

TC.  
UŞAK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

FARKLI ÇİNKO SEVİYELERİNDE YETİŞTİRİLEN BRASSİCA JUNCEA VE  
BRASSİCA NİGRA TÜRLERİNDE METAL ATPAZ' LARIN (HMA2, HMA4)  
ANLATIMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERVE ÇETİNDÖĞAN

HAZİRAN 2019  
UŞAK

TC.  
UŞAK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

FARKLI ÇİNKO SEVİYELERİNDE YETİŞTİRİLEN BRASSİCA JUNCEA VE  
BRASSİCA NİGRA TÜRLERİNDE METAL ATPAZ' LARIN (HMA2, HMA4)  
ANLATIMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERVE ÇETİNDÖĞAN

UŞAK

Merve ÇETİNDÖĞAN tarafından hazırlanan Farklı Çinko Seviyelerinde Yetiştirilen Brassica juncea ve Brassica nigra Türlerinde Metal ATPaz' ların (HMA2, HMA4) Anlatımı adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Abdülrezzak MEMON Tez Danışmanı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

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

Prof. Dr. Abdülrezzak 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 Bölümü, Necmettin Erbakan Üniversitesi

Tarih : 25/ 06/ 2019

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

Yrd. 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 Çetindoğan

**FARKLI ÇİNKO SEVİYELERİNDE YETİŞTİRİLEN BRASSİCA JUNCEA VE  
BRASSİCA NİGRA TÜRLERİNDE METAL ATPAZ' LARIN (HMA2, HMA4)  
ANLATIMI**

**(Yüksek Lisans Tezi)**  
Merve ÇETİNDÖĞAN

**UŞAK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Haziran 2019**

**ÖZET**

*Brassica juncea* (kahverengi hardal) ve *Brassica nigra* (siyah hardal) belli ağır metalleri akümüle ettiği bilinen ve gelişmiş kök sistemine sahip kara bitkileridir. Bu çalışmada *B. juncea* ve *B. nigra* bitkilerine 15 gün boyunca ( $ZnSO_4$ ) uygulanmıştır. Zn uygulanmasıyla bu bitki türlerinin kök ve yapraklarında metal akümülyasyon kapasiteleri ve fitoremediasyon teknolojisi için uygunluğu araştırılmıştır. *Brassicacea* türlerinde (*B. nigra*, *B. juncea*) Zn metali ile uyarılan önemli genlerin, metal ATPazların (HMA2, HMA4) Real Time PCR kullanılarak gen ekspresyonu tespit edilmiş ve HPLC cihazı ile glutatyon analizi ve spektrofotometre cihazı ile fenolik bileşiklerin tayini yapılarak metal transportlarla ilişkisi araştırılmıştır. Tüm bu veriler dahilinde *B. juncea'* nın kök örneklerinde biriken Zn ağır metal miktarı anlamlı olmamakla birlikte *B. juncea'* nın kök örneklerinde biriken Zn ağır metal miktarı, *B. nigra'* nın kök örneklerinden daha yüksek olduğu ve yapraklarında biriken Zn ağır metal miktarlarının her iki türde de birbirine yakınlık gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca *B. juncea* (Zn) ve *B. nigra* (Zn)' da anlatımı yapılan HMA4 ve HMA2 geninin ekspresyon seviyesinin glutatyon miktarıyla paralellik gösterdiği tespit edilmiştir. Tüm bu veriler dahilinde bu iki bitki türünün bünyelerinde metal birikimini ve taşınımını sağladıkları için fitoremediasyon teknolojisinde uygun aday türler olduğu tespit edilmiştir.

**Bilim Kodu:**

**Anahtar Kelimeler:** *B. juncea*, *B. nigra*, Metal ATPaz'lar (HMA2, HMA4), Gen Ekspresyonu, Fitoremediasyon

**Sayfa Adedi:** 80

**Tez Yöneticisi:** Prof. Dr. Abdülrezzak MEMON



**EXPRESSION OF METAL TRANSPORTING (HMA2, HMA4) IN BRASSICA  
JUNCEA AND BRASSICA NIGRA SPECIES GROWN AT DIFFERENT ZINC  
LEVELS**

**(M.Sc. Thesis)**

Merve CETINDOGAN

**UNIVERSITY OF USAK**

**GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE**

**June 2019**

**ABSTRACT**

Brassica juncea (brown mustard) and Brassica nigra (black mustard) are land plants with a well-known root system that accumulate certain heavy metals. In this study, B. juncea and B. nigra plants were grown at different ZnSO<sub>4</sub> concentrations for 15 days. With the application of Zn, the metal accumulation capacities in the root and leaves of these plant species were studied. Gene expression of metal ATPases (HMA2, HMA4) in Brassica species (B. nigra B. juncea) grown at different Zn levels were analyzed by using Real Time PCR. In all these data, the amount of Zn accumulation in the roots of B. juncea was not significant. In contrast, B. juncea accumulated more Zn in roots compare to B. nigra roots. The amount of Zn accumulation in the leaves of both plant species was more or less similar. In addition, the expression pattern of HMA4 and HMA2 genes in B. juncea (Zn) and B. nigra (Zn) was found to be similar to the glutathione amount in the leaves. As a result, both plant species were found to be good candidates for phytoremediation of Zn.

**Science Code:**

**Key words:** B. juncea, B. nigra, Heavy metal ATPases (HMA2, HMA4), Gene expression, Phytoremediation

**Number of phage:**80

**Supervisor:** Prof. Dr. Abdülrezzak MEMON





## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren Hocam Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Prof. Dr. Abdülrezzak MEMON' a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen çok değerli Hocam Dr.Öğr. Üyesi İbrahim BULDUK' a;

Çalışmalarım boyunca yanımda olan laboratuvar arkadaşım Merve ŞAHAN' a;

Bu çalışmaya sağladığı katkılarından dolayı Muhammed MEMON ' a teşekkürü bir borç bilirim.

Bugünlere gelmem için yolumu aydınlatan ve her zaman sevgisiyle yanımda olan başta annem Fatma ÇETİNDÖĞAN olmak üzere Aileme, sevgisini ve desteğini her zaman hissettiğim çok değerli arkadaşım M. Furkan DAŞDEMİR' e içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
TEŞEKKÜR .....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ .....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
RESİM LİSTESİ .....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	xv
GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	5
2.1. Bitkiler ve Ağır Metaller.....	5
2.1.1. Bitkilerde Ağır Metal Alımı ve Taşınması.....	8
2.1.2 Bitkilerde Ağır Metal Toleransı .....	9
2.2 Ağır Metal Akümülayonu ve Toleransının Moleküler Mekanizması .....	10
2.2.1. Metal Alımı .....	10
2.3. Bitkilerde Ağır Metal Metabolizması İle İlişkili Genlerin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler .....	12
3.MATERYAL VE METOD .....	16
3.1.Toprak Sterilizasyonu .....	16
3.2.Tohum Sterilizasyonu .....	16
3.3. Bitkilere Ağır Metal Uygulaması .....	18
3.4. Bitkilerde Biriken Ağır Metal Miktarının Tayini .....	22
3.5. Bitkide Anlatımı Değişen Genlerin Tanımlanması ve Belirlenmesi İçin Kullanılan Moleküler Yöntemler.....	25
3.5.1. Total RNA İzolasyonu .....	25
3.5.2.Total RNA Miktar Tayini.....	26
3.5.3.Ters Transkripsiyon- Komplementer (Tamamlayıcı) DNA (cDNA) Sentezi ve Kontrolü .....	26
3.5.4. Primer Tasarımı.....	28
3.5.5. Yarı Kantitatif Ters Yazılım Zincir Reaksiyonu (REALTIME PCR) .....	28

3.5.6. HPLC ile Glutasyon Tayini .....	29
3.5.7. Toplam Fenolik Bileşen Miktarının Belirlenmesi.....	29
3.5.7.1. Çözeltilerin Hazırlanması .....	29
3.5.7.2. Toplam Flavonoid Bileşen Miktarının Belirlenmesi .....	30
3.5.7.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması .....	30
4. BULGULAR .....	31
4.1. Bitkide Biriken Ağır Metal Miktarı .....	31
4.2. Ağır Metal Uygulaması Yapılan Bitkilerde Anlatımı Değişen Genlerin Tanımlanması Ve Belirlenmesi .....	33
4.2.1. <i>Brassica juncea</i> Bitkisinden Total RNA İzolasyonu .....	33
4.2.2. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) .....	34
4.2.3. HPLC İle Glutasyon Tayini .....	37
4.2.4. Toplam Fenolik Bileşen Miktarı .....	50
4.2.5. Toplam Flovanoid Miktarı .....	51
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	52
KAYNAKLAR .....	57

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Sayfa

<b>Çizelge 3.1.</b> Ters Transkripsiyon- Komplementer DNA (cDNA) Sentez Kiti içerisinde bulunan tampon ve enzimlerin hacimleri .....	27
<b>Çizelge 3.2.</b> Ters Transkripsiyon- Komplementer DNA (cDNA ) sentezi için optimum inkübasyon sıcaklıkları ve süreleri. ....	27
<b>Çizelge 3.3.</b> Tasarlanan primerlerin Baz dizileri ve GC % değerleri.....	28
<b>Çizelge 3.4.</b> <i>B. juncea</i> ve <i>B. nigra</i> yaprak numunelerinin Real-Time PCR' da gen anlatımı için kullanılan malzemeler ve miktarları .....	29
<b>Çizelge 4.1.</b> 15gün boyunca ve haftada üç gün olmakla birlikte farklı konsantrasyonlarda Zn uygulanan <i>B. juncea tomcat</i> gösterimi .....	32
<b>Çizelge 4.2.</b> 15gün boyunca ve haftada üç gün olmakla birlikte farklı konsantrasyonlarda Zn uygulanan <i>B. nigra</i> gösterimi.....	32
<b>Çizelge 4.3.</b> 15 gün boyunca farklı seviyelerde ZnSO <sub>4</sub> çözeltisi <i>B. juncea tamcot</i> ve <i>B. nigra</i> bitkilerine uygulanarak kök ve yaprak dokularından, total RNA izolasyonu.....	33
<b>Çizelge 4.4.</b> Farklı Zn derişimleri uygulanan ve <i>B. juncea'</i> nın ort. glutatyon miktarı (ort.±SH) (µg/g).....	49
<b>Çizelge 4.5.</b> Farklı Zn derişimleri uygulanan ve <i>B. nigra'</i> nın ort. glutatyon miktarı (ort.±SH) (µg/g).....	49
<b>Çizelge 4.6.</b> Farklı Zn derişimleri uygulanan <i>B. juncea'</i> da ort. toplam fenolik madde miktarı (ort.±SH) .....	50
<b>Çizelge 4.7.</b> Farklı Zn derişimleri uygulanan <i>B. nigra'</i> da ort. toplam fenolik madde miktarı (ort.±SH).....	50
<b>Çizelge 4.8.</b> <i>B.juncea</i> bitki türünün farklı Zn seviyesinde ki flovanoid mktarı .....	51
<b>Çizelge 4.9.</b> <i>B. nigra</i> bitki türünün farklı Zn seviyesinde ki flovanoid mktarı .....	51

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. <i>Brassicaceae</i> türleri arasındaki genomik ilişkileri temsil eden üçgen	14
Şekil 4.1. 15 gün boyunca ZnSO <sub>4</sub> uygulaması yapılan <i>B. nigra</i> bitkisinin farklı ZnSO <sub>4</sub> (0 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 500 µM) seviyelerinde ki görünümü. ...	31
Şekil 4.2. 15 gün boyunca Zn uygulaması yapılan <i>B. juncea</i> tomcat bitkisinin farklı ZnSO <sub>4</sub> (0 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 500 µM) seviyelerinde ki görünümü.	31
Şekil 4.3. <i>B. nigra</i> bitkisinin Real Time PCR analizine göre; yatay düzlemde 1= 0µM, 2= 25 µM, 3= 50 µM, 4= 100 µM, 5= 200 µM, 6= 500 µM; dikey düzlemde HMA2 geninin ekspresyon seviyesi.....	34
Şekil.4.4. Şekil 4.3. <i>B. nigra</i> bitkisinin R-T PCR analizine göre; yatay düzlemde 1= 0µM, 2= 25 µM, 3= 50 µM, 4= 100 µM, 5= 200 µM, 6= 500 µM; dikey düzlemde HMA4 geninin ekspresyon seviyesi.....	35
Şekil.4.5. Şekil 4.3. <i>B. juncea</i> bitkisinin R-T PCR analizine göre; yatay düzlemde 1= 0µM, 2= 25 µM, 3= 50 µM, 4= 100 µM, 5= 200 µM, 6= 500 µM; dikey düzlemde HMA2 geninin ekspresyon seviyesi .....	35
Şekil4.6. Şekil 4.3. <i>B. juncea</i> bitkisinin Real Time PCR analizine göre; yatay düzlemde 1= 0µM, 2= 25 µM, 3= 50 µM, 4= 100 µM, 5= 200 µM, 6= 500 µM; dikey düzlemde HMA4 geninin ekspresyon seviyesi .....	36
Şekil 4.7. <i>Brassica juncea</i> (Zn) 0 µM solüsyonda glutasyon miktarı ppm cinsinden hesaplanmıştır. ....	37
Şekil 4.8. <i>Brassica juncea</i> (Zn) 25µM solüsyondaki glutasyon miktarı ppm cinsinden hesaplanmıştır. ....	38
Şekil 4.9. <i>Brassica juncea</i> 50µm Zn solüsyondaki glutasyon miktarı ppm cinsinden hesaplanmıştır. ....	39
Şekil 4.10. <i>Brassica juncea</i> 100 µM Zn solüsyondaki glutasyon miktarı ppm cinsinden hesaplanmıştır. ....	40
Şekil 4.11. <i>Brassica juncea</i> 200 µM solüsyondaki glutasyon miktarı ppm cinsinden hesaplanmıştır. ....	41
Şekil 4.12. <i>Brassica juncea</i> 500 µM Zn solüsyondaki glutasyon miktarı ppm cinsinden hesaplanmıştır. ....	42
Şekil 4.13. <i>Brassica nigra</i> 0µM Zn solüsyondaki glutasyon miktarı, ppm cinsinden hesaplanmıştır .....	43
Şekil 4.14. <i>B. nigra</i> 25 µM Zn solüsyondaki glutasyon miktarı, ppm cinsinden hesaplanmıştır. ....	44
Şekil 4.15. <i>Brassica nigra</i> 50 µM Zn solüsyondaki glutasyon miktarı, ppm cinsinden hesaplanmıştır .....	45
Şekil 4.16. <i>Brassica nigra</i> 100 µM Zn solüsyondaki glutasyon miktarı, ppm cinsinden hesaplanmıştır .....	46
Şekil 4.17. <i>Brassica nigra</i> 200 µM Zn solüsyondaki glutasyon miktarı, ppm cinsinden hesaplanmıştır .....	47

**Şekil 4.18.** *Brassica nigra* 500 µM Zn solüsyondaki glutatyon miktarı, ppm cinsinden hesaplanmıştır ..... 48



## RESİM LİSTESİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Resim 3.1.</b> <i>B. nigra</i> bitkisine ilk hoagland solüsyonu verildikten sonra ki görüntüsü .....	17
<b>Resim 3.2.</b> <i>B. juncea tomcat</i> bitkisine ilk hoagland solüsyonu verildikten sonra ki görüntüsü .....	18
<b>Resim 3.3.</b> <i>B. nigra</i> bitkisine hoagland ve ZnSO <sub>4</sub> karışımı verildikten sonra ki görüntüsü .....	19
<b>Resim 3.4.</b> <i>B. juncea tomcat</i> bitkisinin ilk hoagland ve ZnSO <sub>4</sub> verildikten sonra ki görüntüsü .....	19
<b>Resim 3.5.</b> <i>B. nigra</i> bitkisinin hasat işleminden önce ki görüntüsü ve hasat işleminden sonra ki kök boyları .....	20
<b>Resim 3.6.</b> <i>B. juncea</i> bitkisinin hasat işleminden önce ki görüntüsü ve hasat işleminden sonra kök boyları .....	21
<b>Resim 3.7.</b> Numuneleri yaş yakma işlemine başlamadan önce kuru yaprak(200 mg) ağırlıklarının erlenmayere alınması .....	22
<b>Resim 3.8.</b> Yaş yakma işleminde eklenen Nitrik asitle birlikte sıcaklığın da artmasıyla çözeltilinin rengi yavaş yavaş berraklaşmaya başlamıştır .....	23
<b>Resim 3.9.</b> Berrak bir görüntü elde edildikten sonra da en az 30 daha işleme devam edilmiştir .....	24

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

<b>Ar</b>	: Arsenik
<b>Cd</b>	: Kadmiyum
<b>CDF</b>	: Katyon Difüzyon Hızlandırıcı
<b>Co</b>	: Kobalt
<b>Cu</b>	: Bakır
<b>Fe</b>	: Demir
<b>GR</b>	: Glutasyon Redüksiyon
<b>HPLC</b>	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
<b>Hg</b>	: Civa
<b>Krom</b>	: Krom
<b>NA</b>	: Nikotinamin
<b>Ni</b>	: Nikel
<b>Pb</b>	: Kurşun
<b>R-T PCR</b>	: RealTime- PCR
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	: Çinko Sülfat
<b>ZIP</b>	: Çinko Demir Permeazlar



## GİRİŞ

Ağır metaller; yüksek toksisiteli ve kalıcı olan önemli inorganik kirleticilerdir. Hızlı kentleşme ve endüstriyel kalkınma ile birlikte metal salınımı biyosferde hızla artış göstermektedir. En yaygın antropojenik kaynaklar; endüstri, deri, tekstil gibi birçok sanayi dallarında atıkların uzaklaştırılması, çeşitli kentsel atıklar, metal madenleri ve eritme atıkları, fosil yakıtların kullanımı, endüstriyel atıkların uzaklaştırılması, hava kaynaklı endüstriyel atıkların depolanması, toprak dolgu işlemleri, pestisit, herbisit ve gübre kullanımı gibi insan faaliyetleri ile ağır metal iyonları toprak ve suya karışarak doğal çevreye zarar vermektedir [1]. Kökeni ne olursa olsun ağır metallerin toprakta ve suda birikmesi tüm ekosistem için ciddi bir tehdittir. Dünyada' ki tüm organik ve inorganik kirleticeler arasında toprak kirliliğine en fazla ağır metaller neden olmaktadır ( % 37 ' den daha fazla bir oranda) [2]. Bu metallerin yüksek konsantrasyonlarda toprakta birikmesi toprak kalitesinin bozulmasına, tarımsal üretimin kalitesinin düşmesine; buna bağlı olarak ta ürün kalitesinin ve verimliliğinin azalmasına neden olur. Tüm bu etkiler nedeniyle besin zinciri yoluyla aktarılan besinler tüm canlılar için büyük bir tehlike oluşturmaktadır. Topraktaki metal konsantrasyonları tipik olarak 100000 mg kg-1 da 1 den daha azdır. Arsenik (As), Kadmiyum (Cd), Krom (Cr), Çinko ( Zn), Kurşun (Pb), Civa (Hg), Bakır ( Cu), Nikel (Ni), metallerin / metaloidlerin birikmesi (Zn) mutajenik etkileri ile, canlılarda DNA hasarı ve kansere yol açmaktadır [3].

Ağır metaller genellikle yüksek bir yoğunluğa sahiptir ve aşırı düşük konsantrasyonlarda dahi zehirlidir. Tarımsal topraklarda yükseltilmiş ağır metal konsantrasyonları, süreklilikleri, toksisiteleri, uzun yarı ömürleri ve özellikle biyoakümülyasyon nedeniyle önemlidir ve halen Ni, Cd, Zn gibi ağır metallerin yüksek toksisiteye sahip olduğu düşünülmektedir [4].

Ağır metalle kirlenmiş alanlarda yetişen bitkiler genellikle daha fazla miktarda ağır metal biriktirir ve bunun sonucunda gıda zincirinin kontamine olmasına neden olur. Kirlenmiş besin zinciri, ağır metallerin hayvan ve insan dokularına girmesi için birincil yol olarak işlev görür ve bu da onları dermatitten çeşitli kanser türlerine kadar bir çok hastalığa

eğilimli hale getirir [5]. Fakat bu tür antropojenik etkilerin yanısıra dünyada bazı bölgelerde bulunan doğal maden yatakları bulunmaktadır. Bunlar yüksek miktarda ağır metal içermektedir. Bu bölgelerde genellikle karakteristik olarak ağır metalleri bünyelerinde biriktiren ya da tolere edebilen bitkiler yaşamaktadır. Ağır metallere karşı yüksek tolerans gösteren bu tür bitkiler hiperakümülatör bitkiler olarak adlandırılmaktadır. Japonya' da yapılan bir çalışmaya göre, ormanlık alanlarda 27 familya ve 39 cins içerisinde 62 bitki türü ile çalışırken bu bitki türlerinin yapraklarında Mn (Manganez), Cu, Zn, Cd, Co (Kobalt) ve Ni (birkaç yüz kat) konsantrasyonları olan iki ve ikiden fazla akümülatör bitki türü olduğu tespit edilmiştir [6,7,8]. Bu metal akümülatör bitkilerin *Ilex crenata*, *Acanthopanax sciadophylloides*, *Clethra barbinervis* ve *Pieris japonica* olduğu bulunmuştur. Bununla beraber *Arabidopsis halleri*, *Noccaea caerulescens* (*Thlaspi caerulescens*), *B. nigra* ve *B. juncea* bitkilerinde ağır metal toleransı ve birikim mekanizmaları açıklanmaya çalışılmıştır [9].

Bu bitki türlerinin birçoğu ortamda bulunan ağır metali bünyelerine almaktan kaçınmaktadır. Fakat bazı bitki türleri biyolojik olarak fonksiyonu bilinmeyen bu metallerin yüksek konsantrasyonlarını akümüle etme ve toprak üstü organlara taşıma yeteneği göstermektedir [10].

Akümülatör ve hiperakümülatör bitkilerin belirlenmesi toprak ve suda bulunan ağır metallerin stabilizesinde kullanılan fitoremediasyon teknolojisinin gelişmesini sağlamıştır. Tarım topraklarının ağır metaller tarafından kirlenmesi sonucu ortaya çıkan olumsuz ekolojik etkilerden dolayı, bazı kirli topraklardaki bu metaller kritik bir çevre sorunu haline gelmiştir. Bu tip metaller, geniş alanlara yayıldıklarından ve kirlenmiş topraklarda yetişen bitkiler üzerinde toksik etkiler oluşturduğundan dolayı, toprak kirleticiler olarak kabul edilirler [11]. Atmosferde salınan iz metallerin, antropojenik miktarları ve doğal miktarları karşılaştırıldığında insan faaliyetlerinin doğal süreçlere oranla Cd' un 15, Zn' nin 21, Pb' nin 100 kat daha fazla etkilediği gözlemlenmiştir.

