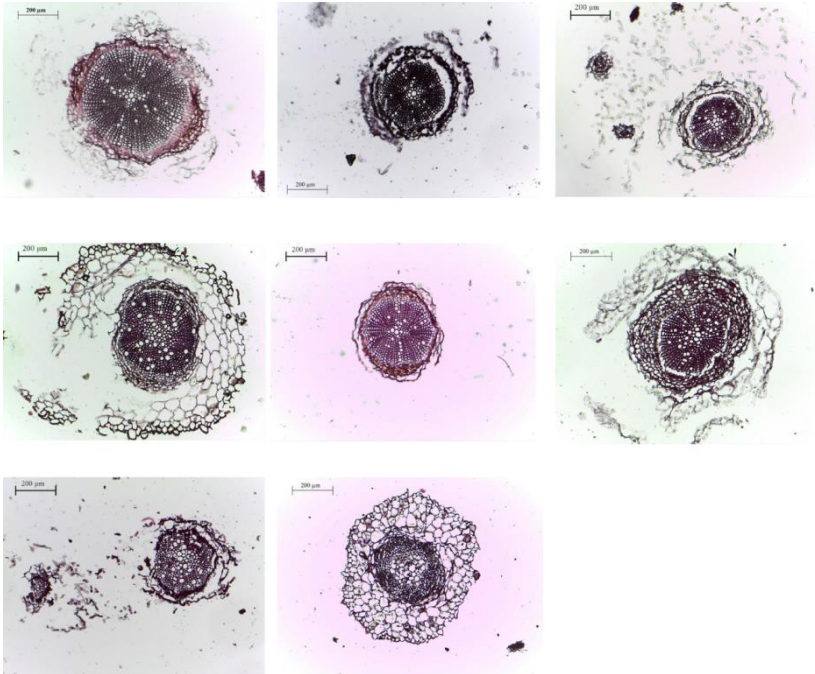
Şekil 4.27. *B. juncea* var *early raya* bitkisinin kök kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşağı olacak şekilde 0-500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri



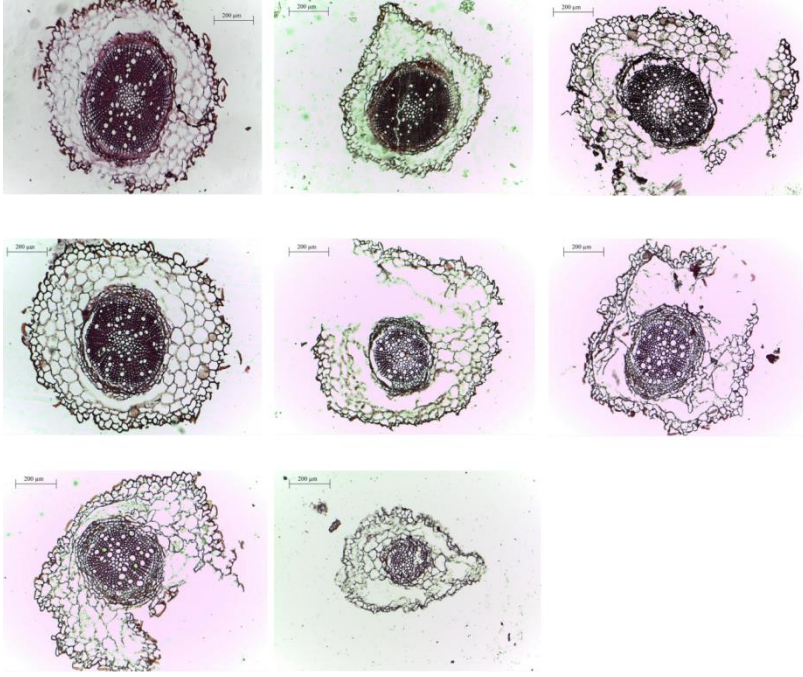
Şekil 4.28. *B. juncea* var *early raya* bitkisinin gövde kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşağı olacak şekilde 0-500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri



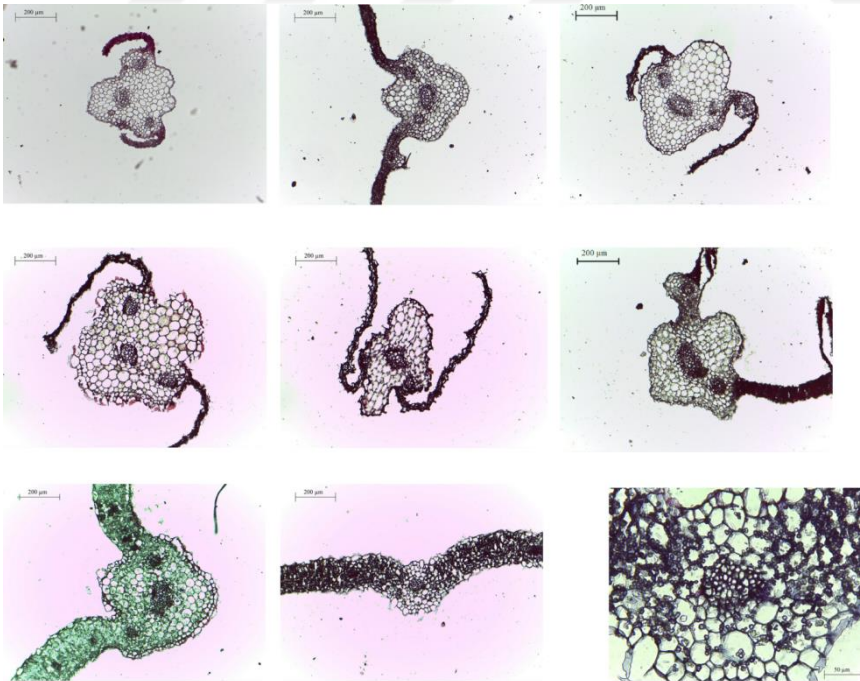
Şekil 4.29. *Brassica juncea* var *early raya* bitkisinin yaprak kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşağı olacak şekilde 0-500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri



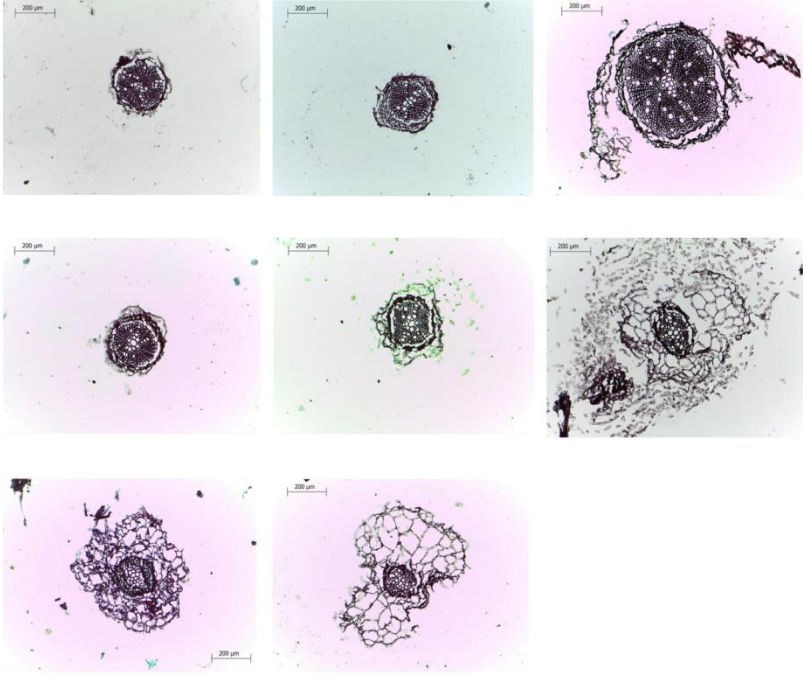
Şekil 4.30. *B. juncea* var *JS-13* bitkisinin kök kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşağı olacak şekilde 0-500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri



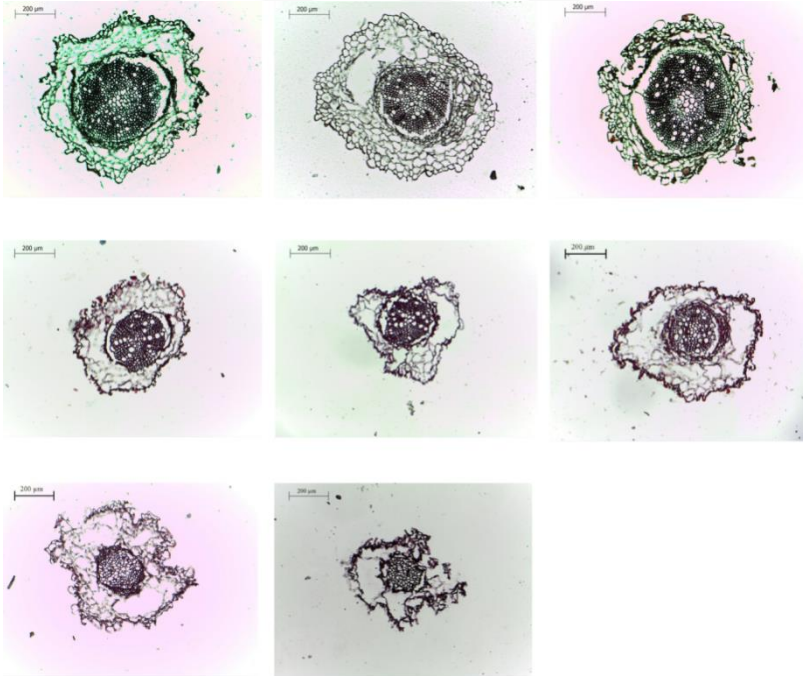
Şekil 4.31. *B. juncea* var *JS-13* bitkisinin gövde kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşağı olacak şekilde 0-500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri



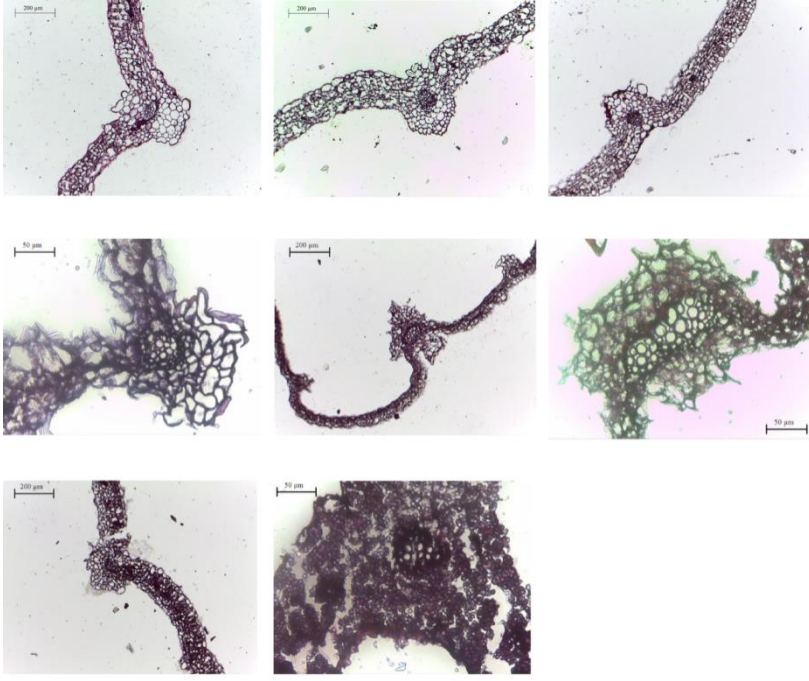
Şekil 4.32. *B. juncea* var *JS-13* bitkisinin yaprak kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşağı olacak şekilde 0-500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri



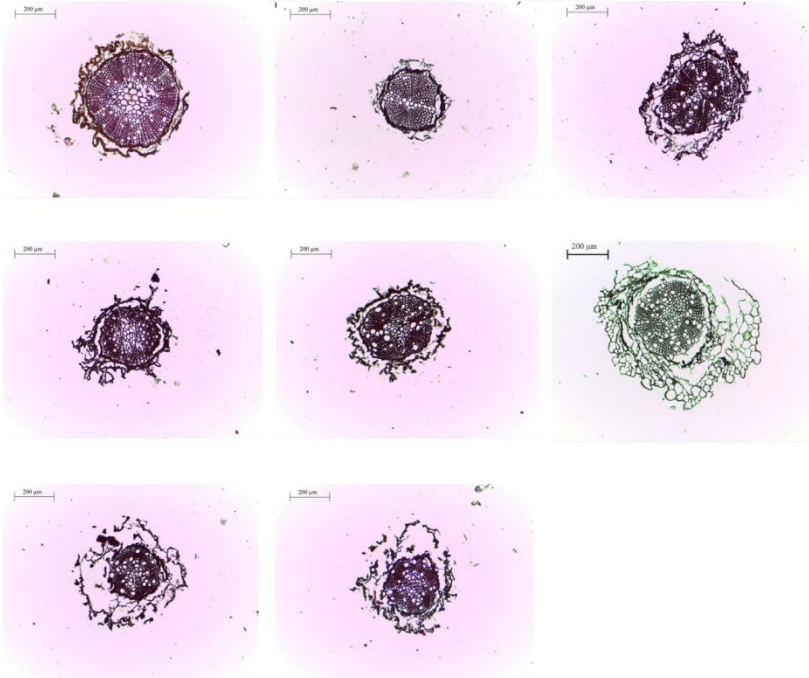
Şekil 4.33. *B. campestris* var *toria* bitkisinin kök kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşağı olacak şekilde 0-500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri



Şekil 4.34. *B. campestris* var *toria* bitkisinin gövde kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşağı olacak şekilde 0-500 µM parametrelerindeki mikroskop görüntüleri



Şekil 4.35. *B. campestris* var *toria* bitkisinin yaprak kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşağı olacak şekilde 0-500 μ M parametrelerindeki mikroskop görüntüleri



Şekil 4.36. *B. juncea* var *S-9* bitkisinin gövde kesitlerinin soldan sağa ve yukarıdan aşağı olacak şekilde 0-500 μ M parametrelerindeki mikroskop görüntüleri

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ağır metaller yoğunluğu 5g/cm^3 'den çok olan metaller şeklinde tanımlanmaktadır [1]. Potansiyel toksisiteleri ve buldukları ortamdaki kalıcı olmalarından dolayı insan kayanklı en tehlikeli çevresel kirleticilerden birisi sayılmaktadır [5]. Yirminci yüzyılda yaşanan birçok bilimsel ve teknolojik gelişmelerin en önemlilerinden birisi de sanayileşmedir. Sanayileşmenin artmasıyla iş olanakları ve üretim artmış, yaşam standartları yükselmiştir. Bunlara ek olarak da tüketim de arttığı için kirlilik artmıştır. Bu durum insan ve çevre üzerine olumsuz etkilere neden olmuştur [6,7].

Sanayi atıkları, egzoz dumanları, maden kaynakları ve buraları işleten fabrikalar, volkanik olaylar, tarımda ilaç ve gübre kaynaklı oluşan kirleticiler ağır metal kirliliğine neden olmaktadır. Kirlenen alanların temizlenmesi zor ve zahmetli olup bu kirleticiler canlıların biyolojik sistemlerine negatif etki etmektedir [14-17].

