

**T.C.  
UŞAK ÜNİVESİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜŐÜ**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**FARKLI BAKIR (Cu) SEVİYELERİNDE YETİŞTİRİLEN BRASSİCA JUNCEA  
VE BRASSİCA NİGRA TÜRLERİNDE AĞIR METAL TAŞIYICI (HMA1 VE  
HMA3) GENİNİN ANLATIMI VE METABOLİK BAZI DEĞİŞİKLİKLER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Nuriye MERAĞLI**

**HAZİRAN 2019**

**UŞAK**

**T.C.**  
**UŞAK ÜNİVESİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜŐÜ**

**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**FARKLI BAKIR (Cu) SEVİYELERİNDE YETİŞTİRİLEN BRASSİCA JUNCEA  
VE BRASSİCA NİGRA TÜRLERİNDE AĞIR METAL TAŞIYICI (HMA1 VE  
HMA3) GENİNİN ANLATIMI VE METABOLİK BAZI DEĞİŞİKLİKLER**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Nuriye MERAKLI**

**UŞAK 2019**

Nuriye MERAKLI tarafından hazırlanan "Farklı Cu Seviyelerinde Yetiştirilen *Brassica juncea* ve *Brassica nigra* Türlerinde Ağır Metal Taşıyıcı (HMA1 ve HMA3) Genlerinin Anlatımı ve Metabolik Bazı Değişiklikler" adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylıyorum.

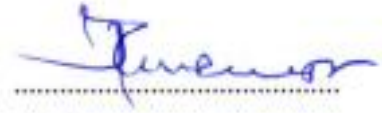
Prof. Dr. Abdülrezzak MEMON



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: 13/06/2019

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

Doç. Dr. Murat Kemal KARACAN



Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü





## TEZ BİLDİRİMİ

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

Nuriye MERAKLI

Bu çalışma; Uşak Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (UBAP) desteklenen 2017/TP042 numaralı proje kapsamında yürütülmüştür.

**FARKLI BAKIR (Cu) SEVİYELERİNDE YETİŞTİRİLEN BRASSİCA JUNCEA  
VE BRASSİCA NİGRA TÜRLERİNDE AĞIR METAL TAŞIYICI (HMA1 VE  
HMA3) GENİNİN ANLATIMI VE METABOLİK BAZI DEĞİŞİKLİKLER**

**(Yüksek Lisans Tezi)**

**Nuriye MERAĞLI**

**UŞAK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Haziran 2019**

**ÖZET**

Bu çalışma, akümülatör bitki *B. nigra* L. (siyah hardal) ve tolerans bitki *B. juncea* L.' da (kahverengi hardal) bakıra karşı indüklenen genlerin anlatım profillerini araştırmak için yürütülmüştür. Bu bağlamda, farklı Cu seviyelerinde (0,25,50,100,200,500,1000  $\mu$ M) yetiştirilen her iki bitkide ağır metal taşıyıcı ATPaz' ların (HMA1, HMA3) gen anlatım profili araştırılmıştır. Bitki türlerinin kök ve yapraklarında biriken Cu miktarı, Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre (AAS) tekniği kullanılarak tespit edilmiştir. Her iki türün yapraklarında HMA1 ve HMA3 anlatım profilleri R-T qPCR kullanılarak analiz edilmiştir. Ek olarak, bu iki bitki türlerinde glutasyon, fenolik içerik ve flavonoid miktarı da araştırılmıştır. Veriler, her iki türün yapraklarında HMA1 ve HMA3 anlatımının, artan Cu seviyelerine bağlı olarak 50  $\mu$ M ile 100  $\mu$ M' ye kadar kademeli bir şekilde arttığı ve daha yüksek Cu seviyeleri uygulanan (100  $\mu$ M Cu üzerinde) her iki türde ise bu iki genin anlatım seviyesinin yavaş yavaş azaldığını göstermektedir. Bu da metal birikim ve toleranstan sorumlu tek taşıyıcı bu metal ATPaz' ların olmadığını, bunlarla birlikte metal birikim ve toleransına başka bazı faktörlerinde katıldığını göstermektedir. Biyoinformatik analizlerden, *Brassica* spp. HMA1-HMA4' ün metal taşınımında önemli bir rol oynadığını anlaşılmaktadır. Bu nedenle birkaç metal ATPaz ve diğer metal taşıyıcılar arasında önemli bir etkileşimin olduğu ve böylece farklı Cu seviyelerinde yetiştirilen bu bitki türlerinde glutasyon miktarı da analiz edilmiştir. Özellikle *B. juncea* L.' da glutasyon birikim

profilinin, bu metal ATPaz' ların anlatım profiline benzer olduğu gözlenmiştir. Flavonoid ve fenolik bileşiklerin birikim profilleri, farklı Cu seviyeleri uygulanan bu bitki türlerinde farklılık göstermiştir. Bu tez çalışma sonuçları, *Brassica* spp.' de Cu' nun birikim ve detoksifikasyon mekanizmasının anlaşılmasına önemli bir katkı sağlayacaktır.

**Bilim Kodu:**

**Anahtar Kelimeler:** *B. nigra* L., *B. juncea* L., HMA1, HMA3, Gen Anlatımı

**Sayfa Adedi:** 118

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



**EXPRESSION OF METAL TRANSPORTING OF GENES (HMA1 AND HMA3)  
AND METABOLIC SOME CHANGES BRASSICA JUNCEA AND BRASSICA  
NIGRA GROWN AT DIFFERENT COPPER (Cu) LEVELS**

**(M.Sc. Thesis)**

**Nuriye MERAKLI**

**UNIVERSITY OF UŞAK**

**GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

**June 2019**

**ABSTRACT**

This study was carried out to analyse the Cu induced gene expression in accumulator plant *B. nigra* L. (black mustard) and tolerant plant *B. juncea* L. (brown mustard). In this connection, the gene expression pattern of metal ATPases (HMA1, HMA3) were investigated in both plant species grown at different Cu levels (0,25,50,100,200,500,1000  $\mu$ M). Cu accumulation in root and leaves of these plants were detected using Atomic Absorption Spectrophotometer (AAS). HMA1 and HMA3 expression levels in the leaves of both plant species were analyzed using R-T qPCR. In addition the amount of glutathione, flavonoids and phenolic compounds were also analyzed. Data show that HMA1 and HMA3 expression in the leaf samples were gradually increased with increase in metal levels in plants till 50  $\mu$ M to 100  $\mu$ M and then expression level gradually drops in the leaves when plants were subjected to high metal concentration (above 100  $\mu$ M Cu). This indicate that metal ATPases are not the only transporters responsible in metal accumulation and tolerance but there are some other factors (possibly other metal transporters) involved in metal accumulation and tolerance. Bioinformatic analyses showed that HMA1-HMA4 play an important role in metal transport in *Brassica* spp. Therefore, studies showed a significant interaction between several metal ATPases and other metal transporters and thus the amount of glutathione were analyzed in these plant species grown at different Cu levels. The glutathion accumulation pattern resembled to the expression



pattern of metal ATPases. Especially in *B. juncea* L. The accumulation pattern of other flavonoids and phenolic compounds varies in the plants subjected to different Cu levels. The results of this thesis will provide an important information in understanding the the accumulation and detoxification mechanism of Cu in *Brassica* spp.

**Science Code:**

**Keywords:** *B. nigra* L., *B. juncea* L., HMA1, HMA3, Gene Expression

**Number of Pages:** 118

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



## TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde, araştırma, uygulama aşamasında ve sonuçların değerlendirilmesi ve tamamlanmasında hem lisans hem de lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve deneyimini esirgemeyen, her konuda yön veren tanımaktan ve birlikte çalışmaktan her zaman kıvanç duyduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. Abdülrezzak MEMON' a bana ayırdığı değerli zamanı ve sağladığı destek için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sürecinde laboratuvar da deneysel çalışmalarım ve analizlerimde katkısını ve yardımını esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi İbrahim BULDUK' a teşekkürü borç bilirim.

Araştırmamın laboratuvar aşamasının bir kısmını gerçekleştirdiğimiz İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi' nde (IBG), RNA miktar tayini için Nanodrop ve Real Time PCR cihazının kullanımına yardımcı olan IBG' de doktora öğrencisi olan, Muhammed MEMON' a destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Araştırmamızı, maddi olarak 2017/TP042 no' lu proje ile destekleyen Uşak Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi' ne (UBAP) teşekkür ederim. Aynı zamanda Fen Edebiyat Fakültesi ve Fen Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına tüm yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

En özel teşekkürlerimi ise hayatımın her aşamasında olduğu gibi, bu önemli aşamasında da beni yalnız bırakmayarak bugünlere gelmem de kuşkusuz en büyük paya sahip olan, her zaman şükür ettiğim iyi ki var dediğim annem Zuhul MERAKLI, babam Hasan MERAKLI ve birtanecik ablam Selin MERAKLI' ya sonsuz teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	5
2.1. Çevresel Kirletici: Ağır Metaller.....	5
3. GENEL BİLGİLER.....	7
3.1. Ağır Metaller ve Bitkiler.....	7
3.1.1. Bitkilerde Metal Toleransı.....	10
3.1.2. Bitkilerde Metal Depolaması.....	11
3.2. Fitoremediasyon.....	12
3.2.1. Fitoekstraksiyon (Bitkisel Özümleme).....	15
3.2.2. Fitodegradasyon (Bitkisel Bozunum).....	15
3.2.3. Fitostabilizasyon (Köklerde Sabitleme).....	16
3.2.4. Fitovolotilizasyon (Bitkisel Buharlaşma).....	16
3.2.5. Rizofiltrasyon (Köklerle Süzme).....	17
3.3. <i>Brassicaceae</i> Familyası.....	17
3.4. Metal Hiperakümülyasyon Mekanizması ve Gen Aileleri.....	20
3.5. Bitkide Antioksidan Savunma Sistemi ve Bazı Antioksidan Elemanları.....	26
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	28
4.1. Materyal.....	28
4.1.1. Kullanılan Organizmalar.....	28
4.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Test Materyalleri.....	30

4.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	31
4.2. Metot.....	32
4.2.1. Fizyolojik Çalışmalar.....	32
4.2.1.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi.....	32
4.2.1.2. Bitkilere Metal Uygulanması.....	32
4.2.1.3. Bitkilerin Hasat Edilmesi.....	34
4.2.1.4. Bitkilerde Biriken Cu Miktarının Tayini.....	34
4.2.2. Biyokimyasal Çalışmalar.....	35
4.2.2.1. Bitki Ekstraktı Hazırlama .....	35
4.2.2.2. Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Tayini.....	37
4.2.2.3. Toplam Flavonoid Miktar Tayini.....	38
4.2.2.4. <i>B. nigra</i> L. ve <i>B. juncea</i> L. Yapraklarında Glutasyon Tayini .....	39
4.2.3. Moleküler Çalışmalar.....	40
4.2.3.1. Total RNA İzolasyonu .....	40
4.2.3.2. Total RNA Miktar Tayini.....	42
4.2.3.3. cDNA Sentezi ve Kontrolü.....	42
4.2.3.4. Primer Tasarımı.....	44
4.2.3.5. Real-Time PCR.....	44
4.2.4. Biyoinformatik Yaklaşımlar.....	46
4.2.4.1. Biyoinformatik Yaklaşımların Araştırılması.....	46
4.3. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz.....	47
5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	48
5.1. Fizyolojik Çalışma Bulguları.....	48
5.1.1. Bitkide Biriken Bakır (Cu) Miktarı.....	48
5.1.2. Bitkide Biriken Bakır (Cu) Miktar Tayini.....	53
5.2. Biyokimyasal Bulgular.....	54
5.2.1. <i>B. juncea</i> ve <i>B. nigra</i> Yapraklarında Toplam Fenolik Madde Miktarları.....	54
5.2.2. <i>B. juncea</i> ve <i>B. nigra</i> Yapraklarında Toplam Flavonoid Madde Miktarı.....	56
5.2.3. <i>B. juncea</i> ve <i>B. nigra</i> Yapraklarında Glutasyon Miktarı.....	58
5.3. Moleküler Bulgular.....	58

5.3.1. <i>B. nigra</i> L. ve <i>B. juncea</i> L. Yapraklarında Total RNA Miktarı.....	58
5.3.2. <i>B. nigra</i> L. ve <i>B. juncea</i> L. Yapraklarında HMA1 ve HMA3 Anlatım Profili.....	59
5.3.2.1. <i>B. juncea</i> L. Yapraklarında HMA1' in Anlatım Profili.....	59
5.3.2.2. <i>B. nigra</i> L. Yapraklarında HMA1' in Anlatım Profili.....	60
5.3.2.3. <i>B. juncea</i> L. Yapraklarında HMA3' ün Anlatım Profili.....	61
5.3.2.4. <i>B. nigra</i> L. Yapraklarında HMA3' ün Anlatım Profili.....	62
5.4. Biyoinformatik Yaklaşım Bulguları.....	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	66
KAYNAKLAR.....	76
EKLER.....	98
EK-1 7 gün boyunca kontrol grubu ve belirlenen farklı Cu seviyeleri uygulanan <i>B. nigra</i> bitkisinin genel görünümü (2. Tekerrür/R2).....	99
EK-2 7 gün boyunca kontrol grubu ve belirlenen farklı Cu seviyeleri uygulanan <i>B. nigra</i> bitkisinin kök kısımlarının genel görünümü (2. tekerrür/R2).....	99
EK-3 7 gün boyunca kontrol grubu ve belirlenen farklı seviyeleri uygulanan <i>B. juncea</i> bitkisinin genel görünümü (2. tekerrür/R2).....	100
EK-4 7 gün boyunca kontrol grubu ve belirlenen farklı seviyeleri uygulanan <i>B. juncea</i> bitkisinin kök kısımlarının görünümü (2. tekerrür/R2).....	100
EK-5 Farklı Cu seviyeleri uygulanan <i>B. juncea'</i> nın yapraklarında HMA1 anlatımından elde edilen verilerin Anova analizi.....	101
EK-6 Farklı Cu seviyeleri uygulanan <i>B. juncea'</i> nın yapraklarında HMA1 anlatımından elde edilen verilerin Turkey ve Duncan analizi.....	101
EK-7 Farklı Cu seviyeleri uygulanan <i>B. nigra'</i> nın yapraklarında HMA1 anlatımından elde edilen verilerin Anova analizi.....	105
EK-8 Farklı Cu seviyeleri uygulanan <i>B. nigra'</i> nın yapraklarında HMA1 anlatımından elde edilen verilerin Turkey ve Duncan analizi.....	105
EK-9 Farklı Cu seviyeleri uygulanan <i>B. juncea'</i> nın yapraklarında HMA3' ün anlatımından elde edilen verilerin Turkey ve Duncan analizi.....	109
EK-10 Farklı Cu seviyeleri uygulanan <i>B. juncea'</i> nın yapraklarında HMA3' ün anlatımından elde edilen verilerin Anova analizi.....	112

EK-11 Farklı Cu seviyeleri uygulanan <i>B. nigra'</i> nın yapraklarında HMA3' ün anlatımında Turkey ve Duncan analizi.....	113
ÖZGEÇMİŞ.....	117



## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Bakır' ın (Cu) bazı metalik özellikleri.....	8
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	30
Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan cihazlar ve teçhizatlar.....	31
Çizelge 4.3. Bitkilerdeki 1X Hoagland Solüsyonun Bileşim İçeriğinin Sağlanması.....	33
Çizelge 4.4. Toplam fenolik bileşiklerin tayini için kullanılan reaksiyon karışımı ve miktarları.....	38
Çizelge 4.5. Toplam flavonoid tayini için kullanılan reaksiyon karışımı ve miktarları.....	39
Çizelge 4.6. Glutasyon tayini için ayarlanan uygun HPLC koşulları.....	40
Çizelge 4.7. Ters Transkripsiyon-Komplementer (Tamamlayıcı) DNA (cDNA) sentez kitinde mevcut kullanılan tampon ve enzim hacimleri.....	43
Çizelge 4.8. Ters Transkripsiyon-Komplementer (Tamamlayıcı) DNA (cDNA) sentezi gerekli inkübasyon sıcaklıkları ve süreleri.....	43
Çizelge 4.9. Gen anlatımında kullanılmak üzere <i>B. nigra</i> ve <i>B. juncea</i> türleri için tasarlanan primerler (Baz dizileri ve GC % değerleri).....	44
Çizelge 4.10. RT qPCR' da gen anlatımı için kullanılan malzemeler ve miktarları.....	46
Çizelge 5.1. Kontrol grubu ve farklı Cu derişimleri uygulanan <i>B. juncea</i> ' nın yaprak ve köklerinde biriken Cu miktarı (ort.Cu±SH) ( $\mu\text{g/g}^{-1}$ kuru ağırlık).....	53
Çizelge 5.2. Kontrol grubu ve farklı Cu derişimleri uygulanan <i>B. nigra</i> ' nın yaprak ve köklerinde biriken Cu miktarı (ort. Cu±SH) ( $\mu\text{g/g}^{-1}$ kuru ağırlık).....	53
Çizelge 5.3. Fenolik standartlarının konsantrasyonları ve absorbans sonuçları.....	55
Çizelge 5.4. Farklı Cu derişimleri uygulanan <i>B. nigra</i> ve <i>B. juncea</i> ' da ort. toplam fenolik madde miktarı (ort.±SH).....	56
Çizelge 5.5. Flavonoid standartlarının konsantrasyonları ve absorbans sonuçları.....	56
Çizelge 5.6. Farklı Cu derişimleri uygulanan <i>B. nigra</i> ve <i>B. juncea</i> ' nın ort. toplam flavonoid madde miktarı (ort.±SH) (TFC mg Cateceq/ g).....	57
Çizelge 5.7. Farklı Cu derişimleri uygulanan <i>B. nigra</i> ve <i>B. juncea</i> ' nın ort. glutasyon miktarı (ort.±SH)( $\mu\text{g/g}^{-1}$ ).....	58

Çizelge 5.8. 7 gün boyunca farklı Cu derişimleri uygulanan *B. nigra* ve *B. juncea*' da tüm derişimlerine ait total RNA saflık miktarları.....59





## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Bitkilerin artan metal konsantrasyonuna karşı tepkisi.....	9
Şekil 3.2. Fitoremediasyon uygulama yöntemlerinin şematik gösterimi.....	14
Şekil 3.3.Farklı diploid ve amphidiploids <i>Brassicaceae</i> türleri arasındaki genomik ilişkiyi gösteren "U diyagramı".....	18
Şekil 5.1. Toplam fenolik madde tayini için gallik asit doğrusallık grafiği.....	55
Şekil 5.2. Toplam flavonoid madde tayini için catechin doğrusallık grafiği.....	57
Şekil 5.3. Farklı Cu derişimleri uygulanan <i>B. juncea'</i> nın yapraklarında HMA1' in anlatımı.....	60
Şekil 5.4. Farklı Cu derişimleri uygulanan <i>B. nigra'</i> nın yapraklarında HMA1' in anlatımı.....	61
Şekil 5.5. Farklı Cu derişimleri uygulanan <i>B. juncea'</i> nın yapraklarında HMA3' ün anlatımı.....	62
Şekil 5.6. Farklı Cu derişimleri uygulanan <i>B. nigra'</i> nın yapraklarında HMA3' ün anlatımı.....	63
Şekil 5.7. <i>B. rapa</i> , <i>B. juncea</i> ve <i>A. thaliana'</i> ya ait HMA ortologlarının (toplam 8 nükleotid gen sekansı) filogenetik analizi.....	64
Şekil 5.8. Clustalw ( <a href="http://www.ebi.ac.uk/">http://www.ebi.ac.uk/</a> ) programı kullanılarak ağır metal taşıyıcı ATPaz' lara ait nükleotid dizilerin çoklu dizi hizalaması ve bunların benzer bölgeleri...64	
Şekil 5.9. Çoklu hizalamadan elde edilen veriler ve <i>Brassica</i> türleri arasındaki dizi benzerlik yüzdeleri.....	65
Şekil 6.1. <i>B. rapa</i> ve <i>A. thaliana'</i> daki tüm ağır metal bağlayıcı genlerin filogenetik ağaç analizi (Karakterize edilen gen aileleri; HMA P <sub>1B</sub> ailesi yeşil, HIPP ailesi kırmızı, NAKR genleri mavi, ATX ve CCH genleri açık mavi olarak gösterilmiştir).....	75

## RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Yetiştirilen <i>B. juncea</i> L. bitkisi.....	29
Resim 4.2. Yetiştirilen <i>B. nigra</i> L. bitkisi.....	29
Resim 4.3. Isıtıcı tablada asit ile yaş yakma metodu.....	35
Resim 4.4. Numune ve solventin erlenlere alınması.....	36
Resim 4.5. Ultrasonik banyoda ekstraksiyon işlemi.....	36
Resim 4.6. Ekstraktların süzülmesi.....	37
Resim 5.1. 7 gün boyunca kontrol grubu ve belirlenen farklı Cu derişimleri uygulanan <i>B.nigra'</i> nın genel görünümü (1. Tekerrür).....	48
Resim 5.2. 7 gün boyunca kontrol grubu ve belirlenen farklı Cu derişimleri uygulanan <i>B. nigra'</i> nın kök kısımlarının genel görünümü (1. Tekerrür).....	50
Resim 5.3. 7 gün boyunca kontrol grubu ve belirlenen farklı Cu derişimleri uygulanan <i>B. juncea'</i> nın genel görünümü (1. Tekerrür).....	51
Resim 5.4. 7 gün boyunca kontrol grubu ve belirlenen farklı Cu derişimleri uygulanan <i>B. juncea'</i> nın kök kısımlarının genel görünümü (1. Tekerrür).....	52

## SİMGELER VE KISALTMALAR

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

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
°C	Santigrat derece
%	Yüzde
μM	Mikromolar
μl	Mikrolitre
mg/kg	Miligram bölü kilogram
mg/L	Miligram bölü litre
g	Gram
mg	Miligram
kg	Kilogram
ml	Mililitre
M	Molar
OD	Optik Yoğunluk
rpm	Dakikada dönüş
R1-R3	Tekerrür 1-3
mg/kg	Miligram bölü kilogram
g/mol	Gram bölü mol
g/cm <sup>3</sup>	Gram bölü santimetreküp
kJ.mol <sup>-1</sup>	Kilojoule çarpı mol
J/(mol K)	Joule bölü mol kelvin
<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
MT	Metallothionein
PC	Fitoşelatin