Yüksek konsantrasyondaki ağır metal seviyeleri potansiyel olarak zehirli hale gelir ve ölümcül değişikliklere yol açabilir. Bu etkilerden dolayı ağır metallerin potansiyel toksisitesi nedeniyle tarım alanlarının ve su kirliliğinin temizlenmesi oldukça güçtür.

Ağır metallerin yol açtığı kirlilikten çevreyi arındırmak için kullanılan fizikokimyasal metotlar pahalı ve aynı zamanda toprağın yapısını da bozmaktadır [12].

Bu nedenle, son yıllarda mevcut remediasyon teknikleri yerine ağır metallerin uzaklaştırılmasında bitkilerin kullanıldığı yeşil ıslah (fitoremediasyon) yöntemi, inaktif ve kirletici metallerin kirlenmiş toprak ve sudan ayrıştırılmasında, restore ve stabilizesinde kullanılan en etkili ve düşük maliyetli bir teknolojik çözüm haline gelmiştir [9].

Fitoremediasyon, ağır metallerle kirlenmiş olan toprak ve suyun bitkiler aracılığıyla toprak ve sudan arındırılması yöntemidir. Bu yöntem diğer remediasyon teknolojilerine kıyasla sürdürülebilir kalkınma sağlanması açısından daha fazla potansiyeli olan yenilikçi bir yöntem olarak ortaya çıkmaktadır. Bu remediasyon tekniği, toprağın biyolojik özelliklerini ve fiziksel yapısını korumaktadır [13]. Toprakta en derin bölgelere ulaşmak için geniş bir kök yapısına sahip olan bitkiler toprak ve sudaki elementleri bünyesinde biriktirme veya ortadan kaldırma yeteneğine sahiptir. Bu metalleri bünyelerinde depo eden bitkiler hasat edilerek özel metal atık alanlarının bulunduğu bölgelere gömülmekte veya metallerin geri dönüşümü sağlanmaktadır.

Günümüzde bilinen transgenik teknolojiler veya metodlar aracılığı ile bitkilerin fitoremediasyon teknolojisi için geliştirilmesi birçok kuruluşun bu teknolojiye olan yaklaşımını ve talebini arttıracaktır. Ancak bu yaklaşım, metal toleransı, akümüasyonu ve translokasyonu daha net bir şekilde anlaşıldıktan sonra tamamen kullanılabilir olacaktır. Bu nedenle bitkilerde ağır metal akümüasyonu ve toleransının moleküler mekanizması hakkındaki bilgilerin artması, mevcut remediasyon teknolojilerinin geliştirilmesi bakımından son derece önemlidir [14]. Bu yüzden metal akümülatör ve metal toleranslı olan bitkilerin ancak gen anlatım seviyeleri ve önemli metabolik yolların moleküler mekanizmasının anlaşılması mevcut yöntemlerin geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır.

Bu tez çalışmasında, ağır metal akümüasyonu ve toleransı ile ilişkili moleküler mekanizmada açıklanamamış noktalara katkıda bulunmak için Çin, Hindistan ve diğer Güney Asya ülkeleri ile Türkiye' nin Güneydoğu bölgesinde yayılış gösteren, Brassicaceae familyasına ait olan metal akümülatör *B. juncea* ve *B. nigra* türlerinin metal (Zn) biriktirme kapasiteleri ve fitoremediasyon teknolojisi için uygunluğu, RT-PCR ile gen ekspresyonu yaparak Zn ile indüklenen P1<sub>B</sub>-tipi metal transportların (HMA2 ve HMA4) anlatımı yapılacaktır. Ayrıca HPLC cihazı ile glutatyon analizi ve çeşitli biyokimyasal metodlar kullanarak fenolik bileşiklerin tayini ile tespit edilen genlerin sonuçlarına göre bu bitkilerin fitoremediasyon için uygunluğu araştırılmıştır. Tezin amacı kapsamında,

uygulama yapmak üzere belli ağır metallere tolerans gösterdiği bilinen ve gelişmiş kök sistemine sahip bir kara bitkisi olan *B. juncea* ( Hindistan hardalı) ve ağır metalleri hiperakümüle ettiği bilinen *B. nigra* kullanılmıştır. *B.juncea* Zn' ye karşı önemli bir tolerans göstermiş ve kirlenmiş topraklarda yetişen bitkilerin dokularında önemli miktarda Zn birikimi gözlenmiştir [15]. Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı tarafından açıklanan en tehlikeli kirleticiler arasında bulunan Zn ağır metali *B. juncea* ve *B. nigra* bitkilerine uygulanmıştır [16]. Uygulamalar sonucunda *B. juncea* bitkisinin Zn' ye karşı toleransının yüksek olduğu, *B. nigra'* nın ise Zn' yi akümüle etme kapasitesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında *Brassicaceae* familyasındaki yüksek metal biriktirme potansiyeline sahip bitkilerden *B. juncea* ve *B. nigra'nın* fitoremediasyon teknolojisinde kullanımı ve metal (Zn) biriktirme kapasitelerini belirlemek için; metale (Zn) karşı indüklenen bazı genler (HMA2 VE HMA4) ve glutatyon gibi enzimleri kodlayan genlerin anlatımı RT-PCR kullanarak araştırılmıştır. Ayrıca, farklı Zn seviyelerinde fenolik bileşiklerin tayini yapılarak bu bitkilerin fitoremediasyon teknolojisi için uygunluğu araştırılmıştır. Ağır metallerin alımı ve dokulara taşınımında görevli olan bazı genlerin ekspresyon seviyeleri Zn ağır metali uygulanan bitkilerin kök ve yapraklarında belirlenerek bu genlerin metal homeostazisindeki rollerinin moleküler düzeyde anlaşılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. Bitkiler ve Ağır Metaller

Bitkiler büyüme ve gelişmelerinde belirli elementlere ihtiyaç duymaktadır. Bitkilerin eser miktarda bünyelerine aldıkları elementler arasında bulunan Zn, Cu, Mn, Fe (Demir), Mo (Molibden), Ni enzimatik reaksiyonlar için gerekli olan ağır metallerdir. Ancak bazı çevresel etkilerle bitkiler bu ağır metalleri ihtiyaç duyulan konsantrasyonun üzerinde de bünyelerinde biriktirebilmektedir. Bu ağır metaller arasında yaygın olarak bulunan Zn [16] Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı tarafından açıklanan " tehlikeli kirletici maddeler " arasında yer almaktadır [17]. 40' dan büyük atom numarasına ve  $5g/cm^3$  'ün üzerinde yoğunluğa sahip olan elementler ağır metal olarak tanımlanmaktadır [18].

İnorganik kirleticiler sınıfında başlıca bulunan ağır metaller çeşitli doğal süreçler veya çevresel etkilerle tüm ekosistemi etkilemektedir. Yeryüzünde kendiginden varolan 90 tane elementten 53 tanesi ağır metaldir [19]. Hava şartlarının değişiklik göstermesiyle oluşan doğal kayaların aşınması sonucunda göl, toprak, deniz suyu ve deniz tabanında bulunan sedimentlerde partikül veya çözülmüş formlarda yaygın bir dağılım göstermektedirler [20]. Doğal süreçlerle meydana gelen kirlilikle beraber gelişen sanayi dalları, hızlı kentleşme, maden yatakları, tarımda kullanılan ilaçlar ve gübreleme gibi birçok faktörün etkisiyle oluşan ağır metal atıkları doğal çevreyi bozarak tüm canlı ve cansız çevreye zarar vermektedir.

Bitkiler besinlerini toprağa bırakırlar, sadece temel elementleri almak için yeterince seçici değildirler, ancak bazen gereksiz ve hatta toksik elementleri emerler. Metal alımı, toprak özünden, köklerin iç hücrelerine metal transferini içeren karmaşık bir süreçtir [21]. Toprakta yüksek konsantrasyonda bulunan ağır metaller bitki metabolizması ve büyümesi üzerinde toksik etkilere neden olmaktadır [22,23]. Ağır metallerin çözünülebilirlikleri, transportları, absorbe edilebilirlikleri ve kimyasal reaktivitelerdeki rolleri, canlı organizmaların toksisiteleri üzerinde önemli değişikliklere neden olmaktadır [24,16].

Ağır metallerin bitkilerde yol açtığı toksik etkiler;

- I. Cu ve Fe gibi ağır metallerin Fenton reaksiyonu ve otoksidasyon aracılığı ile reaktif oksijen türlerinin üretimi,
- II. Redoks-reaktif olmayan ağır metallerde özellikle Hg ve Cd ' de belirtilen, temel fonksiyonel grupların engellenmesi,

- III. Biyomoleküllerdeki temel metal iyonlarının yer değiştirmesi sonucu farklı türlerde ağır metal iyonları meydana gelmektedir [25,26].
- IV. Aşırı yüksek konsantrasyona sahip ağır metaller bitkilerin hücresele düzeyde görülen toksisitenin semptomlarını rapor etmiştir [27]. Oluşan toksisitenin etkileri doğrudan veya dolaylı yollarla meydana gelmektedir. Bu etkiler, protein yapısı, enzim aktivitesi, su dengesi, solunum ve ATP içeriği, fotosentez, büyüme ve morfogenez, reaktif oksijen türlerinin oluşumu açısından metallerin neden olduğu toksik etkiler hücre metabolizmasında ortaya çıkmaktadır.

Ağır metal tarafından kirliliğe maruz kalan bitkiler toprakta ki gelişimlerini sürdürmek için 3 temel sistem geliştirmişlerdir. Buna göre ağır metallerin bitki tarafından alınımıyla ilgili olarak 3 gruba ayrılmıştır: Metale karşı toleranslı, metal akümülatör ve metal indikatör bitkiler [28,29].

1) Metale karşı toleranslı bitkiler: Bu tür bitkilerin metal alınımının köklerden ve/veya metallerin köklerden toprak üstü organlara taşınması sınırlı olarak meydana gelmektedir. Bu sebeple toprakta biriken ağır metal konsantrasyonu ne kadar yüksek olursa olsun bitkinin toprak üstü dokularına taşınan metal konsantrasyonu düşüktür [28]. Bu tür bitkiler hücre zarı geçirgenliğini ya da hücre çeperine metal bağlama kapasitesini değiştirebilmekte veya daha şelatlayıcı madde(hücre içi metal bağlayıcı bileşikler) yayabilmektedir [30,31].

*Silene vulgaris* bu sistemi kullanan bitki türlerinden biridir [32,29].

2) Metal indikatör bitkiler: İndikatör (belirteç) bitkilerin toprak üstü dokularında bulunan metal miktarı, toprakta bulunan metal miktarı ile eşit dağılım göstermektedir. Bu tür bitkiler, şelatlar üreterek toprakta bulunan metal konsantrasyonlarını tolere etmekte ya da vakuollerde depo ederek metallerin hücre içinde bölümlendirilmesini değiştirmektedir [31]. *Populus alba* toprakta meydana gelen kirliliği belirlemek amacıyla kullanılan Zn/Cd indikatör bitkisidir [33,29].

3) Metal akümülatör bitkiler: Toprak üstü dokularında, toprakta bulunan metal miktarından daha fazlasını bünyesinde biriktiren bitki türleri hiperakümülatörlerdir ve çok yüksek miktardaki konsantrasyona sahip ağır metalleri kök, gövde ve/veya yapraklarında biriktirebilmektedir [31,34,35,36].

Toprak üstü organlarında, toprakta bulunan metal konsantrasyonundan 50 ile 500 kat daha fazla biriktirebilen bitkiler hiperakümülatör bitkiler olarak tanımlanmaktadır. Bitkilerde Zn

ve Mn için 10,000 µg/g KA; Cd için 100 µg/g KA; Ni, Cu, Co, Pb için ise 1000 µg/g KA; miktarında hiperakümüle edilen metal konsantrasyonlarını sınırlandırmıştır [10].

Bu ağır metaller için belirlenen seviyeler, sadece akümülatör bitki türlerini kapsamaktadır [37,38]. Yeryüzünde bulunan 22 familyadan yaklaşık 400 bitki türü (angiospermelerin sadece % 0.2' si) hiperakümülatör olarak tanımlanmıştır. Bu hiperakümülatör bitkilerin 87 tanesi *Brassicaceae* familyasında bulunan 11 cinse aittir [10,31]. Ayrıca *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Scrophulariaceae* hiperakümülatör bitki familyalarından birkaç tanesidir [39].

Hiperakümülatör bitkiler 2 ana gruba ayrılmaktadır. İlk olarak *Thlaspi L.* genusuna ait bitki türlerinde olduğu gibi bir çok ağır metali aşırı miktarda bünyesinde toplayabilen fakat az miktarda biyokütle oluşturan hiperakümülatör bitkiler bulunmaktadır. İkinci grupta ise orta seviyede bünyesinde ağır metal biriktiren fakat yüksek miktarda biyokütle oluşturan *B. juncea L.*, *Helianthus annuus L.*, ve *Zea mays L.*, *Nicotiana tabacum L.* gibi bitki türleri yer almaktadır [40].

Ağır metallere karşı direnç gösteren bitkilerde, ağır metaller bitki içerisinde küçük peptidlere bağlanarak kofullarda depo edilirler ve böylece bitkiye zarar vermezler [41]. Ağır metallerin bitkilerde birikimi ve dokulara taşınımı bitkinin ve elementin türüne, kimyasal ve biyolojik aktiviteye, oksidasyon-redüksiyon potansiyeline, pH değerine, kation değişim kapasitesine, oksijenin çözülmesine, ısıya ve köklerin salgı yeteneğine bağlıdır [42]. Hiperakümülatör bitkiler ağır metalleri hücre zarlarında bulunan taşıyıcı proteinler aracılığıyla alırlar. Bu proteinler, bitkilerin mineralleri kökler yardımıyla içeri almasını sağlayan ya da mineral iyonlarını kofullarda depolayan taşıyıcılarla benzerlik gösterirler. Bu tür bitkilerdeki taşıyıcı proteinler ağır metallerin organlara taşınımını gerçekleştirecek şekilde, diğer bitkilere göre değişikliğe uğramışlardır. Değişikliğe uğramış taşıyıcı proteinleri kullanarak *Thlaspi caerulescens* bitkisi, kuru ağırlığının %3'ü oranında Zn 'yi, hiçbir zehirlenme belirtisi göstermeksizin depolayabilme yeteneğine sahiptir. Bir eğrelti türü (*Pteris vittata*), toprakta bulunan Arseniğin (Ar) 100 katı kadarını, kendi bünyesi içinde biriktirebilir. Metal birikimi yapan bitkiler hasat edilerek metaller geri kazanılabilir ya da böyle bitkiler toksik atıklar için ayrılmış özel depolama alanlarına gömülebilirler [41].

### 2.1.1. Bitkilerde Ağır Metal Alımı ve Taşınması

Bitkilerin ağır metalleri absorbe etme ve taşınımı sürecinde, metal iyonları kökler tarafından tutularak köklere girişi sağlanır ve sonrasında kütle akışı ve difüzyon aracılığıyla toprak üstü dokulara translokasyonu gerçekleşir [43].

Birçok metal toprakta çözünmeden varlığını sürdürmektedir. Bitkiler toprak matrisinden metalleri ayırıştırmak amacıyla iki yol izlemektedir. Bunlar, plazma zarında bulunan proton pompalarının harekete geçerek rizosferi asitleştirmesi ve metalleri şelatlama özelliğine sahip ligantların salgılanmasıdır [38].

Köklerde gerçekleşen proton ekstrüzyonu ve metal şelatlayıcı moleküller (mugenik ve aveik asit)' in rizosfere salınması ile toprak parçacıklarına bağlı olan metaller harekete geçirilmektedir [37]. Diğer eksudat tipi ise, Fe' yi bağlayan ve alımını kolaylaştıran fitosideroforlardır [43,44]. Fitosideroforların şelasyonu ile metal iyonları, plazma zarından özel taşıyıcılar ile metal-siderofor kompleksler halinde taşınmaktadır.

Harekete geçmesi sağlanan metallerin hücre duvarına bağlanması kök hücreleri tarafından gerçekleşmekte ve metaller ilk olarak düşük affinite ve seçicilik gösteren iyon deşitiriciler ile birlikte hücre çeperine tutunmaktadır. Metallerin plazma zarından ayrılması taşıma sistemlerinin ve hücre içi yüksek affiniteli bağlayıcı bölgelerin işleviyle gerçekleşmektedir. Metal iyonlarının alımı muhtemelen, kanal proteinleri ve/veya H<sup>+</sup> birleşmiş taşıyıcı proteinler gibi sekonder taşıyıcılar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Sekonder taşıyıcılar ile katyonların alınmasında, membran potansiyeli (kök epidermal hücrelerinde plazma zarının iç kısmı -200 mV' nin üzerinde) itici güç sağlamaktadır [31,45].

Metal iyonlarının bitki hücresine alımı, hangi tip metal ve bitki türü olduğuna bağlı olarak simplastik (intrasellüler) ya da apoplastik (ekstrasellüler) yol aracılığı ile gerçekleşmektedir.

Korteks ve kök epidermisinin apoplastik yolu, çözünen maddeler için yüksek seviyede geçirgendir. Apoplastik yol göreceli olarak düzensizdir. Çünkü su ve suda çözülmüş maddeler, plazma membranından geçmeden difüze olmaktadır. Endodermal tabakanın hücre çeperleri, vasküler sisteme apoplastik difüzyonda savunma olarak görev yapmaktadır [31]. Apoplastik yolda gerçekleşen taşınım hücre duvarının yüksek katyon değişim seviyesine bağlıdır [46].



Simplastik taşınımında ise metal iyonları yaklaşık olarak 170 mV negatif potansiyele sahip plazma zarından geçmektedir. Birçok metal iyonu enerjiye bağımlı bir süreçle spesifik ve genel metal iyon taşıyıcılar ya da kanallar aracılığıyla bitki hücrelerine alınmaktadır [43]. Su ve suda çözülmüş maddelerin birçoğu endodermal tabakayı simplastik yol aracılığı ile ksileme ulaşmaktadır [47]. Ksileme taşınan metal iyonlarının kontrolü genellikle membran taşıma proteinleri ile çok sıkı bir şekilde yapılmaktadır [48]. Ayrıca ağır metal iyonlarının apoplastik taşınımına ksileme ulaşması kök ucunda gerçekleşebilmektedir [49].

Önce ki çalışmalarda  $Zn^{+2}$ 'nin,  $Ni^{+2}$  ve  $Cd^{+2}$  için aynı transmembran taşıyıcıların rekabete girdiği gözlemlenmiştir [50].

Ağır metal iyonlarının köklere girişi gerçekleştikten sonra, köklerde depo edilmekte ya da ksilem yoluyla toprak üstü dokulara taşınmaktadır. Köklerdeki metal yoğunluk oranına bağlı olarak toprak üstü dokulara taşınan metal konsantrasyonu değişim göstermektedir [43].

Metal konsantrasyonunda kullanılmak üzere muhtemel mekanizma olarak, ksilem özsuyunda bulunan fitoşelatin aracılı metal bağlayıcıları göstermiştir [51]. *Allyssum lesbiacum*'da sitrat ve serbest histidin gibi düşük moleküler ağırlıklı şelatörlerde bu süreçle ilişkilendirilmiştir [52]. Sitrat, malat, histidin gibi şelatlayıcı bileşikler, bitkilerde metal iyonlarının hareketini sağlamak amacıyla etkili olabilmektedir [43,53]. Metal iyonlarının vakuolar membrandan aktif olarak taşınması serbest iyonlar veya metal-şelat kompleksler şeklinde gerçekleşmektedir.

### **2.1.2. Bitkilerde Ağır Metal Toleransı**

Topraktaki metal konsantrasyonu genellikle 1 ile 100.000 mg kg<sup>-1</sup> arasında değişmektedir. Tarım topraklarının ağır metaller tarafından kirlenmesi sonucu ortaya çıkan olumsuz ekolojik nedeniyle, bazı kirlili topraklardaki bu metaller önemli bir çevre sorunu haline gelmiştir.

Ağır metallerin yüksek seviyelerde olması toprak yapısının bozulmasına, ürün verim ve kalitesinde azalmaya neden olmakta ve bu sebeple tüm canlı yaşamı için önemli tehlikelere yol açmaktadır [54,55]. Fakat bazı bitki türleri yüksek konsantrasyondaki ağır metallere karşı tolerans göstermekte ve ağır metaller tarafından kirlenmiş toksik etki gösteren topraklarda yaşamını sürdürme yeteneğine sahiptir. Bitkilerin yüksek konsantrasyondaki

ağır metallere gösterdiği tolerans 2 mekanizma ile ilişkilidir. Bu mekanizmalardan birincisi ağır metal alımının azalması, ikincisi ise bitki iç sekestrasyon seviyesinin artmasıdır.

Ağır metal iyonlarının topraktan bitkiye ulaşması kökler aracılığıyla gerçekleşmektedir. Ağır metal iyonları kök yüzeyinde bulunan ve kökleri kapsayan müsülaj üronik asitin karboksil grubuna bağlanmaktadır. Metallerin müsülaja bağlanma yetenekleri farklılık göstermektedir. Ağır metallerin topraktan bitkiye alım yoğunluğu, toprakta ki organik madde miktarına, toprakta bulunan diğer iyonların konsantrasyonuna ve toprak solüsyonunun pH değerine bağlı olarak değişmektedir. Yüksek pH' taki toprak çözeltisinde birçok metal tuzunun çözünürlük oranının azalmasıyla ağır metallerin topraktaki biyolojik fonksiyonu düşmektedir. Ayrıca, topraktaki diğer iyonlar metal alımında büyük önem taşımaktadır.

Toprakta ki diğer iyonların birbirleriyle olan etkileşimlerinin, ağır metal alımının ve topraktaki biyolojik kullanılabilirliğin azalmasına neden olduğu ile ilgili belirli bir mekanizma bilinmemektedir. Bitkinin iç sekestrasyon seviyesinin artması, genotip ve çevre arasındaki etkileşim ile kendini göstermektedir [27].

Bazı bitki türleri hücrese seviyede detoksifikasyona neden olan potansiyel mekanizmalar aracılığıyla ağır metallere karşı tolerans yeteneği göstermektedir.