Topraklar, su ve atmosfere göre dış faktörlere nazaran biriktirme kapasitesi daha çok olan yapılardır. Toprakta oluşan değişiklikler ve bozulmaların eski haline getirilmesi oldukça güçtür ve pahalıya mal olur [18]. Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA)'nın yayınladığı 129 adet öncelikli kirleticiler içinde ağır metaller Biyotada güçlü seviyede dirençli olması ve toksik etkileri yüzünden en ciddi çevre kirleticilerinden biri seçilmektedirler [23]. Topraktaki ağır metal kirliliğine sebep olan ağır metallerin içinde Cu, Ni, Cd, Zn, Cr ve Pb en ön sıralarda yer almaktadır [24]. Bunlardan biri olan Cd ağır metali, metal polimerlerin sabitleştirilmesi, nikel&kadmiyum pili üretiminde, korozyonu engellediği için bilhassa gemi endüstrisinde çelik kaplamada, alaşımlarda ve elektronik sanayisinde kullanımı bulunmaktadır [26]. Toprakta devinimli bir element olan kadmiyumu bitkiler kolayca bünyelerine katabilmektedirler. Bu da besin olarak canlılar tarafından alınımına ya da topraktan suya karışmasına neden olmaktadır [32]. Kadmiyum ağır metalinin biyolojik yarılanma ömrünün toprakta ortalama olarak 18 sene, insan vücudunda ise Cd'un biyolojik yarılanma ömrünün 10 sene olduğu söylenmektedir [29]. Topraktaki Cd'un kilogram başına 3 mg, bitki kuru maddesindeyse kilogram başına 1 mg'den çok olması toksik etkiye neden olmaktadır [31].

Cd ağır metali bitkilerin kök büyümesi ve gelişimini önlediğinde topraktan alınan su ve iyonların alınımını engellemektedir [28]. Ağır metallerle tahrip olmuş alanların doğal yolla

iyileştirme yöntemi olmasından olan fitoremediasyon, diğer ıslah yöntemlerine göre doğal olması, ekonomik olması, görüntü kirliliğine neden olmadan geniş alanlara kolaylıkla uygulanabilmesinden dolayı üstünlük sağlamaktadır [41].

Kirlenmiş çevrenin temizlenmesinde ya da metallerin suda çözünmeyen forma dönüştürülmesinde çeşitli metotlar olsa da bunların binlerce hektara uygulanması oldukça pahalı ve pratikte de mümkün görünmemektedir. Ağır metallere dayanıklı ve kontamine olmamış ürün yetiştiriciliği problemin çözümünde alternatif olarak görünmektedir. Doğada yeşil aksamında normal bitkiden daha fazla metal biriktiren ve hiperakümülatör adı verilen bitkiler bulunmaktadır.

Bu çalışmada, *Brassicaceae* familyasına ait olan *B.rapa* ve *B. juncea* 'ya ait *B.juncea* var *sind raya* ve *B. juncea* var *early raya* genotipleri 31 gün boyunca çeşitli parametrelerdeki Cd metali ile muameleleri sonucunda önemli genler olan HMA2 ve HMA4'ün Real Time PCR kullanılarak ekspresyonunu tespit edilmiştir. Ayrıca nitrik-perklorik asit ile yaş yakma tekniği kullanılarak kurutulmuş bitki yaprak numuneleri ile *B. juncea* var *early raya*, *B. juncea* var *sind raya* ve *B. rapa* bitkilerinin atomik absorpsiyon spektrometresi (ASS) analizi yapılmıştır. Ayrıca bu çalışmaları desteklemek amaçlı anatomik çalışmalar *B. rapa*, *B. campestris* var *toria*, *B. juncea* var *JS-13*, *B. juncea* var *early raya*, *B. juncea* var *S-9*, *B. juncea* var *sind raya* bitkilerinde yapılmıştır. Ancak doku takibi aşamasından sonra preparatlar daimi hale getirilemediğinden ve mikroskopik incelemelerin hemen gerçekleştirilememesinden kaynaklı olarak anatomik görüntüler istenilen parametreleri ölçebilmemize izin vermemiştir. Anatomik analizlerin tekrar çalışılması önerilmekle birlikte yinede mikroskop görüntüleri tez içerisinde paylaşılmıştır.

Hiperakümülatör bitkiler ile ilgili yaptıkları çalışmalarda *B. juncea* var. P78 bitkisinin Cd akümülyasyonunda iyi bir hiperakümülatör bitki olduğunu belirtmişlerdir [40].

Brassica türleri ve *Arabidopsis* 'in 4,5-20,4 milyon yıl önce ortak bir orjinden ayrılmışlardır [135]. *Brassica* türlerinin genomları ile *Arabidopsis* 'in genomu homolog segmentler göstermektedir [136,137].

Brassica türlerinin genomu (diplodiler için 529-696 Mb, poliploidler için 1068-1284 Mb) [138]. *Arabidopsis* 'den (125 Mb) daha büyük olduklarında dolayı *Brassica* türlerinde

ortaya çıkan bazı yeni gen oluşumlarının, paralog genlerin alt işlev ya da yeni işlev kazanmasıyla ilişkili ilgili olduğunu öne sürülmektedirler [139-142].

DNA dizileri temelli yapılan yapılan filogenetik analizler, sonucunda *Brassica* türleri ile *A. thaliana* bitkisi arasında yakın ilişki olduğunu bildirmişlerdir [143,144].

Meyers ve diğ.,(2009)' nın [122], yaptığı çalışmada *B. juncea* bitkisinin kurşun ve kadmiyumun önemli miktarlarını bünyelerinde biriktirdiğini, Begonia ve diğ., (1998) [123] Jiang ve diğ., (2000) [124], Liua ve diğ., (2000) [125], Meyers ve diğ., (2008) [126], Zaier ve diğ., (2010) nin [127], yaptığı çalışmalarda kurşun gibi toksik etkili ağır metalleri yüksek seviyelerde biriktirmesine karşın, kadmiyum gibi ağır metalleri *B. juncea* 'nın gövde veyapraklarına taşıdığını bildirmişlerdir.

Sun ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda (2007) [128], *Sedum alfredii* bitkisinde kadmiyum uygulaması sonrasındaki 12 saat içerisinde, hızlı bir şekilde Cd 'un köklerden toprak üstü organlara taşındığını ve çalıştıkları 2 popülasyonun birisinde kadmiyum akümülyasyonunun sırayla; kök-gövde ve yaprak şeklinde olduğunu bildirmişlerdir.

Haag-Kerwer ve diğ., (1999) [134], yaptıkları çalışmalarda *B. juncea* bitkisinin toprak üstü organlarında 400 µg/gKA'dan çok Cd ağır metalini akümüle ettiğini tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmaların sonucu olarak, 1 gün boyunca 25 µM CdSO₄ çözeltisi uygulanan *B. juncea* var. P78 bitkisinin değişik kısımlarında biriken ağır metal miktarlarının sırayla kök-gövde-yaprak şeklinde olduğunu tespit etmişlerdir.

Siddiqui arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada da *B.rapa* var. *turnip* bitkisinde kadmiyum,krom ve kurşun ağır metallerinin tohum çimlenmesi ve fide büyümesi üzerine etkileri incelendiğinde çimlenme ve büyüme etkileri için çoktan aza doğru Cd >C > Pb şeklinde sıralanmıştır.

Castillo-Michel ve arkadaşlarının (2009) [129], yaptığı çalışmada *Arabidopsis* bitkisinin mısır, erguvan, buğday, sorgum ve salatalıkta yaprak üstü organlarına kıyasla köklerinde daha çok kadmiyum biriktirdiğini saptamışlardır.