<b>ZRT</b>	Zn-düzenlenmiş taşıyıcı
<b>IRT</b>	Fe- düzenlenmiş taşıyıcı
<b>ZTR</b>	Çinko düzenleyici taşıyıcı
<b>CTR/COPT</b>	Cu Taşıyıcı Protein
<b>PS</b>	Fitozotrofor
<b>NA</b>	Nikotinamin-metal
<b>EDTA</b>	Etilendiamintetraasetik asit
<b>ZIP</b>	Çinko taşıyıcı protein
<b>HMA<sub>s</sub></b>	Ağır metal ATPaz' lar
<b>HPLC</b>	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
<b>AtHMA2</b>	<i>A. thaliana'</i> da ağır metal ATPaz 2
<b>AtHMA4</b>	<i>A. thaliana'</i> da ağır metal ATPaz 4
<b>YSL</b>	Sarı çizgil-benzeri protein ailesi
<b>MTP</b>	Metal Tolerans Protein
<b>HMA1</b>	Ağır metal ATPaz 1
<b>HMA3</b>	Ağır metal ATPaz 3
<b>OsNramp1-3</b>	<i>O. sativa'</i> da doğal dirençle ilişkili makrofaj protein 1, 2, 3
<b>Nramp</b>	Doğal dirençle ilişkili makrofaj protein
<b>MRP</b>	Çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein
<b>MDR</b>	Çoklu ilaç direnç proteinleri
<b>dNTP</b>	Deoksinükleosit trifosfat
<b>EST</b>	Sıra dizi ifadeleri
<b>FASTA</b>	Nükleotit veya protein dizi dosya formatı
<b>ROS</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>SOD</b>	Süperoksit dismutaz
<b>POD</b>	Peroksidaz
<b>CAT</b>	Katalaz
<b>GSH</b>	İndirgenmiş glutatyon
<b>BLAST</b>	Temel yerel hizalama arama aracı
<b>MSA</b>	Çoklu dizi hizalama

# 1. GİRİŞ

Günümüzde küresel bir problem haline gelen çevre kirliliği, giderek yaygınlaşan önemli bir sorunu teşkil etmektedir. Özellikle son yüzyılda dünyada çarpık kentleşme, nüfus artışı, gelişen sanayi ve teknoloji sonucu kirlenmiş toprak ve sulak alanların çoğalması ile birlikte çevre kirliliği seviyesi de her geçen gün hızlı bir şekilde artmaya devam etmektedir. Gelişen endüstri ve madencilik aktiviteleri sonucu oluşan atıklardaki kirleticilerin (özellikle ağır metaller) çevreye nüfus etmesi doğa ve tüm ekosistem dengesini hızlı bir şekilde etkilenmekte ve bunlara bağlı olarak da kullanılabilir alanların sayısı her geçen gün azalmaktadır. Bunun ana etmenlerinden biri olan ağır metaller, önemli çevresel kirleticilerden biridir ve toksisiteleri ekolojik, evrimsel, besinsel ve çevresel nedenlerle giderek artan önemli bir sorundur [1,2]. Ağır metaller, çevreye doğal yollardan ya da insan faaliyetleri ile dâhil olurlar [3]. Toprak erozyonu, yer kabuğunun doğal yapısının yıpranması, madencilik, endüstriyel atıklar, kentsel akış, atık su deşarjı, mahsullere uygulanan böcek veya hastalık kontrol ajanları ve diğerleri bu kaynaklar arasında sayılabilir [4]. Çevreye farklı kaynaklarla salınan bazı ağır metaller, eşik seviyesinin üzerinde veya daha düşük seviyede bulunması farketmeksizin başta toprak olmak üzere birçok canlı organizmayı etkileyebilirler. Ağır metallerin en büyük etkisi biyolojik döngü boyunca toprakta yaşayan bitkilerde görülmekte olup, bitkilerin tüketimi aracılığıyla insanlarda sağlık problemlerine neden olarak günümüzde büyük bir tehlike arz etmektedir. Bu durum, aktif olarak hareket etme yeteneği olmayan bitkilerde başta ürün kaybı şeklinde olmak üzere birçok olumsuz etki şeklinde görülür [5]. Bitkilerdeki bu olumsuz etkiler, metalin çeşidine, seviyesine, bitkinin türüne, bitkideki kimyasal, biyolojik etkiye ve bitki aksamındaki dağılımına bağlı olarak yapısal ve işlevsel değişiklikler olarak meydana gelir. Diğer yandan, bitkide bazı metaller zararlı etkilere neden olurken, bazı metaller ise bitki büyüme ve gelişimi için temel olarak gereklidir.

Metallerin yol açtığı kirlilik ve toksisite etkisinin ortadan kaldırılması için farklı ıslah işlemleri uygulanmakta, sonuç olarak toprak verimliliği arttırılmaya çalışılmaktadır. Bu

nedenle, ekosistemdeki metalle kirlenmiş alanların temizlenmesi veya doğal kaynaklarla oluşabilecek kirliliklere karşı korunabilmesi adına mevcut fiziksel, kimyasal veya biyolojik metotlar önem taşımaktadır. Ancak uygulanan bu farklı metotlardan istenen sonuçları almak zor olmasının yanı sıra oldukça maliyetlidir. Toprakta biriken toksik metal ve/veya organik kirleticiler tarafından oluşan kirliliğin bitki, alg, bakteri gibi canlı mikroorganizmalar aracılığıyla yerinde (in situ) temizlenmesini amaçlaması, aynı zamanda uygulanan birçok klasik yöntemle kıyasla çevre dostu, etkili ve ucuz olması biyolojik iyileştirme yöntemi olan biyoremediasyonu araştırmacılar tarafından tercih edilir kılmıştır. Biyoremediasyon, organizmaların (mikroorganizmalar ve/veya bitkiler) kirlenmiş toprakların iyileştirilmesi için yaygın olarak kabul edilen bir toprak ıslahıdır ve bu yöntem doğal süreçlerle gerçekleşen, uygun maliyetli bir teknoloji olarak ortaya çıkmıştır [6]. Günümüz araştırmacıları tarafından popüler hale gelen, bitki kullanılarak metalle kirlenmiş alanların iyileştirme tekniği olan fitoremediasyon, bir biyoremediasyon yöntemidir olup, kirlenmiş toprakların temizlenmesinde bitkiden yararlanılan bir yaklaşım olup, kirleticilerin geniş bir alana yayılmasını engellemesi ve bu kirleticilerin bitkinin kök bölgesi içerisinde tutulmasını sağlamasından dolayı uygulanabilirliği oldukça kolay bir tekniktir [6,7].

Son yıllarda giderek ilgi duyulan fitoremediasyon, inaktif ve kirletici metal gruplarının kirlenmiş toprak veya sudan ayrıştırılması veya temizlenmesinde etkili ve ucuz olması nedeniyle güçlü bir teknolojik çözüm olarak karşımıza çıkarmaktadır [8]. Bu teknoloji için kullanılan en ideal bitki, bulunduğu ortamdaki yüksek metal miktarına rağmen hiçbir fitotoksik etki göstermeksizin yaşayabilme veya toleranslı olabilme, gelişmiş kök sistemi, ortamdaki metali toprak üstü kısımlarına taşıyarak yüksek miktarda biriktirebilme, hızlı büyüme ve yüksek biyokütle üretebilme potansiyeli gösterebilmesi gerekmektedir [9].

Yüksek miktarda metalle kirlenmiş ortamda yaşayabilen, bulunduğu ortamdaki metalleri biriktirebilen veya detoksifiye edebilen, aynı zamanda fitoremediasyonda yararlanılan bu spesifik bitkiler "hiperakümülatör (metal biriktirici)" olarak tanımlanır [9,10]. Normal bitkilere kıyasla bu bitkiler, hiçbir toksik etki göstermeden bünyesinde bir veya birden fazla metali en az yüz kat daha fazla alabilirler veya biriktirebilirler. Hiperakümülatör bitkilerin bazıları metali bünyesinde yüksek miktarda depolayabilirken, bazıları da sadece buldukları ortama uyum sağlayarak hayatta kalabilmektedir.

Güneydoğu Bölgesi' nin maden alanlarında yapılan bir araştırmada, bu alanın Cu florası incelediğinde *Brassicaceae* ailesinin bir üyesi olan Diyarbakır ekotipine ait *B. nigra* L. dâhil olmak üzere birkaç endemik metal akümülatör tür tespit edilmiş, bu türler arasından *B. nigra* L.' nin yapraklarında yüksek miktarda Cu (yaklaşık 700 ppm) biriktirdiği, sonuç olarak bu tür "Cu hiperakümülatörü" olarak bildirilmiştir [11].

Çevreye salınan metalin biyolojik etkisinin indirgenmesi ve metalle kirlenmiş alanların temizlenmesi için tanımlanan bu hiperakümülatör bitkiler son derece önemlidir, aynı zamanda fitoremediasyon verimliliği açısından umut vaat edici adaylardır [12]. Fitoremediasyon tekniğine giderek artan ilgi ile birlikte, hiperakümülatör bitkilere ve onların tolerans ve birikim mekanizması üzerine de yoğun bir ilgi olmaya başlamıştır. Bu bitkiler, metal iyonunu kökten gövdeye taşıma, gövde vakuolünde depolama ve hücre duvarına bağlama sürecini gerçekleştirebildiğinden bunlar metal birikim, tolerans ve detoksifikasyon mekanizmasının çalışma prensibinin anlaşılabilmesi ve açıklığa kavuşturulabilmesi için önemli adaylardır [13]. Çünkü bu bitkiler sahip oldukları translokasyon ve biyolojik birikim mekanizması sayesinde kök sisteminin seçici metal alım kapasitesi, metal iyonunu kökten gövde ve yapraklara taşıyabilme ve metali gövdenin tamamında indirgeyebilme özelliği gösterebilmekte ve bunlar fitoremediasyon için eşsiz bir şekilde kullanılabilirler [14,15].

Son yıllarda moleküler biyoloji alanında transkriptomik, proteomik, metabolomik gelişmeler ile birlikte hiperakümülatörlerin metal birikim ve tolerans mekanizmasında ifade edilen birçok fonksiyonel gen ve bitki metal-homeostasis ağına ait yüzlerce genin tanımlanması başarılmıştır [8,16]. Ayrıca model bitki *Arabidopsis thaliana*' ya ait genom projesinin tamamlanması ve diğer bitki türlerinin genomunun taranması sonucunda metal tolerans ve birikim süreci ile ilgili birçok gen tespit edilmiştir [17]. Böylece birçok akümülatör türün metal birikim ve tolerans sürecine katılan taşıyıcı proteinin; ağır metal ATPaz (HMA), doğal dirençle ilişkili makrofaj protein (NRAMP), katyon difüzyon kolaylaştırıcısı (CDF), çinko-demir permeazın (ZIP) yüksek düzeyde anlatımının gerçekleştiği rapor edilmiştir [8,18]. Diğer yandan, bitkide metal taşıyıcı proteinler (örn. HMA) [8,19] ve metal bağlayan bazı genlerin (örn. metallothionein (MT), fitoşelatin (PC)) anlatımı dikkate alınarak, bunların metal homeostazis, detoksifikasyon, tolerans ve birikim mekanizması dâhil olmak üzere hücre içi birçok süreçte önemli rol oynadıkları bildirilmiştir [19-21]. Bitki fizyolojik ve moleküler mekanizmasının önemli süreçlerinde

rol oynayan genler ve onların görevinin araştırılarak açıklığa kavuşturulması, hiperakümülyasyon olayı hakkında ileriki çalışmalara yön verilebilmesi ve çözümlenebilmesi açısından oldukça önemlidir.

Bu tez çalışması, farklı Cu seviyelerinde yetişen *B. juncea* L. ve *B. nigra* L. türlerinde hücre içi kompartımanlarda Cu teslimatında ve taşınımında aracı gen olarak bilinen HMA1 ve HMA3' ün anlatım profillindeki farklılıkların belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu bitkilerde metal taşıyıcılar yanı sıra Cu stresine karşı hücre içi homeostazi ve detoksifikasyonun sağlanmasında önemli rol oynayan glutatyon sentez yolağının başlıca düzenleyicisi ve fitoşelatinin öncü maddesi olan glutatyonun anlatımı analiz edilmiştir. Ek olarak, her iki türün Cu birikim kapasitesi ve farklı Cu seviyelerine bağılı olarak fenolik bileşik ve flavonoid miktar değışimi araştırılmıştır.



## 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

### 2.1. Çevresel Kirletici: Ağır Metaller

Ağır metaller genel anlamda; periyodik cetvelde üç ve daha yukarı periyotlarda gruplandırılan, moleküler ağırlığı 20 g/mol ve/veya yoğunluğu 5 g/cm<sup>3</sup>' ten yüksek [22-25], metalik özelliklere sahip elementler olarak tanımlanır. Doğada bakır (Cu), krom (Cr), demir (Fe), kadmiyum (Cd), nikel (Ni), cıva (Hg), çinko (Zn) dâhil olmak üzere 60' tan fazla metal mevcut olup [26], bunlar yapıları gereği karbonat, silikat, oksit ve sülfür halinde kararlı bileşik formunda veya silikatlar gibi çeşitli kimyasal bileşikler içerisinde bağlı halde bulunurlar [27].

Bu deyim son yıllarda çevre kirliliğine bağlı olarak alıcı ortamda olumsuz etkilere neden olan unsurları tanımlamak için sıklıkla kullanılmaktadır [28]. Günümüzde birçok alanda sıkça kullanımı yanı sıra tehlikeli özellik göstermelerinden dolayı özellikle ekolojik etkisi açısından önemli olan metaller bu nedenle doğal dengenin bozulmasına sebebiyet veren birçok etmen arasında hemen hemen ilk sırayı alırlar.

Ağır metaller çevreye doğal süreç ya da insanların yol açtığı faaliyetler sonucu dâhil olurlar [3]. Ancak meydana gelen faaliyet veya süreçlerin herhangi birinde ortaya çıkabilecek bir olumsuzluk zincirleme olarak diğer unsurları da etkilediğinden, doğal denge de ciddi bir şekilde bozulabilmektedir. Bu olumsuzluklar erozyon ve volkanik patlama olarak meydana gelen çeşitli doğal süreç unsuru olabileceği gibi madencilik, metal madeni, kentsel ve eritme endüstri atıkları, atık su kullanımı, pestisit, herbisit, gübre gibi tarımsal kimyasalların giderek artan kullanımı şeklinde insanların yol açtığı faaliyetler de olabilmektedir ve bu çeşitli faaliyetler sonucu doğaya salınan birçok metal iyonu uzun yıllar toprak, yeraltı ve yerüstü sularında birikebilmektedir [29-33]. Toprak ve canlı organizmalar (insan, hayvan ve bitki) üzerindeki toksik etkisi göz ardı edilemeyecek kadar önemli olan ağır metaller, farklı ve toksik formda zehirli etki, uzun süre kalıcılık göstererek besin zinciri yoluyla canlı organizma bünyesine alınarak sağlığı önemli

derecede tehdit etmektedirler [34-37]. Bu etkiler ilk olarak toprak yapısı, kalitesi, verimliliği üzerinde görülmekte olup, daha sonra yayılarak yaşamsal sürecini toprakta devam ettiren bitki ve bitki ile beslenen hayvan ve insanları üzerinde görülmektedir [38].



### 3. GENEL BİLGİLER

#### 3.1. Ağır Metaller ve Bitkiler

Doğal olarak meydana gelen ve küresel ekosistemin gerçek parçaları olan ağır metaller, dünya üzerinde birçok yerde biyosferi etkilerler [39-42]. Organik maddeler gibi bozunmayan bu grup, bu nedenle toprakta birikebilir. Böylece topraktaki mikroorganizmaları ve toprakla ilişkili birçok canlıyı olumsuz yönde etkileyerek, sayılarını, çeşitli canlı (biyolojik, morfolojik vb.) aktivitelerini indirgeyebilir. Toprakta biriken metaller, başta toprakta yaşayan bitkiler üzerinde toksik etkiye yol açarlar [38]. Aynı zamanda, toprakta bulunan mikroorganizmalar aracılığıyla mineralleri ve çeşitli inorganik maddeleri bünyesine alabilen bitkiler, yanı sıra toprakta mevcut metalleri de bünyesine alarak bu metallerin topraktan uzaklaştırılma sürecine katkı sağlarlar [43,44]. Ancak bitki normal büyüme ve gelişimi için belli seviyeye kadar bazı metallere gereksinim duyar, bazı metallerin ise düşük veya yüksek seviyesi çeşitli metabolizmal bozukluklar şeklinde ortaya çıkan hasarlara neden olabilmektedir. Bu nedenle, bitkinin yaşamsal süreçlerinde farklı role sahip olan metaller; esansiyel ve esansiyel olmayanlar olmak üzere sınıflandırılırlar. Bunlar arasında kobalt (Co), Cu, mangan (Mn), molibden (Mo), Fe, Ni, Zn gibi metaller esansiyel element; baryum (Ba), Cd, civa (Hg), antimon (Sb), kurşun (Pb) ve Cr gibi metaller ise esansiyel olmayan element olarak nitelendirilir [45].

Tüm bitkiler bünyesine metal alınımını dengeli bir şekilde gerçekleştirmektedirler. Ancak bitki bazı durumlarda topraktan metal alınımı sırasında birtakım olumsuzluklarla karşılaşmakta ve bu olumsuzluklara bağlı olarak bitkinin bünyesine alınan metal seviyesi değişebilmektedir. Bitki bünyesine alınan farklı metal seviyeleri, bazen çok düşük olsa bile bazı metal veya metaloidler toksik özellik gösterebilmeleri nedeniyle bitki bünyesini olumsuz yönde etkileyebilmektedir [46-48]. Genellikle fotosentez, solunum, su, karbonhidrat metabolizmasında önemli bir enzim aktivitesinde, normal metabolik olayda ve çeşitli fitosentetik fonksiyonda meydana gelebildiği gibi bazen lipit, protein ve nükleik

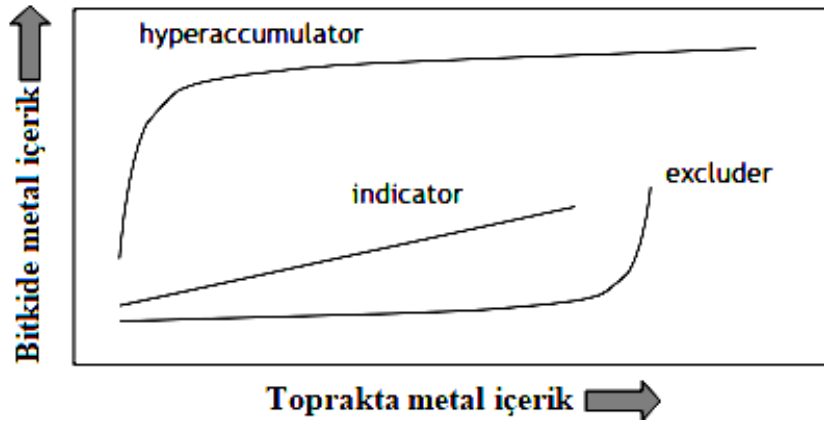
asit gibi biyomoleküller üzerinde oksidatif hasar olarak da meydana gelebilmektedir [49-53]. Örneğin, bitkide birçok fizyolojik sürece katılan önemli bir redoks-aktif geçiş metali ve temel mikro element olan bakır (Cu), oksidasyon reaksiyonlarında önemli bir rol oynar [54,55]. Optimal büyüme için gerekli olan seviyenin üzerinde Cu' nun, esansiyel bir element olmasına rağmen büyümeyi inhibe ettiği, fotosentez ve solunum gibi önemli birçok hücresel süreci engelleyebildiği bildirilmiştir [42,56,57]. Dolayısıyla bakır canlı organizmalar için hem esansiyel hem de toksik etki gösterebilen bir metaldir.

Bitkinin esansiyel olsun ya da olmasın metal toksisitesine karşı toleransı bitki türüne, element türüne, stres koşulları dâhil birçok unsura bağlı olarak değişiklik gösterebilir [55,58]. Bu nedenle ağır metaller hakkında bilgilerin bilinmesi bitki gelişim ve canlılığı açısından son derece önemlidir [55].

Çizelge 3.1. Bakır' ın (Cu) bazı fiziksel özellikleri [59]

<b>Faz</b>	<b>Katı</b>
<b>Atom Ağırlığı</b>	63,546
<b>Yoğunluk</b>	8,96 g/cm <sup>3</sup>
<b>Sıvı Yoğunluk</b>	8,02 g/cm <sup>3</sup>
<b>Erime Noktası</b>	1084,62 °C
<b>Kaynama Noktası</b>	2562 °C
<b>Füzyon Isısı</b>	13,26 kJ. mol <sup>-1</sup>
<b>Buharlaştırma Isısı</b>	300,4 kJ. mol <sup>-1</sup>
<b>Isı Kapasitesi</b>	24,440 (25 °C) J/(mol.K)

Yüksek bitkiler çeşitli nedenlerden dolayı maruz kaldıkları yüksek metal seviyelerine karşı kendilerini korumak için birçok tolerans ve birikim mekanizması geliştirirler. Şekil 3.1' de de görüldüğü üzere, bitkiler metale olan tepkisine göre üç temel strateji geliştirerek, bitki-toprak ilişkisi açısından üç ana grupta incelenirler. Bunlar akümülatörler, göstergeler ve dışlayıcılarıdır [60,61].



Şekil 3.1. Bitkilerin artan metal seviyelerine karşı tepkisi [60]

**1. Metal Dışlayıcı Bitkiler:** Bu grupta yer alan bitkiler, topraktaki metal seviyelerinin üzerindeki seviyelerde, metalleri kökler aracılığıyla alınımı veya toprak üstü kısımlara taşınımını engelleyerek köklerde metal oranını kontrol altında tutmaktadırlar. Stoltz ve arkadaşları (2002), bu tip bitkiler için "low accumulator" terimini kullanmıştır [62]. Bu tip bitkiler, köklerden dallara doğru metal taşınımını aktif olarak gerçekleştiremediğinden dallardaki metal seviyeleri düşük, köklerdeki metal seviyeleri ise yüksek düzeydedir [63]. Ayrıca substratta metal seviyeleri yüksek olduğunda element alınımını azaltabilir veya dışarı atabilirler. Bu olay bitkide kökte metal alınımının engellenmesi [64] veya aktif (enerjiye bağımlı) olarak dışarı akış pompaları aracılığıyla gerçekleştirilir [60,65]. Pseudometallofitler bu grubun üyesi olmakla birlikte, Baker (1981), çoğu metal (hiper) toleranslı bitkiler de bu gruba dâhil olduğunu bildirmiştir [60].

**2. Metal İndikatör Bitkiler:** Toprak üstü kısımlarında metalleri biriktiren bu türlerin genellikle toprak üstü kısımlarındaki metal seviyesi topraktaki metal seviyesi ile doğrusal bir ilişki içerisindeydir. Genellikle ağır metallere karşı duyarlı türlerdir. Topraktaki metal için bir gösterge olarak kullanılabilirler; çünkü indikatör (gösterge) türler, toprak üstü kısımları topraktaki metal seviyesini yansıtacak düzeydedir [66].