## **2.2. Ağır Metal Akümülayonu ve Toleransının Moleküler Mekanizması**

### **2.2.1. Metal Alımı**

Bazı ağır metaller toprakta çözünmeyen formlarda bulunmaktadır. Bitkiler bu metalleri aktif hale getirmek için rizosfere bazı metal şelatlayıcı maddeleri göndermektedir. Bu metal şelatörlerden nikotinamin (NA) yüksek bitkilerde yaygınlık göstermektedir. NA, fitosideroforların biyosentetik prekürsürüdür ve Gramineae familyasında bulunan ve Fe alımında ihtiyaç duyulan önemli bir bileşendir. Örneğin; pirinç bitkisinde OsNAS1, OsNAS2 ve OsNAS3 olmak üzere 3 tane nikotinamin sentez geni bulunmuştur. Bu sentez genleri, köklerden fitosiderofor salınımındaki fonksiyonuyla birlikte Fe' nin uzun mesafe taşınımında da önemli bir role sahiptir [56]. Mısır bitkisinde bulunan Fe(III)-fitosideroforlar, oligopeptid taşıyıcı ailesine ait YS1 taşıyıcılar aracılığıyla köklerden alınmaktadır [57].

Bitki hücrelerinde ağır metallerin hareketlerini kapsayan süreç moleküler düzeyde incelendiğinde, metallerin iletiminde rol oynayan gen ailelerinin metal toleransında büyük

önem taşıdığı tespit edilmiştir. Ağır metal ATPazlar (veya CPx-tip), çinko-demir permeazlar (ZIP), doğal dirençle ilişkili makrofajlar (Nramp) ve katyon-difüzyon hızlandırıcı (CDF) proteinler metal taşınımında homeostazi ve toleransında görevli gen ailelerinden bazılarıdır [58].

Ağır metal ATPazların (HMA), Zn, Pb, Cd ve Cu gibi toksik etkili metallerin hücre zarlarından geçişinde görev aldığı bildirilmiştir [59]. Koruma altına alınmış bir membran içinde, sistein-prolin-sistein, sistein-prolin-serin veya sistein-prolin-histidin dizilimini içerdiğinden tip P1B alt ailesi CPx-ATPazlar olarak da sınıflandırılmaktadır [58,60] ve bu ağır metal pompaları insan, bitki ve bakteri organizmalarında bulunarak yüksek miktarda dizi benzerliği göstermektedir [26,61]. Yüksek bitkilerde tanımlanan ilk CPx- ATPaz, *Arabidopsis* P-tipi ATPaz (PAA1) dir [62]. Bu iyon pompaları P-tipi ATPaz üst ailesi içinde bulunmakta ve hücre duvarından katyonların pompalanmasında görev almaktadırlar. Ağır metal ATPazlar, hücre zarından iyonların taşınımının sağlanması için ATP hidrolizinin meydana geldiği ortak bir enzimatik olan mekanizmayı kullanmaktadır. Enzimin katalitik döngüsünde fosforile edilmiş ara ürünler bulunduğu için "P-tipi olarak tanımlanmaktadır [26,58,63]. Pirinç genomu, *Arabidopsis* genomundan 3 kat daha büyüktür ve bu iki bitki genomları karşılaştırıldığında, her iki bitkide bulunan P-tipi ATPaz genlerinin sayıca benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (*Arabidopsis* :43 ve pirinç: 46) [26,64]. *Arabidopsis* ve pirinç genomunda bulunan P-tipi ATPazların 5 ana alt ailesi bulunmaktadır. Bu aileler, CPx- tipi (P1B) ATPazlar, Ca<sup>+2</sup>-ATPazlar (endoplazmik retikulum-tip Ca<sup>+2</sup>-ATPaz ve otoinhibe Ca<sup>+2</sup>-ATPaz, P2A ve P2B), H<sup>+</sup>-ATPazlar (otoinhibe H<sup>+</sup>-ATPazlar, P3A), putativ aminofosfolipid ATPazlar (ALA, P4) ve bilinmeyen bir özellik gösteren bir dalı (P5) şeklindedir. P1B alt ailesinin filogenetik araştırmalarında, metal taşınımıyla ilgili olarak 2 ana grubun bulunduğu tespit edilmiştir. Bu 2 ana grup monovalent Cu<sup>+</sup>/Ag<sup>+</sup> katyonları ile Zn<sup>+2</sup>/Co<sup>+2</sup>/Cd<sup>+2</sup>/Pb<sup>+</sup> kayonlarından meydana gelmektedir [58,65].

Metal iyonlarının taşınımında rol alan bir diğer taşıyıcı grup ise doğal dirençle ilişkili makrofaj proteinler (Nramp' lar) dir ve bakteriler, mantarlar, bitkiler ve hayvanları içeren organizmalarda bulunmaktadır [54,66]. Nramp ailesi, ilk olarak pirinçte bulunmuş ve 3 tane Nramp geni (OsNramp 1-3) bildirilmiştir [58]. *Arabidopsis thaliana* bitkisinde metal taşınımında farklı rollere sahip olan 6 tane Nramp geni tanımlanmıştır [58,59,67]. Yapılan araştırmalarda *A. thaliana*' da öncelikli olarak Nramp' ların Fe taşınımında rol aldığı ortaya

konmuştur. AtNRAMP1 ve AtNRAMP2' nin aşırı ekspresyona uğraması, Fe' ye karşı dirençte artışa neden olmaktadır [67]. Fe yetmezliğinde ise AtNRAMP3 ve AtNRAMP4 artış göstermektedir [68,69]. Nramp' lar Fe' den başka metallerin taşınımında da rol almaktadır [70,71]. Yapılan son çalışmalarda AtNRAMP 1, 3 ve 4' ün Mn homeostazisinde görev aldıkları ortaya konmuştur [69]. Bununla birlikte AtNRAMP4, Zn taşınımında da büyük bir öneme sahiptir [72]. AtNRAMP3 ve 6 genlerinin, Cd metalinin homeostazisinde bir role sahiptir [58, 71]. Yapılan transkriptomik çalışmalarda Nramp' lar hiperakümülatör özellikteki bitkilerde daha az karakterize edilmiştir. NRAMP3 geninde ki ekspresyon seviyesinin, Zn hiperakümülatör olan *A. halleri'* de, hiperakümülatör olmayan *A. thaliana* ile karşılaştırıldığında arttığı rapor edilmiştir [73]. Hiperakümülatör *T. caerulescens'* de Zn, Ni ve Cd için AtNRAMP3 ve 4' ün ortologları olan TcNRAMP3 ve TcNRAMP4' ün ekspresyon seviyeleri benzer artış göstermektedir [74].

### **2.3. Bitkilerde Ağır Metal Metabolizması İle İlişkili Genlerin Belirlenmesinde**

#### **Kullanılan Yöntemler**

##### **2.3.1. Fitoremediasyon**

Ağır metaller inorganik kirletici maddelerin ana grubudur. Ağır metal ile kontamine olmuş bir çevrede uzun süreli kalıcı olmakla birlikte, insan ve hayvan sağlığı için de ciddi tehditlere yol açmaktadır [75]. Bu sebeple, ağır metal toksisitesinin neden olduğu tehditler üzerindeki artan dikkat, kirlenmiş topraktan, zararlı metal iyonlarını uzaklaştırmak için çeşitli yöntemlerin kullanılmasını gerekli kılmıştır. Ağır metallerle kirlenmiş toprakların temizlenmesi amacıyla, fiziksel, kimyasal ve biyolojik süreçleri içeren birçok yöntem uygulanmaktadır. Bu yöntemler arasında; immobilizasyon ve izolasyon teknolojileri, mekanik ayırma teknolojileri, pirometalurjik teknolojiler, elektrokinetik teknolojiler, biyokimyasal teknolojiler, toprak yıkama (kimyasal sızma) teknolojileri ile fitoremediasyon teknolojileri yer almaktadır. Biyolojik temizleme yolları arasında yer alan fitoremediasyon teknolojisi, diğer yöntemlere göre daha düşük maliyetli ve ekolojik yönden en uygun yaklaşımdır. Fitoremediasyon toprak, su ya da havada bulunan kirleticilerin bitkiler tarafından temizlenmesidir. Bu teknoloji ekolojik ve ekonomik olmasının yanısıra özel bir donanım ihtiyacı duymaması ve uygulanan alanın tekrar kullanımına imkan sağlaması nedeni ile günümüzde en çok tercih edilen yöntem konumundadır. Temel süreç ve uygulanabilirliği bakımından fitoremediasyon teknolojisi

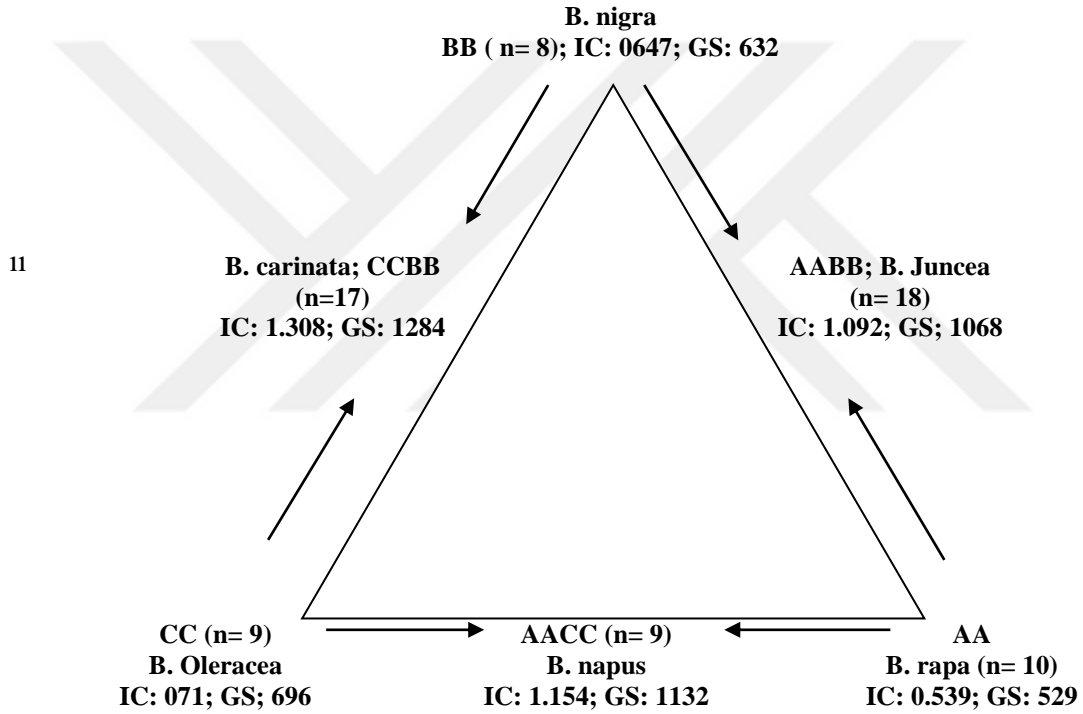
fitoekstraksiyon, rizofiltrasyon, fitostabilizasyon, fitovolatilizasyon ve fitodegradasyon gibi alt sınıfları içermektedir. Fitoekstraksiyon, toprakta bulunan ağır metalleri toprak üstü dokulara taşıyabilen ve biriktirebilen bitkilerin kullanılmasıdır. Rizofiltrasyon, kirlenmiş alanlarda toksik etki gösteren metallerin absorbe edilmesi, birikimi ve/veya çökmesi amacıyla bitki köklerinin kullanılmasını amaçlamaktadır. Fitostabilizasyonda, bitkiler topraktaki kirleticileri etkisiz hale getirerek stabilizasyonu sağlamaktadır. Fitovolatilizasyon ise, uçucu metallerin (civa gibi) topraktan kaldırılması ve yaprakтан buharlaşmasını kapsamaktadır.

Metalle kirlenmiş toprakların bitkiler tarafından temizlenmesi sırasında çevreye verilen zarar minimum düzeydedir. Bu remediasyon tekniği ile, metalle kirlenmiş toprakların bitkiler tarafından temizlenmesi ile çevreye verilen zarar minimum düzeyde olmakla birlikte toprağın fiziksel ve biyolojik yapısı da korunmaktadır [76]. Toprakta en büyük alana sahip olmak ve en derin bölgeye ulaşmak için geniş bir kök sistemine sahip olan bitkiler, kontamine olan toprak ve suda bulunan metalleri ortadan kaldırma ve dokularda biriktirme fonksiyonlarına sahiptirler. Metaller bünyesinde biriktiren bitkiler hasat edilerek, toksik atıklar için ayrılmış özel alanlara taşınmakta ya da biriken metallerin geri kazanımı sağlanmaktadır. Bu yöntemde translokasyon ve biyolojik birikim ile birlikte, bitki kök sistemlerinin seçici alım kapasitelerinden ve bitki gövdesinin tamamındaki kirletici indirgeme yeteneklerinden eşsiz bir şekilde yararlanılmaktadır [77]. Fitoremediasyon teknolojisinin çevreye sağladığı katkıların ön plana çıkması birçok çevresel kuruluş tarafından bu teknolojiye olan yaklaşımı arttıracaktır [78].

Birçok bitki türünün yüksek seviyedeki ağır metallere karşı duyarlılıklarının yanısıra bunları yüksek oranlarda bünyelerinde biriktirebilme kapasiteleri de gelişmiştir. Hiperakümülatör bitkilerin zamanla köklerinde ağır metal alım oranının artması durumunun yanısıra, kökten-gövdeye metallerin taşınımı ve yapraklarda birikmesi durumuna da sıkça görülmektedir. Bu bitkilerin fitoremediasyonda potansiyel olarak kullanımından dolayı hiperakümülatör olayının geçen 10 yıla göre gelişimi dikkat çekmektedir. Hiperakümülatör bitki türlerinin kullanımı ve metal akümülatörün sorumluluğunun tanımlanmasında Fitoremediasyon/phytomining yöntemleri halen odak noktasıdır [79]. Yaklaşık 500 bitki türü ağır akümülatör bitkiler olarak sınıflandırılmaktadır [80]. Bu bitki türleri yapraklarında ağır metalleri yüksek miktarda biriktirme yeteneğine sahiptir [46]. Bunların % 80' i Ni biriktirirken, ikinci büyük grubu

(15 türü) Zn ve Cd hiperakümülatörleridir [81]. Daha önce yapılan çalışmalarda, fitoremediasyonda kullanılacak model bitkinin, yüksek ağır metal konsantrasyonlarında dahi yaşayabilen, dayanıklı ve zengin bir kök sistemine sahip olmakla birlikte, hasat edilebilen kısımlarında ağır metalleri akümüle ve tolere etme, hızlı büyüme yeteneği ve yüksek biyokütle üretebilme potansiyeline sahip bir bitki olması kanısına varılmıştır [82]. Günümüzde ağır metaller ile kontamine olan toprakların temizlenmesinde bu özelliklere sahip olan bitkilerin tespit edilmesi büyük önem taşımaktadır.

### 2.3.1.1. Metal Akümülyasyonunda Model Bitkiler *Brassica juncea*, *Brassica nigra*



**Şekil 2.1.** *Brassicaceae* türleri arasındaki genomik ilişkileri temsil eden üçgen.

IC : Nükleer DNA içeriği (pg), GS genom büyüklüğü (Mbp) [83]

*Brassicaceae* familyası (eski adıyla *Cruciferae*), yaklaşık 375 cins ve yaygın olarak hardal ailesi olarak bilinen 3200 bitki türünden oluşur. *Brassica*, kolza tohumu, lahanası, karnabahar, brokoli, brüksel lahanası, şalgam, çeşitli hardallar ve yabani otları içeren yaklaşık 100 tür içerir [84]. Genellikle "diploid" *Brassica* türü, *B. rapa* (n = 10), *B. nigra* (n = 8) ve *B. oleracea* (n = 9) olarak adlandırılan türler sırasıyla A, B ve C genlerini içerir.

*B. nigra*, yetiştirilen altı Brassica türü arasında ikinci en küçük genom büyüklüğüne (~ 632 Mbp) sahiptir.

Brassicaceae familyasında bulunan bazı türler metalleri akümüle etme yeteneğine sahiptir [85]. Bu türlerden *B. juncea* (kahverengi hardal) ve *B. nigra* (siyah hardal) bazı ağır metalleri hiperakümüle ettiği ya da metal toleranslı olduğu bilinen, gelişmiş kök sistemine sahip kara bitkileridir. *B. juncea* Zn, Pb, Cd, Cr, Cu, ve U (uranyum) gibi çeşitli ağır metalleri akümüle etme ve toprak üstündeki dokulara taşıma yeteneği göstermektedir [86]. Hızlı büyüme ve yüksek biyokütle üretme özellikleri nedeniyle, fitoremediasyon uygulamalarında *Thlaspi* gibi 'model' hiperakümülatörlere kıyasla daha fazla kullanılmaktadır [87].



### 3. MATERYAL VE METOD

Agricultural Research Center Oil Crop Research Institute Sindh (Pakistan)' dan temin edilen *B. juncea* ve Kemal Cüce Tarım Mersin' den temin edilen *B. nigra* bitki tohumlarının ekimi için öncelikle toprak sterilizasyonu yapılmıştır.

#### 3.1. Toprak Sterilizasyonu

Ziraat tarlalarından temin edilen toprakların düşük kil oranında olmasına dikkat edilerek sterilizasyon için öncelikle topraklar elekten geçirilmiş ve 2:1 oranında bahçe toprağı (torf) ile karıştırılarak üzerlerine bir kaç damla distile su damlatılmıştır. Topraklar her bir saksı için 3lt olacak şekilde otoklav torbalarına konularak hiç hava kalmayacak şekilde paketlenmiştir. Paketlenen topraklar 20 dk boyunca 105 kpa basınçta 121 °C ' de otoklavda tutulmuştur. Otoklav bitiminde topraklar 1 gün boyunca steril cam kabinlerde bekletilmiştir.

#### 3.2. Tohum Sterilizasyonu

Tohumların ekimi için bir ortamda öncelikle 50 ml' lik 2 farklı falkon tüplerine konulmuştur. Tüplere 5 ml %70'lik etil alkol ilave edilerek 2 dakika boyunca çalkalama işlemi yapılmıştır. Daha sonra *B. juncea* bitki tohumlarının konulduğu tüpe 20 ml, *B. nigra*'nın konulduğu tüpe 40 ml deiyonize su konularak çalkalama işlemi ile tohumların alkolden arındırılması sağlanmıştır. (Buradaki deiyonize su miktarının farklı olmasının nedeni *B. nigra* tohumlarının *B. juncea* tohumlarına göre daha kalın bir çepere sahip olmasıdır.)

Bir sonraki aşamada ; önceden hazırlanan bleach solüsyonu

1. 4 ml NaClO<sub>2</sub>
2. 36 ml deiyonize su
3. bir kaç damla tween20 ilave edilmiştir.

*B. juncea* ve *B. nigra* tohumları için hazırlanan bleach solüsyonu falkon tüplerine konularak 5 dakika çalkalama işlemi yapılmıştır. Çalkalama işlemi bittikten sonra karışım tüplerden alınarak 7-8 kez ve her bir işlem 2'şer dakika olmak üzere 25 ml deiyonize su ile tohumlar yıkanmıştır. Tohumların tamamen steril olması için, son olarak tüplere 35-40 ml deiyonize su konularak 3 dakika boyunca çalkalanmıştır ve tüm bu aşamalardan sonra tohumlar petri kabına alınarak inhibisyonu sağlamak amacıyla 1 saat boyunca bekletilmiştir.



Belirlenen süre sonunda tohumların çimlenme ve fide gelişimini sağlamak için 25 cm çapta plastik saksılar kullanılmıştır ve her saksı için 12' şer tohum nemli milli toprağa ekilmiştir. Ekilen tohumlar çimlenene kadar her bir saksının üzerine alüminyum folyo geçirilerek karanlık bir ortamda 22 derece sıcaklıkta bekletilmiştir. 4. gün çimlenen *B. juncea* ve 5. gün çimlenen *B. nigra* tohumlarının folyoları çıkarılarak her saksıda 1 bitki kalacak şekilde ve her bir tekrar için (0-25-50-100-200-500) 6 saksıya transfer edilmiştir. (Toplamda *B. juncea* için 3 tekrar = 18 saksı *B. nigra* için 3 tekrar = 18 saksı elde edilmiştir). Daha sonra bitkilere gün aşırı olmak üzere haftada 3 gün ve 2 hafta boyunca Hoagland besi çözeltisi verilmiştir.

Bitkiler %60 nem ve 16 sa ışık ( $25\pm 2$  °C) / 8 sa ( $20\pm 2$  °C) fotoperiyodunda  $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  ışık şiddeti altında bitki büyüme odasında yetiştirilmeye devam edilmiştir.



**Resim 3.1.** *B. nigra* bitkisine ilk hoagland solüsyonu verildikten sonraki görüntüsü



**Resim 3.2.** *B. juncea* bitkisine ilk hoagland solüsyonu verildikten sonraki görüntüsü

### 3.3. Bitkilere Ağır Metal Uygulaması

*B. juncea* ve *B. nigra* bitkilerine ağır metal uygulamasında stock hoagland besi solüsyonundan 1 lt ve ZnSO<sub>4</sub> stock solüsyonu hazırlanmıştır. Burada 0 µM kontrol grubu için 1000 ml + 0,4 gr hoagland besi solüsyonu 25µM için 999.75 ml hoagland besi solüsyonu ve 0,25 ml ZnSO<sub>4</sub> solüsyonu karışımı, 50 µM için 999.50 ml hoagland besi solüsyonu ve 0.5 ml ZnSO<sub>4</sub> solüsyonu karışımı 100 µM için 999 ml hoagland besi solüsyonu ve 1 ml ZnSO<sub>4</sub> solüsyonu karışımı 200 µM için 998 ml hoagland besi solüsyonu ve 2 ml ZnSO<sub>4</sub> solüsyonu karışımı 500 µM için 995 ml hoagland besi solüsyonu ve 5 ml ZnSO<sub>4</sub> solüsyonu karışımı gün aşırı olmak üzere haftada 3 gün ve 2 hafta boyunca uygulanmıştır.