Seth ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda (2008) [130], toprak kullanılmadan yapılan yetiştirme yöntemi olan hidroponik ortamda yaptıkları yaklaşık 1ay süren uygulama süresi

sonunda *Brassica juncea* bitkisinin Cd akümülyasyonunda köklerinde 1925 mg/kgKA, toprak üstü organlarında ise 977 mg/kgKA sonuçlarına ulaşmışlardır.

Ebbs ve diğ., (1997) [131], Rio ve diğ., (2000, 2004) [132], Indoria ve Poonia (2006) [133]'nın yaptıkları çalışmalarda *Brassica* türleri içerisinde en iyi Cd akümülyasyonu özelliğine sahip olan türün *Brassica juncea* bitkisi olduğunu tespit etmişlerdir.

Özetle bu çalışmada, 31 gün boyunca *B. rapa*, *B. juncea var sind raya* ve *B. juncea var early raya* bitkilerine 0 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 500 µM olmak üzere 8 ayrı parametrede Cd uygulanmış olup bitki gelişimine zarar vermeden en yüksek Cd konsantrasyonunun bulunması hedeflenmiştir. qPCR çalışması ile HMA2 ve HMA4 genlerinin ekspresyonlarına bakıldığında, *B. rapa*'nın 20 µM ve *B. juncea var sind raya*'nın 20 µM konsantrasyonlarında HMA2 ekspresyonun arttığı görülmüştür. *B. juncea var early raya* bitkisinin bütün konsantrasyonları için kontrol grubuna göre HMA2 geni ekspresyonunda bir değişiklik gözlenmemiştir

HMA4 geni için *B. juncea var early raya*'nın 10 µM, *B. rapa*'nın 10 µM ve *B. juncea var sind raya*'nın 20 µM konsantrasyonlarında ekspresyonun arttığı tespit edilmiştir.

Atomik absorpsiyon spektrometresi (ASS) ile yapılan metal tayini sonuçları ile HMA4 geni için birbirleriyle paralellik göstermiş olup HMA4 geni için ekspresyonun arttığı konsantrasyonlarda, yaprakta biriken Cd birikimi sonuçları paralellik gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak HMA2 geni için bu paralellik saptanamamıştır.

HMA4 geni Cd'un ana trasportundan sorumlu olduğu için HMA2 genine göre ekspresyon farkı oluşmuştur. HMA4 genini inhibe edici bir etken oluştuğunda (yüksek Cd derişimi) onun yerine HMA2 geninin ekspresyonu arttığı görülmüştür. HMA4 geninde yüksek konsantrasyonlardan sonra ekspresyonun düşmesi HMA4 geninin Cd'un trasport ve akümülyasyon mekanizmasında yeterli olmadığını göstermiştir. Yüksek konsantrasyonlardan sonra Cd trasportunun inhibe olması başka Cd ile ilgili farklı trasport ve akümülyasyon mekanizmalarının olduğu göstermektedir.

Tüm bu sonuçlara bakılarak *B. rapa*, *B. juncea var sind raya* ve *B. juncea var early raya* bitkilerinin Cd hiperakümülatörü olabileceği ve bunu da HMA4 geninin ekspresyonuyla gerçekleştirebileceği görülmüştür. Elde edilen bu veriler sonucunda *B. rapa*, *B. juncea var sind raya* ve *B. juncea var early raya* bitkilerinin ağır metal akümülyasyonu ve toleransıyla

ilişkili HMA2 ve HMA4 genlerinin ekspresyonlarına bakılarak moleküler çalışmalara katkı sağlanmıştır. Ayrıca *B. rapa*, *B. juncea* var *sind raya* ve *B. juncea* var *early raya* bitkilerinin çeşitli parametrelerde yaklaşık 1 ay boyunca yetiştirilmesiyle çimlenme kapasiteleri ve büyüme ve gelişimleri izlenerek en uygun parametreler ve uygun bitkiler konusunda veriler elde edilmiştir.

Doğal yollarla ya da antropojenik etkilerle kadmiyumla kirletilmiş alanların fitoremediasyon çalışmalarıyla temizlemesi ve geri kazanımı için bu bitkilerin ağır metal stresine karşı dayanıklı transgenik bitki geliştirme çalışmaları için ışık tutmuştur.



6. KAYNAKLAR

- [1]. Duffus, J., 2002, "Heavy Metals"- A meaningless term? *Pure and Applied Chemistry*, 74: 793-807.
- [2]. Aslam B, Javed I, Khan HF, Rahman Z., 2011, Uptake of heavy metal residues from sewage sludge in the goat and cattle during summer season. *Pak Vet J.*;31:75-7.
- [3]. Ağcasulu Ö., 2007, "Sakarya nehri Çeltikçe çayı'nda yaşayan capota tinca'nın dokularında ağır metal birikiminin incelenmesi", Yüksek lisans tezi, *Ankara Gazi Üniversitesi*, Ankara.
- [4]. Kahvecioğlu Ö, Kartal G, Güven A, Timur S., 2009, Metallerin çevresel etkileri. *Metalurji Dergisi*, 136:47-53.
- [5]. Ölgen, K., Gür, F., "Yatağan Termik Santrali Çevresinden Toplanan Likenlerde (Xanthoria parietina) Saptanan Ağır Metal Kirliliğinin Coğrafi Dağılışı" *Türk Coğrafya Dergisi*, İzmir.
- [6]. Ekşi A., 1981, "Bazı toksit metal iyonlarının gıdalara bulaşma kaynakları" *Bilim Teknik Dergisi*, 168: 35-36.
- [7]. Mert N, Çetin M, Tayor M.,1993, "Bursa yöresinde tüketilen sütlerdeki kurşun (pb) düzeylerinin saptanması", *Uludağ Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, sayı: 1, Cilt:12
- [8]. Pongrac, P., Zhao, F.J., Razinger, J., Zrimec, A. and Regvar, M. 2009, "Physiological responses to Cd and Zn in two Cd/Zn hyperaccumulating Thlaspi species", *Environmental and Experimental Botany*, 66(3), 479-486.
- [9]. Vural N. 1984, "Toksikoloji" *Ankara Üniversitesi Yayınları*, Ankara
- [10]. Burton J H, Grieve D G, Bravn H E, Frank R. 1982, "Voluntary intake of shredded newsprint by dairy cows", 62: 799-806.
- [11]. Algan G, Tekinşen O C, Gök V., 2003, "Konya yöresi inek sütlerinde bazı ağır metal içeriklerinin saptanması", *Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu*, sayfa: 359-362; İzmir
- [12]. Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A. ve Timur, S., 2003, "Metallerin çevresel etkileri-I", *TMMOB Metalurji Mühendisleri Odası Metalurji Dergisi*, 136: 47- 53.
- [13]. Şanlı Y., 1984, "Çevre sorunları ve besin kirlenmesi" *S.Ü. Vet.Fak.Dergisi*, 17-37