**3. Metal Akümülatör (Toplayıcılar) Bitkiler:** Toprak üstü kısımlarında topraktaki metal seviyesinin çok daha fazlasını biriktirebilen bitkilerdir. Bu bitkiler, bazı metallerin sadece yüksek seviyesini tolere etmekle kalmaz, aynı zamanda onları aktif olarak bünyelerine alabilmekte ve toprak üstü kısımlarında kuru kütlelerin birkaç yüz katını biriktirirler. Farklı araştırmacılar tarafından farklı şekillerde tanımlanmış olan bu bitkiler, ilk olarak Sachs (1865) tarafından tanımlanmıştır [67] ve bunlar 1977' den beri "hiperakümülatör" olarak

adlandırılırlar [68]. Diğer yandan, bu bitkiler Brooks (1977) tarafından, kuru ağırlığında en az 1 mg/ kg metal içeren türler olarak tanımlarken [68], Baker ve arkadaşları (1994) tarafından da gövdesinde 100 mg/kg' den daha fazla miktarda Cd, 1000 mg/kg' den daha fazla miktarda Ni, Cu ve Pb, 10 000 mg/kg' den fazla Zn ve Mn içerenler olarak tanımlamışlardır [69].

### 3.1.1. Bitkilerde Metal Toleransı

Bitkiler metal stresine karşı geliştirdikleri önleyici mekanizmalarla ya metal stresinin etkisini indirgerler ya da önlerler veya tolerans mekanizmaları sayesinde karşı koymakta ve toksik toprakta yaşamlarını sürdürebilmektedir [70]. Tüm bitkiler belirli seviyelerde metal stresine karşı koyma ve yaşamını sürdürebilme özelliği gösterebilirler. Ancak aşırı toksik derecedeki toprakta normal bitkilere nazaran hayatta kalabilen bitkiler "toleranslı bitki" olarak tanımlanırlar [71]. Bu bitkiler ağır metal stresine karşı hücre içi toleranslarını, bazı enzimleri sentezleyerek ya da ağır metalleri vakuol içerisinde biriktirerek veya şelatlayarak gerçekleştirirler [72]. Ayrıca aynı bitki türlerinin ortak birçok mekanizmasından farklı olarak, dayanıklı bitkiler ağır metalleri tolere etmek için kompleks mekanizmalar geliştirirler [73]. Bu mekanizmalar sayesinde, hücreye alınan metalleri hızlı bir şekilde detoksifiye edebilir ya da hücreye alınımını sınırlandırabilirler. Diğer bir yandan, metaller hücreye alındıktan sonra detoksifiye edilmeleri için şelatlanma, çöktürme veya alınımını indirgeme şeklinde farklı yöntemler uygulayabilirler [72].

Dayanıklı bitki, metal stresine karşı koymak veya canlı kalabilmek için hücresel düzeyde sahip olduğu mekanizmalardan yararlanması gerekir. Bu nedenle, dayanıklı bitki "homeostatik mekanizma" olarak adlandırılan metal tolerans mekanizması sayesinde metal stresi sonucu oluşan fizyolojik, yapısal, biyokimyasal, morfolojik, moleküler hasarı azaltabilme ya da en aza indirgeyebilme veya hiç hasar oluşturmama özelliği gösterir [74]. Genellikle elverişli çevresel koşullara sahip alanlara taşınamayan, aynı zamanda aktif olarak hareket edemeyen bitkinin yaşamını sürdürebilmesi için homeostatik mekanizma büyük önem taşımaktadır [74]. Bu da bitki hücresinin önemli bir bölgesinde oluşabilecek toksik etkinin önlenmesi açısından önemlidir. Böylece bitki geliştirdiği farklı tolerans mekanizmaları sayesinde çevre ile uyum içinde bulunur ve hiçbir toksik etki göstermeksizin yaşamına devam eder. Ancak bitkide gelişen bu mekanizmalar elementin

türü ve miktarına, bitkinin maruz kalma süresine, maruz kalan doku veya organa, bulunduğu toprağın yapısına ve bitkinin türü olmak üzere çeşitli etmene bağlı olarak değişiklik gösterebilir [75]. Örneğin; bitkinin tohum, tomurcuk, meristem ve diğer kısımları dâhil birçok kısmı metal stresine karşı dayanıklı veya duyarlı olabilmektedir.

Metal stresine karşı bitkinin plazma membran, kloroplast gibi farklı organellerinde ağır metal taşıyıcı proteinler, ısı şok proteinleri, metallothiyonin gibi sorumlu proteinler veya organik asit, aminoasit, peptid, metal bağlayıcı moleküller gibi aracı etmenler rol oynamakta olup, bunlar metallerin vakuole taşınımından sorumludurlar [76,77]. Bu işleyiş, bitkinin membran taşıma sistemleri tarafından kontrol edilmektedir. Bu taşıma sistemlerinde sorumlu çeşitli gen ailesinin HMA, Nramp, CDF, ZIP gibi varlığı bilinmektedir. Örn. model bitki *A. thaliana* L.' da tanımlanan COPT' nin altı üyesinin hücre içi Cu alınımları ve taşınımı ile ilgili olduğu tespit edilmiştir [78]. Bununla birlikte bitki tolerans mekanizmasının sadece plazma membranında değil, aynı zamanda diğer hücre içi membranlarda da sağlanabildiği ve toksik metallerin sitoplazmadan uzaklaştırılmasında veya kompartımanlaşmasında işlev gösteren başka taşıyıcı proteinlerin bulunduğu öne sürülmektedir [79].

### 3.1.2. Bitkilerde Metal Depolanması

Bitkide hücre içi metal iyonunun alınımları ve taşınımı kök tarafından gerçekleştirilmektedir [80]. Bu süreç, ilk olarak topraktaki metal iyonun kökte tutulması ya da biriktirilmesi, daha sonra toprak üstü kısmına (gövde, yaprak) iletilmesi şeklinde süre gelmektedir [81]. Genellikle metalin bitki bünyesine geçiş süreci; iyon halindeki metalin harekete geçirildikten sonra kök hücresi tarafından kök yüzeyinde tutulması, kök içine alınması, daha sonra hücre duvarına bağlanarak, ksilem aracılığıyla gövde ve yapraklara iletimini şeklinde gerçekleşmektedir [82]. Toprağa bağlı metali topraktan ayırma da sorumlu olan bazı metal şelatlayıcı moleküller rizosfere salınırlar. Böylece bitki kökünde plazma membranına bağlı bazı özel metal redüktazlar aracılığıyla metal iyonu indirgenebilir. Dahası kökün salgıladığı protonlar sayesinde toprağın asitleşmesi sağlanabilir ve metal iyonu serbest kalabilir hale gelebilir yani çözülebilir. Köke alınımları intraselüler veya ekstraselüler yolla gerçekleşen metal iyonları, ksilem veya floem yoluyla da gövdeye taşınımı devam eder ve çeşitli taşıyıcı ya da kanal aracılığıyla da hücre içine

katılırlar [83,84]. Topraktaki metalin bir kısmı bitki kökü tarafından alınır ve taşıyıcı proteinler aracılığıyla bitkinin toprak üstü kısımlarına taşınarak depolanır, bir kısmı ise toprakta kalır. Bitkinin kök kısmında tutulan veya üst kısmına taşınarak depolanan metale karşı, oluşabilecek stresten sakınması veya strese toleransı bitki reaksiyonlarının genel mekanizması sayesinde gerçekleşir [85]. Bitki bu mekanizmalarla metal iyonunun geçirgenliğini düzenlemekte ve plazma üyelerinin bazı stratejileri ile uyarmaktadır [85]. Ancak bazı durumlarda bitki hücresine ulaşan metal iyonunun fazla olması veya kullanılamaması durumun da toksisiteye neden olmamak amacıyla çeşitli proteinler, peptidler ve küçük organik moleküller depolama işlemi gerçekleştirirler. Böylece bitki hücre içinde ağır metalleri özel mekanizmalarla biriktirebilir. Bitki metalotiyonin (MT' ler) (metal bağlama proteinleri) ve fitoşelatin (PC) gibi mekanizmalarla detoksifiye edilebilir [86]; örn. sitosol' deki PC mekanizması, stres koşullarında en iyi detoksifikasyon mekanizmalarından biridir [87].

### 3.2. Fitoremediasyon

Fitoremediasyon diğer bir deyişle çevre temizliği, dünyada önemli bir teknoloji haline gelmekte olup, bu teknoloji kentsel veya endüstriyel faaliyetler sonucu kirlenmiş alan veya suyun temizlenmesi, gıda güvenliğinin iyileştirilmesi, yenilenebilir enerji kaynaklarının geliştirilmesi yanı sıra sürdürülebilir arazi kullanımına sağladığı katkı sayesinde potansiyel bir araç olmaya ve çevre dostu çözümler sunmaya başlamıştır [87]. Yeşil bitkiler (ve ilgili mikroorganizmaların) kullanılarak kirlenmiş alan (toprak, çamur, tortu) ve suları (yeraltı) temizlemeyi, organik veya inorganik kirleticileri zararsız hale getirmeyi mümkün kılan bir yöntemdir [87]. Genellikle bitki veya ilgili bitki ürünü kullanılarak toprağın yerinde iyileştirilmesi şeklinde yani organik ve metal kirletici seviyesinin veya toksik etkisinin azaltılması veya giderilmesini sağlar [88]. Bu işlem bitki bünyesine kök aracılığıyla metalin alınması, toprak üstü kısımlarına taşınması ve bu kısımlarda biriktirilmesi şeklinde gerçekleşen bir süreçtir.

Çevreden kirleticilerin temizlenmesi veya uzaklaştırılmasında doğal süreçlerden yararlanan çevre dostu bir yöntemdir, sonuç olarak kirlenmiş alanların bitki veya bitki ürünleriyle sabitleştirilmesi veya restore edilmesi ve kirliliğin seçilerek indirgenmesi ya da uzaklaştırılması sağlanır [75]. Kısaca bitki organik veya inorganik kirleticileri gidermeyi,



parçalamayı veya bünyesinde depolanmayı sahip olduğu doğal yetenekleri ile gerçekleştirir [87]. Dolayısıyla bu teknoloji için kirli alanlarda hiçbir şekilde toksik etki göstermeden normal olarak yetişebilen, bünyesinde yüksek oranda metal biriktirebilen veya metale karşı tolerans gösterebilen, aynı zamanda güçlü kök yapısına ve hızlı büyüme özelliğine sahip bitkilerden yararlanmak en ideal seçim olacaktır [9]. Genellikle toprağın yapısını etkilemeden kirleticileri toprak üstü kısımlarında biriktirebilme özelliğine sahip olduğundan ideal bitkinin kullanımı ve verimliliği korunmaktadır.

Fitoremediasyon ağır metal ve radyonüklidler yanı sıra organik kirleticilerin (polinükleer hidrokarbon, poliklorlu bifenil ve pestisit) uzaklaştırılmasında da uygulanmaktadır [83].

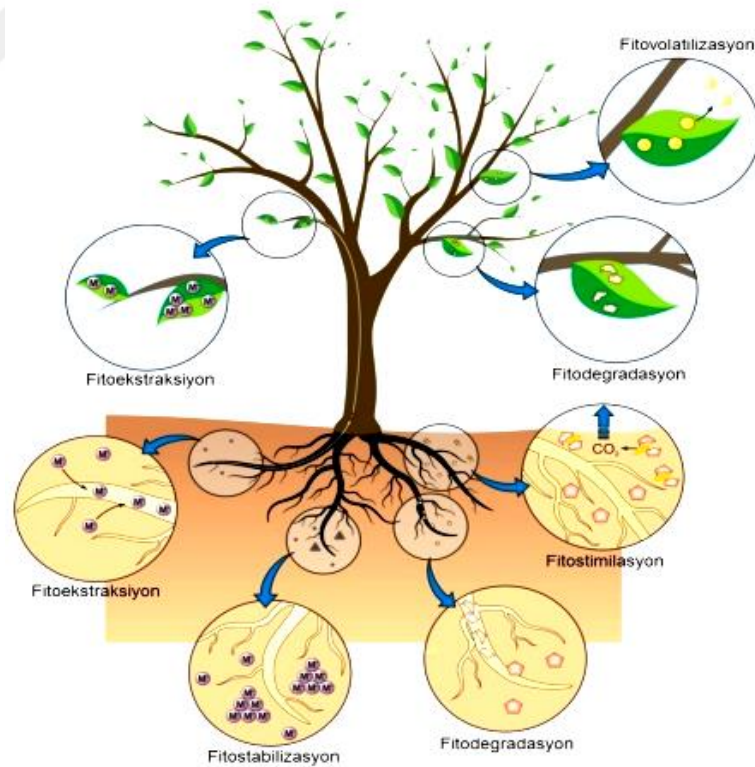
Yeşil bitkiler, topraktan kirleticileri bünyesine alabilmek ve detoksifikasyonu gerçekleştirebilmek için çeşitli mekanizmaları ile birlikte muazzam bir yetenek sergilerler [13,87]. Bu mekanizmalara sahip ve bunlarla metal stresine karşı hayatta kalabilen bitkiler "hiperakümülatör" olarak adlandırılır [13,60,87]. Fitoremediasyon için ideal aday olarak gösterilen bu bitkilerin kullanımı ile uygulandığından yeni bir yaklaşım haline gelmiştir. Çünkü bu bitkiler toprak üstü kısımlarında metal iyonlarını biriktirme ve detoksifiye edebilme yeteneklerini müthiş bir şekilde kullanmaktadırlar.

Gelişen moleküler teknolojiler ile birlikte hiperakümülatörlerin metal tolerans ve birikim mekanizmaları daha detaylı anlaşılmaya çalışılmaktadır. İlk olarak birçok araştırmacı tarafından biyolojik süreçte bitki-mikroorganizma arasındaki etkileşim ve rizosferik süreç, bitkiye metalin alınımı, taşınımı ve tolerans mekanizması, daha sonra iletim ve depolama da sorumlu bitki şelatörleri ve taşıyıcı proteinler hakkında bilgi edinilmesi gerektiği belirtilmiştir [83,88]. Böylece bu teknoloji için bazı sınırlar ortadan kaldırılacak ve ilgili alanlarda daha verimli bir şekilde kullanımı sağlanarak, birçok gelişmeye fırsat sağlayacaktır. Bu bağlamda, farklı araştırma alanı yanı sıra remediasyon özelliklerine sahip transgenik veya transgenik olmayan bitkiler geliştirilebilecektir [89,90].

Son yıllarda ciddi boyutta kirlenmiş alanların yerinde veya başka bir yerde gerçekleştirilen arıtım işlemleri için ana yöntem olarak kullanılan fizikokimyasal arıtma tekniğinin çoğu, yapay ve dağınık olarak bulunan kirlenmiş geniş alanların veya çok düşük kirletici içeriğine sahip yerlerin iyileştirilmesi için yeterince uygun olmayan ve kullanışsız teknikler olarak görülmektedir [91]. Diğer arıtma tekniklerine alternatif olarak ortaya çıkan fitoremediasyon; yeni, uygun maliyetli ve çevreci bir yöntem olması yanı sıra uygulama

esnasında özel bir donanım gerektirmemesi, yerinde uygulanabilir olması ve uygulanan bölgenin yeniden kullanılabilme imkânını sağlayabilmesinden dolayı dünya çapında araştırmacılar tarafından son on beş yıldır tercih edilen bir iyileştirme stratejisi haline gelmiştir [92].

Bu popüler teknoloji kirleticilerin bertaraf edilmesi ve temizlenmesinde yararlanılan bitki türüne göre farklılık göstermekle birlikte uygulama yöntemleri de değişebilmektedir. Şekil 3.2' de görüldüğü üzere, uygulanabilirlik ve temel süreç bakımından altı alt başlık olarak incelenir. Bunlar fitoekstraksiyon, fitodegradasyon, fitostabilizasyon, fitovolatilizasyon ve rizofiltrasyon' dur [93]. Uygulanacak olan yöntemin seçiminde bitkilerin kirleticilere karşı seçiciliği, kirliliği giderme mekanizmaları, kirletici ortamın fiziksel ve kimyasal özellikleri, uygulanacak yöntemin kirleticilerle uyumu, kirliliğin mevcut derişimi, kirleticinin toprak içerisindeki derinliği ve iklim şartları gibi farklı faktörler etkili olmaktadır [94].



Şekil 3.2. Fitoremediasyon uygulama yöntemlerinin şematik gösterimi [46]

### 3.2.1. Fitoekstraksiyon (Bitkisel özümleme)

Fitoekstraksiyon bitki kökü aracılığıyla bitkinin hasat edilebilen kısımları yani toprak üstü (gövde, yaprak) kısımlarında topraktaki metalin alınımı, taşınımı ve birikmesi şeklinde metalin ortamdan uzaklaştırılması için kullanılan en etkili ve yaygın yöntemdir [6,95]. Bu yöntemde kullanılan bitkiler, diğer bitkilere nazaran bünyelerinde kirlilik etmenini 100-1000 kat daha fazla biriktirebilme özelliği gösterebilmektedir [9]. Bitki hasadı, budanması ya da sökölme işlemleri ile uzaklaştırılabilen kirleticiler, aynı zamanda hasat edilen bitki kısımlarının kurutulması, yakılarak kül haline getirilmesi, kompost haline getirilmesi veya çürütölme yoluyla da yok edilebilmektedir [15,96]. Ayrıca bu kısımlar gübre olarak kullanılabilir, biriken metaller ise geri dönüştürölerek yeniden kullanılabilir hale getirilebilirler. Özellikle ABD gibi ölkelerde bitkisel madencilik (phytomining) olarak da adlandırılan bu yöntem, çok ekonomik olmayan maden cevherlerinin daha kolay elde edilme, işlenerek çıkarılma ve geri kazanımında kullanılır. Hasat edilebilen kısımlarında metal birikimi ve alınımı gerçekleştirebilen *Brassicaceae*, *Euphorbiaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae* ve *Scrophulariaceae* dâhil birçok ailenin yaklaşık 450 üyesi bu yöntem için ideal olduğu bildirilmiştir [9,96,97].

### 3.2.2. Fitodegradasyon (Bitkisel Bozunum)

Bitki bünyesine alınan organik kirleticilerin belirli metabolik süreçlerde rol oynayan enzim ve kofaktörler yardımıyla kısmen veya tamamen giderilme işlemidir, diğer bir deyişle "fitotransformasyon" olarak bilinen yöntemdir [98,99,100]. Bakteri, maya, mantar, bitki ya da toprak mikroorganizmalarının ürettiği protein veya enzimler sayesinde topraktaki pestisit, fenol, petrol bileşik dahil farklı organik kirleticiler grubunun uzaklaştırılmasıdır [101]. Ana mekanizma, kirleticinin bitkiler tarafından alınımı ve bitki bünyesinde bozularak metabolize olması şeklinde gerçekleşir. Bitki bünyesine alınan kirleticilerin çözünebilirlikleri, bitki tipi, kirlilik etmeninin toprakta kalma süresi ve toprağın fiziksel ve kimyasal yapısına bağlı olarak genellikle bitkinin kök bölgesindeki en uç kök kısımlarında aktivitesini göstermektedir. Diğer yandan kirleticiler birikimi, alınımı, taşınımı ve parçalanma sürecine bağlı olarak bitki içerisinde veya rizosferde gerçekleşebilir. Organik kirleticiler grubundan sentetik herbisit ve insektisitlerin

uzaklaştırılması üzerine çalışmalar bulunmakta olup, Doty ve ark. (2007) tarafından, yapılan moleküler çalışmalarda genetiği değiştirilmiş bitkiler (kavak) kullanılmıştır [102].

### **3.2.3. Fitostabilizasyon (Köklerle sabitleme)**

Topraktaki kirleticilerin bitki kökü aracılığıyla biriktirilmesi, bitki yüzeyine yapışması veya kök bölgesinde sabitlenmesi şeklinde gerçekleşen, böylece biyolojik alınabilirliği indirgeyebilen bir yöntemdir [101]. Kirleticilerin hareket yeteneğini ve bulunma olasılığını sınırlayan bu yöntem, özellikle ağır metallerce zengin maden yatakları gibi alanların arındırılmasında tercih edilmektedir. Bu teknik için yüksek metal miktarına karşı toleranslı, metali absorbe edebilen, çöktürebilen, karmaşık hale gelmesini sağlayan veya metal değerini indirgeyebilen bitkiler uygun adaylardır [103,104]. Dolayısıyla bitki kökünde kirletici hareketliliğinin kısıtlanması veya engellenebilmesi için bitki kökünün derinliği oldukça önem taşır [101]. Böylelikle topraktaki kirleticiler köke veya rizosfere kolay bir şekilde bağlanabilir ve metalin gövde kısmına taşınımı engellenebilir. Bu nedenle, metale karşı toleranslı bitkiler ideal adaylardır. Çünkü metalin mobilitesini indirgeyerek çevreye yayılımını sınırlarlar. Örneğin, geniş kök sistemine sahip kavak bu teknikle ilgili birçok çalışmada kullanılmaktadır [101]. Ayrıca bitki için toksik etkisi yüksek olan Cr(VI), daha az toksik etkisi olan Cr(III) türüne indirgenmesi ve aktif hale getirilmesi ile ilgili çalışmalarda bu yöntem dâhildir [105].

### **3.2.4. Fitovolatilizasyon (Bitkisel Buharlaşma)**

Bitki bünyesine alınan topraktaki kirleticinin (organik ve inorganik) kök, gövde gibi bitki kısımları aracılığıyla uçucu bir forma dönüştürülerek, bu formdaki yapının atmosfere verilecek hale getirilmesi ve yapraklardan atmosfere salınımının (buharlaşması) gerçekleşmesi şeklinde gelişen bir süreçtir [106,107,108]. Genellikle organik (klorlu bileşikler) ve inorganik (Se, As, Hg) kirleticilerin uçucu forma dönüştürülerek uzaklaştırılma işlemidir [101]. En tartışmalı fitoremediasyon tekniğidir. Çünkü toksik bileşenlerin daha az toksik forma (örn. cıva (Hg)) dönüştürülmesi açısından avantajken, bu toksik gazların atmosfere salınımı açısından bir o kadar dezavantajlıdır. Daha az toksik forma dönüştürülen metal formunun atmosfere salınımında yararlanılan bitkinin

fitoremediasyon yeteneği taşıma, metali absorbe edebilme ve gaz forma dönüştürebilme özelliği gösterebilmesi gerekir. Yapılan bazı araştırmalarda *B. juncea* ve *A. thaliana*'nın bu teknik için uygun aday bitki oldukları görüşündedir [109-111]. Ayrıca bu teknik için birçok bitki ve ağaç türünün kullanımı da önerilmektedir [101].