**Resim 3.3.** *B. nigra* bitkisine hoagland ve ZnSO<sub>4</sub> karışımı ( 0  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 500  $\mu$ M)verildikten sonraki görüntüsü

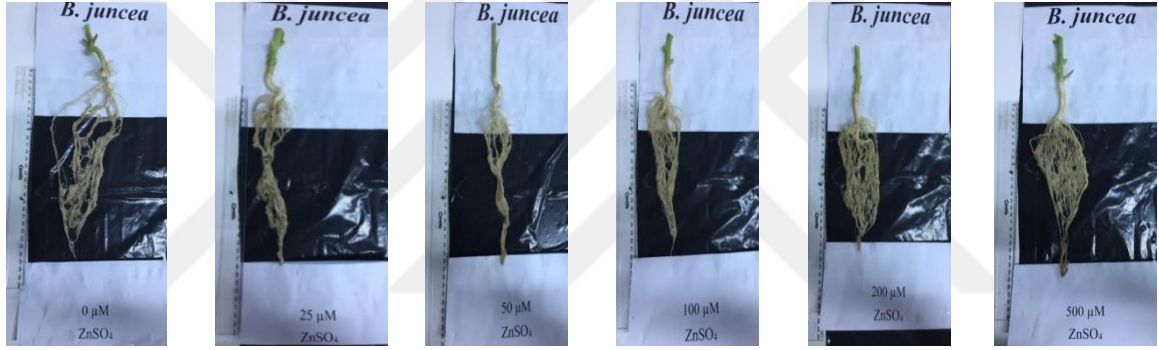


**Resim 3.4.** *B. juncea tomcat* bitkisine ilk hoagland ve ZnSO<sub>4</sub> karışımı (0  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M, 500  $\mu$ M verildikten sonraki görüntüsü

İki haftanın sonunda ağır metal uygulanan ve uygulanmayan (kontrol) bitkilerin kök, gövde ve yaprak kısımları bitkinin farklı organlarında biriken ağır metalleri tespit etmek ve moleküler çalışmalarda kullanmak üzere hasat edilmiştir.



**Resim 3.5.** *B. nigra* bitkisinin hasat işleminden önce ki görünüşleri ile hasat işleminden sonra ki kök boyları (0 μM= 18 cm, 25 μM = 21 cm, 50 μM = 22 cm, 100 μM = 23 cm, 200 μM = 23 cm, 500 μM = 24 cm )



**Resim 3.6.** *B. juncea* bitkisinin hasat işleminden önce ki görüntüsü ve hasat işleminden sonra kök boyları (0 µM= 20 cm, 25 µM = 23 cm, 50 µM = 22 cm, 100 µM = 21 cm, 200 µM = 20 cm, 500 µM = 19 cm

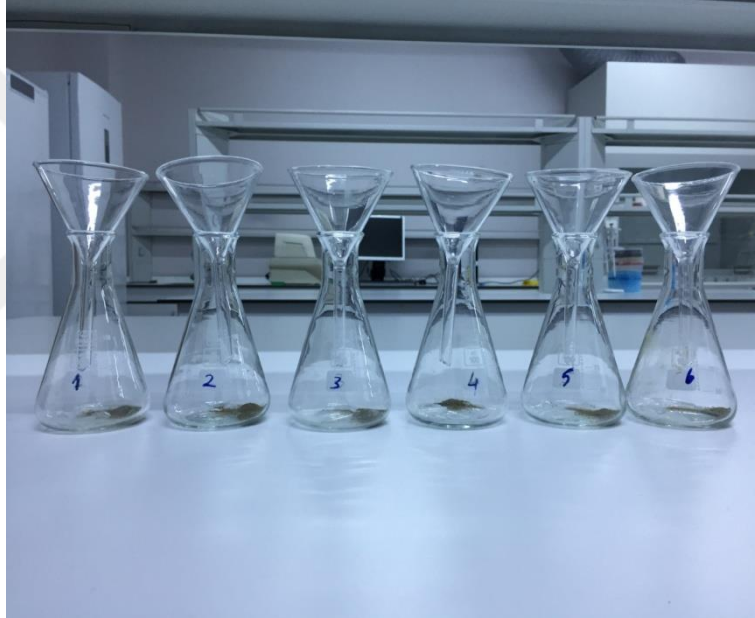
Hasat işleminde her bir saksı için ayrı ayrı olmak üzere bitkinin yaprakları ve gövdeleri kesilmiştir. Kesilen yaprak ve gövde miktarları hassas terazide tartılarak moleküler genetik çalışmalarda kullanılmak üzere - 20 derecede buzdolabında saklanmıştır. Kökler ise deiyonize su ile çamurdan arınana kadar yıkanmıştır. Steril hale gelen kökler hassas terazide tartılmıştır ve metal tayininde kullanılmak üzere 72 °C' lik etüve konulmuştur.

Her deney kendi içinde, kontrol ve ağır metal uygulanan deney gruplarına ait 3' er adet biyolojik tekrar içermektedir.

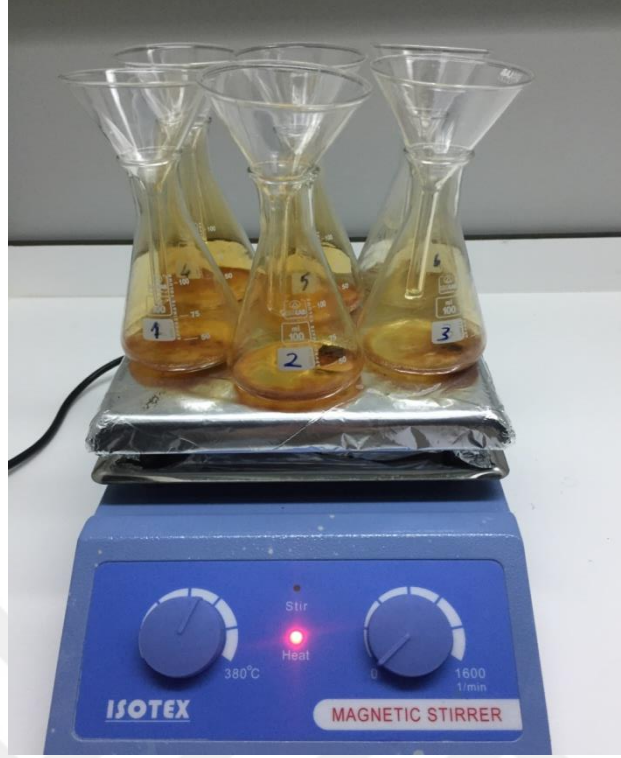


### 3.4. Bitkilerde Biriken Ağır Metal Miktarının Tayini

*B. juncea* ve *B. nigra* bitkilerine ağır metal uygulamasından sonra kök ve yapraklarda biriken ağır metal miktarının tayini için hasat edilen örnekler yaş yakma yöntemi uygulanmıştır [88]. Hasat edilen örneklerin taze ağırlıkları belirlendikten sonra 75 °C’de ve 72 saat boyunca etüvde kurutulmuştur [89]. Tartımları yapılan 200 mg kurutulmuş bitki örnekleri 100 ml’ lik erlenmayere konulmuştur. Örneklerin üzerine ilk önce 5 ml nitrik asit daha sonra 2 ml perklorik asit ilave edilmiştir. Nitrik asit ilave edilen örneklerin asitle tamamen ıslanmasını sağlamak için, üzerlerine küçük huni konulan erlenmayerler yavaşça sıcaklığı 80 °C’den 100 °C’ ye yükseltileen ısıtıcı tablaya konularak ortamdan nitrik asitin uzaklaşması sağlanmış ve açığa çıkan kahverengi dumanlar azalarak bitki çözeltileri açık sarı bir renge dönüşmüştür.



**Resim 3.7.** Numuneleri yaş yakma işlemine başlamadan önce kuru yaprak (200 mg) ağırlıklarının erlenmayere alınması



**Resim 3.8.** Yaş yakma işleminde eklenen Nitrik asitle birlikte sıcaklığın da artmasıyla çözeltilerin rengi yavaş yavaş berraklaşmaya başlamıştır



**Resim 3.9.** Berrak bir görüntü elde edildikten sonra da en az 30 daha işleme devam edilmiştir

Bu aşamada ısıtıcı tabla üzerinden alınan örnekler oda sıcaklığına getirilerek 2 ml perklorik asit eklenmiştir. Sıcaklığı yavaşça 100 °C'den 200 °C'ye yükseltileen ısıtıcı tablaya tekrar alınan örnekler içinde kalan nitrik asit miktarı azaldıkça çözeltilerde ki sıcaklık yükselmeye devam etmiş ve en sonunda perklorik asit, parçalanmamış organik materyali oksitleyerek çözeltilinin rengini berraklaştırmıştır. Daha sonra perklorik asitin yoğun beyaz dumanları erlenmayerin içini tamamen kapladıktan sonra yakmaya en az 30 dakika daha devam edilmiştir.

Erlenmayer içinde yaklaşık 2 ml perklorik asit kalacak şekilde ve bitki çözeltilisi tamamen berraklaşınca yakma işlemine son verilmiştir. Örnekler yeterince soğuduktan sonra hunilerin üzerine süzgeç kağıdı konularak (%1' lik) 1 ml nitrik asit ve 2 ml deiyonize su ile ıslatılmıştır. Bu aşamadan sonra tüm gruplara (0 µm-25µm-50µm-100µm-200µm-500µm) 2 ml deiyonize su eklenmiş fakat diğer gruplardan farklı olarak 0µm kontrol grubuna



deiyonize su eklenmeden önce 2 ml nitrik asit eklenmiş ve 50 ml' lik falkon tüplere alınmıştır. Ağır metal miktarının tayini için yaş yakma yöntemine tabi tutulan bitki örneklerinin analizleri, Atomik Absorpsiyon Spektrofotometre (AAS 9009)' de yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre, *B. juncea* ve *B. nigra* bitkisinin kök ve yaprak kısımlarında akümüle edilen ağır metal miktarı mg/kgKA (kilogram kuru ağırlık başına miligram), total akümüstasyon oranı (TAR) ise mg/kg gün olacak şekilde hesaplanmıştır.

### **3.5. Bitkide Anlatımı Değişen Genlerin Tanımlanması ve Belirlenmesi İçin Kullanılan Moleküler Yöntemler**

#### **3.5.1. Total RNA İzolasyonu**

*B. juncea tomcat* ve *B.nigra* (firma) bitkilerinin ağır metal tayini yapılan kök ve yaprak örneklerinden kitinde bulunan metoda göre;

1. - 86 °C'de muhafaza edilen bitki materyalinin çözünmesi önlenerek tartımı yapılmış ve homojenizasyon safhasına kadar sıvı azot içerisinde bekletilmiştir.
2. Hassas terazi ile tartımı yapılan 6 bitki materyalinin her biri havan ile havan eli kullanılarak sıvı azot yardımıyla toz hale gelinceye total RNA' ları elde etmek için içerisinde 2 farklı kolon (homojenizasyon kolonu ve RNA izolasyon kolonu) bulunan RNA izolasyon kiti (GeneJET Plant RNA Prufication Mini Kit) kullanılmıştır. RNA izolasyon
3. İzolasyonda kullanılmak üzere 6 bitki materyali için 980 Plant RNA Lysis Solution ve 20 ml 1.4 Dithiotheitol (DDT) eklenerek her bir örnek için 500 ml bu tampondan ilave edilerek vorteks yapılmıştır.
4. Vortekslenen örnekler 56 °C' de 3 dakika su banyosunda bekletilmiştir.
5. Bu aşamada örnekler 2 ml' lik homojenizasyon kolonuna aktarılarak 13.500 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
6. Kolondan geçen lizat steril tüpe aktarılmış ve aktarılan miktarın yarısı hacminde % 96' lık etanol ilave edilen lizat pipet yardımıyla karıştırılmıştır.
7. Etanol eklenen lizat RNA izolasyon (RNaeasy spin) kolonuna aktarılarak 11.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
8. Kolondan geçen sıvı atılarak, kolonda kalan örneğin yıkanması için 700 µl WB tamponu ilave edilmiş ve 11.000 rpm' de 1 dk santrifüj edilmiştir.
9. Kolondan geçen sıvı tekrar atılarak, kolonda kalan örneği ikinci kez yıkamak amacıyla 500 µl WB2 tamponu ilave edilmiş ve 11.000 rpm' de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.

10. Daha sonra tekrar 13500 rpm' de 2 dakika santrifüj edilmiş böylece yıkama safhası tamamlanmıştır.

11. Kolon, kapakları kesilmiş RNaz içermeyen steril mikrosantrifüj tüpe (1,5 ml) aktarılarak ve üzerine 50 µl nükleaz içermeyen su ilave edilerek 12000 rpm' de 1 dk santrifüj edilmiştir.

12. Santrifüj sonucunda RNA' lar kolondan uzaklaştırılmış ve mikrosantrifüj tüpe geçmesi sağlanmıştır. Örneklerden elde edilen saflaştırılmış RNA' lar kullanılmak üzere -20 °C' de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

### **3.5.2. Total RNA Miktar Tayini**

Elde edilen total RNA' ların (genomik *B. nigra* ve *B. juncea* örneklerinin total RNA' larının miktar ve saflıkları Nanodrop cihazında 260 nm ve 280 nm dalga boylarında okumalar yapılmıştır. Total RNA örneklerinin konsantrasyonları DEPC' li saf su ile sulandırılarak ng/µl cinsinden hesaplanmıştır. Özellikle (OD 260/ OD 280) 1,60-2,10 arasında saflık oranlarına sahip olmasına dikkat edilmiştir.

### **3.5.3. Ters Transkripsiyon- Komplementer (Tamamlayıcı) DNA (cDNA) Sentezi ve Kontrolü**

RNA izolasyon aşamasından sonra, saf halde ki total RNA' lardan komplementer DNA(cDNA )sentezi, RNA' ya yönelik DNA Polimeraz olan ters transkriptaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Total RNA' lardan komplementer DNA sentezi için Thermo Scincetific™ markanın R-T qPCR kiti olan Maxima First Strand cDNA Sentez Kiti kullanılmıştır. cDNA Sentez Kit içerisinde bulunan tampon ve enzimler ; polimeraz enzimi, dNTP' ler, SYBR Green gibi floresan boyalar, optimize edilmiş tamponda ROX (pasif referans boya) dahil R-T PCR' da kullanılacak tüm bileşikleri içermektedir.

Çizelge 3.1. Ters Transkripsiyon- Komplementer DNA (cDNA) Sentez Kiti içerisinde bulunan tampon ve enzimlerin hacimleri

5X Reaction Mix	4 $\mu$ L
Maxima Enzyme Mix	2 $\mu$ L
Templete RNA	1-5 $\mu$ L
Water, nuclease- free	20' tamamlanır
Total volume	20 $\mu$ L

Karışımın toplam hacmi 20  $\mu$ l olacak şekilde hazırlanarak hafifçe çalkalanır ve santrifüj işlemi uygulanır. Bir sonra ki aşamada ise 25  $^{\circ}$ C' de 10 dakika inkübe edilen örnekler, enzimi inhibe etmek için 50  $^{\circ}$ C' de 15 dakika daha ve reaksiyonu sonlandırmak amacıyla 85  $^{\circ}$ C' de 5 dakika inkübasyon yapılmış ve reaksiyon sonlandırılmıştır.

Saf hale getirilen RNA' lardan komplementer DNA (cDNA) sentezi ısıtıcı blok (heating block) cihazında optimum inkübasyon sıcaklıkları ve süreleri ayarlanarak sağlanmıştır.

Çizelge 3.2. Ters Transkripsiyon- Komplementer DNA (cDNA ) sentezi için optimum inkübasyon sıcaklıkları ve süreleri.

Sıcaklık	İnkübasyon Süresi
25 $^{\circ}$ C	10 dakika
50 $^{\circ}$ C	15 dakika
85 $^{\circ}$ C	5 dakika
- 20 $^{\circ}$ C	1 hafta

Tüm bu aşamalar sonucunda cDNA' ların pozitif sonuçlanması ile örnekler, -20  $^{\circ}$ C' de kantitatif Realtime PCR' da kullanılmak üzere saklanmıştır.

### 3.5.4. Primer Tasarımı

Ağır metallerin köklere alımında ve dokulara taşımında fonksiyona sahip olduğu düşünülen genlerin ekspresyonlarının, Realtime yöntemiyle kontrolünün sağlanması için, bu genlere ait olan primerler kullanılmaktadır. Tasarlanan primerlerin *Brassica nigra* ve *Brassica juncea* bitki türlerine uygunluğunun ve çalışmasının düzgün bir şekilde olması için, *Arabidopsis* bitkisine ait gen dizileri ile *B. juncea* (AABB) ve bu türe yakın olan *B. rapa* (AA) ve *B. nigra* (BB) bitki türlerinin EST dizileri NCBI ( <http://ncbi.nlm.nih.gov/>) veri tabanı kullanılarak bulunmuştur. Böylece Brassica türleri arasında en çok korunan bölgeler belirlenerek primerlerin daha iyi bir şekilde çalışması amaçlanmıştır ve her bir gen için Brassica türleri arasında en çok benzerlik gösteren gen dizileri seçilmiştir. Seçilen gen dizilerinden en çok benzerlik gösteren diziler ClustalIX veri tabanı kullanılarak ayırt edilmiştir. Benzerlik gösteren bölgelerden Primer3 programı ile gen anlatımında kullanmak amacıyla primer tasarımı yapılmıştır.

Çizelge3.3. Tasarlanan primerlerin Baz dizileri ve GC % değerleri

Primer adı:	Primer dizisi 5'-3'	G-C %
BR-HMA2-F	5'- GGAGCGATTCTTGCTTTGGC-3'	55
BR-HMA2-R	5'- CCTGACTTGCAATGCTTCGG-3'	52
BR-HMA4-F	5'-AGCAATGCATGCTAAGAAC-3'	52
BR-HMA4-R	5'-GCATCATTCACACCATCTCC-3'	55
BJ-UBQ9-F	5'-GAAGACATGTTCATTGGCA-3'	45
BJ-UBQ9-F	5'- ACACCTTAGTCCTAAAAGCCACCT-3'	46

Primerleri tasarlarken öncelikle, amplikasyon uzunluğunun 80 -100 baz içermesine, GC içeriğinin %45-55 aralığında olmasına ve erime sıcaklığı (55- 60 °C)'nın primer çiftleri arasında farklılık göstermemesine dikkat edilmiştir.

### 3.5.5. Yarı Kantitatif Ters Yazılım Zincir Reaksiyonu (REALTİME PCR)

Farklı seviyelerdeki Zn konsantrasyonlarıyla yetiştirilen *B. juncea* ve *B. nigra* bitkilerinin yaprak numunelerindeki ekspresyon seviyelerini belirlemek amacıyla kantitatif bir metod olan RT-PCR kullanılmıştır. Kontrol grupları ( Zn içermeyen) ve diğer Zn seviyelerindeki yaprak numunelerinin total RNA' larından cDNA örnekleri hazırlanmıştır. Bu aşamadan

sonra çalışma için BioRad CFX96 sistemi kullanılmıştır. 96 kuyucuklu plateler (BioRad) üzerinde reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.4. *B. juncea* ve *B. nigra* yaprak numunelerinin Real-Time PCR' da gen anlatımı için kullanılan malzemeler ve miktarları

<b>Kullanılan Malzemeler</b>	<b><math>\mu\text{L}</math></b>
Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2x)	13
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
RNA	4
Water, nuclease-free	6
	25

### **3.5.6. HPLC ile Glutasyon Tayini**

GR miktarının belirlenmesi amacıyla ilk olarak ekstraksiyon işleminden önce cihaza yerleştirilecek Mobilfaz için;

1 lt ' de 2,72 gr Potasyum dihidrojen fosfat ( $\text{H}_2\text{KO}_4\text{P}$ )

1 lt ' de 2,31 gr fosforik asit (%85-%88) ( $\text{H}_3\text{O}_4\text{P}$ )

Bu iki içerik karıştırılarak mobilfazA hazırlanmıştır.

Hazırlanan mobilfaz ve asetonitril ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ ) HPCL cihazına yerleştirilmiştir.

Bu aşamadan sonra Önceden öğütülerek toz haline getirilen kuru ağırlıktaki (50mg) yaprak numuleri santrifüj tüplerine alınarak, her bir numune üzerine 1 lt' ye tamamlanmış olan 8 ml HCl (%37'lik) karışımından her bir numuneye 1ml ilave edilerek, 4 °C' de 14.000 g ' de 10 dk santrifüj edildi ve elde edilen GR miktarının belirlenmesi için numuneler viallere aktarıldı. Bununla beraber, ilk numune olarak 200 ppm ' lik bir glutasyon standardı hazırlandı. Daha sonra numuneler Agilent 1260 model HPLC Cihazına yerleştirildi.

### **3.5.7. Toplam Fenolik Bileşen Miktarının Belirlenmesi**

#### **3.5.7.1. Çözeltilerin Hazırlanması**

a. % 7.5'lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisi: 7.5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  100 mL'lik balon jojeye konuldu ve distile su yardımıyla çözülme işleminden sonra hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

**b.** Folin alındığı şekilde kullanıldı.

Fenoliktayini için 100 mg kurutulmuş ve öğütülmüş *B. juncea* ve *B. nigra* yaprak numuneleri hassas terazi ile tartılarak erlenlere alındı. Üzerine 30 ml (%70 'lik) metanol eklenerek erlenlerin ağzı alüminyum folyo ile kapatıldı. 20 dk boyunca 27°C ' de ultrasonik banyoda ekstrakte edildi. Karışım beyaz bant süzgeç kâğıdında süzülerek deney tüpüne alındı.

Karışımın üzerine fenolik için 4.5 ml saf su ,4 ml sodyum karbonat ve 0.5 ml folin eklenerek 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra Uv Spektrofotometre cihazı ile 765 nm boyunda ölçümlerle fenolik miktarları belirlendi.

### **3.5.7.2. Toplam Flavonoid Bileşen Miktarının Belirlenmesi**

#### **3.5.7.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması**

**a.** Sodyum nitrit çözeltisi hazırlamak için 5gr NaNO<sub>2</sub> 100 mL'lik balon jöjeye konuldu ve distile su yardımıyla çözülme işleminden sonra hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı

**b.** Sodyum hidrroksit çözeltisi hazırlamak için 4gr NaOH 100 mL'lik balon jöjeye konuldu ve distile su yardımıyla çözülme işleminden sonra hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı

**c.** Alevinum klorür çözeltisi hazırlamak için 10 gr AlCl<sub>3</sub> 100 mL'lik balon jöjeye konuldu ve distile su yardımıyla çözülme işleminden sonra hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Flovanoid tayini için önceden kurutulmuş ve öğütülmüş *B. juncea* ve *B. nigra* yaprak numuneleri hassas terazi ile 100 mg tartılarak erlene aktarıldı. Üzerine 30 ml metanol (%70 ' lik) eklendi. Erlenlerin ağzı alüminyum folyo ile kapatılarak 20 dk boyunca 27<sup>0</sup> C sıcaklıkta ultrasonik banyoda ekstrakte edildi. Daha sonra karışım filtre kâğıdında süzülerek deney tüpüne alındı. Süzülen karışımın üzerine 4 ml saf su, 0.3 ml sodyum nitrat eklendikten sonra örnekler 6 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra üzerine 0,3 ml alüminyum klorür, 4 ml sodyum hidrroksit ve 0.4 ml distile su eklenerek 10 ml tamamlandı Bu aşamadan sonra örnekler ağzı kapalı bir şekilde 15 dk karanlık bir ortamda bekletildi ve Uv Spektrofotometrede 510 nm boyunda ölçümlerle flovanoid miktarları belirlendi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Bitkide Biriken Ağır Metal Miktarı

*B. juncea* ve *B. nigra* bitki numunelerinin her birine 200' er ml  $ZnSO_4$  çözeltisi hafta da üç gün olmakla birlikte iki hafta boyunca uygulanmıştır. Bu süre sonunda her iki bitki türü için de yapılan ağır metal uygulamasında, kontrol bitkileri ( $0 \mu M$ ) ile ağır metal uygulanan ( $25 \mu M$ ,  $50 \mu M$ ,  $100 \mu M$ ,  $200 \mu M$ ,  $500 \mu M$ ) deney bitkileri arasında morfolojik olarak herhangi bir fark gözlenmemiştir.