- [14]. Baş I, Demet Ö., 1992, “Çevresel toksikoloji yönünden bazı ağır metaller”, *Ekoloji Çevre Dergisi*, sayı: 5
- [15]. Algan G, Tekinşen O. C., 2002, “Konya yöresi sütlerinde bazı ağır metallerin incelenmesi” *S.Ü. Sağ.Bil.Ens*; Yüksek Lisans Tezi, Konya.
- [16]. Zengin F. K., 2006, “Fasulye fidelerinin kök, gövde ve yaprak büyümesi üzerine nikel(Ni+ 2) ve kromun(Cr⁺³)un etkileri”, *Tarım Bilimleri Dergisi (J. Agric. Sci.)*, 16(1): 49-56.
- [17]. Ayar A., Sert D, Akın N., 2007, “Konya'da Tüketime sunulan süt ve ürünlerinin ağır metal içeriklerinin belirlenmesi”, *Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21 (41):58-64.
- [18]. Tongarlık Ş., 2010,” Farklı buğday ve arpa varyetelerinin kadmiyuma tepkilerinin belirlenmesi”, Doktora tezi, *Selçuk Üniversitesi*,Konya.
- [19]. Ayhan B., Ekmekçi Y., Tanyolaç D., 2006, “Bitkilerde Ağır Metal Zararları Ve Korunma Mekanizmaları”, *Anadolu Üniversitesi Bilim Ve Teknoloji Dergisi*, Cilt/Vol.:7-Sayı/No: 1 : 1-16
- [20]. Vamerali T., Bandiera M., Mosca G.,2010,“Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land”,*Environmental Chemistry Letters*, 8: 1–17.
- [21]. Nies, D.H., 1999,“Microbial heavy metal resistance”,*Appl Microbiol Biotechnol*, 51: 730-750.
- [22]. Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro M.L., 2005, “Cadmium Toxicity İn Plants”, *Brazilian Journal Of Plant Physiology*, 17, 21-34.
- [23]. Vanlı, Ö. Ve Yazgan, M.,2008, “Ağır Metallerle Kirlenmiş Toprakların Temizlenmesinde Fitoremediasyon Tekniği”.
- [24].Yıldırım D., 2016,“Fitoremediasyon Sonrası Yabancı Hint Yağı (Ricinus Comimus) Ve Aspir (Carthamus Tinctorius) Bitkilerinin Biyokütlesinden Toksik Metallerin Elektrokimyasal Yöntemle Giderimi Ve Geri Kazanımı”, Yüksek Lisans Tezi, *Mersin Üniversitesi*, Mersin
- [25]. Jonnalagadda, S.B., Rao, P.V., 1993, “Toxicity, Bioavailability And Metal Speciation” *Comparative Biochemistry And Physiology, Part C: Pharmacology, Toxicology And Endocrinology, Sciencedirect*, 106(3): 585-595.
- [26]. Gündüz, T., 2008, “Çevre Kimyası”, *Gazi Kitabevi*, 134-137,145-148.
- [27]. Shearon, I.S., Singal, H.R., Singh, R.,1990, “Effect Of Cadmium And Nickel On Photosynthesis And Enzymes Of The Photosynthetic Carbon Reduction Cycle İn Pigeon Pea (Cajanus Cajan L.)”, *Photosynthesis Research*, 23: 345-351.
- [28]. Hernández, L.E., Rodriguez, E.L., Górate, A., Ruiz, R.C., 1998, “Influence Of Cadmium On The Uptake, Tissue Accumulation And Subcellular Distribution Of Manganese İn Pea Seedings”, *Plant Science*, 132: 139-151.

- [29]. Forstner, J. C., 1995, "Soil sampling, handling, storage and analyses, in methods", *Applied Soil Microbiology and Biochemistry*, Academic press, London, p. 49-121
- [30]. Yang, X., Jin, X., Feng, Y. Ve Islam, E., 2005. "Molecular Mechanisms And Genetic Basis Of Heavy Metal Tolerance In Plants", *Journal Of Integrative Biology*, 47, 1025-1035.
- [31]. Özbek, H., Kaya, Z., Gök, M Ve Kaptan, H., "Toprak Bilimi", 1995, *Çukurova Üniversitesi Ziraat Fak. Genel Yayın No: 73 Ders Kitapları Yayın No:16*, Adana.
- [32]. Köleli, N., Kantar, Ç., 2005, "Fosfat Kayası, Fosforik Asit Ve Fosforlu Gübrelerdeki Toksik Ağır Metal (Cd, Pb, Ni, As) Konsantrasyonu", *Ekoloji Dergisi*, 14(55).
- [33]. Kabata, A., Pendias, H., "Trace Elements In Soils And Plants", 1992, 2nd Edition. *Crc Press*, Baton Rouge.
- [34]. Yost, K.J., Miles, L.J., 1979, "Journal Of Environmental Science and Health A." 14: 285-311.
- [35]. World Health Organisation, 2000, "Fifty-Third Report Of The Joint Fao/Who Expert Committee On Food Additives", *Who Technical Report Series 896*, Geneva, Switzerland.
- [36]. Haktanır, K., 1987, "Çevre Kirliliği", *A.Ü. Ziraat Fakültesi Ders Notu*, Teksir No:140.
- [37]. Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001, "Trace Elements In Soils And Plants", *Third Edition. Crc Press*, Boca Raton.
- [38]. Bailey, S.E., Olin, T.J., Bricka, R.M., Adrian, D.D., 1999, "A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals". *Water Res.* 33, 2469-2479.
- [39]. Rulkens Wh., Tichy R., 1998, "Grotenhuis Jtc. Remediation Of Polluted Soil And Sediment: Perspectives And Failures", *Water Sci. Technol*, 37: 27-35.
- [40]. Baker A.J.M., Brooks R., 1989, "Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry", *Biorecovery*, 1(2), 81-126.
- [41]. Rulkens Tong, Y.P., Kneer, R., Zhu, Y.G., 2004, "Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for phytoremediation", *Trends in Plant Science*, 9, 7-9.
- [42]. Eapen, S., & D'Souza, S. F., 2005, "Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals", *Biotechnology Advances*, 23, 97-114.
- [43]. Hassinen V.H., Vallinkoski M., Issakainen S, Tervahauta AI, Kärenlampi SO, Servomaa K., 2009, "Correlation of foliar MT2b expression with Cd and Zn concentrations in hybrid aspen (*Populus tremula x tremuloides*) grown in contaminated soil", *Environ Pollut.* 157:922-930
- [44]. Wilson, L., 2015, "Toxic Metals And Detoxification", *The Center For Development*.

- [45]. Özbek, K., 2011,“Hiper toplayıcı bitkilerle kadmiyumlu toprakların iyileştirilmesi ve gübre, humik asit ve şelat uygulamalarının etkinliği”, Doktora Tezi,Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [46]. Ouzounidou, G., 1994,“Copper Induced Changes On Growth Metal Content And Photosynthetic Functions Of *Alyssum Montanum* L. Plant”,*Env. Exp. Bot.*, 34, 165-172.
- [47]. Costa, G.,Michaut, J.C., Morel, J.L., 1994,“Influence Of Cadmium On Water Relations And Gas Exchanges İn Phosphorus Deficient *Lupinus Alba*”*Plant Physiol*, 32, 105.
- [48]. Lidon, F.C., Ramalho, J., Henriques, F.S., 1993,“Copper İnhibition Of Rice Photosynthesis” *J. Plant Physiol.*, 142, 12-17.
- [49]. Chugh L.K.,Sawhney, S.K., 1993,“Effect Of Cadmium On Activities Of Some Enzymes Of Glycolysis And Pentose Phosphate Pathway İn Pea”,*Biologia Plantarum*, 42 (3), 401-407.
- [50]. Mohan, B.S., Hosetti, B.B., 1997,“Potential Phytotoxicity Of Lead And Cadmium To *Lemna Minor* Grown İn Sewage Stabilization Ponds”,*Environ. Pollut.*, 98, 233-238.
- [51]. Munzuroglu, Ö.,Geçkil, H., 2002,“Effects Of Metals On Seed Germination, Root Elongation, And Coleoptile And Hypocotyl Growth İn *Triticum Aestivum* And *Cucumis Sativus*”,*Environ. Cont. And Toxi.*, 43, 203-213.
- [52]. Kennedy, C.D., Gonsalves, F.A.N., 1987,“The Action Of Divalent Zinc, Cadmium, Mercury, Copper And Lead On The Trans-Root Potential And Efflux Of Excised Roots” *J. Exp. Bot.*, 38, 800-817.
- [53]. Memon, A.R.,Aktoprakligül, D., Özdemir, A., Vertii, A., 2001,“Heavy Metal Accumulation And Detoxification Mechanisms İn Plants”,*Turkish Journal Of Botany*, 25: 111-121.
- [54]. Brooks R. R., 1998,“Plants That Hyperaccumulate Heavy Metals: Their Role İn Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration And Phytomining” *Cab International*, New York, Pp. 1-14.
- [55]. Reeves R. D., 2006,“Hyperaccumulation of trace elements by plants. in: morel, j.l., echevarria, g. ve goncharova, n. (eds.)”*Phytoremediation Of Metal-Contaminated Soils*, *Nato Science Series: IV: Earth And Environmental Sciences*, Springer, Ny, Pp. 1-25
- [56]. Cunningham, S. D., Shann, J. R., Crowley, D. E., & Anderson, T. A.,1997, “Phytoremediation of contaminated water and soil”,*Phytoremediation of soil and water contaminants. ACS Symposium series 664*, pp. 2–19, Washington, DC: American Chemical Society.
- [57]. Ghosh, M.,& Singh, S. P., 2005, “A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its by-products”,*Applied Ecology and Environmental Research*, 3(1), 1–18.