### 3.2.5. Rizofiltrasyon (Köklerle Süzme)

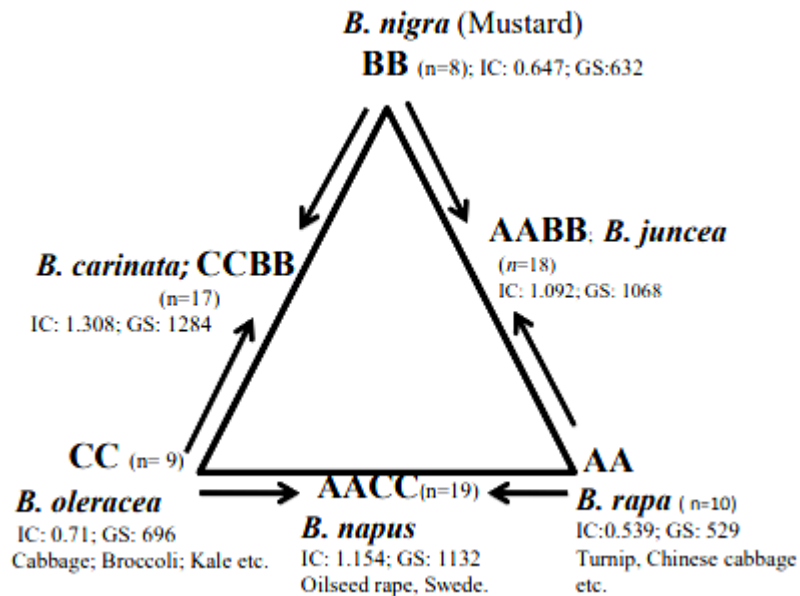
Sulak ortamlarda oluşan çökelti veya birikinti içerisinde bulunan toksik metal iyonlarının bitki kökünün fiziksel ve biyokimyasal işlevleri sayesinde absorbe edilmesini gerçekleştiren yardımcı bir mekanizmadır [99,100]. İlk olarak kök aracılığıyla süzme ardından kirleticilerin kök içine alınımı veya kök üzerine absorbe olarak kirliliğin kaynağından uzaklaştırılma olayıdır [101]. Genellikle bu teknikte önemli su bitki *Azolla spp.*, *Lemna spp.*, *Elodea spp.*, *Typha.*, *Eichhornia spp.* aktif bir şekilde yararlanır. Ancak su bitkileri yanı sıra karasal bitkilerin de kullanılabilirdiği bu yöntemde, bitki biyokimyasal filtre olarak nitelendirilmekte olup, bitkinin yüksek miktarda kök biyokütlesi ve yüzey alanı oluşturabilmesi oldukça önemlidir [112]. Bu açıdan rizofiltrasyon yönteminde hidroponik ortamda aktif özellik gösteren birçok karasal bitki (*B. juncea* L., *Helianthus annuus*) türü verimli bir şekilde kullanılabilir [14,113,114].

### 3.3. Brassicaceae Familyası

Bitki âleminin en geniş ailelerinden biri olan *Brassicaceae* (*Cruciferae*), "angiospermler" in yaklaşık 338 cins ve 3 700 türünü içeren monofiletik bir gruptur [115]. Kuzey Yarımküre' de bol miktarda bulunan kozmopolit bir ailedir ve dünya çapında araştırmacılar tarafından bilimsel ve ekonomik açıdan ayrı bir değere sahip olması nedeniyle odak noktası haline gelmiştir [116,117]. Genel olarak, bu aileye *Brassica*, *Draba*, *Cardamine*, *Erysimum*, *Nasturtium*, *Lepidium*, *Alyssum* gibi en iyi bilinen türler ve başta model bitki *A. thaliana* olmak üzere *B. rapa*, *B. oleraceae*, *B. napus* gibi önemli cinsler dâhildir [118]. Diğer yandan birçok tarımsal bitki (*B. oleracea*, *B. napus*, *Armoracia rusticana*), süs bitki (*Aubrieta*, *Iberis*, *Lunaria*, *Arabis*, *Draba*) ve moleküler çalışmalar için bazı model organizmalar (*A. thaliana*, *A. lyrata*, *A. halleri*, *B. napus*, *Capsella rubella*, *Thellungiella halophila*, *Arabis alpina*) dâhil olup, bunlar dünya çapında

birçok araştırmacı tarafından sahip oldukları özelliklerden dolayı büyük ilgi uyandırdılar [118].

*B. juncea* L. ve *B. nigra* L., diğer *Brassica* türleri gibi en iyi bilinen türler arasındadırlar. Bu iki türünde dâhil olduğu küresel ekonomik öneme sahip olan altı *Brassica* türü (*B. rapa*, *B. carinata*, *B. oleracea*, *B. napus*) arasındaki genetik ilişki, U akrabalık üçgen modeli ile açıklanır (Şekil 3.3). *B. juncea* ve *B. nigra*, U-diyagramı (U 1935)' na göre kültürü yapılan altı *Brassica* türü içerisinde yer alan iki önemli türdür. Bu türler arasındaki sitogenetik ilişki, 20. yüzyılın başlarında Asyalı Sitogenetikçi Nagaharu (1935) tarafından; A, B, C genomlarına sahip üç progenitor (ata) diploid tür; *B. rapa* (A genom, n = 10), *B. nigra* (B, n = 8), *B. oleracea* (C, n = 9) ve her çiftin hibridizasyonu ile ortaya çıkan üç allotetraploid form; *B. juncea* (AB genomu, n = 18), *B. napus* (AC genomu, n = 19) ve *B. carinata* (BC genomu, n = 17) şematik gösterilmiştir [119]. Şekil 3.3' de de görüldüğü üzere, U diyagramının üç köşesinde sırasıyla *B. rapa*, *B. nigra* ve *B. oleracea*' ya ait üç temel gen, AA, BB ve CC; diğer yandan üçgenin üç tarafında sırasıyla üç allotetraploid form *B. juncea*, *B. napus* ve *B. carinata*' ya ait neotetraploid AABB, AACC ve BBCC genomları yer alır.



Şekil 3.3. Farklı diploid ve amphidiploids *Brassicaceae* türleri arasındaki genomik ilişkiyi gösteren "U diyagramı" [119,120]

Hardalgiller ya da Haçlıgiller olarak da bilinen *Brassicaceae* ailesi, birçok ağır metal biriktirme yeteneğine sahip birçok üye içermesinden dolayı "metalofit aile" olarak da bilinirler. Bu nedenle fitoremediasyon teknolojisinde önemli rol oynayan bu aile inorganik bileşikleri (metaller veya metaloidler) biriktirme yeteneğine sahip *Alyssum*, *Arabis*, *Arabidopsis*, *Bornmuellera*, *Kakdam*, *Cochlearia*, *Peltaria*, *Streptanthus*, *Thalaspis* dâhil 11 cins ve 87 tür içermesi ve bunların biyosferde birçok yerde kirlenmiş alanın iyileştirilmesinde yaygın olarak kullanılmasıdır [118]. En dikkat çeken yetenekleri arasında çoğunun Ni' yi biyolojik olarak, yaklaşık 30 türünün Cu, Zn ve/veya Co absorbe etmesi ve birkaç türünün de Mn ve Cd' yi biriktirebilmesidir [121]. Farklı metalleri değişik miktarlarda bünyelerine alabilme ve akümüle edebilme yetenekleri gelişmiş olması, *Brassicaceae* türlerinin metal hiperakümülyasyon açısından üst düzey kaynak olduklarını göstermektedir. "Hiperakümülyatör" olarak tanımlanan gruba dâhil olan bu grubun çoğu üyesi, bu grubun yaklaşık % 25' ini oluşturdukları belgelenmiştir [122-125]. Hiperakümülyatör grubuna dâhil en az 45 bitki familyası tanımlanmış olup, araştırmacılar bunlar arasında *Brassicaceae'* nin bitki çeşidi bakımından en zengini olduğunu belirtmiştir [122-125].

Günümüzde bitki bilimine çeşitli disiplinlerde sağladıkları katkı sayesinde *Brassicaceae* ailesi ile ilgili birçok bilimsel bilgi üretilmiştir [118]. Son on beş yıldır önemli bir teknoloji haline gelen fitoremediasyon için de elverişli türler içeren bu familya, aynı zamanda sahip oldukları moleküler mekanizmalarla topraktaki yüksek miktarda metali biriktirebilme özelliğine gösterebilmelerinden dolayı müthiş bir gen kaynağı olarak görülmektedirler. Bu türler, metallerin yol açtığı toksik etkilere karşı dirençli genlere sahiptirler [126]. Başta model bitki *A. thaliana* L. olmak üzere birçok *Brassicaceae* türünde metal alınımı ve birikiminde rol oynayan genlerin anlatımı üzerine çalışmalar yapılmış ve birçok önemli gen belirlenmiştir [126]. Araştırmacılar tarafından gen kaynağı olarak görülen bu aile üyeleri, birçok önemli genin anlatımının tespiti ile birlikte hiperakümülyasyon çalışmalarında ilerleme sağlanacağından büyük önem taşımaktadır [127]. Dolayısıyla tespit edilen önemli türlerin biyokütle üretimleri artırılarak, çevre fitoremediasyonu için ideal hale getirilebilecektir. Aynı zamanda gelişen biyoteknoloji ve moleküler genetik teknikler sayesinde tespit edilen genlerin yüksek metal seviyelerine tolerans gösteren türlerden, hiperakümülyatör türlere aktarımı gerçekleştirilerek transgenik bitkiler üretilebilir.

### 3.4. Metal Hiperakümülyasyonun Moleküler Mekanizmaları ve Gen Aileleri

Bitkiler metal toksisitenin üstesinden gelebilmek için karmaşık fizyolojik ve biyokimyasal işlevleri sayesinde gen anlatımı, protein değişimleri ve metabolit içeriklerinde meydana gelen değişimlerin bir koordinasyonuna gerek duyarlar [128]. Moleküler düzeyde yapılan araştırmalarla bitki bünyesindeki süreçlerde yani metalin bitki hücresine alınımı, taşınımı ve depolanma şeklinde gerçekleşen aktivitelerde gen ailelerinin anahtar rol oynadıkları anlaşılmıştır. Böylece metal hiper-akümülyasyon süreçlerinde rol oynayan genlere ait ilk bulgular mayada veya akümülatör olmayan bitkilerde tespit edilmiştir [129,130]. Bitkilerde önemli olan bu süreçlerde rol oynayan protein aileleri hücresele düzeyde plazma membranı ve tonoplastta taşıyıcı olarak işlev görmektedirler. Bitkiler bu taşıyıcılar aracılığıyla metallerin fizyolojik yoğunlaşmalarına karşı korunabilmekte ve metal stresine karşı yanıtta katkı sağlayabilmektedirler. Ancak biyolojik işlevleri, metal özgünlükleri ve hücresele yerleşimleri henüz tam olarak bilinmeyen birçok metal taşıyıcı bulunmaktadır. Ağır metal (veya CPx-tip) ATPaz' lar, Nramp, ZIP, CDF proteinler metal taşınımında rol oynayan gen ailelerinden bazısıdır [16]. Bu taşıyıcılar, ağır metal detoksifikasyonu, toleransı, alınımı ve metallerin hücresele bölmelere taşınımını kapsayan birçok sürece katılırlar. Sitoplazmada hücre içi bölmeler arası ya da sitoplazma dışına metal akışını sağlarlar.

Bu metal taşıyıcı proteinler metal akışına göre:

1. Sitoplazmada metal akışını sağlayan metal taşıyıcı proteinler [131,132]:
  - Doğal dirençle ilişkili makrofaj protein (Nramp) ailesi: ( $Fe^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ),
  - Çinko-demir permeaz (ZIP) ailesi: ( $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ),
  - Bakır taşıyıcı protein (COPT) ailesi: ( $Cu^{+}$ ),
  - Sarı çizgil-benzeri (YSL) ailesi: ( $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{+}$ )
2. Sitoplazma dışında metal akışını sağlayan metal taşıyıcı proteinler ise [131-133]:
  - P<sub>1B</sub>- tipi ATPaz ailesi: ( $Cu^{+}$ ,  $Ag^{+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  ve  $Co^{2+}$ ),
  - Katyon difüzyon hızlandırıcı protein (CDF) ailesi: ( $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ )



## **Nramp gen ailesi**

Divalent metal iyonlarının taşınımından sorumlu olduğu tespit edilen yeni bir protein ailesi olan Nramp' lar, bakterilerden insana çeşitli organizmalarda metal homeostazında önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir [134-137]. Gelişim sırasında yapısı oldukça korunmuş olan bu grubun bakteriler, mayalar, böcekler, memeliler ve yüksek bitkiler de dâhil olmak üzere çeşitli canlı organizmalarda homologları bulunmaktadır. Bu organizmalarda metal taşınımına katılırlar. Bu ailenin tanımlanan ilk geni memeli Nramp1' dir. Bitkilerde ise bu aile ilk olarak pirinçte tanımlanmış olup, pirinçte Nramp' a ait yedi üyenin bulunduğu rapor edilmiştir [16,138,139]. Genellikle yüksek yapılı bitkilerde bu genin araştırılması üç tane Nramp homologun tanımlandığı pirinçle (*Oryza sativa*) sınırlı kalmıştır. Pirinçte OsNramp3 gen lokalizasyonu esas olarak kök ve yaprakta olup, OsNramp2' nin ise yapraklarda bulunduğu tespit edilmiştir [139]. Bitkilerde toksik metal iyonlarının taşınımında rol oynayan Nramp proteinin, her ne kadar fonksiyonu bilinse de erişilebilecek bilgiler sınırlı olup, henüz tam olarak açıklanmamıştır. Diğer yandan bitkilerde *A. thaliana*' da tanımlanan Nramp1-6 geni olmak üzere altı üyesi bulunmaktadır. AtNramp1, demir homeostazı için önemli bir taşıyıcıdır [140]. Sorumlu genlerin anlatımının bitkinin hem kök hem de yaprak kısımlarında gerçekleştiği ve Fe taşınmasında görev aldıkları belirtilmiştir [140].

## **ZIP Gen Ailesi**

İlk olarak bitkilerde tanımlanan yeni bir metal taşıyıcı aile olan ZIP' nin, son çalışmalarda başta *A. thaliana* olmak üzere hayvanlar, bitkiler, protistalar ve mantarlar dâhil tüm ökaryotik âleminde üyelerinin bulunduğu tespit edilmiştir [141]. ZIP ailesi, dört temel mikro besin elementi olan Zn, Fe, Mn ve Cu taşınımında rol oynar [142-148]. Diğer yandan Cd gibi ağır metal taşınımında da rol oynadığı belirtilen bu aile hem temel hem de toksik çeşitli metallerin bitki metabolizmasına nasıl alındığı ve taşındığı konusuna dair önemli bilgiler sağlayacağı ve anahtar rolünün olabileceği bildirilmiştir [148-150]. Adını ZRT (Zn-düzenlenmiş taşıyıcı) ve IRT (Fe- düzenlenmiş taşıyıcı) olarak tanımlanan iki tip benzer proteini içeren ilk üyelerinden alır. Bugüne kadar, sınırlı sayıda tanımlanan üyeleri, hem taşıma yetenekleri hem de plantadaki rolleri bakımından bitkilerde (esas olarak

*Arabidopsis*' te) tanımlanmıştır. Diğer gen ailelerinde olduğu gibi bu ailenin de tanımlanan ilk üyesi *Arabidopsis*' ten izole edilmiş olan AtIRT genidir. *Arabidopsis*' e ait AtIRT1, AtIRT2 ve AtIRT3 geni ayrıntılı bir şekilde açıklanmış ve yapılan çalışmalarda özellikle AtIRT1 geninin kökler aracılığıyla topraktan yüksek affinite ile Fe alınımı ve taşınımını gerçekleştirdiği belirlenmiştir [151]. On beş ZIP üyesi bulunan *Arabidopsis*' in diğer on iki ZIP üyesinin fonksiyonu hakkında literatürde çok az bilgi mevcuttur. ZTR (çinko düzeneyici taşıyıcı), mayalarda yüksek ve düşük değerlikli Zn taşıyıcısıdır [152,153].

### **COPT Gen Ailesi**

Bitkiler dışında diğer organizmalar için CTR' ler, olarak adlandırılan COPT' ler yüksek afiniteli Cu taşıyıcıları olup, hücrel kompartımanlarda muhtemel bir redüktaz ile birlikte hareket eden yüksek afiniteli Cu taşınımını sağlayan yolun temel bileşenleridir. Bu aileye ait *Arabidopsis*' in altı üyesi (COPT1-6) tanımlanmıştır [153-156]. Bu üyelerden COPT1, COPT2 ve COPT6' nın plazma membranında aktif oldukları bilinmektedir [153,156-161]. Ayrıca, COPT4 hariç diğer taşıyıcıların, yaprak ve gövde anlatımı köke nazaran daha fazladır. Özellikle yaprak ve gövde kısımlarında anlatımı en fazla olan gen COPT2' dir. COPT1 ise fizyolojik olarak karakterize edilen en iyi bakır taşıyıcısı olup, bu protein ailesinin hücre içi lokalizasyonunun netleştirildiği tek üyesidir [159,162]. Diğer üyelerden olan COPT2-5' in hücre içi lokalizasyonlarının henüz netleşmemesi, fizyolojik işlevlerinin belirsizliğine neden olmaktadır.

### **YSL Gen Ailesi**

YSL proteinleri bitkilerde fitozotroforların (PS) sentez için bir öncü olarak bulunan PS veya nikotinamin-metal (NA) şelatlarının ksileme depolanması ve taşınması yanı sıra bitki hücresine Cu-NA taşınımına aracılık ettikleri bulunmuştur [163]. Bu aile ile ilişkili biyokimyasal düzeydeki çalışmalar mısırdaki gerçekleştirilmiş ve mısıra özgü YS1 geni üzerine yapılmıştır, aynı zamanda bu gen *Arabidopsis* ve pirinçte tanımlanmıştır [164]. Bu genin önemli diğer bir rolü bitki kök ve yapraklarında Fe ihtiyacını gidermektir. *Arabidopsis*' te sekiz üyeden oluşan YSL ailesi, özellikle nikotianamine (NA) kompleksleşen Fe şelatlarının hücreler arası taşınımında rol oynamaktadır [165]. Ayrıca *T.*

*caerulescens'* in hiperakümülyasyonunda Zn ve Ni üzerine rolünün olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır [166,167]. Fonksiyonel analiz bazı YSL üyelerinin Zn, Cu, Mn ve Ni gibi diğer geçiş metallerrinin taşınmasında ve homeostazında da rol oynadığını göstermiştir [18,131,166].

### **ABC-Tipi Aile**

Tüm organizmalarda mevcut protein aileleri arasında en geniş yayılım gösterenlerden biri olan ATP bağlayıcı kasetin (veya ABC)' nin metabolik fonksiyonları, hem prokaryotik hem de ökaryotik organizmada araştırılmıştır [168,169]. Tamamen işlevsel olan bu protein ailesinin üyelerinin çoğu, ATP' ye bağlı aktif taşıyıcılar olarak işlev görür ve hücreyel birçok fizyolojik süreçte rol alırlar [170]. Fonksiyonel farklılıkları yanı sıra, her bir ABC proteinin enerji sağlayan en az bir ATPaz bölgesi bulunur. Genellikle çeşitli organizmalarda biyotik veya abiyotik toksinlerin yok edilmesi ve hormon sinyal iletiminde görev alırlar. Bazıları metal iyonu, çeker, lipid, peptid, pigment, ksenobiyotik ve antibiyotikleri içeren çok çeşitli maddelerin vakulde sekestrasyonundan sorumludur [170]. Bitkilerde bu protein ailesinin, tanımlanan iki alt sınıfı bilinmektedir, bunlar çoklu ilaç direnciyle ilişkili proteinler (MRP' ler) ve çoklu ilaç direnç proteinleri (MDR' ler)' dir. Ayrıca şelatlı ağır metallerrin veya ağır metallerrin taşınması için gerekli organik asitlerin taşınmasında rol oynayan proteinlerdir. İlk ABC taşıyıcı *Arabidopsis'* in MDR-benzeri geni klonlanmış olsa da bitkilerde sadece belirli MRP' ler fonksiyonel olarak tanımlanmıştır [16,171,172].

### **CDF-Tipi Gen Ailesi**

CDF proteinleri, metal homeostazisi ve toleransında önemli rol oynayan katyon difüzyon kolaylaştırıcılardır [173]. Ayrıca, sitoplazmadan diğer hücre içi kompartımanlarına Zn, Fe, Co, Cd ve Mn iyonlarının taşınımında sorumludur. Diğer bir ifadeyle, "Metal tolerans protein 1 (MTP1)" olarak adlandırılırlar. Genel olarak hücre içinde her yerde bulunan CDF taşıyıcılar, altı transmembran içermekte olup, ağır metalleri sitoplazmadan dışarı aktaran proton antiportörlerini kodlarlar. CDF ailesinin üyelerinin, bakteri, maya, bitki ve memelilerdeki  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  ya da  $Co^{2+}$  katyonlarının homeostazının

korunmasında önemli olduğu gösterilmiştir [174,175]. İlk olarak prokaryotlarda karakterize edilen bu taşıyıcılar, bitkilerde ilk karakterize edilen üyesi ise *A. thaliana*'ya ait çinko taşıyıcı ZAT1' dir ve bitkide temel olarak ZAT genin anlatımı Zn ile doğru ilişkilidir [176]. Hücresel katyon seviyelerinin modüle edilmesindeki rolünün katyon birikimini, katyon toleransını, sinyal iletim basamaklarını, oksidatif stres direncini ve protein dönüşümünü etkilediği gösterilmiştir [177].

### **Katyon/H<sup>+</sup> Antiportörler**

Katyonların alınımı ve taşınımı bitki yaşam döngüsünün tamamlanması, bitki beslenme, büyüme, gelişim ve sinyal iletimi gibi fonksiyonların gerçekleşmesi açısından oldukça önemlidir. Bitkilerde plazma ve organel membranında aktif olan çok sayıda katyon taşıyıcısı mevcuttur [178-180]. Fizyolojik olarak çeşitli bitkilerde karakterize edilen bu antiportörler, genellikle bitkide yerleşim organeli vakuol membranı yani tonoplasttır. Diğer yandan plazma membranı ve kloroplast tilakoid membranı da bu antiportörleri içerebilir. Monovalent ve divalent katyonlar için geçirgen olan bu kanalların, plazma membranında yerleşmiş oldukları ve seçici olmadıkları görülmektedir [181]. Ancak zarlar boyunca tek değerlikli katyonların taşınımında işlev gösterirler. Genellikle, bu üyelerin bitkilerde, hayvanlarda, mantarlarda ve bakterilerde tek değerlikli katyon değişiminden sorumlu olduğu düşünülmektedir [182]. Bu süper ailenin, *Arabidopsis* genomunda tanımlanmış ve bazı üyeleri fonksiyonel olarak karakterize edilmiştir [183]. Diğer bir deyişle "CaCA" protein ailesi olarak adlandırılan katyon/H<sup>+</sup> antiportörleri, yüksek kapasite ve düşük affiniteye özelliğine sahip taşıyıcılardır.

### **P<sub>1B</sub>-tipi ATPaz (HMA' lar)**

P-tipi metal ATPaz' lar hücre zarı boyunca önemli ve potansiyel toksik metallerin (Cu<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Pb<sup>+2</sup>) taşınımından sorumlu olan enzimlerdir . P-tipi ATPaz üst ailesine dâhil bu iyon pompaları, biyolojik membranlar boyunca farklı yüklü substratların pompalanması için aktif ATP enerjisine ihtiyaç duyarlar [132,184]. Böylece ATP hidrolizinin gerçekleştiği ortak enzimatik mekanizmayı membrandan iyon taşınımı, detoksifikasyonu ve kompartımanlaşma için paylaşırlar. Reaksiyon döngüsü sırasında

fosforile bir ara ürün oluşumu ile ayırt edilirler ve bu içerdikleri ara ürünlerden dolayı "P-tipi" olarak tanımlanırlar [16,185,186].