Şekil 4.1. 15 gün boyunca  $ZnSO_4$  uygulaması yapılan *B. nigra* bitkisinin farklı  $ZnSO_4$  ( $0 \mu M$ ,  $25 \mu M$ ,  $50 \mu M$ ,  $100 \mu M$ ,  $200 \mu M$ ,  $500 \mu M$ ) seviyelerinde ki görünümü.



Şekil 4.2. 15 gün boyunca  $Zn$  uygulaması yapılan *B. juncea* tomcat bitkisinin farklı  $ZnSO_4$  ( $0 \mu M$ ,  $25 \mu M$ ,  $50 \mu M$ ,  $100 \mu M$ ,  $200 \mu M$ ,  $500 \mu M$ ) seviyelerinde ki görünümü.

Çizelge4.1. Kontrol grubu ve farklı Zn derişimleri uygulanan *B. juncea*'nın yaprak ve köklerinde biriken Zn miktarı (ort.Zn ±SH) ( $\mu\text{g}/\text{g}^{-1}$ kuru ağırlık)

Tür	Metal Konsantrasyonları	Yaprak	Kök
<i>Brassica juncea</i>	0 $\mu\text{M}$	1,86 $\pm$ 0,0457	3,31 $\pm$ 0,1213
<i>Brassica juncea</i>	25 $\mu\text{M}$	3,33 $\pm$ 0,1940	3,34 $\pm$ 0,0447
<i>Brassica juncea</i>	50 $\mu\text{M}$	24,62 $\pm$ 0,0722	24,62 $\pm$ 0,8425
<i>Brassica juncea</i>	100 $\mu\text{M}$	18,37 $\pm$ 0,1481	18,37 $\pm$ 0,9046
<i>Brassica juncea</i>	200 $\mu\text{M}$	27,36 $\pm$ 0,1462	27,36 $\pm$ 1,2744
<i>Brassica juncea</i>	500 $\mu\text{M}$	26,57 $\pm$ 0,1193	26,57 $\pm$ 0,9280

Çizelge 4.2. Kontrol grubu ve farklı Zn derişimleri uygulanan *B. nigra*'nın yaprak ve köklerinde biriken Zn miktarı (ort.Zn ±SH) ( $\mu\text{g}/\text{g}^{-1}$ kuru ağırlık)

Tür	Metal Konsantrasyonu	Yaprak (ppm)	Kök (ppm)
<i>Brassica nigra</i>	0 $\mu\text{M}$	3,367	8,7934
<i>Brassica nigra</i>	25 $\mu\text{M}$	4,3085	12,0148
<i>Brassica nigra</i>	50 $\mu\text{M}$	5,3116	16, 1154
<i>Brassica nigra</i>	100 $\mu\text{M}$	3, 9823	17, 0198
<i>Brassica nigra</i>	200 $\mu\text{M}$	3,9445	19, 3368
<i>Brassica nigra</i>	500 $\mu\text{M}$	2, 8973	28, 161



## 4.2. Ağır Metal Uygulaması Yapılan Bitkilerde Anlatımı Değişen Genlerin Tanımlanması Ve Belirlenmesi

### 4.2.1. *Brassica juncea* Bitkisinden Total RNA İzolasyonu

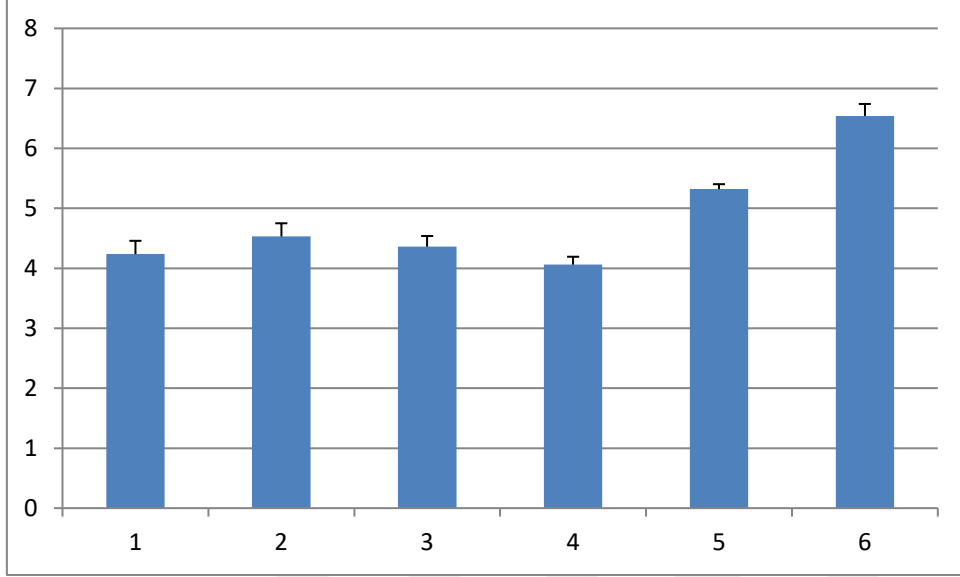
Çizelge 4.3. 15gün boyunca farklı seviyelerde ZnSO<sub>4</sub> çözeltisi *B. juncea tamcot* ve *B. nigra* bitkilerine uygulanarak kök ve yaprak dokularından, total RNA izolasyonu

<i>B. juncea tamcot</i>				
10 gün boyunca ZnSO <sub>4</sub> muamelesi	A260	A280	A260/A280	g/μl
B. juncea tamcot 0μM (kontrol)	0,482	0,242	1,99	19,3
B. juncea tamcot 25 μM	0,223	0,105	2,11	8,6
B. juncea tamcot 50μM	4,401	2,144	2,05	176,0
B. juncea tamcot 100 μM	0,750	0,360	2,09	30,0
B. juncea tamcot 200 μM	1,561	0,745	2,10	62,4
B. juncea tamcot 500 μM	1,427	0,692	2,06	57,1
<i>B. nigra</i>				
10 gün boyunca ZnSO <sub>4</sub> muamelesi	A260	A280	A260/A280	g/μl
B.nigra 0 (kontrol)	1,085	0,538	2,01	43,6
B. nigra 25 μM	0,018	0,007	2,43	0,7
B. nigra 50μM	0,669	0,339	1,97	26,8
B. nigra 100μM	0,042	0,021	2,00	1,7
B. nigra 200 μM	2,751	1,356	2,03	110,0
B. nigra 500 μM	0,661	0,318	2,08	26,4

İzolasyon RNA izolasyon kiti kullanılarak yapılmıştır ve İzolasyonu takiben NanoDrop spektrofotometresinde yapılan ölçümler ile total RNA'ların saflık miktarları (OD260/OD280) 1,80 ile 2,2 arasında saptanmıştır.

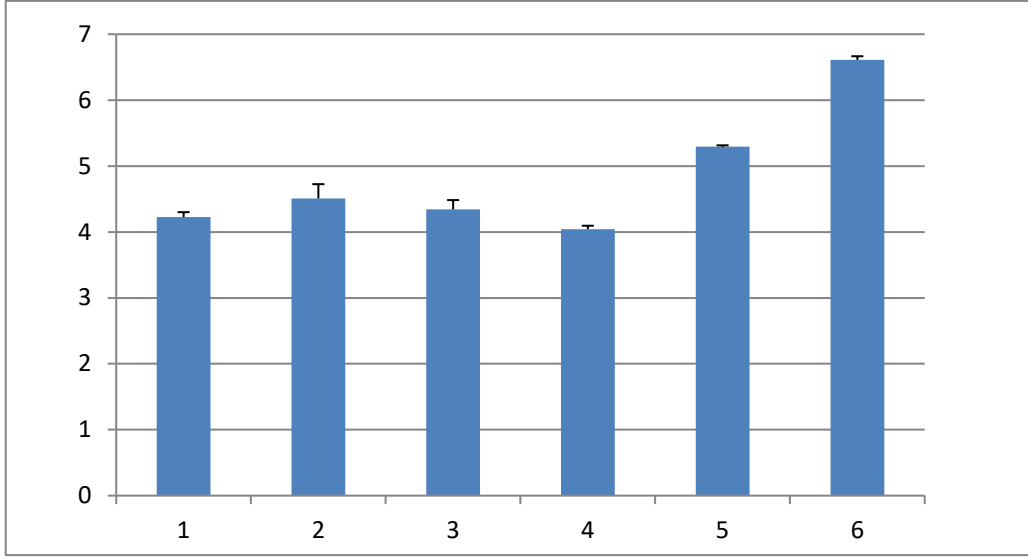
#### 4.2.2. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

deney grubunda gen ekspresyon seviyesinde değişiklikleri tespit etmek için RT-PCR uygulanmıştır.



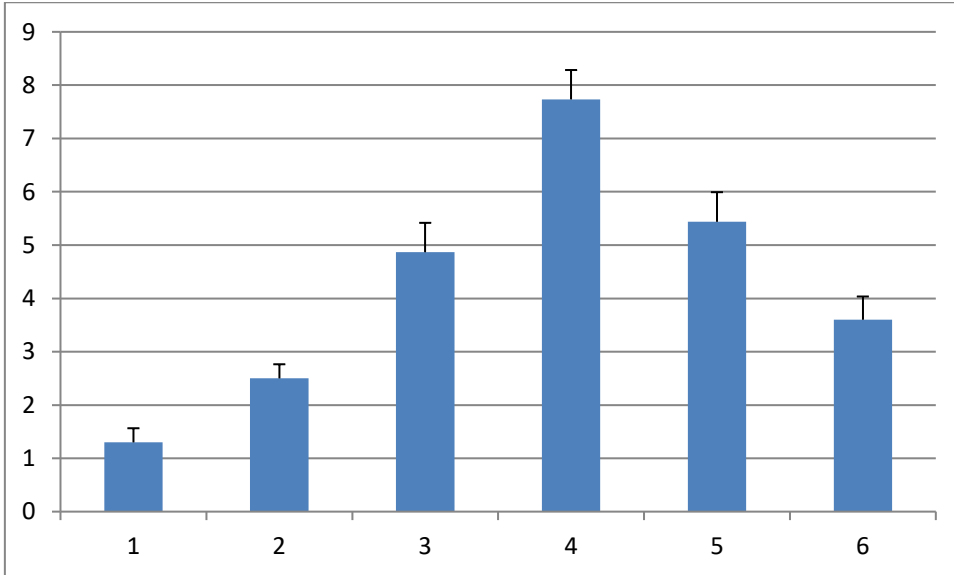
Şekil 4.3. *B. nigra* bitkisinin R-T PCR analizine göre; yatay düzlemde 1= 0μM, 2= 25 μM, 3= 50 μM, 4= 100 μM, 5= 200 μM, 6= 500 μM; dikey düzlemde HMA2 genin ekspresyon seviyesi

R-T PCR analizine göre *B. nigra* bitkisinin 0 μM, 25 μM, 100 μM ve 500 μM' da anlamlı derecede bir artış görülmezken 50 μM ve 200 μM ' da anlamlı bir artış gözlenmiş ve ekspresyon seviyesinin en yüksek olduğu ZnSO<sub>4</sub> seviyesi 200 μM' dır.



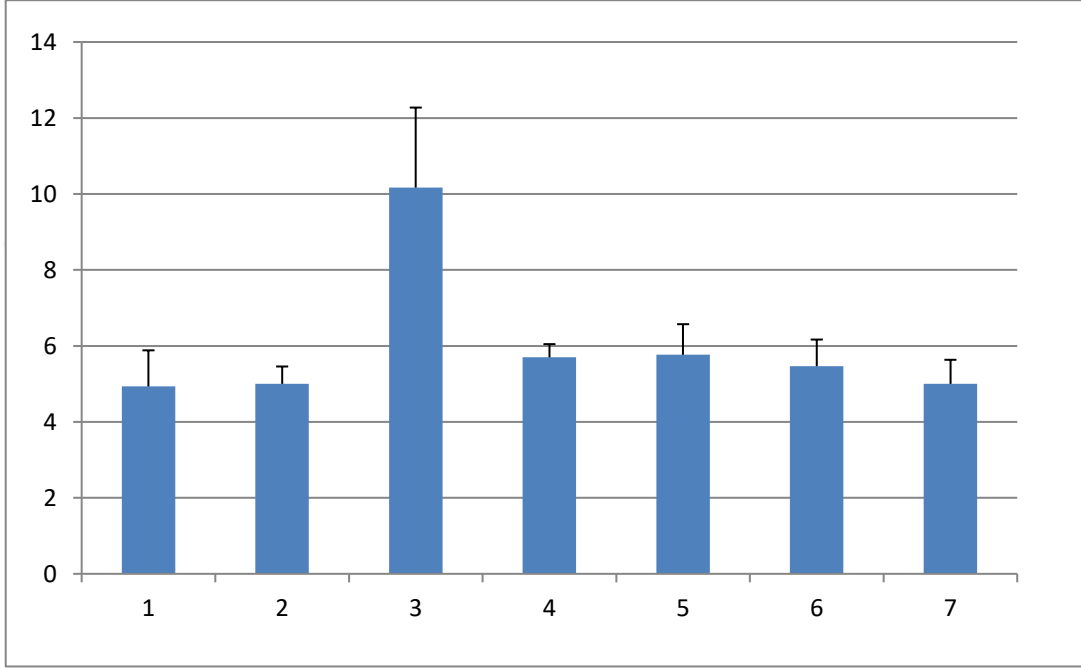
**Şekil.4.4.** Şekil 4.3. *B. nigra* bitkisinin R-T PCR analizine göre; yatay düzlemde 1= 0µM, 2= 25 µM, 3= 50 µM, 4= 100 µM, 5= 200 µM, 6= 500 µM; dikey düzlemde HMA4 geninin ekspresyon seviyesi

*B. nigra* bitkisinin R-T PCR analizinde (HMA4) 'de 0 µM, 25 µM, 50 µM ve 100 µM' da anlamlı derecede bir farklılık görülmezken 200 µM ve 500 µM ' da ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Ekspresyon seviyesinin en yüksek olduğu ZnSO4 500 µM' dır.



**Şekil.4.5.** Şekil 4.3. *B. juncea* bitkisinin R-T PCR analizine göre; yatay düzlemde 1= 0µM, 2= 25 µM, 3= 50 µM, 4= 100 µM, 5= 200 µM, 6= 500 µM; dikey düzlemde HMA2 geninin ekspresyon seviyesi

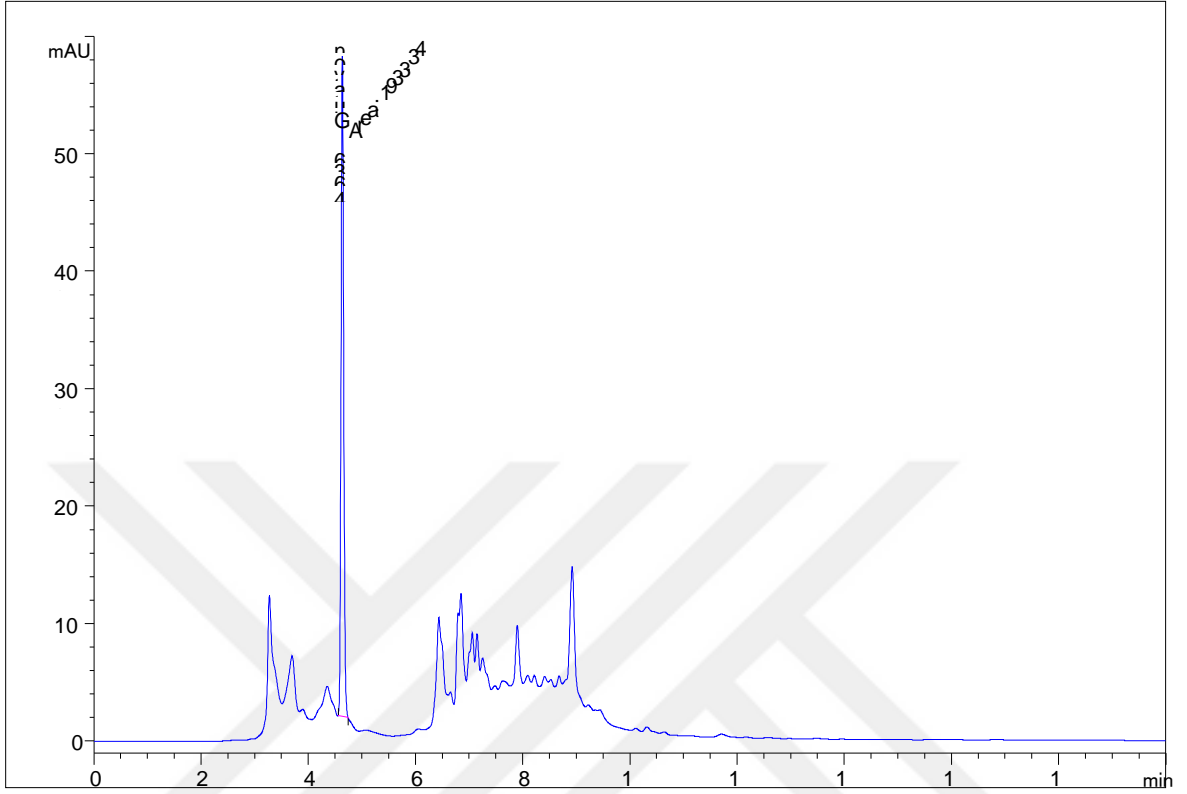
R-T PCR analizine göre *B. juncea*' da HMA2 geninin ekspresyonu 0  $\mu\text{M}$  , 25  $\mu\text{M}$  , 500  $\mu\text{M}$ ' da anlamlı derecede bir artış gözlenmezken 50  $\mu\text{M}$  , 100  $\mu\text{M}$  , 200  $\mu\text{M}$ ' da ekspresyon seviyesinin arttığı gözlenmiştir. Ayrıca ekspresyon seviyesi 50  $\mu\text{M}$ ' da artmaya başlamış ve 200  $\mu\text{M}$ ' dan sonra azalmıştır.



**Şekil4.6.** Şekil 4.3. *B. juncea* bitkisinin Real Time PCR analizine göre; yatay düzlemde 1= 0 $\mu\text{M}$ , 2= 25  $\mu\text{M}$ , 3= 50  $\mu\text{M}$ , 4= 100  $\mu\text{M}$ , 5= 200  $\mu\text{M}$ , 6= 500  $\mu\text{M}$ ; dikey düzlemde HMA4geninin ekspresyon seviyesi

R-T PCR analizine göre *B. juncea*' da HMA4 geninin ekspresyonunda 50  $\mu\text{M}$ ' da anlamlı derecede bir artış gözlenirken diğer  $\text{ZnSO}_4$  seviyelerinde bir artış görülmediği ve ekspresyon seviyesinin birbirine yakın olduğu gözlemlenmiştir.