- [58]. Schat, H., Ten Bookum, W.M., 1992, "Genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*", *Heredity*, 68: 219–229.
- [59]. Hassinen, V. H., Tuomainen, M., Peräniemi S., Schat, H., Kärenlampi S. O., Tervahauta A. I., 2009, "Metallothioneins 2 and 3 contribute to the metal-adapted phenotype but are not directly linked to Zn accumulation in the metal hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*", 60(1):187-96.
- [60]. Memon A.R., Yatawaza, M., 1982, "Chemical nature of manganese in the leaves manganese accumulator plants" *Soil Science and Plant Nutrition*, 28(3), 401-412.
- [61]. Madejón, P., Ciadamidaro, L., Marañón, T., Murillo, J. M., 2013, "Long Term Biomonitoring of Soil Contamination Using Poplar Trees: Accumulation of Trace Elements in Leaves and Fruits", *International Journal of Phytoremediation*, 15:6, 602-614.
- [62]. Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Sidoli, C.M.D., Reeves, R.D., 1994, "The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants", *Resour. Conserv. Recycl.* 11; 41-49.
- [63]. Cunningham, S.D., Huang, J.W., Chen, J., Berti, W.R., 1996, "Abstracts of Papers of the American Chemical Society". 212; pp 87.
- [64]. Raskin, I, Kumar, P.B.A.N., Dushenkov, S., Salt, D., 1994, "Bioconcentration of heavy metals by plants", *Current Opinion Biotechnology* 5; 285-290.
- [65]. Salt, D. E., Kramer, 2000, "Mechanism of metal hyperaccumulation in plants", *Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment*, pp 231-246, Wiley, New York.
- [66]. Steffens, J.C., 1990, "The heavy-metal binding peptides of plants", *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41, 553–575.
- [67]. Salt, D., Price, R., Pickering, I., Raskin, I., 1995, "Mechanisms Of Cadmium Mobility And Accumulation In Indian Mustard" *Plant Physiol.*, 109, 1427-1433.
- [68]. Clemens, S., Palmgren, M.G., Kramer, U., 2002, "A Long Way Ahead: Understanding And Engineering Plant Element Accumulation", *Trends In Plant Science*, 7: 309-314.
- [69]. Hélène, S.R., Jií, F., 2009, "Auxin and other signals on the move in plants", *Nature Chemical Biology*, 5: 325-332.
- [70]. Prasad, M.N.V., 2004, "Heavy Metal Stress In Plants, 2nd Ed", *Springer*, India, V-Vi, 47-83.
- [71]. Jabeen, R., Ahmad, A., Iqbal, M., 2009, "Phytoremediation of Heavy Metals: Physiological and Molecular Mechanisms", *Botanical Reviews*, 75, 339- 364.

- [72]. Dučić, T., Polle, A., 2005, "Manganese And Copper Toxicity And Detoxification In Plants", *Brazilian Journal Of Plant Physiology*, sayı: 172, 115–122
- [73]. Grill, E., Winnacker, E., Zenk, M. H., 1985, "Phytochelatin: The Principal Heavy-Metal Complexing Peptides Of Higher Plants", *Science* 230, 674-676.
- [74]. Briat, J.F., Lebrun, M., 1999, "Plant Responses To Metal Toxicity", *C. R. Academic Science*, 322, 43-54.
- [75]. Hoagland D.R., Arnon, D., 1938, "The water culture method for growing plants without soil", *UC College of Agriculture*, Ag. Exp. Station, Berkeley, CA. Circular. 347, 1-39.
- [76]. Ayhan B., Ekmekçi Y., Tanyolaç D., 2006, "Bitkilerde ağır metal zararları ve korunma mekanizmaları", *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, Cilt/Vol.:7- Sayı/No: 1:1-16.
- [77]. Rauser, W. E., 1990, "Phytochelatin. Ann. Rev. Biochem", 59: 61-86.
- [78]. Cumming, J.R., Taylor, G.J., 1990, "Mechanisms Of Metal Tolerances In Plants: Physiological Adaptation For Exclusion Of Metal Ions From The Cytoplasm", P. 329-359. In: *Stress Responses In Plants: Adaptation And Acclimation Mechanisms*, Alscher, R. G. And Cumming, J. R. (Eds.), Wiley-Liss, Inc.
- [79]. Salt, D.E., Wagner, G.J., 1993, "Cadmium Transport Across Tonoplast Of Vesicles From Oat Roots. Evidence For A Cd/H Antiport Activity" *J. Biol. Chem.* 268: 12297-12302.
- [80]. Crowley, D.E., Wang, Y.C., Reid, C.P.P., Szansizlo, P.J. 1991, "Mechanism of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants", *Plant and Soil* 130; 179-198.
- [81]. Clarkson, D., Lüttge, U., 1989, "Mineral Nutrition: Divalent Cations, Transport And Compartmentalization", *Prog. Botany*, 51: 93-112.
- [82]. Rivetta A., Negrini N., Cocucci M., 1997, "Involvement of Ca²⁺- calmodulin in Cd₂₊ toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination", *Plant Cell Environ.* 20:600–608.
- [83]. Singh, O.V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R. Ve Jain, R.K., 2003, "Phytoremediation: An Overview Of Metallic Ion Decontamination From Soil", *Applied Microbiology And Biotechnology*, 61, 405-412.
- [84]. Rascio, N., Navari-Izzo, F., 2011, "Heavy Metal Hyperaccumulating Plants: How And Why Do They Do It? And What Makes Them So Interesting?", *Plant Science*, 180, 169-181.
- [85]. Terzi H., Yıldız M., 2011, "Ağır Metaller Ve Fitoremediasyon: Fizyolojik Ve Moleküler Mekanizmalar", *Afyon Kocatepe Üniversitesi*, Afyonkarahisar.
- [86]. Williams, L.E., Pittman, J.K., Hall, J.L., 2000, "Emerging Mechanisms For Heavy Metal Transport In Plants", *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1465, 104-126.