Bakteri, maya, bitki ve insan gibi çeşitli organizmalarda tanımlanan bu taşıyıcılar, hem DNA dizisi hem de fonksiyonel protein benzerliklerine göre birçok alt-familyalar halinde sınıflandırılırlar [187]. Örneğin; bitki ve mantarlardaki H1-ATPaz' lar (tip 3<sub>A</sub>), hayvanlardaki Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPaz' lar, Ca<sup>2+</sup> ATPaz' lar (tip 2<sub>C/D</sub>) ve ağır metal taşıyıcıları (tip 1<sub>B</sub>) örnek olarak verilebilir [188]. Solioz ve Vulpe (1996) tarafından ağır metal P-tipi ATPaz' ları korunmuş intramembranöz sistein-prolin sistein, sistein-prolin-histidin veya sistein-prolin-serin motif (CPx motifi) dizisi içermelerinden dolayı "CPx-ATPaz' lar" olarak adlandırılmıştır [189]. Bu proteinlerin plazma membranında aktif oldukları, sitoplazmadan toksik metal uzaklaştırılmasında işlev gören pompalar olarak nitelendirildikleri, yanı sıra çeşitli hücre içi membranlarda da bulunabildikleri esas alınarak bunların ağır metallerin kompartımanlaşmasından sorumlu olabilecekleri ileri sürülmüştür [79]. Ayrıca metal tradüksiyonunda da rol oynadığı ileri sürülen çoğu CPx-ATPaz' ın, Cu ve Cd taşınımında sorumlu oldukları bilinmektedir. Ancak ağır metal ATPaz' ların fizyolojik rolü henüz tam olarak bilinmemektedir.

Filogenetik analiz sonucu elde edilen verilere göre, taşıma spesifitesi ile ilişkili olarak P<sub>1B</sub> alt ailesi iki alt gruba ayrılır [16,190-193]:

1. Monovalent katyonlar: Cu<sup>+</sup>/Ag<sup>+</sup>
2. Divalent katyonlar: Zn<sup>2+</sup>/Co<sup>2+</sup>/Cd<sup>2+</sup>/Pb<sup>2+</sup>

Ağır metal taşıyıcı olarak P-tipi metal ATPaz' ları da kapsayan P<sub>1B</sub> alt familyası hem ökaryot hem de prokaryotlar da tespit edilmiştir [187]. Transmembran metal taşıma proteinleri, geçiş metal homeostazı için çok önemlidir [16,80] ve P<sub>1B</sub>-ATPaz' lar için anahtar roller tanımlanmıştır [187]. Genellikle plazma membranında lokalizasyon gösteren bu enzimler, fonksiyonlarını gerçekleştirmek için ATP' ye bağımlıdırlar [194]. Elektrokimyasal gradiyente karşı metal iyonlarının ATP hidroliziyle taşınımı oldukça önemlidir [195]. Transport proteinleri ve intraselüler yüksek bağlama kapasiteli bölgeler plazma membranı boyunca metal alınımına aracılık eder. Birçok sınıfı ağır metal taşınımı ile ilişkilidir. Bu gruba dâhil olan metal ATPaz' lar bitkide ağır metal toleransı ve homeostazisini katılırlar [80]. Alt aileleri, ağır metal ATPaz' lar (P<sub>1B</sub>), Ca<sup>2+</sup>-ATPaz' lar (endoplazmik retikulum-tipi Ca<sup>2+</sup>-ATPaz ve otoinhibe Ca<sup>2+</sup>-ATPaz, P<sub>2A</sub> ve P<sub>2B</sub>), H<sup>+</sup>-

ATPaz' lar (otoinhibe  $H^+$ -ATPaz' lar,  $P_{3A}$ ), putativ aminofosfolipid ATPaz' lar (ALA,  $P_4$ ) ve bilinmeyen bir özellik gösteren bir dalı ( $P_5$ ) şeklindedir [196]. Metal taşınım sürecinin işleyişinin anlaşılması, çok ciddi genetik mühendisliği çalışmaları ve özel stratejiler gerektirir.

### **3.5. Bitkide Antioksidan Savunma Sistemi ve Bazı Antioksidan Elemanları**

Çevre kirliliği tüm yaşam biçimleri üzerinde sürekli olarak artan bir stres yaratmaktadır. Kirlilik kaynaklarının her biri bitkiler, hayvanlar ve nihayetinde insan sağlığı üzerinde zarar verici etkileri bulunmaktadır. Ancak bu kirlilik etmenlerinden özellikle toprak veya suya karışan ağır metaller, çevrede kalıcılıkları nedeniyle ciddi bir endişe kaynağıdır. Biyolojik olarak yok edilemeyen bu grup kirleticiler sadece bir oksidasyon durumundan veya organik kompleksinden diğerine dönüşürler [197,198]. Mevcut teknolojiler bu sorunu ortadan kaldırmamakla birlikte gelecek nesillere aktarılmaktadır. Bu sorun fitoremediasyon olarak bilinen nispeten yeni bir teknoloji ile sağlanabilir. Kirlenmiş toprak çökeltiler ve yeraltı suyunun yerinde arıtılması için yeşil bitkilerin ve bunlarla ilişkili mikro biyotaların kullanıldığı bitki bazlı bir biyoremediasyon tekniğidir. Bu teknik için verimli çok sayıda bitki türü tanımlanmış ve özellikler ve metal alım mekanizmaları test edilmiştir [199]. Fitotoksik metallerin bitki tarafından daha yüksek miktarlarda alınımı, birkaç enzimi inhibe edilmesini veya aktive edilmesine neden olabilir [200]. Farklı bitki gruplarında metale karşı tolerans ve duyarlılık gösteren farklı enzimler, stres proteinleri, fitoşelatinler gibi biyokimyasal özellikler işlev görür [201,202]. Yüksek miktarlardaki ağır metallerin bitki dokularına zarar verebileceği olası bir durumda bu mekanizmalar, oksidatif stres uygulayarak serbest radikal üretiminin uyarılmasıdır [203]. Dolayısıyla reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimi, bitkilerde antioksidan savunma sistemini harekete geçirir. Böylece bitki metal stresinin sonucu olarak veya normal metabolik aktiviteleri süresince oluşan toksik oksijen ara ürünlerini aktif bir şekilde detoksifiye etmeye çalışır. Bitkilerde oksidatif strese karşı koruma, süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD), katalazdan (CAT) oluşan enzimatik antioksidanların veya glutatyon, flavonoidler, karotenoidler, askorbat gibi enzimatik olmayan bileşenlerin üretilmesiyle sağlanır [77,204,205].

## Glutasyon

Glutasyon bitkilerde başta oksidatif stres belirteci olmak üzere çok yönlü işlev görür [206,207]. Reaktif oksijen türlerine karşı savunmada [208], hücre içinde ağır metallerin dağılımının engellenmesinde [209] ve ksenobiyotiklerin, oksidikaller ve metal kasyonlarının detoksifikasyonunda [210] fonksiyon görmektedir. İndirgenmiş glutasyon (GSH) formu, glutamil-sisteinil-glisin (c-glu-cys-gly) formüllü bir tripeptit tiyoldür. Düşük molekül ağırlıklı tiyol tripeptide sahip bitki hücrelerinde suda çözünebilen bir antioksidandır [211]. Glutasyonun sahip olduğu tiyol grubu biyolojik ve biyokimyasal fonksiyonlarına göre kimyasal olarak reaktif olan ana gruptur [212]. Bitki dokularında sitozol, endoplazmik retikulum, vakuol, mitokondri, kloroplast, peroksizom gibi hücre kısımlarında bulunmaktadır [213,214]. Moleküler çalışmalarla, glutasyonun gen anlatımında düzenleyici olarak işlev gördüğü belirtilmiştir [215,216], ayrıca yüksek seviyelerdeki ağır metaller bağlayan fitoşelatinlerin öncüsüdür [217] ve GSH konjügasyonunu herbisitler gibi potansiyel olarak tehlikeli ksenobiyotiklerle katalize eden GSH S-transferazlar için de bir substrattır [218]. Bununla birlikte, GSH sentezinin oksidatif stres ile düzenlendiği bildirilmiştir [219].

## Fenolik Bileşikler ve Flavonoidler

Doğal fenolik ve flavonoid bileşikler, en az bir hidroksil grubu taşıyan bir aromatik halka içeren bitki sekonder metabolit grupları ve biyoaktif bileşiklerdir [220,221]. Bitkilerin fenolik bileşikleri iyi bir elektron verici olduklarından oldukça önemlidir, çünkü hidroksil grupları doğrudan antioksidan etkisine katkıda bulunarak, temizleme yeteneği gösterirler [222]. Bitkilerde fenolik bileşikler birkaç kategoriye ayrılmaktadır; bunlar arasında en güçlü antioksidan aktiviteye sahip olan flavonoidler bulunmaktadır [223]. Yapılan araştırmalarda, bitkide flavonoidler, singlet oksijen ve çeşitli serbest radikalleri içeren çoğu oksitleyici molekülün temizleyicisi oldukları gösterilmiştir [224]. Son yıllarda antioksidan aktivitesine sahip fenolik ve flavonoid bakımından zengin doğal besinler sayesinde bitki metabolizmasındaki önemli metabolitlere olan ilgiyi arttırmıştır.

## 4. MATERYAL VE METOT

### 4.1. Materyal

#### 4.1.1. Kullanılan Organizmalar

##### *B. nigra* L. ve *B. juncea* L.

Araştırmada *B. nigra* L. (siyah hardal) Diyarbakır ekotip tohumu Diyarbakır Ergani' den, *B. juncea* L. (kahverengi hardal) tohumu ise Pakistan Araştırma Enstitüsü' nden temin edilmiştir. Bu iki farklı tür, farklı Cu (25, 50, 100, 200, 500 ve 1000) seviyelerinde (3' er tekerrürlü) olmak üzere Uşak Üniversitesi, Bilimsel Analiz ve Uygulama ve Araştırma Merkezi' nde (UBATAM) Moleküler Biyoloji Bölümü' ne ait bitki odasında uygun koşullarda yetiştirilmiştir. Ayrıca araştırmada kullanılan Bakır(II) Sülfat ( $CuSO_4$ ) kimyasalı Sigma firmasından temin edilmiştir.

Araştırmada materyal olarak kullanılan Resim 4.2' de görüldüğü üzere yetiştirilen *B. nigra* L., yüksek oranda biyokütle üretimi, hızlı büyüme oranı, toprak üstü ve hasat edilebilen kısımlarında ağır metalleri biriktirme yeteneği, aynı zamanda yapılacak moleküler çalışmalar için uygulanabilirliğinden, Resim 4.1' de görüldüğü üzere yetiştirilen *B. juncea* L., hızlı büyüme, yüksek biyokütle potansiyel ve yüksek oranda çeşitli metallere karşı tolerans yeteneğinden dolayı tercih edilmiştir.





*B. juncea* L.

Resim 4.1. Yetiştirilen *B. juncea* L. bitkisi



*B. nigra* L.

Resim 4.2. Yetiştirilen *B. nigra* L. bitkisi

#### 4.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar-Test Materyalleri

Çalışmada kullanılan kimyasallar Çizelge 4.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Sıra No	Kimyasal Adı	Marka/Safılık
1	Copper(II) sulfate pentahydrate	Sigma-Aldrich, analitik safılıkta
2	Copper standart solution	Merck, analitik safılıkta
3	Nitric acid	Carlo Erba, analitik safılıkta
4	Perchloric acid	Carlo Erba, analitik safılıkta
5	Hydrochloric acid	Carlo Erba, analitik safılıkta
6	1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roche, analitik safılıkta
7	Tween20	Sigma, analitik safılıkta
8	Potasyum nitrat (KNO <sub>3</sub> )	Sigma, analitik safılıkta
9	Kalsiyum nitrat (Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O)	Sigma, analitik safılıkta
10	Monopotasyum fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma, analitik safılıkta
11	Magnezyum sülfat (MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O)	Sigma, analitik safılıkta
12	Sodyum hidroksit (NaOH)	Sigma, analitik safılıkta
13	Sodyum Karbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck, analitik safılıkta
14	Aleminum Klorür (AlCl <sub>3</sub> )	Merck, analitik safılıkta
15	Sodyum Nitrit (NaNO <sub>2</sub> )	Sigma, analitik safılıkta
16	Metanol	Merck, HPLC saflığında
17	Etanol	Sigma, analitik safılıkta
18	Gallik asit standardı	Sigma, analitik safılıkta
19	Catectin standardı	Merck, analitik safılıkta
20	Folin ciocalteu	Sigma, analitik safılıkta
21	Glutasyon (reduced) standardı	Sigma, analitik safılıkta
22	Monokalsiyumfosfat (Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O)	Sigma, analitik safılıkta
23	Potasyum sülfat (K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Sigma, analitik safılıkta
24	Kalsiyum sülfat dihidrat (CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O)	Sigma, analitik safılıkta
25	% 10 nitrogen (Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O)	Sigma, analitik safılıkta

#### 4.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 4.2' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Çalışmada kullanılan cihazlar ve teçhizatlar

Sıra No	Cihaz Adı	Marka/Model
1	Hassas Terazi	Precisa / LS 220 A SCS
2	±4 °C Buzdolabı	Vestel
3	Ultrasaf Su Cihazı	Millipore / Direct Q-3 UV
4	Su Banyosu	Nüve bath /NB20
5	Soğutmalı Santrifüj	Hettich / Mikro 200R
6	Vorteks	Thermo Scientific
7	Manyetik Karıştırıcı	Thermo Scientific
8	Hotplate	Thermo Scientific
9	Buz Makinesi	EIM-25 EKO
10	Otoklav	Nüve steamart OT 106
11	Real-Time qPCR	Biorad / CFX96 Real time system -C1000 thermal cycler
12	Laminar Flow (Steril Kabin)	ESCO Class II BSC
13	Derin Dondurucu (-20°C)	Arçelik
14	HPLC	Agilent Technology
15	UV-VIS Spektrofotometre	UV-1800 Shimadzu
16	Etüv	Binder
17	Ultrasonik Banyo Cihazı	Wisebath
18	Pipet Tipler (0,5-2 µl, 0,5-100 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl, 1-5 ml)	Thermo Scientific
19	Mikrosantrifüj Tüpleri- P.P- 1,5-2 ml	IsoLab
20	GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit	Thermo Scientific
21	0,2 ml skirted 96-well PCR Plates	Thermo Scientific

## 4.2. Metot

### 4.2.1. Fizyolojik Çalışmalar

#### 4.2.1.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi

*B. nigra* L. ve *B. juncea* L. tohumları, %70' lik ethanolde 30-60 saniye boyunca sterilize edilmiştir. Ardından Tween20 içeren %5' lik sodyum hipoklorür (NaClO) çözeltisi ile 15 dk boyunca muamele edilerek yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra birçok defa deiyonize suya (dH<sub>2</sub>O) tabi tutulmuştur. İşlemler tamamlandıktan sonra, tohum imbibisyonunu sağlamak amacıyla petri kabında 1 saat bekletilmiştir. Tohumların, çimlenme ve fide gelişimleri için kil oranı düşük, en uygun milli steril toprak kullanılmıştır. Her bir saksıya 10 tohum olacak şekilde; 3 litrelik saksılara normal toprak/bahçe toprak (torf) (2:1) şekilde ayarlanan karışıma ekilmiştir. Çimlenme aşamasında tohumların karanlıkta bekletilmesi ve büyüme fazında nemi korumak için tüm saksıların üzeri 3 gün boyunca alüminyum folyo ile kaplanmıştır. 4. gün çimlenen fideler, 16 saat gündüz/ 8 saat gece periyodu, 22-25 °C hava sıcaklığı, % 70/85 bağıl nem oranı ve 10.000 lüks ışık yoğunluğu olacak şekilde ayarlanan uygun koşullar altında iklim odasında doğal ışıklandırma ve düzenli sulamayla yetiştirilmiştir.

Ekimden 2 hafta sonra, bitkilerde gelişimlerin sağlanabilmesi için gerekli besinleri içeren Çizelge 4.3' de görüldüğü üzere haftada üç kez (1/4) oranında seyreltilen her biri Cu içermeyen hoagland besi çözeltisi, iki hafta boyunca tanımlandığı şekilde bitkilere (her bir saksıya 50 ml) uygulanmıştır.

#### 4.2.1.2. Bitkilere Metal Uygulaması

Bu çalışmada, *B. nigra* L. ve *B. juncea* L.' ya esansiyel metal olan, ancak yüksek miktarlarda toksik etki gösterebilen Bakır(II) Sülfat (CuSO<sub>4</sub>) uygulanmıştır. Uygulanan

seviyeler, ön çalışmalar dikkate alınarak ve kaynak tarama sonuçlarına göre belirlenmiştir. Bu nedenle uygulanan farklı Cu seviyeleri kontrol grubu haricinde; 25, 50, 100, 200, 500, 1000 µM olacak şekilde seçilmiştir. İki türde, her bir farklı Cu seviye için 3 lt' lik her bir saksıda bir bitki olacak şekilde belirlenen farklı Cu seviyeleri uygulanmıştır. Her bir saksı için toplam hacmi 200 ml olacak şekilde hazırlanan 1/4 oranındaki hoagland besi çözeltilisine stok CuSO<sub>4</sub> çözeltilisinden (1M) belirlenen miktarlarda CuSO<sub>4</sub> ilave edilerek farklı Cu seviyeleri hazırlanmıştır. Denemelerde 31 günlük bitkilere, farklı Cu seviyelerinde 7 gün boyunca devamlı bir şekilde uygulanmıştır. Cu uygulanmayan kontrol (0) gruplarına ise sadece toplam hacmi 200 ml şeklinde hazırlanan 1/4 hoagland besi çözeltisi uygulanmıştır. Her deney grubu kontrol grubu da dâhil olmak üzere 3' er adet tekerrürlü (*B. nigra* L.: R1, R2, R3 ve *B. juncea* L.: R1, R2, R3) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.3. Bitkilerdeki 1X hoagland solüsyonun bileşim içeriğinin sağlanması [225]

Kimyasal Adı	Formül	Moleküler Ağırlık	Besin çözeltisi litresi başına
Potasyum nitrat	KNO <sub>3</sub>	101.1	1 M' dan 5 ml
Kalsiyum nitrat	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	236.15	1 M' dan 5 ml
Monopotasyum fosfat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.09	1 M' dan 1 ml
Magnezyum sülfat	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	246.47	1 M' dan 2 ml
Mikrobesin stok çözeltisi			Stok çözeltiden 1 ml
Demir şelat	Fe-EDTA		1000 mg/l' den 1-5 ml
<b>Minus Nitrogen</b>			
% 10 nitrogen	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	236.15	1 M' dan 0.75 ml
Monokalsiyum fosfat	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	252	0.05 M' dan 10 ml
Kalsiyum sülfat dihidrat	CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	172.17	0.01 M' dan 200 ml
Potasyum sülfat	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	174.26	0.5 M' dan 5 ml
Mikrobesin stok çözeltisi			Stok çözeltiden 1 ml
Demir şelat	Fe-EDTA		1000 mg/l' den 1-5 ml
<b>Mikrobesin stok çözeltisi</b>			<b>Litre Başına</b>
Borik asit	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		2.86 g
Manganez klorür-4 hidrat	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O		1.81 g
Çinko sülfat-7 hidrat	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O		0.22 g
Bakır sülfat-5 hidrat	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O		0.08 g
%85 Molibdik asit	MoO <sub>3</sub>		0.02 g

#### 4.2.1.3. Bitkilerin Hasat Edilmesi

Kontrol grubu da dâhil olmak üzere belirlenen 25, 50, 100, 200, 500 ve 1000 µM Cu seviyeleri uygulanan bitkiler, yaprak ve kök kısımlarında biriken Cu miktar tayini için hasat edilmiştir. Bitki numuneleri RNA, protein ve atomik absorpsiyon için üç parça halinde gruplandırılmıştır.

İlk olarak kök numuneleri topraktan arındırılmak için iyice dH<sub>2</sub>O ile yıkanarak tüm numuneler kurutma kâğıtlarında Atomik Absorpsiyon Spektroskopik (AAS) analiz için 82 °C' ye ayarlanmış etüvde 72 saat boyunca kurutulmak üzere saklanmıştır. Diğer iki parça moleküler çalışmalar için -20 °C' de muhafaza edilmiştir. Her deney grubu kontrol grubu da dâhil olmak üzere 3' er tekerrürlü (*B. nigra* L.: R1, R2, R3 ve *B. juncea* L.: R1, R2, R3) olacak şekilde ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Kısaca hasat işleminde, her bir tekerrür kendi içinde ele alınarak farklı seviyelerdeki bitki yaprak, gövde ve kök örnekleri biraraya getirilerek gruplandırılmıştır.

#### 4.2.1.4. Bitkilerin Yaprak ve Köklerinde Biriken Cu Miktarı Tayini

Farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. nigra* L. ve *B. juncea* L. bitkilerinin yaprak ve kök kısımlarında biriken Cu' nun tayini için hasat işleminden sonra örneklere asit ile yağ yakma yöntemi uygulanmıştır (Resim 4.3). AAS, gaz halindeki atomların ışık absorpsiyonunun ölçülmesiyle elementlerin miktarının belirlenmesine olanak sağlayan bir yöntemdir. AAS analiz okuması için, 82 °C' de kurutulan bitki numuneleri Memon' un (1980) yöntemi uygulanarak solüsyon haline getirilmiştir [226].

Kısaca hasatı yapılan yaş numuneler 82 °C' de kurutulduktan sonra havan ve tokmak yardımıyla öğütülmüştür. Öğütülen numunelerin hassas terazide tartımları yinelenerek her bir 100 ml' lik erlen mayerlere 500 mg kuru numune olacak şekilde ilave edilmiştir. İlk olarak 500 mg numunelerden her birinin üzerine 5 ml % 96' lık nitrik asit (HNO<sub>3</sub>) kimyasalı ilave edilerek çeker ocakta ısıtıcı tabla üzerinde organik materyal az miktarda kalana kadar nitrik asit ile sindirilmiş ve açık sarı renkte bir çözelti oluşmuştur. Ardından her bir erlen mayerde oluşan açık sarı renkteki çözeltilere 2 ml' lik %50' lik perklorik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) kimyasalı ilave edilmiştir. İlk olarak az miktarda kalan nitrik asit iyice uzaklaştırılmış ve daha sonra perklorik asit ile parçalanmamış organik materyal

oksitlenerek çözeltinin berraklaşması sağlanmıştır. Uygulanan  $\text{HNO}_3$ ' ün  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ' e oranı 2.5:1' dir. Tüm bu yakma işlemi yaklaşık 2 saatlik bir süre zarfında gerçekleşmiştir. İşlem erlen mayerlerde yaklaşık 1 ml materyal kalacak şekilde ve çözelti tam olarak berraklaşmaya kadar devam ettirilmiştir. Numunelerin bulunduğu erlen mayerler yeterince soğuduktan sonra 15 ml' lik falkon tüplerinde 10 ml' ye olacak şekilde  $\text{dH}_2\text{O}$  ilave edilmiştir. Yaş yakma yöntemine tabi tutularak hazırlanan bitki numunelerin Cu miktar tayini Skyray AA-9000 markalı AAS ile gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, elde edilen solüsyonlardan iki farklı türün yaprak ve kök kısımlarında biriken Cu miktarı belirlenmiştir.