#### 4.2.3.HPLC İle Glutasyon Tayini

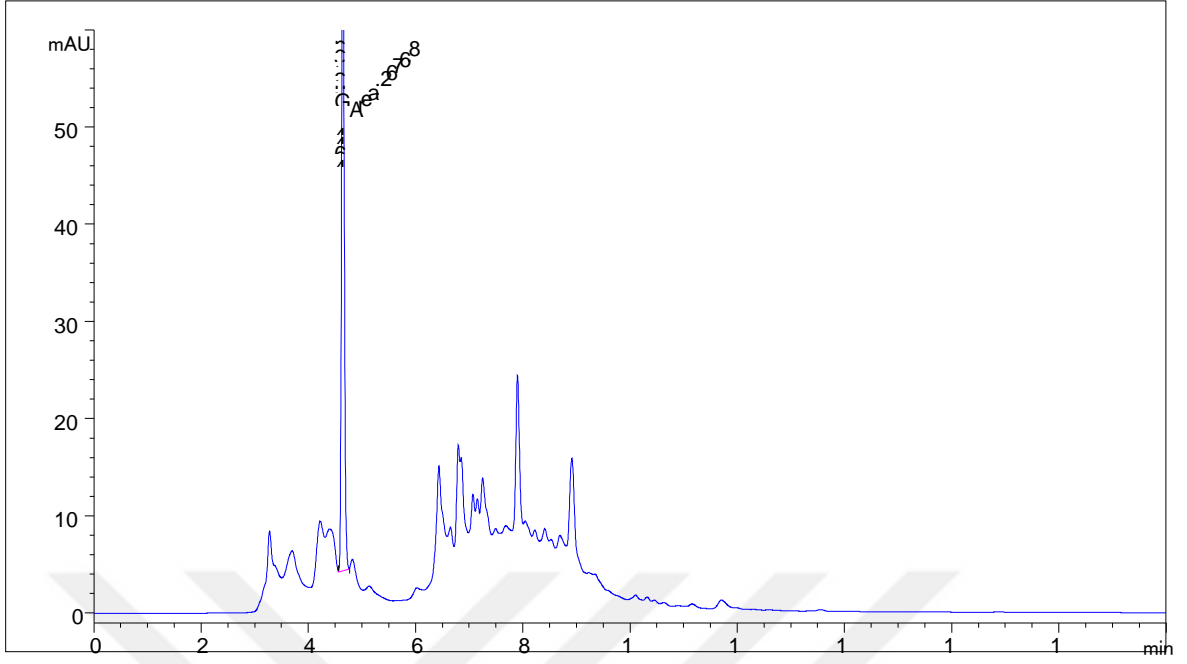


RetTime	Type	Area	Amt/Area	Amount	Grp	Name
[min]		[mAU*s]		[ppm]		

4.636	MM	1933.34167	7.51396	1.45271e4		Glutasyon
-------	----	------------	---------	-----------	--	-----------

Totals : 1.45271e4

Şekil 4.7. *B. juncea* (Zn) 0 µM solüsyonda glutasyon miktarı ppm cinsinden hesaplanmıştır



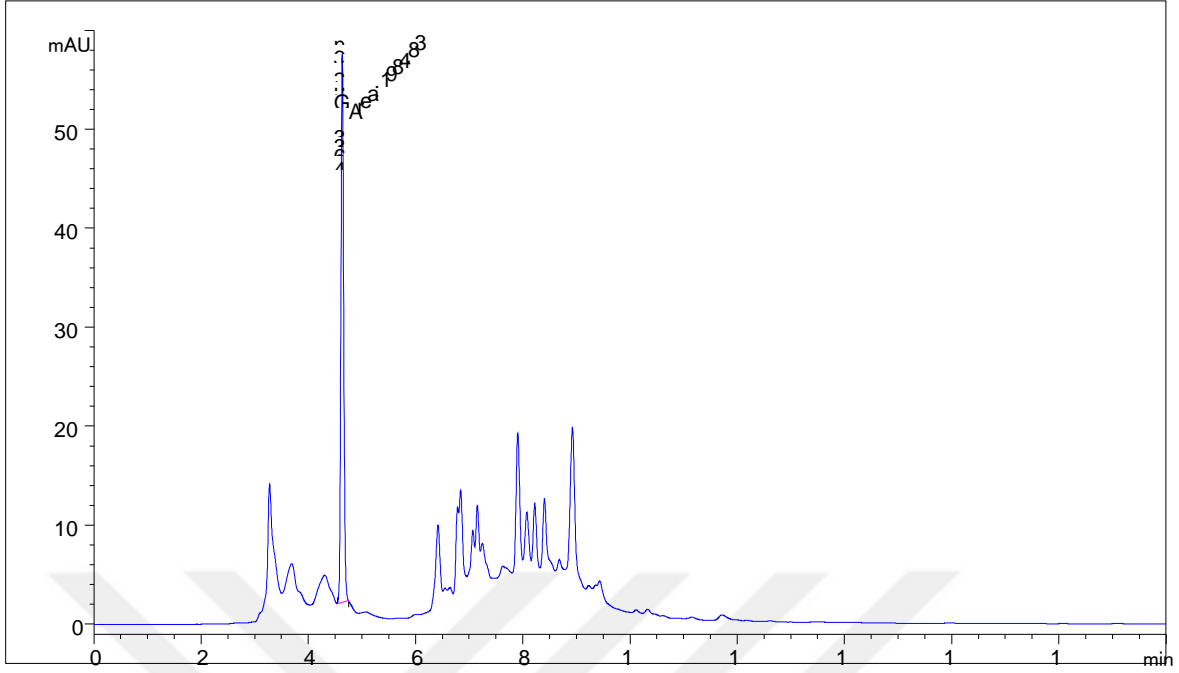
RetTime	Type	Area	Amt/Area	Amount	Grp	Name
[min]		[mAU*s]		[ppm]		

-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----

4.644	MM	2676.83984	7.51396	1.41629e4		Glutatyon
-------	----	------------	---------	-----------	--	-----------

Totals : 1.41629e4

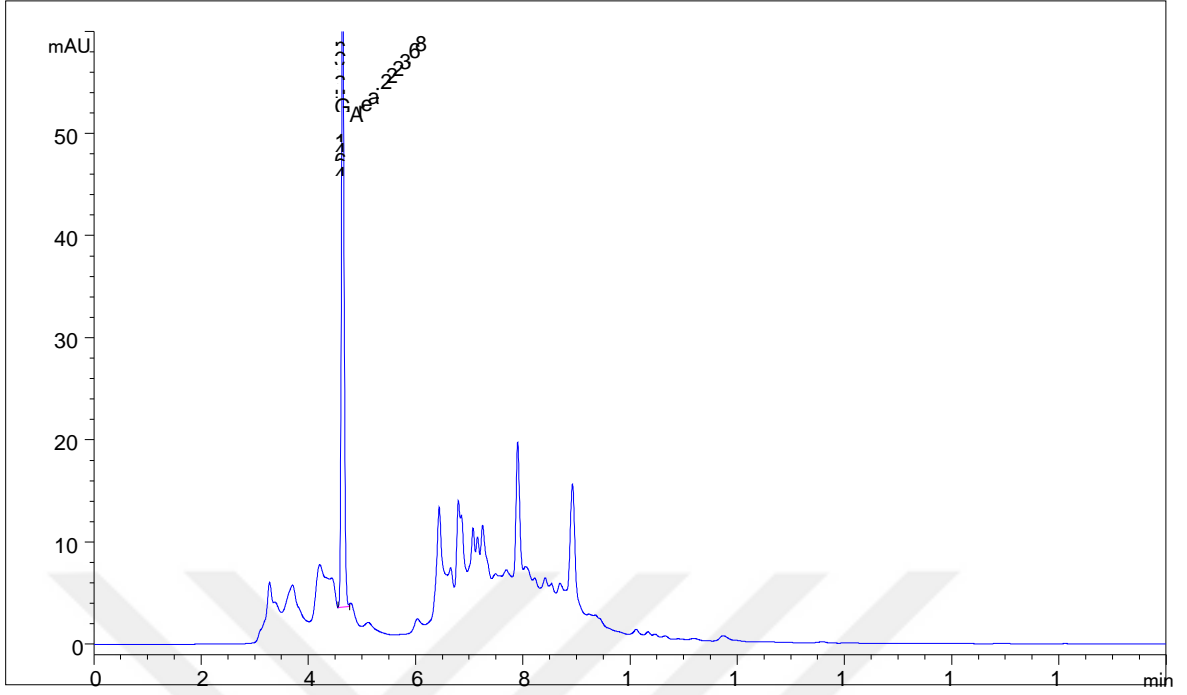
Şekil 4.8. *B. juncea* (Zn) 25µM solüsyondaki glutatyon miktarı ppm cinsinden hesaplanmıştır



RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ppm]	Grp Name
4.633	MM	1984.82764	7.51396	1.49139e4	Glutatyon

Totals : 1.49139e4

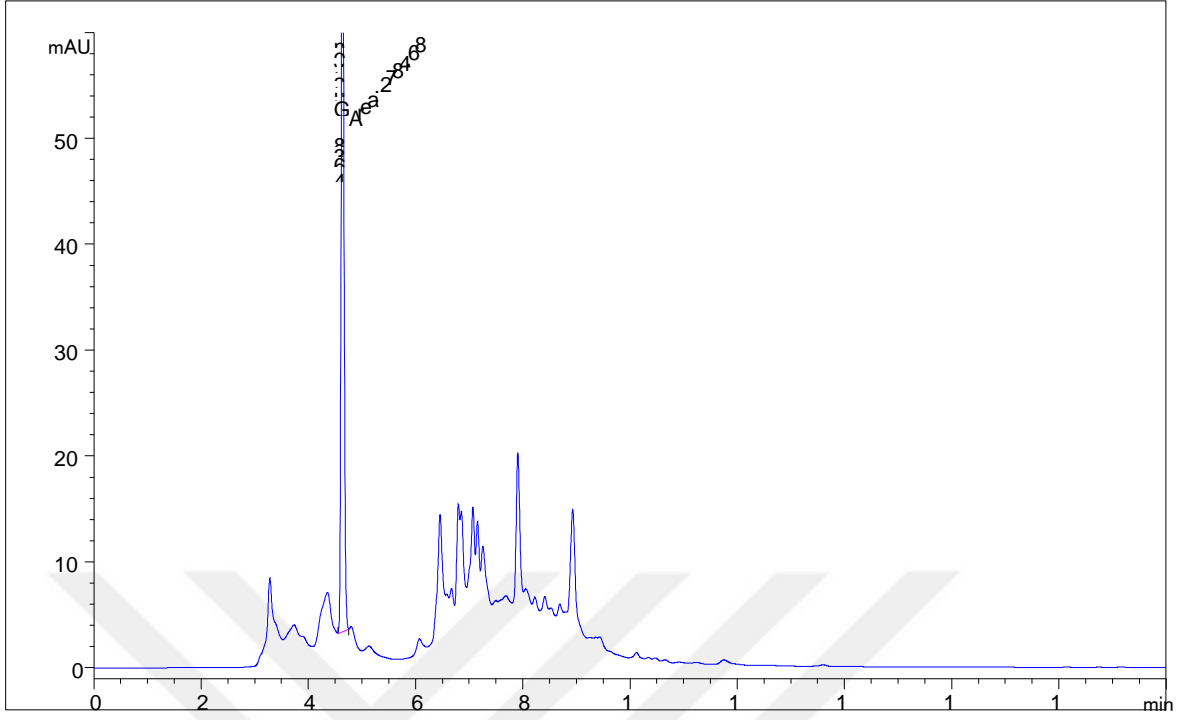
Şekil 4.9. *B. juncea* 50µm Zn solüsyondaki glutatyon miktarı ppm cinsinden hesaplanmıştır



RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ppm]	Grp Name
4.641	MM	2223.67627	7.51396	1.67086e4	Glutasyon
Totals :				1.67086e4	

Şekil 4.10. *B. juncea* 100 µM Zn solüsyondaki glutasyon miktarı ppm cinsinden hesaplanmıştır

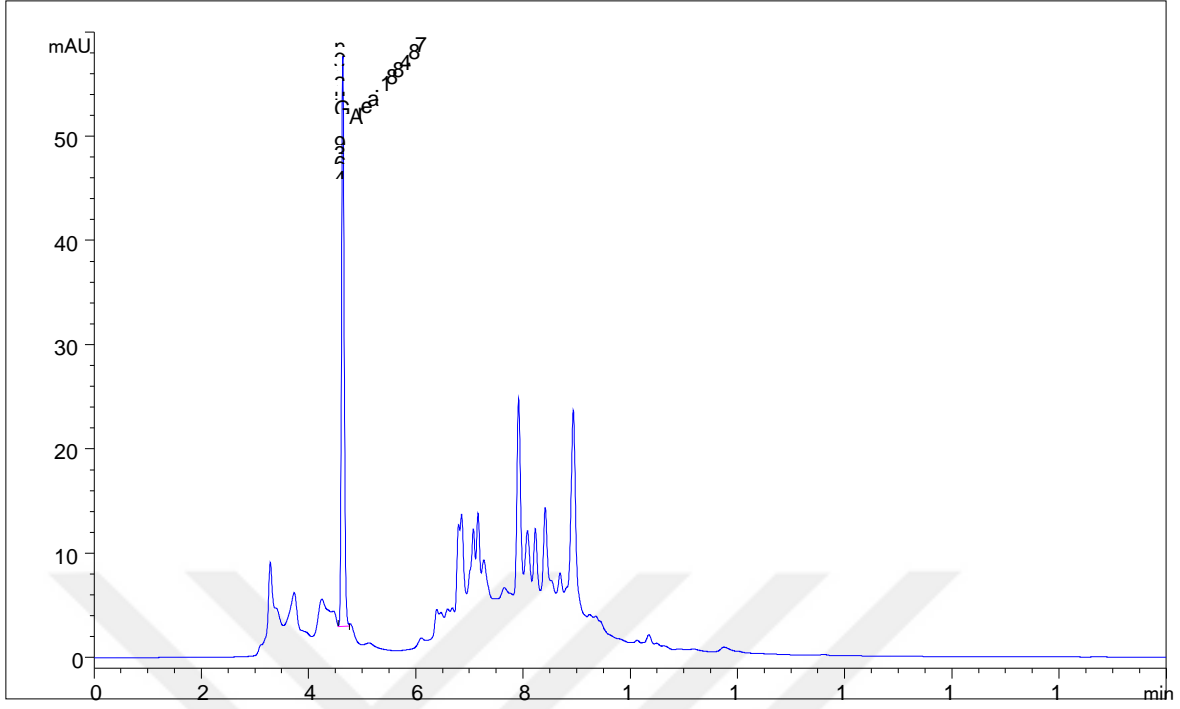




RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area [ppm]	Amount	Grp Name
4.638	MM	2784.68091	7.51396	2.09240e4	Glutatyon

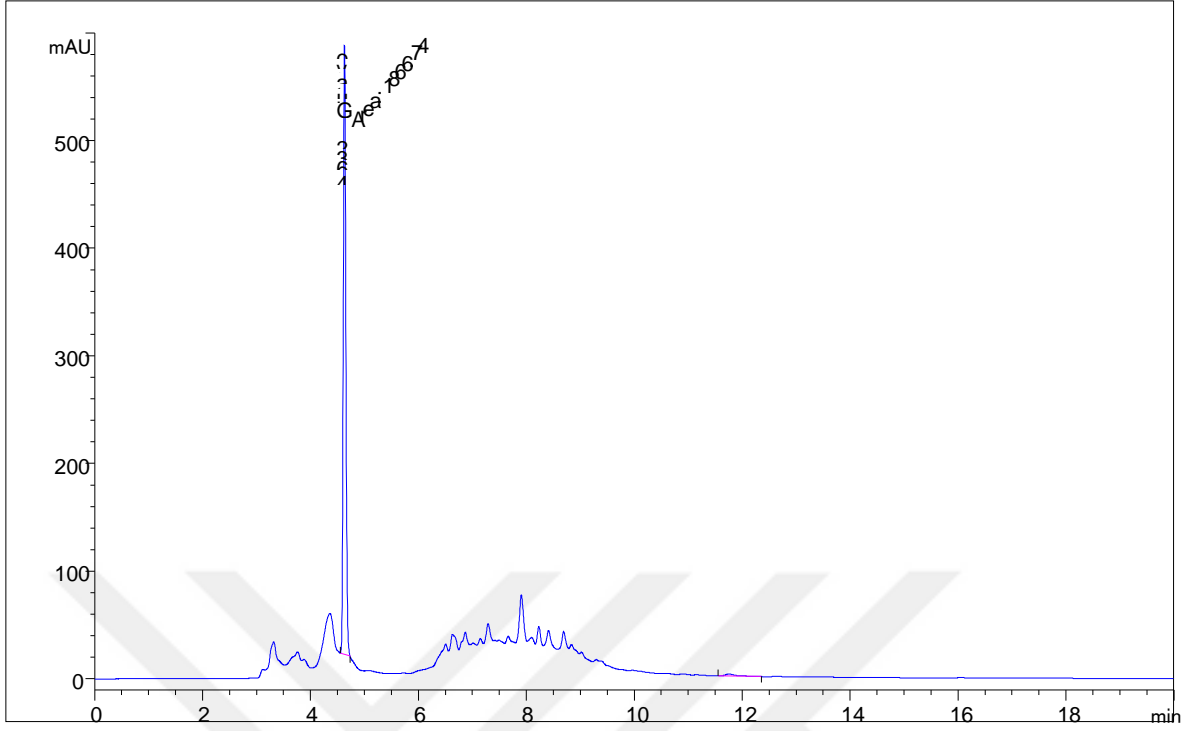
Totals : 2.09240e4

Şekil 4.11. *B. juncea* 200 µM solüsyondaki glutatyon miktarı ppm cinsinden hesaplanmıştır



RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ppm]	Grp Name
4.639	MM	1884.87134	7.51396	2.01137e4	Glutasyon
Totals :				2.01137e4	

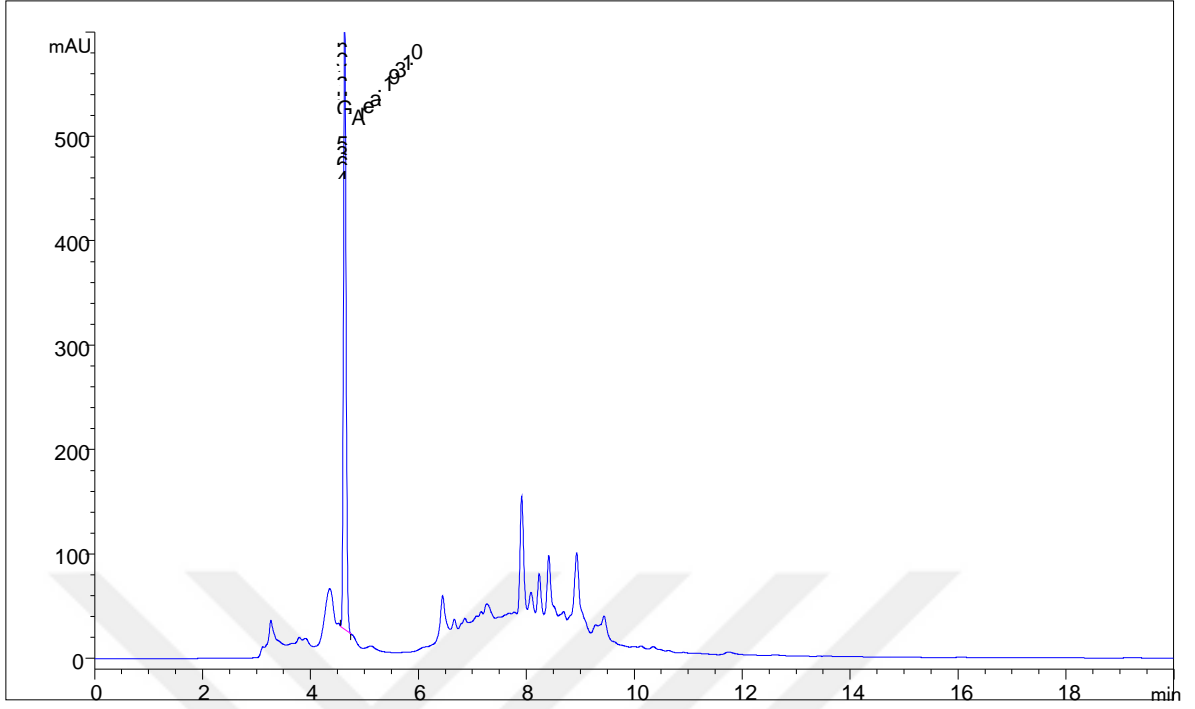
Şekil 4.12. *B. juncea* 500 µM Zn solüsyondaki glutasyon miktarı ppm cinsinden hesaplanmıştır



RetTime	Type	Area	Amt/Area	Amount	Grp	Name
[min]		[mAU*s]		[ppm]		
4.632	MM	1866.73840	7.51396	1.22288e4		Glutasyon

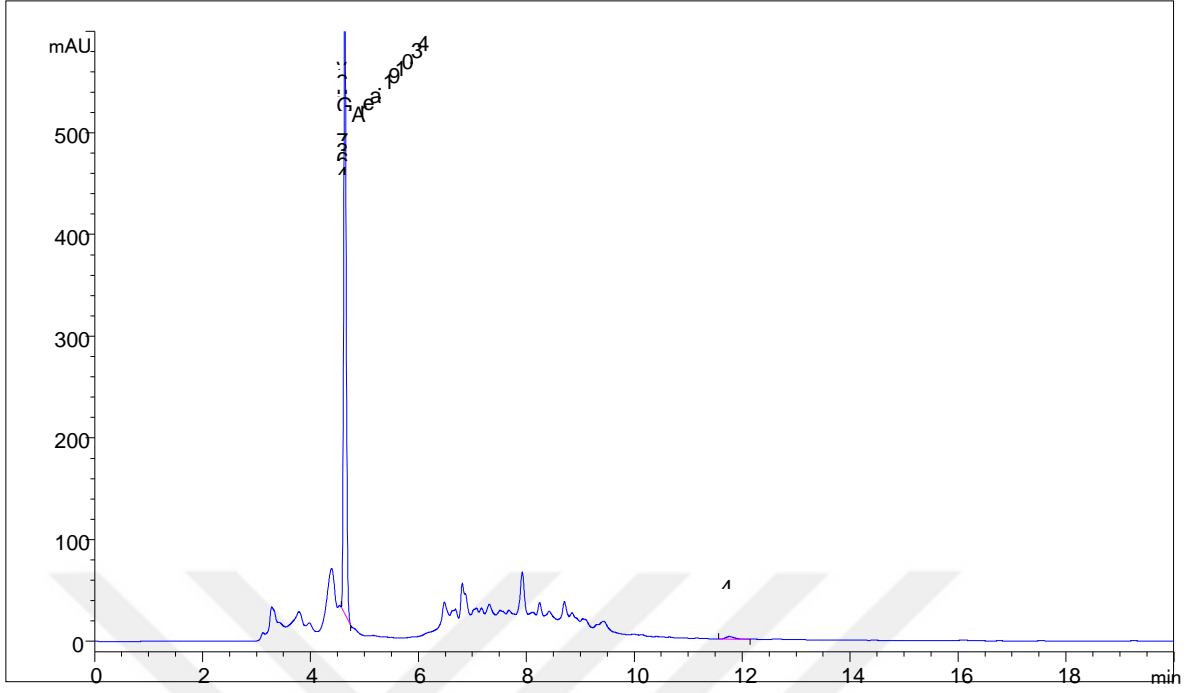
Totals : 1.22288e4

**Şekil 4.13.** *B. nigra* 0µM Zn solüsyondaki glutasyon miktarı, sonuçlar ppm cinsinden hesaplanmıştır



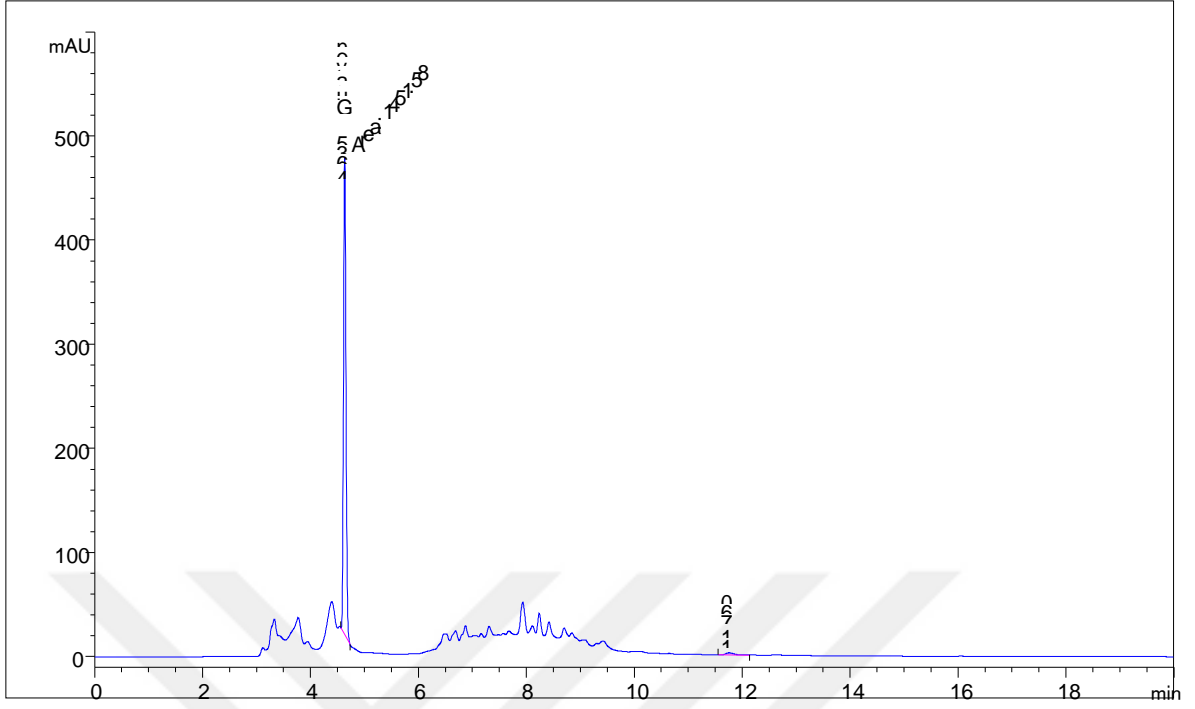
RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area [ppm]	Amount	Grp Name
4.633	MM	2626.86841	7.51396	1.40266e4	Glutasyon
Totals :				1.40266e4	