- [87]. Belouchi, A., Kwan, T., Gros, P., 1997, "Cloning And Characterization Of The Osmramp Family From *Oryza sativa*, A New Family Of Membrane Proteins Possibly Implicated In The Transport Of Metal Ions", *Plant Molecular Biology*, 33, 1085-1092.
- [88]. Cobbett, C.S., 2000, "Phytochelatins And Their Roles In Heavy Metal Detoxification", *Plant Physiol*, 123:825-832.
- [89]. Axelsen, K.B., Palmgren, M.G., 1998, "Inventory Of The Superfamily Of P-Type Ion Pumps In *Arabidopsis*" *Plant Physiol*, 126, 696–706.
- [90]. Argüello J., Eren E., González-Guerrero M., 2007, "The Structure And Function Of Heavy Metal Transport P1b-Atpases", *Biomaterials*, 20:233-248.
- [91]. Mills, R.F., Francini, A., Da Rocha, P.S.C.F., Baccarini, P.J., Aylett, M., Krijger, G.C., Williams, L.E., 2005, "The Plant P-1b-Type Atpase Athma4 Transports Zn And Cd And Plays A Role In Detoxification Of Transition Metals Supplied At Elevated Levels" *Febs Letters*, 579, 783-791.
- [92]. Hussain, D., Haydon, M.J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S.M., Young, J., Camakaris, J., Harper, J.F., Cobbett, C.S., 2004, "P-Type Atpase Heavy Metal Transporters With Roles In Essential Zinc Homeostasis In *Arabidopsis*", *Plant Cell*, 16, 1327-1339.
- [93]. Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Preveral, S., Forestier, C., Vavasseur, A., Richaud, P., 2005, "Heavy Metal Transport By Athma4 Involves The N-Terminal Degenerated Metal Binding Domain And The Cterminal His(11) Stretch", *Febs Letters*, 579, 1515- 1522.
- [94]. Courbot, M., Willems, G., Motte, P., Arvidsson, S., Roosens, N., Saumitou-Laprade, P. Ve Verbruggen, N., 2007, "A Major Quantitative Trait Locus For Cadmium Tolerance In *Arabidopsis* Halleri Colocalizes With Hma4, A Gene Encoding A Heavy Metal Atpase", *Plant Physiology*, 144, 1052-1065.
- [95]. Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Leohardt, N., David, P., Nussaume, L., Vavasseur, A., Richaud, P., 2004, "Overexpression of AtHMA4 Enhances Root-to-Shoot Translocation of Zinc and Cadmium and Plant Metal Tolerance", *Febs Letters*, 576, 306-312.
- [96]. Hanikenne, M., Talke, I.N., Haydon, M.J., Lanz, C., Nolte, A., Motte, P., Kroymann, J., Weigel, D., Krämer, U., 2008, "hyperaccumulation required cisregulatory changes and triplication of HMA4 Evolution of metal ", *Nature*, 453, 391–395.
- [97]. Jusovic, M., Maya Y., Velitchkova S., P. Misheva Andreas B., Emilia L. Apostolova, A., Anelia G., 2018, "Photosynthetic Responses of a Wheat Mutant (Rht-B1c) with Altered DELLA Proteins to Salt Stress" *J Plant Growth Regul*, 37:645–656.
- [98]. Verret, F., Gravot, A., Auroy, P. Et Al., 2004, "Overexpression Of Athma4 Enhances Root-To-Shoot Translocation Of Zinc And Cadmium And Plant Metal Tolerance", *Febs Letters* 576: 306–312.
- [99]. Jusovic M., Memon A.R., 2015, Unpublished Data.
- [100]. Kim, D.Y., Bovet, L., Kushnir, S., Noh, E.W., Martinoia, E. Ve Lee, Y., 2006, "Atatm3 Is Involved In Heavy Metal Resistance In *Arabidopsis*" *Plant Physiology*, 140, 922- 932.

- [101]. Delhaize, E., Gruber, B.D. Ve Ryan, P.R., 2007, "The Roles Of Organic Anion Permeases In Aluminium Resistance And Mineral Nutrition", *Febs Letters*, 581, 2255-2262.
- [102]. Talke, I., Hanikenne, M., Krämer, U., 2006, "Zinc Dependent Global Transcriptional Control, Transcriptional De-Regulation And Higher Gene Copy Number For Genes In Metal Homeostasis Of The Hyperaccumulator *Arabidopsis Halleri*", *Plant Physiology*, 142, 148-167.
- [103]. Van de Mortel, J.E., Villanueva, L.A., Schat, H., Kwekkeboom, J., Coughlan, S., Moerland, P.D., Ver Loren van Themaat, E., Koornneef, M., Aarts, M.G.M., 2006, "Large Expression Differences in Genes for Iron and Zinc Homeostasis, Stress Response, and Lignin Biosynthesis Distinguish Roots of *Arabidopsis thaliana* and the Related Metal Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*", *Plant Physiology*, 142, 1127- 1147.
- [104]. US EPA, 2000.
- [105]. Suresh, B., Ravishankar, G.A., 2004, "Phytoremediation a novel and promising approach for environmental cleanup", *Critical Reviews in Biotechnology*, 24, 97-124.
- [106]. Tangahu, B. J., Abdullah, S. R. S., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., Mukhlisin, M., 2011, "A Review on Heavy Metals (As, Pb, and Hg) Uptake by Plants through Phytoremediation", *International Journal of Chemical Engineering*, Article ID 939161, 31 pp.
- [107]. Memon, A.R., Zahirovic, E., 2014, "Genomics and Transcriptomics Analysis of Cu Accumulator Plant *Brassica nigra* L.", *Journal of Applied Biological Sciences*, 8(2): 1-8.
- [108]. Dağhan, H., Köleli, N., Uygur, V., Arslan, M., Önder, D., Göksun, V., Ağca, N., 2012, "Kadmiyum İle Kirlenmiş Toprakların Fitoekstraksiyonla Arıtımında Transgenik Tütün Bitkisinin Kullanımının Araştırılması", *Toprak Su Dergisi*; 1 (1): 1-6.
- [109]. Padmavathiamma, P. K., Loretta, Y.L., 2007, "Phytoremediation Technology: Hyper-Accumulation Metals In Plants. Water Air Soil Pollution", 184, 105- 126.
- [110]. Blaylock, M.J., Huang, J.W., 2000, "Phytoextraction Of Metals" In: Raskin, I., Ensley, B.D. (Eds.), *Phytoremediation Of Toxic Metals: Using Plants To Clean-Up The Environment*. Wiley, New York, Pp. 53- 70.
- [111]. Newman, L.A., Reynolds, C.M., 2004, "Phytodegradation Of Organic Compounds. Current Opinion In Biotechnology", 15, 225-230.
- [112]. Rai, P.K., 2009, "Heavy Metal Phytoremediation From Aquatic Ecosystems With Special Reference To Macrophytes", *Environmental Science And Technology*, 39: 697-753.
- [113]. Vidali, M., 2001, "Bioremediation", XVIII ICCA, Dakar.
- [114]. Pilon-Smits, E., Freeman J.L., 2006, "Environmental Cleanup Using Plants: Biotechnological Advances And Ecological Considerations", *Frontiers In Ecology And The Environment*, 4 (4): 203–210.