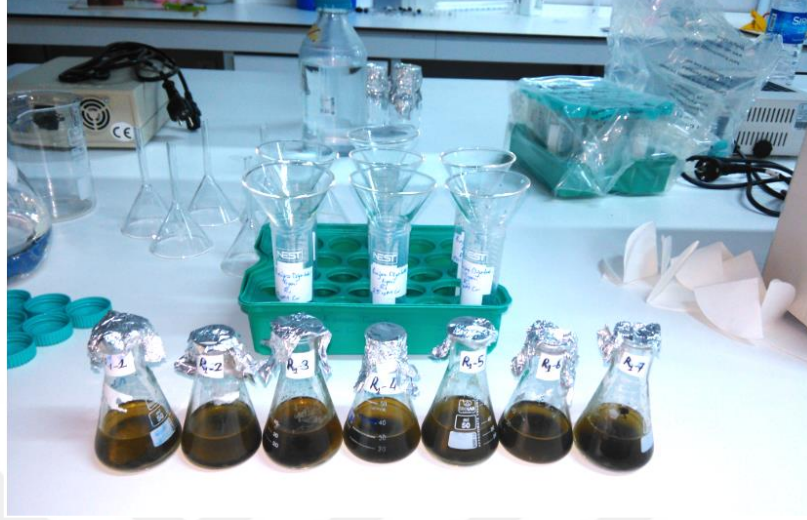
Resim 4.3. Isıtıcı tablada asit ile yaş yakma metodu

## 4.2.2. Biyokimyasal Çalışmalar

### 4.2.2.1. Bitki Ekstraktı Hazırlama

Farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. juncea* L. ve *B. nigra* L.' nin 82 °C etüvde kurutulan yaprak numuneleri öğüldükten sonra hassas terazide 100 mg tartılarak 50 ml' lik erlenlere konulmuştur (Resim 4.4). Üzerlerine 30 ml ethanol solventi ilave edilmiştir. Daha sonra, ultrasonik banyonun sıcaklığı ve süresi çalışma programına göre ayarlanarak, erlenler ultrasonik banyo içerisine yerleştirilmiştir (Resim 4.5). Banyodaki su ile erlen içerisindeki çözelti seviyeleri dikkate alınarak, program sıcaklığı ve süresine uygun bir

şekilde ekstrakte edilmiştir (Resim 4.5). İşlem bittikten sonra, ekstraktlar beyaz bant süzgeç kâğıtlarından süzülerek analiz için +4 °C' de muhafaza edilmiştir (Resim 4.6).

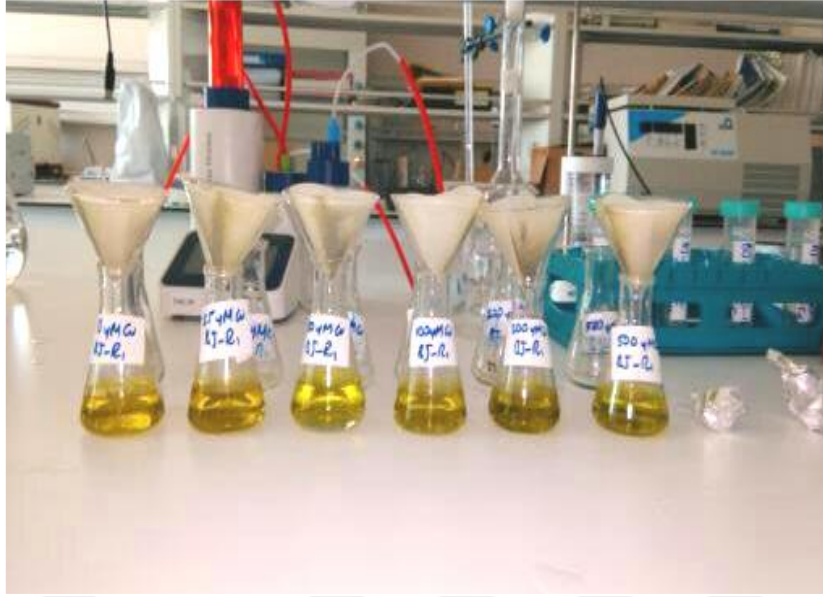


Resim 4.4. Numune ve solventin erlenlere alınması



Resim 4.5. Ultrasonik banyoda ekstraksiyon işlemi





Resim 4.6. Ekstraktların süzülmesi

#### 4.2.2.2. Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Tayini

##### I. Çözeltilerin Hazırlanması

- a. Sodyum karbonat çözeltisi hazırlama: 7,5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  100 ml' lik balon jöjeye konularak ve  $\text{dH}_2\text{O}$  ile çözülerek hacmi yine distile suyla 100 ml' ye tamamlanmıştır.
- b. Folin: Sigma firmasından temin edildiği şekilde kullanılmıştır.

##### II. Deneyin Yapılışı

Toplam fenolik bileşik miktar tayini (TPC), Folin-Ciocalteu testine uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir [227]. İlk olarak önceden hazırlanan metanolik ekstrakt çözeltisi (1 ml) ile Folin-Ciocalteu reaktifi (500  $\mu\text{l}$ ) 15 ml' lik falkon tüpüne ilave edilmiştir. Daha sonra çözelti 5 dakika boyunca karanlık ortamda bekletilmiştir. Ardından  $\text{NaCO}_3$  (% 7,5 w/v) ilave edilerek, tüpler 15 saniye vorteksenerek çözeltinin iyice karışması sağlanmıştır (Çizelge 4.4). Renk değişiminin gerçekleşmesi için parafilm ile sarılan tüpler, yeniden 1 saat karanlık ortamda bekletilmiştir.

İşlem sonunda örneklerin absorbanans okumaları UV-VIS Spektrofotometre cihazında 760 nm dalga boyunda gerçekleştirilerek toplam fenolik içeriği belirlenmiştir. Toplam fenolik içeriği gallik asit kalibrasyon eğrisi göre hesaplanmıştır. Aynı zamanda mg gallik asit eş değeri mg (GAE)/ g kuru numune olarak ifade edilmiştir. Her bir deney grubu kontrol grubu da dâhil olmak üzere 3' er adet tekerrürlü (*B. juncea* L.: R1, R2, R3/ *B. nigra* L.: R1, R2, R3) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.4. Toplam fenolik bileşiklerin tayini için kullanılan reaksiyon karışımı ve miktarları

Reaksiyon Karışımı	Kullanılan Miktar
Numune Ekstraktı	1000 µl
Folin-Ciocalteu	500 µl
Sodyum karbonat	4000 µl
Deiyonize (saf) su	4500 µl
Toplam	10.000 µl

#### 4.2.2.3. Toplam Flavonoid Tayini

### III. Çözeltilerin Hazırlanması

- Sodyum nitrit çözeltisi hazırlama: 5 g NaNO<sub>2</sub> 100 ml' lik balon jøjeye konularak, distile su ile çözüldükten sonra hacmi yine distile suyla 100 ml' ye tamamlanmıştır.
- Sodyum hidroksit çözeltisi hazırlama: 4 g NaOH 100 ml' lik balon jøjeye konularak, distile su ile çözüldükten sonra hacmi yine distile suyla 100 ml' ye tamamlanmıştır.
- Alüminyum klorür çözeltisi hazırlama: 10 g AlCl<sub>3</sub> 100 ml' lik balon jøjeye konularak, distile su ile çözüldükten sonra hacmi yine distile suyla 100 ml' ye tamamlanmıştır.

### IV. Deneyin Yapılışı

Ekstraktın total flavonoid bileşik tayini, alüminyum klorid kolorimetrik yöntemi kullanılarak belirlenmiştir [228]. İlk olarak, 15 ml' lik falkon tüpe ekstrakt (500 µl) ve standart çözeltilere saf su (2200 µl) ve %5' lik NaNO<sub>2</sub> (150 µl) çözeltisi ilave edilmiştir.

İnkübasyon işleminden sonra %10' luk  $AlCl_3$  (150  $\mu$ l) ilave edilerek 6 dakika beklemeye bırakılmıştır. Ardından örnekler %4' lük NaOH (2 ml) ilave edilerek, karışımın nihai hacmi 10 ml olacak şekilde  $dH_2O$  ile tamamlanmıştır (Çizelge 4.5).

Örnekler 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Süre sonunda örneklerin absorban okumaları UV-VIS Spektrofotometre cihazında 510 nm dalga boyunda gerçekleştirilerek toplam flavonoid miktarı belirlenmiştir. Toplam flavonoid içeriği Catectin kalibrasyon eğrisine göre hesaplanmıştır. Aynı zamanda sonuçlar catectin eş değeri mg (CE)/ g kuru numune olarak ifade edilmiştir. Her bir deney grubu kontrol grubu da dâhil olmak üzere 3' er adet tekerrürlü (*B. juncea* L.: R1, R2, R3/ *B.nigra* L.: R1, R2, R3) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.5. Toplam flavonoid tayini için kullanılan reaksiyon karışımı ve miktarları

Reaksiyon Karışımı	Kullanılan Miktar
Numune Ekstraktı	500 $\mu$ l
Deiyonize (saf) su	2200 $\mu$ l
$NaNO_2$	150 $\mu$ l
$AlCl_3$	150 $\mu$ l
NaOH	2000 $\mu$ l
Toplam	5.000 $\mu$ l

#### 4.2.2.4. *B. nigra* L. ve *B. juncea* L. Yapraklarında Glutatyon Tayini

Kontrol ve farklı Cu derişimleri uygulanan iki farklı türün yapraklarından glutatyon içeriğinin belirlenmesi, Newton ve Fahey (1995) göre modifiye edilerek yapılmıştır [229]. Öğütülerek toz haline getirilen her bir 0,05 gr bitki kısmı 1 ml 0.1 M HCl (% 37' lik) ile ekstrakte edilerek, ardından ekstraktlar 4 °C' de 10.000 rpm' de 10 dk santrifüjlenmiştir. Daha sonra elde edilen süpernantlar glutatyon tayininin belirlenmesi için her bir numune viallere aktarılmıştır. Bununla birlikte cihaza ilk numune olarak 200 ppm' lik glutatyon standardı hazırlanmıştır. Daha sonra numuneler cihaza yerleştirilmiştir.

Glutasyon tanımlanması ve farklı Cu derişimleri uygulanan iki türde glutasyon miktarının belirlenmesi, Agilent marka 1260 model kromotografik ile yapılmıştır. HPLC sistemi; auotsampler, quaternary pompa, kolon kompartımanı ve multiwavelenght dedektör içermektedir. Miktar analizleri ACE C-8 kolon ile yapıldı. Mobil faz olarak %99' luk potasyum dihidrojen fosfat ( $H_2KO_4P$ ), %85' lik fosforik asit ( $H_3O_4P$ ),  $dH_2O$  (10:90 V/V) kullanılmıştır. Çizelge 4.6' da görüldüğü üzere HPLC koşulları ile ilgili diğer bilgiler verilmiştir.

Çizelge 4.6. Glutasyon tayini için ayarlanan uygun HPLC koşulları

HPLC Koşulları	
Kolon	C-8 (250 x 4.6 mm)
Mobil Faz	Potasyum dihidrojen fosfat, Fosforik asit, $dH_2O$ (10:90 V/V)
Akış Hızı	0.8 ml/dk
Enjeksiyon Hacmi	50 mikrolitre
Dedektör	UV/VIS 280 nm
Analiz süresi	40 dk

### 4.2.3. Moleküler Çalışmalar

#### 4.2.3.1. Total RNA İzolasyonu

Biyolojik materyallerden RNA' nın saflaştırmasına dayanan bir yöntemdir. Farklı Cu konsantrasyonları ile muamele edilen *B. nigra* L. ve *B. juncea* L. türlerinin hasat işleminden sonra RNA izolasyonu için  $-20\text{ }^{\circ}C$ ' de saklanan yaprak numunelerinden total

RNA Thermo Scientific™ in GeneJET Bitki RNA Saflaştırma Mini Kiti kullanılarak izole edilmiştir. Kite belirtilen talimatlar aşağıdaki gibidir:

1. İlk olarak, -20 °C' de muhafaza edilen bitki numuneleri çözünmeden minimum 0,2 g olacak şekilde tartımları yapılarak homojenizasyon safhasına kadar sıvı azot ile muamele edilmiştir.
2. Steril havan ve havan tokmağı kullanılarak sıvı azot yardımıyla bitki materyali toz haline gelinceye kadar öğütülerek materyal steril mikrosantrifüj tüpe (1.5 ml) aktarılmıştır.
3. Aktarılan materyale 500 µl olacak şekilde bitki RNA lizis solüsyonu ilave edilmiştir. Ekstraktların iyice homojenize olabilmesi için 10-20 s vorteks yapılmıştır.
4. Vortekslenen numune 56 °C' de 3 dakika inkübe edildikten sonra 14.000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüj edilen numunenin supernatant kısmı uzaklaştırılarak yeni steril bir mikrosantrifüj tüpe aktarılmıştır. Aktarılan örneğe 250 µl olacak şekilde % 96' lık etanol ilave edilerek lizat pipet yardımıyla karıştırılmıştır.
6. Etanol eklenen lizat RNA izolasyon kolonuna aktararak 1 dk 11.000 rpm' de santrifüj edilmiştir.
7. Saflaştırma kolonundan geçen sıvı atıldıktan sonra, kalan numunenin yıkanması için 700 µl Yıkama Tamponu 1 (WB1) (tampona kitle belirtildiği gibi etanol ilave edilmiştir) ilave edilmiş ve 12.000 rpm' de santrifüj edilmiştir.
8. Kolondan geçen sıvı tekrar atılarak, kalan numunenin tekrar yıkanması için kolona 500 µl Yıkama Tamponu 2 (WB2) (tampona kitle belirtildiği gibi etanol ilave edilmiştir.) ilave edilerek 12.000 rpm' de 1 dk santrifüj edilmiştir.
9. Kolondan geçen sıvı tekrar atılarak bir önceki aşama tekrar gerçekleştirilerek kolona 500 µl Yıkama Tamponu 2 (WB2) ilave edilerek 14.000 rpm' de 1 dk santrifüj edilmiştir.
10. Yıkama aşamaları tamamlanan kolon, RNaz içermeyen steril mikrosantrifüj tüpe (1.5 ml) aktarılmıştır.
11. RNA' nın ayrılması için, kolona 50 µl nükleaz içermeyen su ilave edilerek 12.000 rpm' de 1 dk santrifüj edilmiştir. Böylece santrifüj yapıldıktan sonra RNA'lar kolondan uzaklaştırılmış ve mikrosantrifüj tüpte birikmesi sağlanmıştır. Kısaca total RNA izolasyonu tamamlanarak, numunelerden elde edilen saflaştırılmış RNA' lar -20 °C' de kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir

#### 4.2.3.2. Total RNA Miktar Tayini

İzole edilen *B.nigra* L. ve *B. juncea* L. örneklerinin total RNA (genomik DNA içermeyen) miktarı ve saflıkları ölçümleri Nanodrop cihazında 260 nm ve 280 nm dalga boylarında okumalarla yapılmıştır. Örneklerin saflık oranlarının (OD260/ OD280) 1,60 ile 2,10 arasında olmasına özellikle dikkat edilerek, uygun RNA konsantrasyon miktarları belirlenmiştir.

#### 4.2.3.3. Ters Transkripsiyon- Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi ve Kontrolü

RNA izolasyonundan sonra, saf hale getirilmiş olan total RNA' lar Thermo Scientific™ markasının RT-qPCR kiti olan Maxima First Strand cDNA sentez kiti kullanılarak DNA komplementleri sentezlenmiştir. cDNA sentezi, ters transkriptaz enzimi aracılığıyla RNA molekülünün DNA' ya dönüşmesi şeklinde gerçekleşen bir işlemdir. Bu işlem, sadece kalıp DNA ile çalışan RT-qPCR için gereklidir. cDNA sentez aşamasında kontaminasyon varlığının kontrolünü sağlamak amacıyla NTC kontrolü hazırlanmış olup, NTC RT-qPCR sürecinde negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Bu nedenle, NTC' ye cDNA' lar hariç cDNA sentezi için gerekli tüm reaktifler ilave edilmiştir. cDNA sentezi, Maxima First Strand cDNA sentez kiti içerisinde mevcut olan tampon ve enzimler dâhil edilerek gerçekleştirilmiştir. Master Mix; polimeraz enzimi, deoksi-nükleozid trifosfat (dNTP)' lar, SYBR Green gibi floresan boyalar dâhil RT-qPCR için gerekli olan tüm bileşikleri içermektedir (Çizelge 4.7). Önceki araştırmaya dayalı olarak ifade edilen referans geni Ubiquitin, kontrol geni olarak kullanılmıştır [230,231].

Çizelge 4.7. Ters Transkripsiyon-Komplementer (Tamamlayıcı) DNA (cDNA) sentez kitinde mevcut kullanılan tampon ve enzim hacimleri

<b>Kullanılan Tampon</b>	<b>Miktar</b>
5X Reaction Mix	4 uL
Maxima Enzyme Mix	2 uL
Template RNA	1-5 uL
Water, nuclease-free	20' e tamamlanır
Total Volume	20 uL

Çizelge 4.7' de görüldüğü üzere, toplam hacmi 20 uL olacak şekilde hazırlanan karışım hafifçe çalkalanmış ve daha sonra santrifüjlenmiştir. Daha sonra, örnekler 25 °C' de 10 dk inkübe edilir ve enzim inhibisyonu için 50 °C' de 15 dk bekletilir. Son aşama olarak reaksiyonun sonlandırmak için 85 °C' de 5 dk inkübasyon yapılmıştır.

Çizelge 4.8. Ters Transkripsiyon-Komplementer (Tamamlayıcı) DNA (cDNA) sentezi için gerekli inkübasyon sıcaklıkları ve süreleri

<b>Sıcaklık</b>	<b>İnkübasyon Süresi</b>
25 °C	10 dk
50 °C	15 dk
85 °C	5 dk
-20 °C	1 hafta

Çizelge 4.8' de görüldüğü üzere, saf haldeki total RNA' dan cDNA sentezi için gerekli inkübasyon sıcaklıkları ve süreleri, ısıtıcı blok (heating block) cihazında ayarlanarak gerçekleştirilmiştir. Tüm cDNA' lardan pozitif sonuç elde edildikten sonra, örnekler bir sonraki aşama olan kantitatif RT-PCR' da kullanılmak üzere -20 °C' de saklanmıştır.

#### 4.2.3.4. Primer Tasarımı

Tasarlanan primerlerin *B. juncea* L. ve *B. nigra* L.' ya uygun olması ve düzgün çalışması dikkate alınarak, model bitki *A. thaliana* L. bitkisine ait gen dizilerinin tümü ile *B. juncea* (AABB) ve yakın ilişkili *B. rapa* (AA) ve *B. nigra* (BB)' nin NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) EST dizileri ve ClustralX veri tabanından elde edilen gen dizilerine benzer diziler seçilmiştir. Daha sonra primerler Primer3 programı kullanılarak tasarlanmıştır [232,233].

Çizelge 4.9' da görüldüğü üzere, kullanılan primerler tasarlanırken, GC içeriğinin % 45-55 arasında olmasına ve erime sıcaklığına (55-60 °C) dikkat edilmiştir.

Çizelge 4.9. Gen anlatımında kullanılmak üzere *B. nigra* L. ve *B. juncea* L. türleri için tasarlanan primerler (Baz dizileri ve GC % değerleri)

Primer	Baz Dizileri 5'-3'	GC (%)
BR-HMA1-F	GGCAGCTTACTTGGCTTTCC	55
BR-HMA1-R	AAGTCGAAAGTGGGTGGTGG	52
BR-HMA3-F	TTCTCCGTCATCGTCCCTTC	55
BR-HMA3-R	GCAGCTTCTGTGTAATCCTCC	52
BJ-UBQ9-F	GAAGACATGTTCCATTGGCA	45
BJ-UBQ9-R	ACACCTTAGTCCTAAAAGCCACCT	46

#### 4.2.3.5. Gerçek Zamanlı (Real Time/RT) qPCR

Hazırlanan cDNA, gerçek zamanlı PCR için doğrudan kullanılmıştır. Bu yöntem, DNA kalıbının hedef bölgesi sadece tek bir molekülden milyonlarca kopya üretilerek çoğaltmak için kullanılmaktadır. RT-qPCR, DNA' nın çoğaltımını ve ürünlerini tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan çok yakın bir zamandır uygulanan bir yöntemdir. Gen



anlatım analizini sağlayan bu metot geleneksel PCR yöntemi ve gen analizini birlikte kapsamaktadır. PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma teknolojidir.

Spesifik olmayan çift zincirli DNA' nın çoğaltımında "SYBR Green I" yöntemi kullanılır. Bu yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA' ya bağlandığında çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak "real-time" PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı artar. Çoğaltımın başında reaksiyon karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve "SYBR Green I" boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışımaya yapar. Primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA' nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. Başlangıçtaki döngü boyunca sinyal zayıf olabilir ancak ürün miktarı arttıkça floresan miktarı hızla artar. Böylece bu artış "real-time" cihazının monitöründen izlenebilir.

Bu araştırma farklı Cu derişimleri uygulanan *B. juncea* L. ve *B. nigra* L.' nin yapraklarında HMA1 ve HMA3 geninin anlatım düzeylerindeki farklılığı belirlemek için RT-qPCR kullanılmıştır. İlk olarak kontrol ve farklı Cu derişimleri uygulanan bitki yapraklarına ait izole edilen RNA' dan cDNA örnekleri hazırlanmıştır. Daha sonra, kitteki (Thermo scientific) talimatlarına uygun şekilde gen anlatımı için hazır hale getirilmiştir. RT-qPCR verileri de "SYBR Green I" boyası kullanılarak gözlenmiştir.

Reaksiyonda hazırlanan cDNA örnekleri, hazırlanan master mix, polimeraz enzimi, dNTP' ler, SYBR Green gibi floresan boyalar karışımı 96 kuyucuklu plâtelere yüklenerek BioRad CFX96 sisteminde gerçekleştirilmiştir [234].