**Şekil 4.14.** *B. nigra* 25 µM Zn solüsyondaki glutasyon miktarı, sonuçlar ppm cinsinden hesaplanmıştır



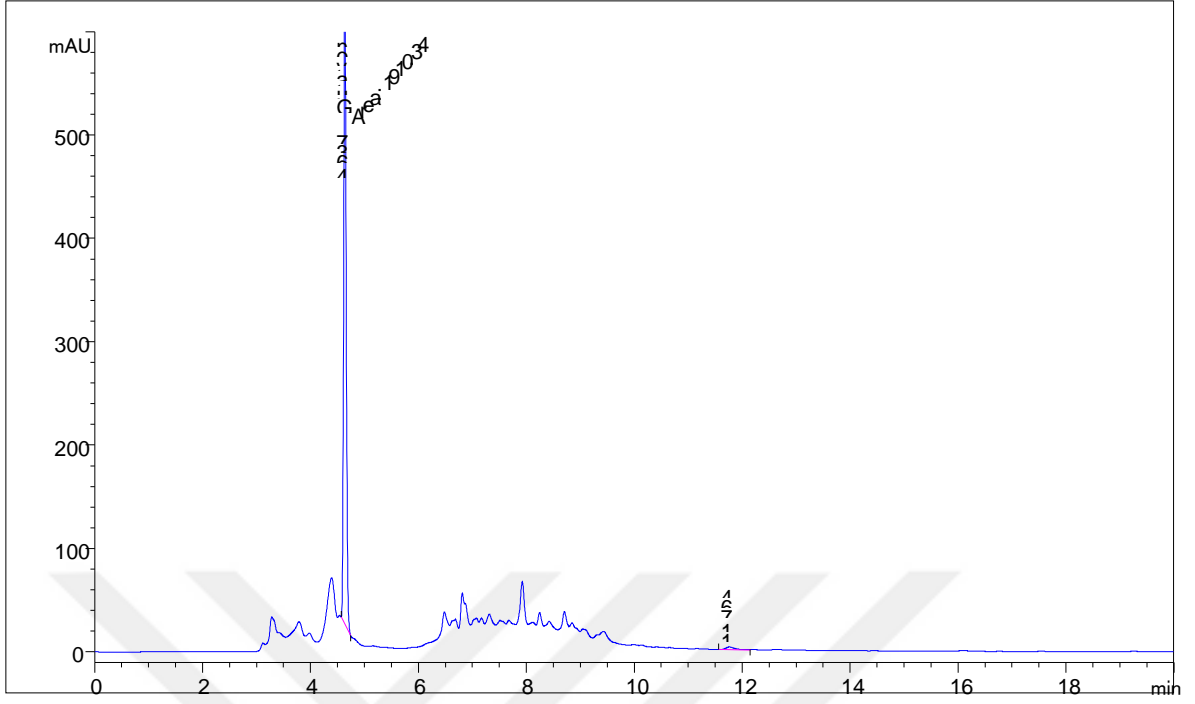
RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ppm]	Grp Name
4.635	MM	1931.0630	7.51396	1.45099e4	Glutasyon
Totals :				1.45099e4	

**Şekil 4.15.** *B. nigra* 50µM Zn solüsyondaki glutasyon miktarı, sonuçlar ppm cinsinden hesaplanmıştır



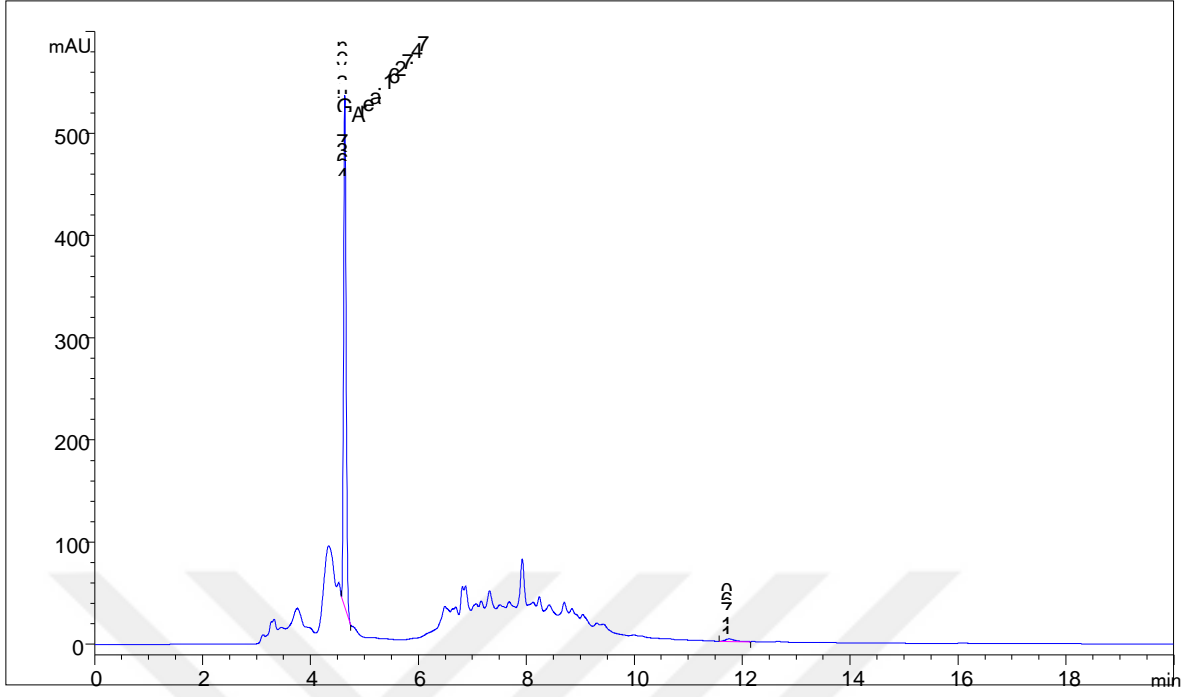
RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area [ppm]	Amount	Grp Name
4.635	MM	1451.58447	7.51396	1.09072e4	Glutasyon
Totals :			1.09072e4		

**Şekil 4.16.** *B. nigra* 100µM Zn solüsyondaki glutasyon miktarı, sonuçlar ppm cinsinden hesaplanmıştır



RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ppm]	Grp Name
4.637	MM	1910.33606	7.51396	1.43542e4	Glutasyon
Totals :				1.43542e4	

**Şekil 4.17.** *B. nigra* 200µM Zn solüsyondaki glutasyon miktarı, sonuçlar ppm cinsinden hesaplanmıştır



RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [ppm]	Grp Name
4.637	MM	1627.47046	7.51396	1.97382e4	Glutasyon
Totals :				1.97382e4	

**Şekil 4.18.** *B. nigra* 500µM Zn solüsyondaki glutasyon miktarı, sonuçlar ppm cinsinden hesaplanmıştır



Çizelge 4.4. Farklı Zn derişimleri uygulanan ve *B. juncea*' nin ort. glutatyon miktarı (ort.±SH) (µg/g)

Derişim	<i>B. juncea</i> ort. glutatyon (µg/g)±SH
0 µM	1.45 ± 0,0850
25 µM	1.41 ± 0,1006
50 µM	1.49 ± 0,907
100 µM	1.67 ± 0,9373
200 µM	2.09 ± 0,1205
500 µM	2.01 ± 0,0953

Ağır metal konsantrasyonu glutatyon miktarıyla paralel olarak artış göstermiştir. Bu analizde 200µM 'a kadar artış gözlenirken 500 µM ' dan itibaren tekrar kontrol düzeyine inmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı Zn derişimleri uygulanan *B. nigra*' nin ort. glutatyon miktarı (ort.±SH)(µg/g)

Derişim	<i>B. nigra</i> ort. glutatyon (µg/g)±SH
0 µM	1.22 ± 0,1873
25 µM	1.40 ± 0,7234
50 µM	1.45 ± 0,1006
100 µM	1.09 ± 0,0964
200 µM	1.43 ± 0,0750
500 µM	1.97 ± 0,4041

#### 4.2.4. Toplam Fenolik Bileşen Miktarı

**Çizelge 4.6.** Farklı Zn derişimleri uygulanan *B. juncea'* da ort. toplam fenolik madde miktarı (ort.±SH)

Konsantrasyon Zn ( $\mu\text{M}$ )	Miktar
0 $\mu\text{M}$	0,38 $\pm$ 0,0189 mg GA/ g
25 $\mu\text{M}$	0,58 $\pm$ 0,0009mg GA/ g
50 $\mu\text{M}$	0,47 $\pm$ 0,0011 mg GA/ g
100 $\mu\text{M}$	0,49 $\pm$ 0,0006 mg GA/ g
200 $\mu\text{M}$	0,56 $\pm$ 0,0002 mg GA/ g
500 $\mu\text{M}$	0,55 $\pm$ 0,0010 mg GA/ g

**Çizelge 4.7.** Farklı Zn derişimleri uygulanan *B. nigra'* da ort. toplam fenolik madde miktarı (ort.±SH)

Konsantrasyon Zn ( $\mu\text{M}$ )	Miktar
0 $\mu\text{M}$	0,33 $\pm$ 0,0119 mg GA/ g
25 $\mu\text{M}$	0,54 $\pm$ 0,3038 mg GA/ g
50 $\mu\text{M}$	0,45 $\pm$ 0,0419 mg GA/ g
100 $\mu\text{M}$	0,49 $\pm$ 0,0456 mg GA/ g
200 $\mu\text{M}$	0,50 $\pm$ 0,0488 mg GA/ g
500 $\mu\text{M}$	0,37 $\pm$ 0,0247 mg GA/ g

#### 4.2.5. Toplam Flovanoid Miktarı

Çizelge 4.8. *B. juncea* flovanoid miktarları

Konsantrasyon Zn ( $\mu\text{M}$ )	Miktar
0 $\mu\text{M}$	0,05 $\pm$ 0,0036 mg EK/g
25 $\mu\text{M}$	0,07 $\pm$ 0,0042 mg EK/g
50 $\mu\text{M}$	0,07 $\pm$ 0,0046 mg EK/g
100 $\mu\text{M}$	0,07 $\pm$ 0,0036 mg EK/g
200 $\mu\text{M}$	0,06 $\pm$ 0,0053 mg EK/g
500 $\mu\text{M}$	0,08 $\pm$ 0,0039 mg EK/g

Çizelge 4.9. *B. nigra* flovanoid miktarları

Konsantrasyon Zn ( $\mu\text{M}$ )	Miktar
0 $\mu\text{M}$	0,03 $\pm$ 0,0163 mg EK/g
25 $\mu\text{M}$	0,02 $\pm$ 0,002152 mg EK/g
50 $\mu\text{M}$	0,04 $\pm$ 0,0011 mg EK/g
100 $\mu\text{M}$	0,04 $\pm$ 0,0022 mg EK/g
200 $\mu\text{M}$	0,05 $\pm$ 0,0037 mg EK/g
500 $\mu\text{M}$	0,03 $\pm$ 0,0045 mg EK/g

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yoğunluğu 5 gr' ın üzerinde olan metaller ağır metal olarak tanımlanmaktadır ve [Zn (7.1g/cm<sup>3</sup>)] bir ağır metaldir.

Günümüzde, ekosistemlerin toprak, su ve hava gibi ortamlarında yaygın bir şekilde birikmeye başlayan ağır metaller çeşitli antropolojik nedenlerle çevreye yayılmakta ve Dünya yüzeyindeki tüm organizmaların yaşamını tehdit eden önemli bir çevre sorunu haline almıştır. Ağır metal biriktiren türler *B. nigra* ve *B. juncea*, ağır metal ile kirlenmiş toprakların arıtımı için olası kullanımı nedeniyle dikkat çekmiştir [90]. *B. juncea* ve *B. nigra* gibi akümülatör bitki türleri, bitki bünyesindeki fotosentez, solunum, büyüme ve gelişme gibi bir çok metabolik olaylar üzerinde toksik etki oluşturan metalleri genetik olarak bünyelerinde biriktirme potansiyeline sahiptirler. Bu tür akümülatör bitkiler, ağır metalle kirlenmiş toprak, su ya da havanın bitkiler tarafından iyileştirilmesini sağlayan fitoremediasyon teknolojisinin gelişmesini sağlamıştır. Mevcut remediasyon teknolojilerinin geliştirilmesi bakımından, bitkilerde ağır metal akümülayonu ve toleransının moleküler mekanizması hakkındaki bilgilerin artması son derece önemlidir [29]. Son zamanlarda araştırmacılar Zn metalinin fitoremediasyonu için Hindistan hardalını (*B. juncea* (L. Czern) kullanmaktadırlar.

Bu tez çalışmasında Brassicaceae familyasına ait *B. juncea* ve *B. nigra* bitkilerinin kök ve yapraklarında Zn ağır metal akümülayonu ve toleransının moleküler mekanizmasına katkı sağlamak ve fitoremediasyon teknolojisinde ki rolü araştırılmıştır. Farklı seviyelerde Zn ile uyarılan önemli genlerin; ATPaz' ların (HMA2 ve HMA4) R-T PCR ile gen ekspresyonu yaparak metal taşınımında ki rolü ve metal stresine yol açan reaktif oksijen türlerinin neden olduğu zararları önlemek için, bitkinin savunma mekanizmasında rol oynayan ve önemli antioksidanlar olarak bilinen glutatyon, fenolik ve flavonoid bileşenlerin miktarları belirlenerek metal akümülayonu ile olan bağlantısı anlaşılmaya çalışılmıştır.

*B.nigra* ve *B.juncea* türleri, hızlı büyüyen, büyük biyokütle potansiyeli olan ve yüksek oranda metal biriktirme yeteneklerine sahip türlerdir. Bu sebepten dolayı bu bitkiler, fitoremediasyon ve fitoekstraksiyon için en uygun aday olarak tercih edilmiştir. Elde edilen bu veriler doğrultusunda metal alınımı, taşınımı ve birikiminin anlaşılması sağlanarak fitoremediasyon kapasitesi yüksek transgenik bitkilerin geliştirilmesi mümkün olabilir [91].

*B. juncea* ağır metalleri akümüle etme ve toprak üstündeki dokulara taşıma yeteneğine sahiptir [86].

*B. juncea* sahip olduğu yüksek biyokütle nedeniyle (diğer hiperakümülatörlere göre en azından 10 kat daha fazla), ağır metalle kirlenmiş topraklarda bile hızla büyüeyebilen bir bitkidir. Gelişmiş bir kök sistemine sahip olan bu bitki özellikle Pb, Cd ve Zn gibi ağır metalleri akümüle etme yeteneğine sahiptir [92]. Özellikle ağır metallerin bitkilerde akümülyasyonu ve toleransıya ilgili moleküler mekanizmaların detaylı olarak aydınlatılması son derece önemlidir [93]. *Brassicaceae* familyasına ait *A. halleri*, *Thlaspi caerulescens*, *B. juncea* ve *B. napus* gibi akümülatör bitkiler bu mekanizmaların aydınlatılmasında model bitki olarak kullanılmakta ve birçok çalışmada yer almaktadır [94, 95].

Ancak önemli bir yağ bitkisi olan ve ağır metallere karşı tolerans gösteren *B. nigra* ile ilgili detaylı moleküler çalışmalara literatürde rastlanmamıştır. Ülkemizde Doğu Anadolu bakır maden yataklarında yaşamaya adapte olmuş *B. nigra*'nın, ağır metal toleransı yeteneğiyle ilgili az sayıda fizyolojik çalışma bulunmaktadır. *B. nigra* ağır metallere karşı toleranslı bir tür olup ağır metalleri özellikle kökte depolama yeteneğine sahiptir [96]. Farklı Zn seviyelerinde yetiştirilen *B. juncea* ve *B. nigra* bitki türlerinin metal alım ve birikim mekanizması için; hasat edilen bitkiler metal tayini yapılmıştır.

*B. juncea tamcot* bitki türüne uygulanan ağır metal uygulamasında kontrol bitkilerinin yaprak ve köklerinde iz miktarda Zn saptanmıştır. *B. juncea* bitki türünün yapraklarında kontrol grubuna göre artış gözlenmiş ve ekspresyon seviyesi 50 µM- 100 µM' a kadar yükseldikten sonra Zn inhibe edilmiştir. Kök numunelerinde ise yine kontrol grubunda Zn ' ye rastlanmıştır. Metal birikiminin en fazla olduğu Zn seviyesi 200 µM ' dır. *B. juncea* bitki türünün yaprak ve kök kısımlarında metal alım kapasitelerini karşılaştırdığımızda metal taşınımının yapraklara doğru azaldığı ve Zn için köklerde daha fazla birikim gösterdiği tespit edilmiştir.

Ağır metaller; *B. juncea*, *B. nigra Koch*, *B. campestris L.*, *B.napus L.* ve *B. oleracea L* dahil olmak üzere, metalleri tolere etme ve biriktirme yetenekleri açısından *Brassicaceae* familyasından yüksek büyüme hızına sahip bitkileri incelemiştir [97]. *Brassicaceae* familyasından incelenen tüm bitkiler metalleri biriktirmesine rağmen *B. juncea* Cr, Cd ve Zn'yi biriktirme ve taşıma kabiliyetlerine göre en yüksek yeteneği göstermektedir.

*B. nigra* bitki türünün yapraklarında 0 kontrol grubuna göre çok küçük değişiklikler saptanmıştır. Fakat köklerde 50 µM ve üzerinde 0 kontrol grubuna göre önemli artışlar meydana gelmiştir. Her iki uygulamada da bitkinin farklı kısımlarında akümüle edilen metal miktarlarına bakıldığında, en fazla miktarın kökte saptandığı, yapraklarda ise kökte akümüle olan metal miktarından daha azdır. Ayrıca *B. nigra* 'nın metal alımının en yüksek olduğu seviye 500 µM 'dır.

*B. nigra* ağır metallerle karşı toleranslı bir tür olup ağır metalleri özellikle kökte depolama yeteneğine sahiptir.

*B. juncea* ve *B. nigra* bitkilerinin R-T PCR ile gen ekspresyonu yapılarak metal ATPaz'ların (HMA2 -HMA4) rolü araştırılmıştır.

HMA2 geninin *B.nigra* bitkisinde RT- PCR sonuçlarına göre; 0 µM, 25 µM, 100 µM ve 500 µM seviyelerinde anlamlı bir artış gözlenmezken 50µM ZnSO4 ve 200µM ZnSO4 ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Farklı Zn seviyelerinde ki *B.nigra* yaprak numunelerinde ekspresyon seviyesinin en anlamlı artışın 200 µM seviyesinde olduğu tespit edilmiştir. HMA4 geninin *B. nigra* bitkisinde R-T PCR sonuçlarına göre; 0 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM ve 200 µM' daki ekspresyon seviyeleri anlamlı ve birbirine yakınlık gösterirken, 500 µM' daki ekspresyon seviyesi anlamlı derecede bir artış göstermiştir. *B. nigra* yaprak numunelerinde HMA4 geni ile en uyumlu seviyenin 500 µM ZnSO4 olduğu tespit edilmiştir.

HMA2 geninin *B. juncea* bitkisinde R-T PCR sonuçlarına göre; HMA2 geninin ekspresyonu 0µM, 25 µM ve 500 µM' da anlamlı derecede bir artış gözlenmezken 50 µM, 100 µM ve 500 µM' da anlamlı derecede ekspresyon seviyesinin arttığı gözlenmiştir. Ancak *B. juncea* yaprak numunelerinde HMA2 geni ile en uyumlu seviyenin 100µM ZnSO4 olduğu tespit edilmiştir.

HMA4geninin *B. juncea* bitkisinde RT- PCR sonuçlarına göre; göre 50 µM' da anlamlı derecede ekspresyon seviyesinin arttığı görülürken diğer Zn seviyelerinin birbirine yakınlık gösterdiği gözlenmiştir. Ancak anlamlı derecede olmasa da 100 µM ' dan sonra ekspresyon seviyesinde bir azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre 50 µM gözlemlenen HMA4 geni ile ilişkili en uygun seviye olduğu tespit edilmiştir.

HMA4, Brassicaceae'deki metal akümülatör tesislerinde Zn ve Cd toleransının ana belirleyicisi olarak görünmektedir [98].

AtHMA2 ve AtHMA4'ün temel görevleri, ksileme çinko iyonlarının taşınmasını sağlamaktır. Ayrıca kadminyum iyonlarına karşı önemli bir afiniteye sahiptirler ve köklerden kendi translokasyonunu yürütmeleri mümkündür.

HMA4 geni en yüksek ekspresyon seviyesi *B. juncea* ' da 50 µM, *B. nigra* ' da ise 500 µM' dır.

Özellikle Arabidopsis bitkilerinde yapılan genom analizleri ile, HMA1-4'ün Zn, Co, Cd ve Pb taşınımı ve diğer grubu olan HMA5-8'in ise Cu ve Ag taşınımından sorumlu olduğu gösterilmiştir [99].

Bu iki bitki türünün HMA4 geni için karşılaştırılması yapıldığında *B. juncea* ' nın yapraklarında daha fazla Zn birikimi olduğu ve *B. nigra* ' ya göre ekspresyon seviyesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

HMA2 geni en yüksek ekspresyon seviyesi *B. juncea*' da 100 µM, *B. nigra*' da ise 50 µM ve 200 µM' dır.