- [115]. Hooda, V., 2007, "Phytoremediation Of Toxic Metals From Soil And Waste Water", *Journal Of Environmental Biology*, 28 (2): 367-376.
- [116]. Rajakaruna, N., Tompkins, K.M., Pavicevic, P.G., 2006, "Phytoremediation: An Affordable Green Technology For The Clean-Up Of Metal-Contaminated Sites In Sri Lanka", *Ceylon Journal Of Science*, 35 (1): 25-39.
- [117]. ATSDR, 2011, "Agency For Toxic Substances And Disease Registry", [Http://Www.Atsdr.Cdc.Gov/Spl/.](http://www.atsdr.cdc.gov/spl/)
- [118]. Chandna R., Gupta S., Ahmad A., Iqbal M., Prasad M., 2010, "Variabilities in Indian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties differing in nitrogen efficiency as assessed by microsatellite markers", *Protoplasma*, 242: 55–67.
- [119]. Memon, A.R., 2014, "Metal Hyperaccumulators: Mechanisms of Hyperaccumulation and Metal Tolerans" *Springer*, DOI: 10.1007/978-3-319-40148-5_8.
- [120]. Siddiqui M., Abbasi B., Ahmad N., Ali M., Mahmood T., 2014, "Toxic Effects Of Heavy Metals (Cd, Cr And Pb) On Seed Germination And Growth And Dpph-Scavenging Activity In Brassica Rapa Var. Turnip", *Toxicology And Industrial Health*, 30(3): 238-249.
- [121]. Metcalfe, C.R., Chalk, L., 1950, "Anatomy of the Dicotyledons", *Clarendon Press*, Vol. 1, Oxford, 243-245.
- [122]. Meyers, D.E.R., Kopittke, P.M., Auchterlome, G.J., Web, R.I., 2009, Characterization of lead precipitate following uptake by roots of *Brassica juncea*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28, 11, 2250–2254.
- [123]. Begonia, G.B., Davis, C.D., Begonia, M.F.T., Gray, C.N., 1998, "Growth responses of Indian Mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern.] and its phytoextraction of lead from a contaminated soil", *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61, 38-43.
- [124]. Jiang, W., Liu, D., Hou, W., 2000, "Hyperaccumulation of lead by roots, hypocotyls, and shoots of *Brassica juncea*", *Biologia Plantarum*, 43, 603-606.
- [125]. Liu, D., Jianga, W., Liu, C., Xina, C., Hou, W., 2000, "Uptake and accumulation of lead by roots, hypocotyls and shoots of Indian mustard [*Brassica juncea* (L.)]", *Bioresource Technology*, 71, 273-277.
- [126]. Meyers, D.E.R., Auchterlome, G.J., Webb, R.I., Wood, B., 2008, "Uptake And Localisation Of Lead In The Root System Of *Brassica Juncea*", *Environmental Pollution*, 153, 323-332.
- [127]. Zaier, H., Mudarra, A., Kutscher, D., Fernandez De La Campa, M.R., Abdelly, C., Sanz-Medel, A., 2010, "Induced lead binding phytochelatins in *Brassica juncea* and *Sesuvium portulacastrum* investigated by orthogonal chromatography inductively coupled plasma-mass spectrometry and matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry", *Analytica Chimica Acta*, 671, 48–54.

- [128]. Sun, Q., Ye, Z.H., Wang, X.R., Wong, M.H., 2007, “Cadmium Hyperaccumulation Leads To An Increase Of Glutathione Rather Than Phytochelatins In The Cadmium Hyperaccumulator *Sedum Alfredii*”, *Journal Of Plant Physiology*, 164, 1489-1498.
- [129]. Castillo-Michel, H.A, Hernandez, N., Martinez-Martinez, A., Parsons, J.G., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2009, “Coordination And Speciation Of Cadmium In Corn Seedlings And Its Effects On Macro- And Micronutrients Uptake”, *Plant Physiology And Biochemistry*, 47, 608–614.
- [130]. Seth, C.S., Chaturvedi, P.K., Misra, V., 2008, “The Role Of Phytochelatins And Antioxidants In Tolerance To Cd Accumulation In *Brassica Juncea* L.”, *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 71, 76–85.
- [131]. Ebbs, S.D., Kocham, L.V., 1997, “Toxicity of zinc and copper to *Brassica* species: Implications for phytoremediation”, *Journal of Environmental Quality*, 26, 776–781.
- [132]. Rio, M., Del Fong, R., Fernandez-Martinez, J., Dominguez, J., Haro, A., De-Haro, A., 2000, “Field Trials Of *Brassica Carinata* And *Brassica Juncea* In Polluted Soils Of The Guadamar River Area”, *Fresenius Environmental Bulletin*, 9, 328–332.
- [133]. Indoria, A.K., Pooma, S.R., 2006, “Phytoextractability Of Lead From Soil By Some Oilseed Crops As Affected By Sewage Sludge And Farmyard Manure”, *Archives Of Agronomy And Soil Science*, 52, 667–677.
- [134]. Haag-Kerwer, A., Schäfer, H.J., Heiss, S., Walter, C., Rausch, T., 1999, “Cadmium Exposure In *Brassica Juncea* Causes A Decline In Transpiration Rate And Leaf Expansion Without Effect On Photosynthesis”, *Journal Of Experimental Botany*, 50, 1827–1835.
- [135]. Bowers, J.E., Chapman, A.B., Rong, J.M., Paterson, A.H., 2003, “Unraveling Angiosperm Genome Evolution By Phylogenetic Analysis Of Chromosomal Duplication Events”, *Nature*, 422, 433-438.
- [136]. O’neill, C.M., Bancroft, I., 2000, “Comparative Physical Mapping Of The Segments Of The Genome Of *Brassica Oleracea* Var. *Alboglabra* That Are Homologous To Sequenced Regions Of Chromosomes 4 And 5 of *Arabidopsis Thaliana*”, *Plant Journal*, 23, 233-243.
- [137]. Rana, D., Van Den Boogaart, T., O’neill, C.M., Hynes, L., Bent, E., Macpherson, L., Park, J.Y., Lim, Y.P., Bancroft, I., 2004, “Conservation Of The Microstructure Of Genome Segments In *Brassica Napus* And Its Diploid Relatives”, *Plant Journal*, 40, 725-733.
- [138]. Johnston, J.S., Pepper, A.E., Hall, A.E., Chen, Z.J., Hodnett, G., Drabek, J., Lopez, R., Price, H.J., 2005, “Evolution Of Genome Size Of Brassicaceae”, *Annals Of Botany*, 95, 229-235.
- [139]. Lynch, M., Force, A., 2000, “The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization”, *Genetics*, 154, 459-473.
- [140]. He, X., Zhang, J., 2005, “Rapid subfunctionalization accompanied by prolonged and substantial neofunctionalization in duplicate gene evolution”, *Genetics*, 269, 1157-1164.

- [141]. Roth, C., Rastogi, S., Arvestad, L., Dittmar, K., Light, S., Ekman, D., Liberles, D.A., 2007, "Evolution after gene duplication: models, mechanisms, sequences, systems and organisms", *Journal of Experimental Zoology*, 306B, 58-73.
- [142]. Kushwaha, H.R., Kumar, G., Verma, P.K., Singla-Pareek, S.L., Pareek, A., 2011, "Analysis of a salinity induced BjSOS3 protein from *Brassica* indicate it to be structurally and functionally related to its ortholog from *Arabidopsis*", *Plant Physiology and Biochemistry*, 49 (9), 996-1004.
- [143]. Yang, Y.-W., Lai, K.N., Tai, P.-Y., Li, W.-H., 1999, "Rates of nucleotide substitution in angiosperm mitochondrial DNA sequences and dates of divergence between *Brassica* and other angiosperm lineages", *Journal of Molecular Evolution*, 48, 597–604.
- [144]. Koch, M., Haubold, B., Mitchell-Olds, T., 2001, "Molecular systematics of the Brassicaceae: Evidence from coding plastidic *matK* and nuclear *Chs* sequences", *American Journal of Botany*, 88, 534–544.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ŞAHAN Merve Nur

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri : 09.01.1994 Ankara

Medeni hali : Bekar

Telefon : 0 (546) 4795306

e-mail : merve.nur.sahan@gmail.com

Eğitim

Yüksek lisans Uşak Üniversitesi /Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (devam ediyor)

Lisans Uşak Üniversitesi/ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü 2012

Lise Hürriyet Sürer Anadolu Lisesi 2008

İş Deneyimi

2019 MST Lab – Laboratuvar Asistanı

Yabancı Dil

İngilizce

Yayımlar

-

Hobiler

Yağlı boya resim, karakalem resim, bisiklet sürme, doğa yürüyüşü