Çizelge 4.10. Real Time qPCR' da gen anlatımı için kullanılan malzemeler ve miktarları

<b>Kullanılan malzemeler</b>	<b>uL</b>
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X)	13
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
cDNA	4
Water, nuclease-free	6
Total Volume	25 uL

#### 4.2.4. Biyoinformatik Yaklaşımlar

##### 4.2.4.1. *A. thaliana* ve Diğer *Brassica* Türleri Arasındaki İlişkinin Biyoinformatik Yaklaşımlarla Araştırılması (Çoklu Dizi Hizalama-Filogenetik Ağaç)

Biyoinformatik bilişim teknolojileri ya da mevcut tüm bilgisayar uygulamaları kullanılarak biyolojik süreçlerin anlaşılması, çözülmesi, elde edilen biyolojik verilerin oluşturulması ve saklanması için veritabanlarının kurulması ve kullanılması şeklinde ortaya çıkan yeni multidisipliner bir bilim dalıdır. Multidisipliner olması başta bilişim, bilgisayar teknolojileri, istatistik, matematik ve moleküler biyoloji olmak üzere çeşitli dallarda elde edilen verilerin oluşturulması, depolanması ve en önemlisi birlikte değerlendirilme analizlerini kapsamaktadır. Kısaca araştırmacılar tarafından tespit edilen yeni gen, nükleotit ya da protein bilgilerinin veritabanlarına depolanması ve bunların diğer araştırmacıların kullanımına açık hâle getirilmesi şeklinde açıklanmaktadır. Depolanan spesifik gen, nükleotit, protein bilgilerinin bulunduğu FASTA formatı, BLAST analizi ve bunlar gibi birçok biyoinformatik araç mevcuttur. Bu araçlar sayesinde çeşitli organizmaların nükleotit dizilimleri, makromoleküllerin yapıları hakkında bilgi edinilebilir, organizmaların nükleotit dizilimleri karşılaştırılabilir, protein yapı ve işlev

modelleri oluşturulabilir. Biyoinformatiğin en önemli veritabanı olan NCBI, istenilen birçok veriyi sunabilmektedir.

Bu araştırmaya ön çalışma olan biyoinformatik verilerinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda yön verilmiştir. İlk olarak, organizmaların sınıflandırmasında moleküler bulgu olarak kullanılan tüm P<sub>1B</sub>-ATPaz' ların protein, gen nükleotit dizileri çeşitli web sitelerinden elde edilmiştir. İşlemler herkese açık çeşitli online veri kaynakları: "https://www.arabidopsis.org/, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/, http://www.uniprot.org/, http://aramemnon.uni-koeln.de/" kullanılarak yapılmıştır. Bununla birlikte gen, nükleotit ve proteinlere spesifik bilgilerin depolandığı FASTA formatı ve istenilen dizilerin benzerlikleri "protein-protein BLASTP" programı kullanılarak incelenmiştir.

Araştırma materyali olarak kullanılan başta *B. juncea* L., *B. nigra* L. olmak üzere diğer *Brassicacea* türleri *A. thaliana*, *A. halleri* ve *N. caerulescens*' de HMA1-HMA4' ün protein dizilimleri Uniprot ve NCBI online veritabanından elde edilmiştir. Çoklu dizi hizalamaları (MSA), varsayılan ayarlar kullanılarak, Avrupa Biyoinformatik Enstitüsü'nün (EBI) websitesinde yer alan "Clustral Omega" yazılımı kullanılarak oluşturulmuştur [235]. MSA; gen, nükleotit ve protein dizilimleri arasındaki benzerlikleri ve değişiklikleri incelemek amacı ve evrimsel ilişkilerinin oluşturulmasında yararlanılan paha biçilemez bir biyoinformatik araçtır [236-238]. Clustral Omega, Clustral programının son sürümüdür. Daha önceki sürümlerinden birisi olan Clustral W, en yaygın kullanılan MSA yazılımıdır ve 35.000' den fazla alıntı içermesiyle biyoloji tarihinde en geniş çapta alıntı yapılmış program olarak tanımlanmaktadır. Program ilerleme gösteren bir hizalama yöntemi ile bütün dizileri tek tek hizalamaktadır [236,239,240]. Bununla birlikte, HMA proteinleri arasındaki evrimsel ilişki ve moleküler dizilimlerin filogenetik analizi önemli bir web hizmeti olan Phylogeny.fr kullanılarak bir filogenetik ağaç oluşturularak belirlenmiştir. Hizmet varsayılan ayarlarda kullanılmıştır [241,242].

### 4.3. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz

Sonuçlar ortalama standart sapma şeklinde verilmiş olup, IBM SPSS 23.0 for Windows paket programında, grup ortalamalarının karşılaştırılması saptanmıştır. Anlamlılık  $p < 0,05$  olarak belirlenmiştir.

## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 5.1. Fizyolojik Çalışma Bulguları

#### 5.1.1. Bitkide Biriken Bakır (Cu) Miktarı

31 gün boyunca toprak ortamında yetiştirilen *B. juncea* L. ve *B. nigra* L.' ya 7 gün boyunca farklı Cu seviyelerde (25, 50, 100, 200, 500 ve 1000  $\mu$ M) uygulanmıştır. Geçen süre zarfında kontrol grubu bitkilerle farklı Cu seviyelerde uygulanan bitkiler arasında herhangi bir fizyolojik değişiklik gözlenmemiştir. *B. juncea* L. ve *B. nigra* L.' nin kontrol grubu ve farklı Cu seviyeleri uygulanan grupların gövde ve köklerinin görünüşleri aşağıda verilmiştir (Bkz. Resim 5.1, Resim 5.2, Resim 5.3, Resim 5.4).



*B. nigra* L./R1/0  $\mu$ M Cu



*B. nigra* L./R1/25  $\mu$ M Cu



*B. nigra* L./R1/50 µM Cu



*B. nigra* L./R1/100 µM Cu



*B. nigra* L./R1/200 µM Cu



*B. nigra* L./R1/500 µM Cu



*B. nigra* L./R1/1000 µM Cu

Resim 5.1. 7 gün boyunca kontrol grubu ve farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. nigra* L.'nin gövde görünümü (1. Tekerrür)



*B. nigra* L.  
R1  
0 µM Cu

*B. nigra* L.  
R1  
25 µM Cu

*B. nigra* L.  
R1  
50 µM Cu



*B. nigra* L.  
R1  
100 µM Cu

*B. nigra* L.  
R1  
200 µM Cu

*B. nigra* L.  
R1  
500 µM Cu

*B. nigra* L.  
R1  
1000 µM Cu

Resim 5.2. 7 gün boyunca kontrol grubu ve farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. nigra* L.'nin kök kısımlarının genel görünümü (1. Tekerrür)



*B. juncea* L.  
R1  
0 μM Cu

*B. juncea* L.  
R1  
25 μM Cu

*B. juncea* L.  
R1  
50 μM Cu

*B. juncea* L.  
R1  
100 μM Cu



*B. juncea* L.  
R1  
200 μM Cu

*B. juncea* L.  
R1  
500 μM Cu

*B. juncea* L.  
R1  
1000 μM Cu

Resim 5.3. 7 gün boyunca kontrol grubu ve farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. juncea* L.'nin gövde kısımlarının genel görünümü (1. Tekerrür)



*B. juncea* L. R1 0 µM Cu      *B. juncea* L. R1 25 µM Cu      *B. juncea* L. R1 50 µM Cu      *B. juncea* L. R1 100 µM Cu



*B. juncea* L. R1 200 µM Cu      *B. juncea* L. R1 500 µM Cu      *B. juncea* L. R1 1000 µM Cu

Resim 5.4. 7 gün boyunca kontrol grubu ve belirlenen farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. juncea* L.'nin kök kısımlarının genel görünümü (1. Tekerrür)



### 5.1.2. Bitkide Biriken Bakır (Cu) Miktarı Tayini

7 gün boyunca farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. nigra* L. ve *B. juncea* L.' ya ait kök ve yapraklarda biriken Cu miktarı belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 5.1, Çizelge 5.2).

Çizelge 5.1. Kontrol grubu ve farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. juncea* L.' nin yaprak ve köklerinde biriken Cu miktarı (ort. Cu $\pm$ SH) ( $\mu\text{g/g}^{-1}$  kuru ağırlık)

Cu ( $\mu\text{M}$ )	<i>B. juncea</i>	
	Yaprakta biriken ort. Cu miktarı ( $\mu\text{g/g}^{-1}$ ) $\pm$ SH	Kökte biriken ort. Cu miktarı ( $\mu\text{g/g}^{-1}$ ) $\pm$ SH
0	11,33 $\pm$ 5,33	3,34 $\pm$ 0,98
25	26,28 $\pm$ 4,36	41,63 $\pm$ 8,81
50	28,60 $\pm$ 1,65	17,44 $\pm$ 1,33
100	33,20 $\pm$ 2,03	27,24 $\pm$ 2,96
200	32,71 $\pm$ 3,39	38,11 $\pm$ 6,37
500	66,17 $\pm$ 7,03	91,82 $\pm$ 6,12
1000	77,59 $\pm$ 3,04	243,81 $\pm$ 13,54

Çizelge 5.2. Kontrol grubu ve farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. nigra* L.' nin yaprak ve köklerinde biriken Cu miktarı (ort. Cu $\pm$ SH) ( $\mu\text{g/g}^{-1}$  kuru ağırlık)

Cu ( $\mu\text{M}$ )	<i>B. nigra</i>	
	Yaprakta biriken ort. Cu miktarı ( $\mu\text{g/g}^{-1}$ ) $\pm$ SH	Kökte biriken ort. Cu miktarı ( $\mu\text{g/g}^{-1}$ ) $\pm$ SH
0	23,92 $\pm$ 4,83	9,81 $\pm$ 0,81
25	75,63 $\pm$ 2,6	5,77 $\pm$ 0,67
50	97,00 $\pm$ 5,71	12,91 $\pm$ 2,66
100	166,52 $\pm$ 8,55	39,87 $\pm$ 1,89
200	182,25 $\pm$ 7,71	14,31 $\pm$ 1,56
500	380,40 $\pm$ 4,12	12,24 $\pm$ 0,72
1000	1073,91 $\pm$ 9,02	289,67 $\pm$ 6,97

*B. nigra* L. ağır metallere karşı toleranslı bir türdür ve ağır metallere kirlenmiş alanlarda yetişebildiği gibi bu metalleri kökte depolayabilme yeteneğine de sahiptir [231,243]. Bununla birlikte, *B. juncea* L., toprak üstü kısımlarında yüksek biyokütle ve metal miktarı içerebilen bir türdür [244]. Bu çalışma 7 gün boyunca farklı seviyelerdeki (25, 50, 100, 200, 500 ve 1000  $\mu\text{M}$ )  $\text{CuSO}_4$  çözeltisi uygulanarak, her iki türünde kök ve

yapraklarda biriken Cu miktarı AAS analiziyle tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 5.1., Çizelge 5.2.). *B. nigra* L.' nin yapraklarında biriken Cu miktarı, kökte biriken Cu miktarına göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Özellikle bu bitkinin 1000 µM Cu' da yapraklarında 1073,91 µg/g<sup>-1</sup> biriktirdiği, kök kısmında ise 289,67 µg/g<sup>-1</sup> biriktirdiği (yaklaşık 11 mg/kg) belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 5.2). *B. juncea* L.' nin ise kök kısımlarında biriken Cu miktarı, yaprak kısmına göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. Özellikle 1000 µM Cu' da *B. juncea* L.' nin köklerin 243,81 µg/g<sup>-1</sup> biriktirdiği, yapraklarında ise 77,59 µg/g<sup>-1</sup> biriktirdiği belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 5.1). Baker ve ark. (1994), bitkilerin gövdesinde 1000 mg/kg' den daha fazla miktarda Cu' nun toksik olabileceğini ve bünyesine alabilen bitkileri de metal akümülatörü olarak tanımlamıştır [69]. *B. nigra* L.' nin yaprak ve köklerinde toplam Cu miktarı yükek bir tür olduğundan metal akümülatördür. Sonuç olarak, iki türünde Cu' ya karşı toleranslı olduğu ve bunların Cu' yu bünyelerinde biriktirebildikleri, bununla birlikte *B. nigra* L., *B. juncea* L.' ya göre toprak üstü kısmında Cu' yu daha fazla biriktirdiği gözlemlenmiştir. *B. nigra* L. ve *B. juncea* L. türleri karşılaştırıldığında, her iki türünde köklerinde saptanan Cu miktarı 1000 µM konsantrasyonda önemli bir artış göstermiştir (p<0.05). *B. nigra* L.' nin köke nazaran yapraklarında fazla Cu birikiminin olduğu gözlenmiştir. Özellikle *B. nigra* L. yapraklarında saptanan Cu miktarları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (p<0,05).

Bitkilerde biriken Cu miktarı belirlendikten sonra, bitkilerin yapraklarının Cu stresine karşı verdiği tepki için fenolik, flavonoid bileşik miktarları, daha sonra da önemli antioksidan olan glutatyon aktivitesi araştırılmıştır.

## 5.2. Biyokimyasal Bulgular

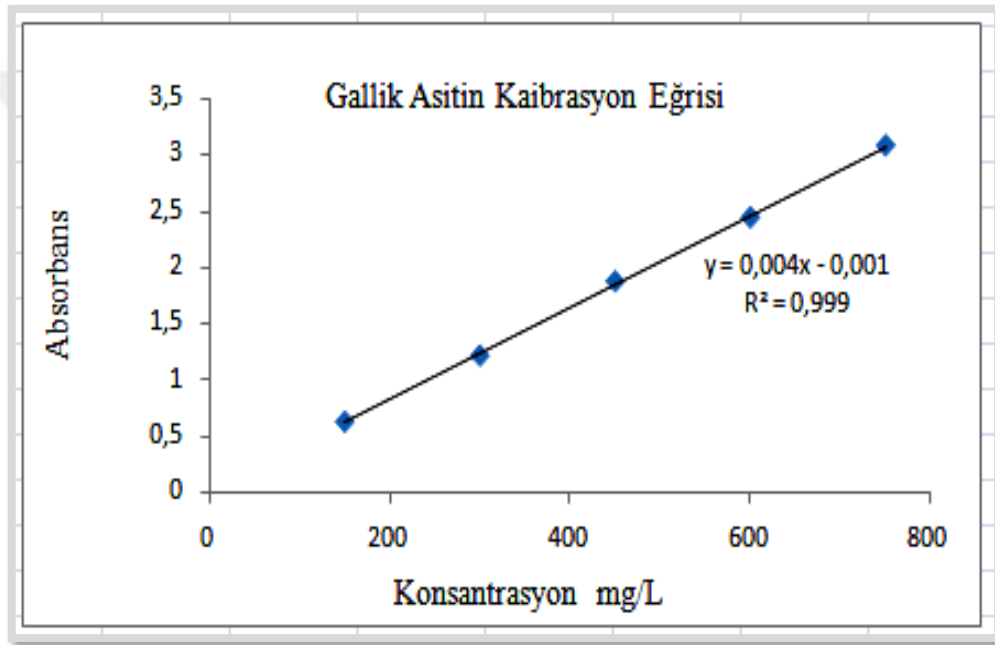
### 5.2.1. *B. juncea* L. ve *B. nigra* L. Yapraklarında Toplam Fenolik Madde Miktarları

Farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. juncea* L. ve *B. nigra* L. yaprak numunesi ethanol solventi ile ekstrakte edilerek, ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarı UV-VIS Spektrofotometresi ile belirlenmiştir. Analitik metodun validasyonu için hazırlanan 50, 100, 150, 200 ve 250 ppm konsantrasyonlarında hazırlanan gallik asit standart solüsyonlarının UV-VIS Spektrofotometre de ölçülen absorbans değerleri Çizelge 5.3' de verilmiştir. Değerlerden elde edilen doğrusallık grafiği Şekil 5.1' de verilmiştir. Toplam

fenolik madde miktarları gallik asit grafiğinden yararlanılarak belirlenmiştir. Farklı Cu seviyelerinde her iki türde de toplam fenolik miktarlar arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Sonuçlar sırasıyla Çizelge 5.4' de verilmiştir.

Çizelge 5.3. Fenolik standartlarının konsantrasyonları ve absorpsiyon sonuçları

Konsantrasyon Ppm	50	100	150	200	250
Absorbans	0,206	0,403	0,623	0,813	1,027



Şekil 5.1. Toplam fenolik madde tayini için gallik asit doğrusallık grafiği

Çizelge 5.4. Farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. nigra* L. ve *B. juncea* L.' da ort. toplam fenolik madde miktarı (ort.±SH)

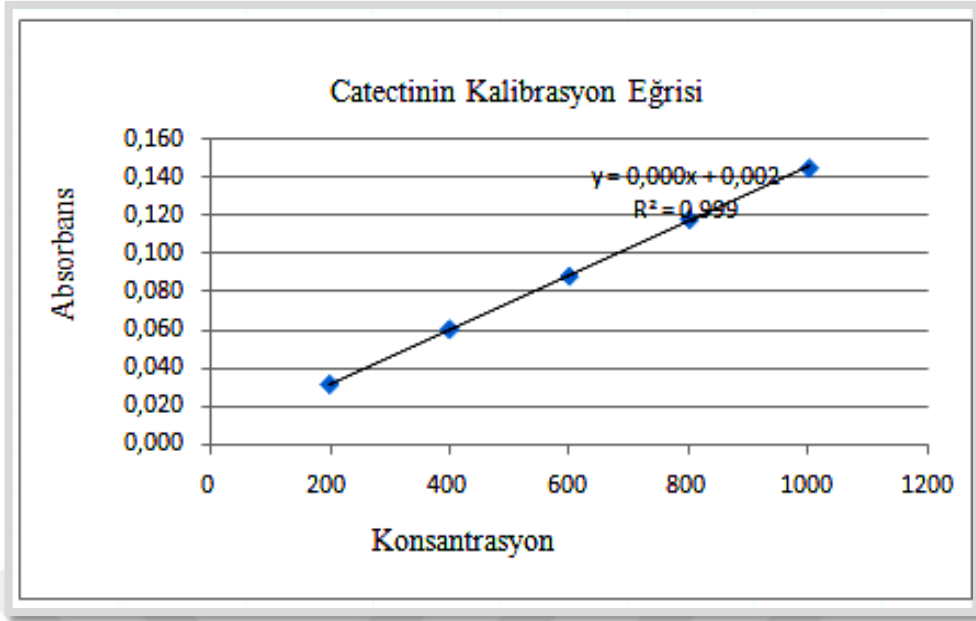
<b>Konsantrasyon Cu (µM)</b>	<b><i>B. nigra</i> ort. toplam fenolik içerik mg GAE/ g±SH</b>	<b><i>B.juncea</i> ort. toplam fenolik içerik mg GAE/ g±SH</b>
<b>0</b>	31,6±0,13	27,7±0,73
<b>25</b>	40,2±0,42	29,8±0,42
<b>50</b>	42,6±0,96	31,4±0,30
<b>100</b>	43,2±0,12	30,7±0,31
<b>200</b>	32,5±0,19	33,2±0,45
<b>500</b>	32,2±0,59	32,0±0,20
<b>1000</b>	35,9±0,48	34,5±0,90

#### 5.2.2. *B. juncea* L. ve *B. nigra* L. Yapraklarında Toplam Flavonoid Madde Miktarı

Farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. juncea* L. ve *B. nigra* L. yaprakları etanol solventi ile ekstrakte edilerek, ekstraktlardaki toplam flavonoid madde miktarı UV-VIS Spektrofotometresi ile belirlenmiştir. Toplam flavonoid madde miktarları catectin grafiğinden yararlanılarak belirlenmiştir. Analitik metodun validasyonu için hazırlanan 100, 200, 300, 400 ve 500 ppm konsantrasyonlarında hazırlanan catechin standart solüsyonlarının UV-VIS Spektrofotometrede ölçülen absorbans değerleri Çizelge 5.6' de verilmiştir. Değerlerden elde edilen doğrusallık grafiği Şekil 5.2' de verilmiştir. Farklı Cu seviyelerinde her iki türde de toplam flavonoid miktarları arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Elde edilen sonuçlar, Çizelge 5.7' de verilmiştir.

Çizelge 5.5. Flavonoid standartlarının konsantrasyonları ve absorbans sonuçları

<b>Konsantrasyon ppm</b>	100	200	300	400	500
<b>Absorbans</b>	0,016	0,030	0,044	0,059	0,073



Şekil 5.2. Toplam flavonoid madde tayini için catectin doğrusallık grafiği

Çizelge 5.6. Farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. nigra* L. ve *B. juncea* L.'nin ort. toplam flavonoid madde miktarı (ort.±SH) (TFC mg Cateceq/ g)

Konsantrasyon Cu (µM)	<i>B. nigra</i> ort. toplam flavonoid içerik TFC mg Cateceq/ g±SH	<i>B. juncea</i> ort. toplam flavonoid içerik TFC mg Cateceq/ g±SH
0	136,90±6,76	176,90±7,89
25	150,80±2,11	164,80±4,85
50	171,30±3,69	162,00±4,76
100	168,90±2,75	182,40±3,54
200	139,20±1,80	149,90±4,05
500	154,90±5,04	128,00±9,38
1000	169,50±1,97	157,00±4,95

### 5.2.3. *B. juncea* L. ve *B. nigra* L. Yapraklarında Glutasyon Miktarı

Farklı Cu seviyelerinde 7 gün boyunca maruz bırakılan *B. juncea* L. ve *B. nigra* L. yapraklarında glutasyon miktarı Çizelge 5.8' de verilmiştir.

Cu' nun farklı seviyeleri uygulanan *B. juncea* L. ve *B. nigra* L. yapraklarında glutasyon miktarında önemli miktarda artış gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). *B. juncea* L.' da en fazla artış 25, 50, 100 ve 200  $\mu\text{M}$  Cu seviyelerinde gözlenirken, *B. nigra* L.' da tüm Cu seviyelerinde artış gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 5.8). *B. juncea* L.' da 500 ve 1000  $\mu\text{M}$  Cu' da diğer Cu seviyelerine göre azalma saptanmıştır. Yapraklardaki glutasyon içeriği farklı Cu uygulamalarında değişmiştir ve farklı Cu seviyelerindeki uygulamalar ile kontrol arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir ( $p<0.05$ ).

Çizelge 5.7. Farklı Cu derişimleri uygulanan *B. nigra* L. ve *B. juncea* L.' nin ort. glutasyon miktarı (ort. $\pm$ SH)( $\mu\text{g/g}^{-1}$ )

Konsantrasyon Cu ( $\mu\text{M}$ )	<i>B. nigra</i> ort. glutasyon ( $\mu\text{g/g}$ ) $\pm$ SH	<i>B. juncea</i> ort. glutasyon ( $\mu\text{g/g}$ ) $\pm$ SH
0	238,43 $\pm$ 1,16	288,29 $\pm$ 0,26
25	260,24 $\pm$ 1,46	458,37 $\pm$ 0,32
50	312,11 $\pm$ 0,23	470,69 $\pm$ 1,34
100	379,85 $\pm$ 0,61	529,45 $\pm$ 0,02
200	318,75 $\pm$ 1,22	458,56 $\pm$ 1,32
500	378,07 $\pm$ 0,48	279,51 $\pm$ 0,35
1000	386,92 $\pm$ 0,46	384,14 $\pm$ 0,98

### 5.3. Moleküler Bulgular

#### 5.3.1. *B. nigra* L. ve *B. juncea* L. Yapraklarında Total RNA Miktarı

7 gün boyunca farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. nigra* L. ve *B. juncea* L. yapraklarının total RNA izolasyonu, ThermoScientific RNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolasyonu takiben, NanoDrop spektrofotometre de yapılan ölçümler

sonucunda, elde edilen total RNA saflık dereceleri (OD260/ OD280) 1,8 ile 2,2 arasında saptanmıştır. Çizelge 5.9' da verildiği üzere elde edilen ölçümlerin moleküler çalışma açısından uygunluğu belirlenmiştir.