Bu iki bitki türünün HMA2 geni için karşılaştırılması yapıldığında ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir farklılık gözlenmezken, yapraktaki ZnSO<sub>4</sub> birikimlerinin birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada *Brassicaceae* familyasındaki yüksek metal biriktirme potansiyeline sahip metale karşı toleranslı bitki olan *B.juncea* ve metal akümülatör bitki olan *B.nigra*'nın yaprak ve köklerinde Zn birikimi tespit edilerek bu bitki türlerinin fitoremediasyon teknolojisine yaklaşımı araştırılmıştır. Eldeki veriler dahilinde *B. juncea*' da Zn birikimi en fazla köklerde (200 µM ZnSO<sub>4</sub>) tespit edilmiştir. *B. nigra*' da ise en fazla Zn birikiminin görüldüğü konsantrasyon seviyesi 500 µM olmakla birlikte köklerde tespit edilmiştir. Ayrıca *B.nigra* ve *B.juncea*'nın yaprak ve köklerinde ağır metal ATPazların (HMA2, HMA4) metale karşı anlatımı Realtime PCR ile tespit edilerek HMA2 geninin en yüksek anlatımının olduğu *B. juncea* (100 µM) ve *B. nigra* (200 µM) 'da anlamlı bir yakınlık gösterdiği tespit edilmiştir. HMA4 genininde ekspresyon seviyesinin en yüksek olduğu *B. juncea*' da 500 µM ' dır ve *B. nigra*' nın ekspresyon seviyesinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu araştırmaya göre bu genlerin ekspresyon seviyeleri *B. juncea* ve *B.nigra*' da farklılık göstermektedir. *B. nigra* akümülatör bitki de ekspresyon seviyesi 200 uM' dan (HMA2) ve 500 uM' a (HMA2) kadar yükselmiştir. Fakat *B. juncea* tolerant bitkide bu genlerin ekspresyonu 50 µM' dan 100 uM' a kadar yükselmiş ve Zn'nin yüksek seviyelerinde inhibe edilmiştir. Bu sonuçlara göre *B. nigra*' nın Zn akümülatör bitki

mekanizması *B. juncea*' dan değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. *B. juncea*' da değişik taşıyıcıların yüksek Zn seviyelerinde devreye girdiği görülmektedir. İleri ki çalışmalarda daha detaylı araştırmalar ile *B. juncea*' da rol oynayan değişik taşıyıcıların görevleri tespit edilerek ağır metal taşınım mekanizmasına katkı sağlanacaktır. Ayrıca fitoremediasyon için aday türler olan *B. juncea* ve *B. nigra* bitkilerinin kirlenmiş topraklarda yetiştirilmesi ile tohumlarından yağ üretilebilir ve biyoyakıt üretiminde dahil olmak üzere çeşitli amaçlar için sanayide kullanılabilir.





## KAYNAKÇA

- [1]. Johansson C, Norman M, Burman L (2009) Road traffic emission factors for heavy metals. *Atmos Environ* 43:4681–4688
- [2]. VAMERALI, T., BANDIERA, M., MOSCA, G., 2010, Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review, *Environmental Chemistry Letters*, 8, 1–17.
- [3]. Knasmuller.S., Gottmann.E., Steinkellner.H., Fomin.A., Pickl.C., Paschke.A., God.R., Kundi.M., (1998), Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassay, *Mutation Research*, 420(1-3), pp 37–48.
- [4]. Duruibe, J.O., Ogwuegbu, M.O.C., Egwurugwu, J.N., 2007. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of Physical Sciences* 2(5): 112–118.
- [5]. McLaughlin M. J., Parker D. R., Clark J. M. (1999). Metal and micronutrients-food safety issues. *Field Crops Res.* 60, 143–163. 10.1016/S0378-4290(98)00137-3 [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
- [6]. Memon AR, Ito S., Yatazawa M (1979) Absorbtion and accumulation of iron, manganese and copper in plants in the temperate forest of central Japan *Soil SciPlant Nutr* 25:611-620.
- [7]. Memon AR, Ito, S., and Yatazawa, M., (1980a) Taxonomic characteristics in accumulating cobalt and nickle in temperate forest vegetation of central Japan. *Soil Sci Plant Nutr* 26:271-280
- [8]. Memon AR, Ito, S., Yatazawa, M (1980b) Distribution of zinc and cadmium in temperate forest taxa of central Japan *Soil Sci Plant Nutr* 26:281-290
- [9]. Memon AR, Schroder P (2009) Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation *Environ Sci Pollut Res Int* 16:162-175
- [10]. BAKER, A.J.M., BROOKS, R.R., 1989, Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry, *Biorecovery*, 1, 81-126.
- [11]. Nagajyoti PC, Lee KD, Sreekanth TVM (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ Chem Lett* 8:199– 216
- [12]. Gardea Torresdey, J.I., Peralta Videa, J.R., Rosa, G.D., and Parsons, J.G. (2005). Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy, *Coord. Chem. Rev.*, 249(17–18): 1797–1810.
- [13]. KHAN, A.G., KUEK, C., CHAUDHRY, T.M., KHOO, C.S., HAYES, W.J., 2000, Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation, *Chemosphere*, 41, 197-207.
- [14]. HASSINEN, V., 2009, *Search for Metal-Responsive Genes in Plants*, Thesis (PhD), *Kuopio University*.
- [15]. EBBS, S.D., KOCHAIN, L.V., 1997, Toxicity of zinc and copper to *Brassica* species: Implications for phytoremediation, *Journal of Environmental Quality*, 26, 776–781.
- [16]. Lal, 2010. LAL, N., 2010, *Molecular Mechanisms and Genetic Basis of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants*, Plant Adaptation and Phytoremediation, Springer Science, DOI 10.1007/978-90-481-9370-7-2.
- [17]. ATSDR, 2011, *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>.
- [18]. DUFFUS, J.H., 2002, “Heavy Metals”—A Meaningless Term?, *Pure and Applied Chemistry*, 74 (5), 793–807.

- [19]. WEAST, R.C., 1984, *CRC Handbook of chemistry and physics*, 64th edn., Boca Raton, CRC Pres.
- [20]. Babula ve diğ., 2008. BABULA, P., ADAM, V., OPATRILOVA, R., ZEHNALÉK, J., HAVEL, L., KIZEK, R., 2008, Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 6 (4), 189-213.
- [21]. Tangahu, B.V., Abdullah, S., Rozaimah, 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*, Volume 2011, Article ID 939161, 31 pages.
- [22]. SHAH, K., DUBEY, R.S., 1998, A 18 kDa cadmium inducible protein complex: its isolation and characterization from rice (*Oryza sativa* L.) seedlings, *J. Plant Physiol.*, 152, 448-454.
- [23]. SHARMA, R. K., AGRAWAL, M., 2006, Single and Combined Effects of Cadmium and Zinc on Carrots: Uptake and Bioaccumulation, *Journal of Plant Nutrition*, 29:10,1791-1804.
- [24]. STOHS, S.J., BAGCHI, D., 1995, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Radical Biology and Medicine*, 18, 321–336.
- [25]. SCHÛTZENDÛBEL, A., POLLE, A., 2002, Plant responsive to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization, *Journal of Experimental Botany*, 372, 1351-1365.
- [26]. GASIC, K., KORBAN, S.S., 2006, *Heavy Metal Stress*, Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants, Springer, Printed in the Netherlands, pp. 219–254.
- [27]. HALL, J.L., 2002, Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance, *Journal of Experimental Botany*, 53, 1–11.
- [28]. BAKER, A.J.M., 1981, Accumulators and excluders strategies in the response of plants to heavy metals, *Journal of Plant Nutrition*, 3, 643-654.
- [29]. HASSINEN, V., 2009, *Search for Metal-Responsive Genes in Plants*, Thesis (PhD), Kuopio University.
- [30]. CUNNINGHAM, S., 1995, Current Topics in Plant Biochemistry, *In Proceedings/Abstracts of the Fourteenth Annual Symposium*, Physiology, Molecular Biology Columbia, pp. 47-48.
- [31]. GHOSH, M., SINGH, S.P., 2005, A Review On Phytoremediation Of Heavy Metals And Utilization Of Its Byproducts, *Applied Ecology And Environmental Research*, 3 (1), 1-18.
- [32]. SCHAT, H., TEN BOOKUM, W., 1992, Genetic control of copper tolerance in *Silene vulgaris*, *Heredity*, 68, 219–229.
- [33]. MADEJON, P., MARANON, T., MURILLO, J.M., ROBINSON, B., 2004, White poplar (*Populus alba*) as a biomonitor of trace elements in contaminated riparian forests, *Environmental Pollution*, 132, 145–155.
- [34]. 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, *Resources, Conservation and Recycling*, 11, 41-49.
- [35]. CUNNINGHAM, S.D., OW, D.W., 1996, Promises and prospects of phytoremediation, *Plant Physiology*, 110, 715-719.
- [36]. RASKIN, I., KUMAR, P.B.A.N., DUSHENKOV, S., SALT, D., 1994, Bioconcentration of heavy metals by plants, *Current Opinion Biotechnology*, 5, 285-290.

- GHOSH, M., SINGH, S.P., 2005, A Review On Phytoremediation Of Heavy Metals And Utilization Of Its Byproducts, *Applied Ecology And Environmental Research*, 3 (1), 1-18.
- [37]. SALT, D.E., KRAMER, U., 2000, *Mechanisms of metal hyperaccumulation in plants*, Phytoremediation of Toxic Metals, John Wiley and Sons Inc., New York, pp. 231-246.
- [38]. PEER, W.A., BAXTER, I.R., RICHARDS, E.L., FREEMAN, J.L., MURPHY, A.S., 2005, *Phytoremediation and hyperaccumulator plants*, Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification, DOI 10.1007/4735\_100, Springer.
- [39]. Assuncao, A.G.L., Schat, H., Aarts, M.G.M., *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation plants, *New Phytologist*, 159(2), 351-360, (2003).
- [40]. Memon, A.R., Aktoprakligül, D., Özdemir, A., Vertii, A., Heavy metal accumulation and detoxification mechanisms in plants, *Turkish Journal of Botany*, 25, 111-121, (2001).
- [41]. Işık, K., Bitki Biyolojisi, Palme Yayıncılık, Ankara, (2004).
- [42]. Sharma, P., Dubey, R.S., Lead toxicity in plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 35-52, (2005).
- [43]. JABEEN, R., AHMAD, A., IQBAL, M., 2009, Phytoremediation of Heavy Metals: Physiological and Molecular Mechanisms, *Botanical Review*, 75, 339–364.
- [44]. HIGUCHI, K., SUZUKI, K., NAKANISHI, H., YAMAGUCHI, H., NISHIZAWA, N.K., MORI, S., 1999, Cloning of nicotinamide synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores, *Plant Physiology*, 119, 471–479.
- [45]. HIRSCH, R.E., LEWIS, B.D., SPALDING, E.P., SUSSMAN, M.R., 1998, A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition, *Science*, 280, 918-921.
- [46]. RASKIN, I., SMITH, R.D., SALT, D.E., 1997, Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment, *Current Opinion Biotechnology*, 8, 221–226.
- [47]. TESTER, M., LEIGH, R.A., 2001, Partitioning of nutrient transport processes in roots, *J. Exp. Bot.*, 52, 445–457.
- [48]. GAYMARD, F., PILOT, G., LACOMBE, B., BOUCHEZ, D., BRUNEAU, D., BOUCHEREZ, J., MICHAUX-FERRIÈRE, N., THIBAUD, J.B., SENTENAC, H., 1998, Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K<sup>+</sup> release into the xylem sap, *Cell*, 94 (5), 647-55.
- [49]. CLEMENS, S., PALMGREN, M.G., KRÄMER, U., 2002a, A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation, *TRENDS in Plant Science*, 7, 309-315.
- [50]. CROWLEY, D.E., WANG, Y.C., REID, C.P.P., SZANSISZLO, P.J., 1991, Mechanism of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants, *Plant and Soil*, 130, 179-198.
- [51]. PREZEMECK, E., HAASE, N.U., 1991, The binding of manganese, copper and cadmium to peptides of the xylem sap of plant roots, *Water Air Soil Pollution*, 57–58, 569–577.
- [52]. LEE, J.R.D., REEVES, R.R., BROOKS, R.R., JAFFRE, T., 1977, Isolation and identification of a citrate complex of nickel from nickel-accumulated plants, *Phytochemistry*, 16, 1502–1505.

- [53]. VON WIREN, N., KLAIR, S., BANSAL, S., BRIAT, J.F., KHODR, H., SHIORI, T., LEIGH, R.A., HIDER, R.C., 1999, Nicotinamide chelates both Fe III and Fe II. Implications for metal transport in plants, *Plant Physiology*, 119, 1107–1114.
- [54]. LONG, X.X., YANG, X.E., NI, W.Z., 2002, Current status and perspective on phytoremediation of heavy metal polluted soils, *Journal of Applied Ecology*, 13, 757–762.
- [55]. BLAYLOCK, M.J., HUANG, J.W., 1999, *Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment*, New York: John Wiley and Sons Inc., pp. 53–70.
- [56]. INOUE, H., HIGUCHI, K., TAKAHASHI, M., NAKANISHI, H., MORI, S., NISHIZAWA, N.K., 2003, Three rice nicotianamine synthase genes, OsNAS1, OsNAS2, and OsNAS3 are expressed in cells involved in long-distance transport of iron and differentially regulated by iron, *Plant Journal*, 36, 366–381.
- [57]. CURIE, C., PANAVIENE, Z., LOULERGUE, C., DELLAPORTA, S.L., BRIAT, J.F., WALKER, E.L., 2001, Maize *yellow stripe 1* encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake, *Nature*, 409, 346–349.
- [58]. HALL, J.L., WILLIAMS, J.E., 2003, Transition metal transporters in plants, *Journal of Experimental Botany*, 54, 2601–2613.
- [59]. 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.
- [60]. SOLIOZ, M., VULPE, C., 1996, CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals, *Trends in Biochemical Sciences*, 21, 237–241.
- [61]. PALMGREN, M.G., AXELSEN, K.B., 1998, Evolution of P-type ATPases, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1365, 37–45.
- [62]. BELOUCHI, A., KWAN, T., GROS, P., 1997, Cloning and characterization of the OsNramp family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions, *Plant Molecular Biology*, 33, 1085–1092.
- [63]. PEDERSEN, P., CARAFOLI, E., 1987, Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function, *Trends in Biochemical Sciences*, 4, 146–150.
- [64]. BAXTER, I., TCHIEU, J., SUSSMAN, M.R., BOUTRY, M., PALMGREN, M.G., GRIBSKOV, M., HARPER, J.F., AXELSEN, K.B., 2003, Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice, *Plant Physiology*, 132, 618–328.
- [65]. AXELSEN, K.B., PALMGREN, M.G., 2001, Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 126, 696–706.
- [66]. CELLIER, M., PRIVÉ, G., BELOUCHI, A., KWAN, T., RODRIGUES, V., CHIA, W., GROS, P., 1995, Nramp defines a family of membrane proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 10089–10093.
- [67]. CURIE, C., ALONSON, J.M., LE, J.M., 2000, Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport, *Biochemistry Journal*, 347, 749–755
- [68]. LANQUAR, V., LELIEVRE, F., BOLTE, S., 2005, Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron, *The EMBO Journal*, 24, 4041–4051.
- [69]. LANQUAR, V., RAMOS, M.S., LELIEVRE, F., BARBIER-BRYGOO, H., KRIEGER-LISZKAY, A., KRAMER, U., THOMINE, S., 2010, Export of vacuolar manganese by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is required for optimal photosynthesis and growth under manganese deficiency, *Plant Physiology*, 152, 1986–1999.
- [70]. THOMINE, S., WANG, R., WARD, J.M., CRAWFORD, N.M., SCHROEDER, J.I., 2000, Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family

- in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 4991-4996.
- [71]. THOMINE, S., LELIEVRE, F., DEBARBIEUX, E., SCHROEDER, J.I., BARBIER-BRYGOO, H., 2003, AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency, *The Plant Journal*, 34, 685-695.
- [72]. OOMEN, R.J.F.J., WU, J., LELIEVRE, F., BLANCHET, S., RICHAUD, P., BARBIER-BRYGOO, H., AARTS, M.G.M., THOMINE, S., 2009, Functional characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *New Phytologist*, 181, 637-650.
- [73]. TALKE, I.N., HANIKENNE, M., KRÄMER, U., 2006, Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*, *Plant Physiology*, 142, 148-167.
- [74]. LANG, M, HAO, M., FAN, Q., WANG, W., MO, S., ZHAO, W., ZHOU, J., 2011, Functional characterization of BjCET3 and BjCET4, two new cation-efflux transporters from *Brassica juncea* L., *Journal of Experimental Botany*, 4467-4480.
- [75]. GISBERT, C., ROS, R., DE HARO, A., WALKER, D. J., BERNAL, M.P., SERRANO, R., NAVARRO-AVINO, J., 2003, A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303, 440-445.
- [76]. KHAN, A.G., KUEK, C., CHAUDHRY, T.M., KHOO, C.S., HAYES, W.J., 2000, Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation, *Chemosphere*, 41, 197-207.
- [77]. Memon, A.R. and Schröder, P. 2008. Implication of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. *Environ. Sci. Pol. Res. (ESPR)*. 16: 162-175.
- [78]. EAPEN, S., D'SOUZA, S.F., 2005, Prospects of genetic engineering of plants for Phytoremediation of toxic metals, *Biotechnol Advances*, 23 (2), 97-144.
- [79]. Assunção, A.G.L., ten Bookum, W.M., Nelissen, H.J.M., Vooijs, R., Schat, H. ve Ernst, W.H.O., 2003. Differential Metal-Specific Tolerance and Accumulation Patterns Among *Thlaspi Caerulescens* Populations Originating from Different Soil Types. *New Phytologist*, 159, 411-419.
- [80]. Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Reeves, R.D. ve Smith, J.A.C., 2000. Metal Hyperaccumulator Plants: A Review of the Ecology and Physiology of a Biological Resource for Phytoremediation of Metal Polluted Soils. In: Terry, N. ve Banuelos, G., (eds.). *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Lewis, Boca, pp. 85-107.
- [81]. Reeves, R.D., Baker, A.J.M., 2000, Metal-Accumulating Plants. In *Phytoremediation of Toxic Metals—Using Plants to Clean Up the Environment*, ed. I Raskin, BD Ensley, New York: Wiley, pp. 193-229.
- [82]. Reeves, R.D. and A.J.M. Baker., Metal-accumulating plants. In: *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*, Raskin, I. and B.D. Ensley (Eds.). Wiley, New York, pp: 193-229, (2000).
- [83]. Johnston J, Pepper A, Hall A, Chen Z, Hodnett G, Drabek J, Lopez R, Price H (2005) Evolution of genome size in Brassicaceae. *Ann Bot* 95:229-235.
- [84]. Warwick S, Black L: Molecular systematics of Brassica and allied genera (subtribe Brassicinae, Brassiceae) - chloroplast genome and cytodeme congruence. *Theor Appl Genet* 1991, 82:81 - 92.

- [85]. BROADLEY, M., WILLEY, M.J., WILKINS, J.C., BAKER, A.J.M., MEAD, A., WHITE, P.J., 2001, Phylogenetic variation in heavy metal accumulation in angiosperms, *New Phytologist*, 152, 9–27.
- [86]. DUQUENE, L., VANDENHOVE, H., TACK, F., MEERS, E., BAETEN, J., WANNIJN, J., 2009, Enhanced phytoextraction of uranium and selected heavy metals by Indian mustard and ryegrass using biodegradable soil amendments, *Science of The Total Environment*, 407, 1496–1505.
- [87]. BLAYLOCK, M.J., HUANG, J.W., 1999, *Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment*, New York: John Wiley and Sons Inc., pp. 53–70.
- [88]. MILLER, O.R., 1998, *Extractable Nitrate in Plant Tissue: Ion-Selective Electrode Method*, Handbook of Reference Methods for Plant Analysis, CRC, Boca Raton, pp.
- [89]. Memon AR, Ito, S., Yatazawa, M (1980b) Distribution of zinc and cadmium in temperate forest taxa of central Japan *Soil Sci Plant Nutr* 26:281-290.
- [90]. Memon et al 2008. Metal accumulation in crops- Human health issues, In : Trace Elements- Nutritional benefits, environmental contamination, and health implications, Ed. M. N. V. Prasad, John Wiley & Sons pp. 81-97
- [91]. Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Reeves, R.D. ve Smith, J.A.C., 2000. Metal Hyperaccumulator Plants: A Review of the Ecology and Physiology of a Biological Resource for Phytoremediation of Metal Polluted Soils. In: Terry, N. ve Banuelos, G., (eds.). *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Lewis, Boca, pp. 85-107.
- [92]. MINGLIN, L., YUXIU, Z., TUANYAO, C., 2005, Identification of genes up-regulated in response to Cd exposure in *Brassica juncea* L., *Gene*, 363, 151–158.
- [93]. YANG, X., FENG, Y., HE, Z., STOFFELLA, P.J., 2005, Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18, 339-353.
- [94]. Bert, V., Meerts, P., Saumitou-Laprade, P., Salis, P., Gruber, W., Verbruggen, N., 2003, Genetic Basis of Cd Tolerance and Hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*, *Plant Soil*, 249:9–18.
- [95]. Bernard, C., Roosens, N., Czernic, P., Lebrun, M., Verbruggen, N., 2004, A Novel CPx-ATPase from The Cadmium Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *FEBS Lett.*, 569:140–48.
- [96]. Memon, A.R., Zahirović, E. (2014): Genomics and Transcriptomics Analysis of Cu Accumulator Plant *Brassica nigra* L. *Journal of Applied Biological Sciences* 8(2): 01-08.
- [97]. KUMAR, P.B.A.N., DUSHENKOV, V., MOTTO, H., RASKIN, I., 1995, Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils, *Environmental Science and Technology*, 29, 1232-1238.
- [98]. Willems G, Dräger DB, Courbot M, Godé C, Verbruggen N, Saumitou-Laprade P (2007) The genetic basis of zinc tolerance in the metallophyte *Arabidopsis halleri* ssp. *halleri* (Brassicaceae): an analysis of quantitative trait loci. *Genetics* 176(1):659–674.
- [99]. BAXTER, I., TCHIEU, J., SUSSMAN, M.R., BOUTRY, M., PALMGREN, M.G., GRIBSKOV, M., HARPER, J.F., AXELSEN, K.B., 2003, Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice, *Plant Physiology*, 132, 618-328.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÇETİNDÖĞAN, Merve  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 29.01.1993 Adana  
Medeni hali : Bekar  
Telefon : 0 537 920 06 86  
Faks : -  
e-mail : mervecetindogann@gmail.com

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Uşak Üniversitesi / Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2016
Lise	Dr. Mehmet. Feyyaz Etiz Lisesi	2011

### İş Deneyimi

Yıl Yer Görev

- - -

**Yabancı Dil** İngilizce,

### Yayınlar

-

### Hobiler

Tenis, Yüzme, Dans