Çizelge 5.8. 7 gün boyunca farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. nigra* L. ve *B. juncea* L.' da tüm seviyelerine ait total RNA saflık miktarları

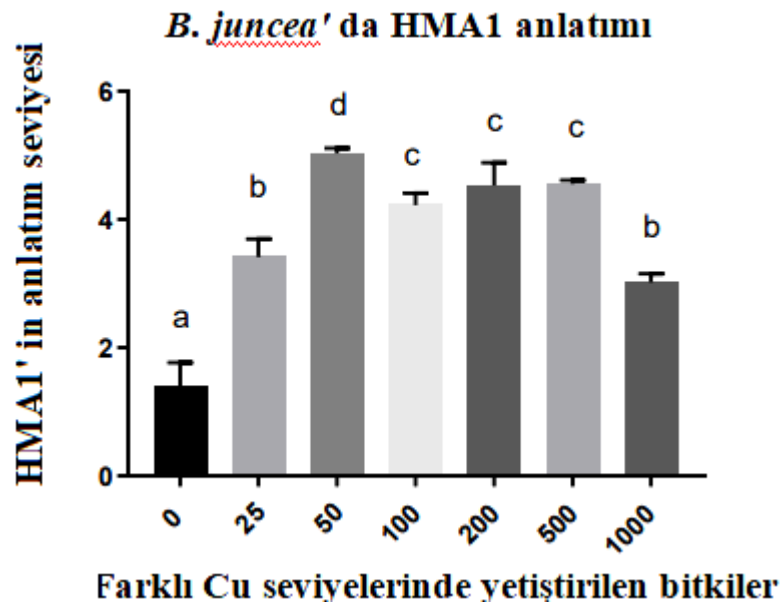
<b>Cu uygulaması µM</b>	<b>A260</b>	<b>A280</b>	<b>A260/ A280</b>	<b>ng/ µl</b>
<b><i>B. nigra</i> 0 (kontrol)</b>	0,467	0,222	2,10	19
<b><i>B. nigra</i> 25</b>	0,398	0,185	2,16	16
<b><i>B. nigra</i> 50</b>	1,098	0,523	2,10	15,6
<b><i>B. nigra</i> 100</b>	0,873	0,412	2,12	34,9
<b><i>B. nigra</i> 200</b>	0,666	0,308	2,16	26,6
<b><i>B. nigra</i> 500</b>	0,430	0,217	1,98	17,2
<b><i>B. nigra</i> 1000</b>	0,430	0,224	1,92	17,2
<b><i>B. juncea</i> 0</b>	0,749	0,354	2,12	30,0
<b><i>B. juncea</i> 25</b>	1,445	0,675	2,14	57,8
<b><i>B. juncea</i> 50</b>	0,302	0,149	2,03	13,4
<b><i>B. juncea</i> 100</b>	1,089	0,520	2,09	43,5
<b><i>B. juncea</i> 200</b>	0,184	0,085	2,16	7,3
<b><i>B. juncea</i> 500</b>	0,146	0,203	2,05	16,6
<b><i>B. juncea</i> 1000</b>	0,458	0,220	2,08	18,3

### 5.3.2. Farklı Cu Seviyeleri Uygulanan *B. nigra* L. ve *B. juncea* L. Yapraklarında R-T qPCR Kullanılarak HMA1 ve HMA3 ' ün Anlatım Profilleri

#### 5.3.2.1. *B. juncea* L. Yapraklarında HMA1' in Anlatım Profili

Farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. juncea* L.' da HMA1 anlatım profili RT-qPCR ile analiz edilmiştir. HMA1 anlatım profili Şekil 5.3' te verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, yaprakta en yüksek HMA1 anlatımının 50 µM Cu' da olduğu gözlemlenirken, bu genin anlatımında 100, 200, 500 µM Cu' da, 50 µM Cu' ya nazaran biraz azalma gözlenmiş olup,

en düşük ve en önemli azalmanın ise 1000  $\mu\text{M}$  Cu' da olduğu saptanmıştır (Bkz. Şekil 5.3). Kontrol grubuna kıyasla 50  $\mu\text{M}$  Cu' ya kadar artan Cu seviyesine bağlı olarak HMA1 anlatım seviyesi de artış göstermiştir, sonuç olarak 50  $\mu\text{M}$  Cu' dan daha yüksek seviyelerde bu genin anlatım seviyesinde önemli bir değişiklik olmadığı ve yüksek Cu seviyeleri karşı tolere olduğu gözlenmiştir. Ancak diğer seviyeleri nazaran 1000  $\mu\text{M}$  Cu' da önemli derecede inhibe olduğu saptanmıştır ( $p < 0.05$ ). Cu' nun uygulanan bütün seviyeleri kontrol grubuna göre farklılık göstermiş olup, bunlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Uygulanan Cu seviyeleri ve HMA1 anlatım seviyeleri arasında istatistiksel farklılık  $p < 0.05$  düzeyinde önemlidir.



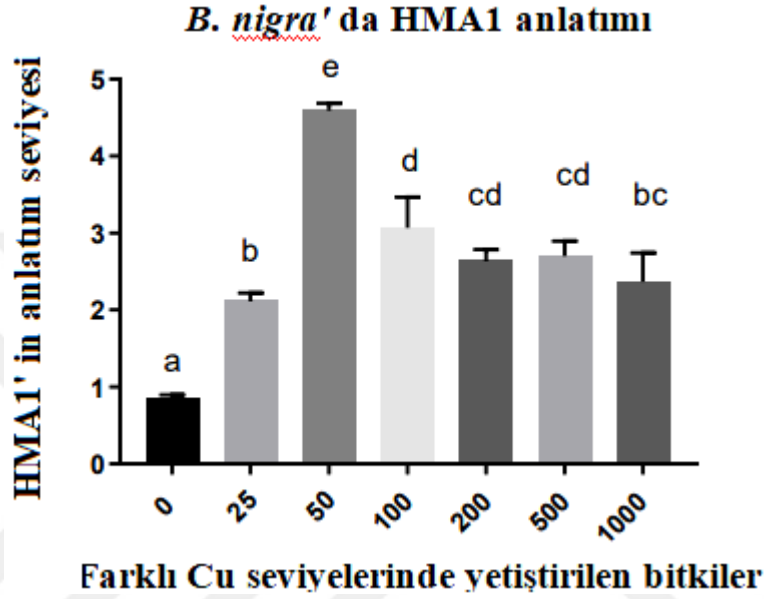
Şekil 5.3. Farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. juncea'* nin yapraklarında HMA1' in anlatımı

### 5.3.2.2. *B. nigra* L. Yapraklarında HMA1' in Anlatım Profili

Farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. nigra* L. yapraklarında HMA1' in anlatım profili R-T qPCR ile analiz edilmiştir. HMA1 anlatım profili Şekil 5.4' de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, yaprakta kontrole kıyasla HMA1' in en yüksek anlatımı 50  $\mu\text{M}$  Cu' da (~5 kat) olduğu belirlenmiştir. Artan Cu seviyelerine bağlı olarak, 50  $\mu\text{M}$  Cu' ya kadar HMA1 anlatım seviyesinde artış gözlemlenirken, diğer yüksek seviyelerde (100-1000 $\mu\text{M}$ ) ise



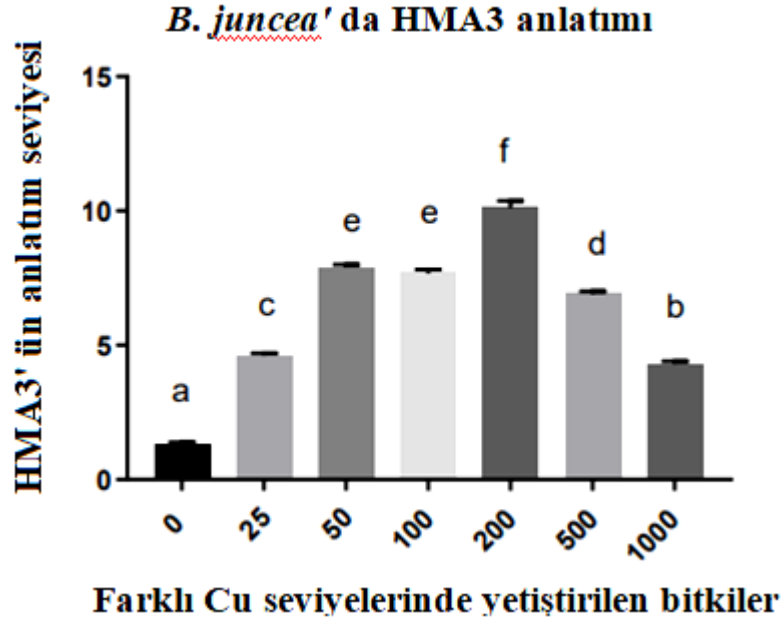
HMA1' in anlatım seviyesinde azalma olduğu gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 5.4). *B. nigra'* nın yapraklarında HMA1 anlatım profili, *B. juncea'* nın yapraklarındaki HMA1 anlatım profiline benzemektedir. Cu' nun uygulanan bütün seviyeleri kontrol grubuna göre farklılık göstermiş olup, bunlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Uygulanan seviyeler ve HMA1 anlatım seviyeleri arasında istatistiksel farklılık  $p < 0.05$  düzeyinde önemlidir.



Şekil 5.4. Farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. nigra'* nın yapraklarında HMA1' in anlatımı

### 5.3.2.3. *B. juncea* L. Yapraklarında HMA3' ün Anlatımı

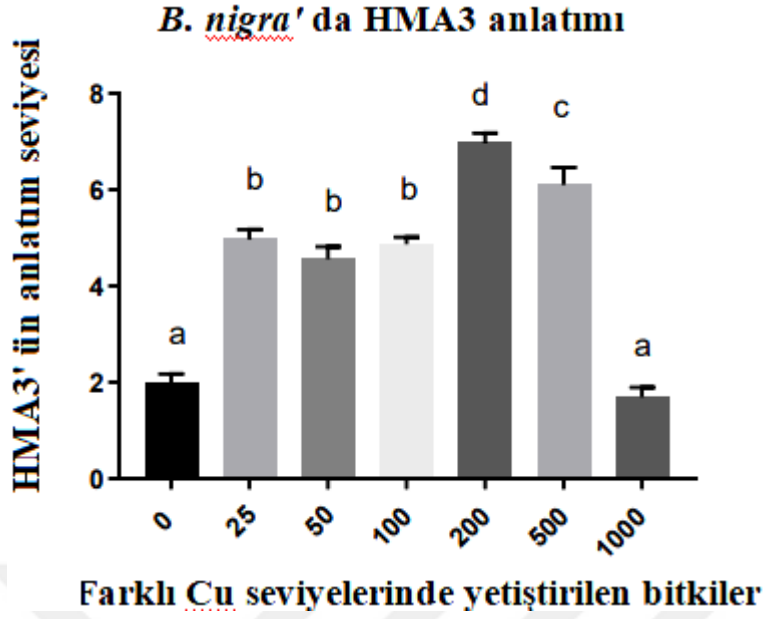
Farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. juncea* L.' da HMA3' ün anlatım profili RT-qPCR ile analiz edilmiştir. HMA3 anlatım profili Şekil 5.5' de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, en yüksek HMA3 anlatımının, kontrole kıyasla 200  $\mu$ M Cu' da (~10 kat) gözlemlenirken, bu genin en düşük anlatımının ise 1000  $\mu$ M Cu' da olduğu gözlemlenmiştir. Artan Cu seviyeleri bağlı olarak 200  $\mu$ M Cu' ya kadar HMA3' ün anlatımının da artış göstermiştir, ancak daha yüksek Cu' da (500, 1000  $\mu$ M) ise anlatımın azaldığı gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 5.5). Cu' nun uygulanan bütün konsantrasyonları kontrol grubuna göre farklılık göstermiş olup, bunlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Uygulanan seviyeler ve HMA3' ün anlatım seviyeleri arasında istatistiksel farklılık  $p < 0.05$  düzeyinde önemlidir.



Şekil 5.5. Farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. juncea'* nın yapraklarında HMA3' ün anlatımı

#### 5.3.2.4. *B. nigra* L. Yapraklarında HMA3' ün Anlatımı

Farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. nigra* L. yapraklarında HMA3' ün anlatım profili R-T qPCR ile analiz edilmiştir. HMA3' ün anlatım profili Şekil 5.6' da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, en yüksek anlatımın 200 µM Cu' da (~7 kat), en düşük anlatımın ise 1000 µM Cu' da olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 5.6). Cu' nun uygulanan bütün seviyeleri kontrol grubuna göre farklılık göstermiş olup, bunlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Uygulanan Cu seviyeleri ve HMA3 anlatım seviyeleri arasında istatistiksel farklılık  $p < 0.05$  düzeyinde önemlidir.

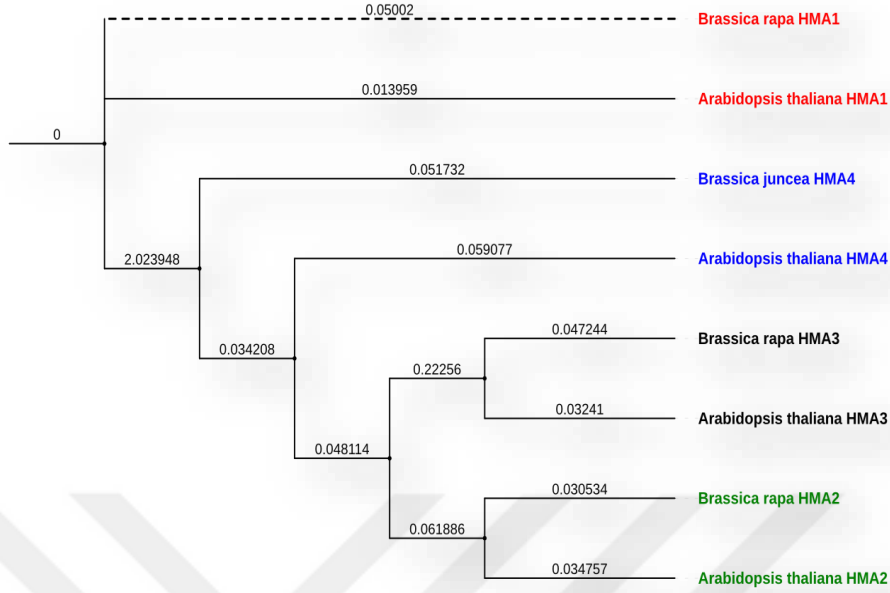


Şekil 5.6. Farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. nigra*'nın yapraklarında HMA3' ün anlatımı

#### 5.4. Biyoinformatik Yaklaşım Bulguları

Bu çalışmada organizmaları sınıflandırmak için moleküler bulgu olarak kullanılan tüm P<sub>1B</sub>-ATPaz' lara ait ön veriler çeşitli web sitelerden elde edilmiştir. Herkese açık olan online veri kaynakları arasında; "<https://www.arabidopsis.org/>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>", <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <http://www.uniprot.org/>, <http://aramemnon.uni-koeln.de/>" kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Türler arasındaki filogenetik ilişki, Şekil 5.8' de gösterildiği şekildedir. Bununla birlikte, filogenetik ağacı oluşturmak için ağır metal taşıyıcı ATPaz dizileri Clustalw (<http://www.ebi.ac.uk/>) programı kullanılarak elde edilmiştir. Böylece çoklu dizi hizalamayla nükleotit dizilerinde benzer bölgeler gösterilmiştir (Şekil 5.9). Dizilerin benzerlikleri "protein-protein BLASTP" programı kullanılarak belirlenmiş ve "BLASTP" algoritmasında yapılan karşılaştırmaya göre protein dizi benzerlik %' leri ise aşağıda verilmiştir (Şekil 5.10).

mRNA dizileri ITOL (<http://itol.embl.de/>)' da Neighbour-joining metodu kullanılarak oluşturulmuştur. Filogenetik ağaç HMA' ların ortologları (toplam 8 nükleotid gen sekansı) *B. rapa*, *B. juncea* ve *A. thaliana*' dan karşılaştırmalı analizlerden elde edilmiştir.



Şekil 5.7. *B. rapa*, *B. juncea* ve *A. thaliana*' ya ait HMA ortologların (toplam 8 nükleotid gen sekansı) filogenetik analizi

AthMA4	: 88	: Cadmium/zinc-transporter ATPase HMA4,[Arabidopsis thaliana]
AthMA2	: 88	: Cadmium/zinc-transporter ATPase HMA2,[Arabidopsis thaliana]
AthMA1	: 84	: Cadmium/zinc-transporter ATPase HMA1,[Arabidopsis thaliana]
AthMA3	: 92	: Cadmium/zinc-transporter ATPase HMA3,[Arabidopsis thaliana]
BjHMA4	: 87	: P <sub>1B</sub> -ATPase 4, [Brassica juncea]
BrHMA1	: 84	: Probable cadmium/zinc-transporter ATPase HMA1,[Brassica rapa]
BrHMA2	: 89	: Probable cadmium/zinc-transporter ATPase HMA2,[Brassica rapa]
BrHMA3	: 92	: Probable cadmium/zinc-transporter ATPase HMA3,[Brassica rapa]
cons	: 88	

AthMA4	PIIENI-LKSLDGVKEYSVIVPSRTVIVVHDSLLIS
AthMA2	PLIENI-LNSMDGVKEFSVIVPSRTVIVVHDTLLIS
AthMA1	PYRRGLSTLRLARVNSFSILPPKT-LLR-----QK
AthMA3	SIVGNV-LRQVDGVKEFSVIVPSRTVIVVHDTFLIS
BjHMA4	PLIVNI-LKSLDGIKEYSVIVPRTVIVVHDSVLIS
BrHMA1	PYRRGLATLRLARVNSFSILPPKTPPL-----
BrHMA2	PLIENI-LNSLDGVKEYSVIVPSRTVIVVHDSLITS
BrHMA3	SLVGEI-LRPLDGVKEFSVIVPSRTVIVVHDILLIS
cons	.....:.....*::*.....

AthMA4	ILVITVIAATLAMQDFMEAAAUVFLFTISDWLETRA
AthMA2	ILVVVTVGATIGMQDYTEAAVVVFLFTIAEWLQSRRA
AthMA1	VLMAAASFASFVFMGNALEGGLLAMFNLAHIAEEFF
AthMA3	ALTLLAVIATLCMQDFTEAATIVFLFSVADWLESSA
BjHMA4	ILVITVIAATLAMQDYMEAAAUVFLFTIAEWLETRA
BrHMA1	VLMAAASFASFVFMGNALEGGLLAMFNLAHIAEEFF
BrHMA2	ILVVTIVGATLGMRDYTEAAAUVFLFTIAEWLQSRRA
BrHMA3	ALTLLAVIATVCMEDYTEAATIVFLFSVADWLESSA
cons	*:::*::*::*::*::*::*::*::*::*::*::*

Şekil 5.8. Clustalw (<http://www.ebi.ac.uk/>) programı kullanılarak ağır metal taşıyıcı ATPaz' lara ait nükleotit dizilerin çoklu dizi hizalaması ve bunların benzer bölgeleri

Similarity: %	BrHMA1	AtHMA1	BrHMA3	AtHMA3	BrHMA2	AtHMA2	BjHMA4	AtHMA4
<b>BrHMA1</b>	100.0	92.65	26.79	24.38	26.65	27.06	25.94	26.22
<b>AtHMA1</b>	92.65	100.0	27.04	24.52	26.23	26.68	26.54	26.68
<b>BrHMA3</b>	26.79	27.04	100.0	90.39	68.80	68.78	66.97	68.55
<b>AtHMA3</b>	24.38	24.52	90.39	100.0	70.58	71.91	68.15	71.11
<b>BrHMA2</b>	26.65	26.23	68.80	70.58	100.0	82.91	72.61	75.91
<b>AtHMA2</b>	27.06	26.68	68.78	71.91	82.91	100.0	69.31	71.55
<b>BjHMA4</b>	25.94	26.54	66.97	68.15	72.61	69.31	100.0	78.39
<b>AtHMA4</b>	26.22	26.68	68.55	71.11	75.91	71.55	78.39	100.0

Şekil 5.9. Çoklu hizalamadan elde edilen veriler ve *Brassica* türleri arasındaki dizi benzerlik yüzdeleri

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda küresel ekonominin gelişmesi ile birlikte artan insan faaliyetleri sonucu topraktaki ağır metal türü ve içeriği giderek artarak çevre dengesinin bozulmasına neden olabilecek seviyeye ulaşmış duruma gelmiştir [245-251]. Bu nedenle özellikle gelişmiş ülkelerde ciddi problem haline gelen toprak kirliliği, çevre yanı sıra canlı organizmalar için de son derece tehlikeli bir etmen olmaya başlamıştır. Dolayısıyla toprak kirliliğine verilen önem zamanla artmış ve böylece çevreyi koruma faaliyetleri adı altında dünya çapında giderek daha fazla dikkat çeken bir konu haline gelmiştir. Toprakta ağır metal kirliliğinin aşırı olması arındırılma işleminin gerçekleştirilmesini zorlaştırdığı gibi bu işlemi ekonomik açıdan da oldukça masraflı hale getirmektedir. Şuana kadar ki, mevcut durum ve dünyadaki toprak kirliliği nedeniyle birçok araştırmacının çalışmalarında, genellikle çözüm odaklı olarak etki gösterebilecek iyileştirme yöntemleri üzerine yoğunlaşması dikkat çekmektedir. Bu çözüm odaklı çalışmaların, ağır metallerce kirlenmiş topraklarda olumlu etki gösteren spesifik (hiperakümülatör) bitkiler ile gerçekleştirildiği bilinmektedir [68-71]. Spesifik bitkiler topraktaki kirlenici etmenleri kök veya toprak üstü kısımlarında yüksek miktarda biriktirebilme yeteneği gelişmiş olduğundan diğer normal bitkilerden kolayca ayırtedilebilirler. Topraktaki kirlenici etmenlerin başında gelen ağır metallerin, düşük seviyeleri dahi gerekli veya gereksiz oluşuna bakılmaksızın bitkinin spesifik özellik göstermesi açısından oldukça önemlidir, bu nedenle belirli bir seviye üzerindeki metal miktarında bitki büyümesinde baskılayıcı veya engelleyici bir etki gösterebilmektedir. Çünkü metal seviyeleri giderek yükselir, böylece bitki bünyesine topraktan alması gereken metalden daha fazla metal alarak sınır değerini aşarak toksik etkiler görülebilir ve hatta ölümüne sebep olabilir [46-48]. Ağır metal kirliliğini temizlemek için bitki ve birbirleri ile ilişkili mikrobiyal sistemlerden yararlanan yeni bir yaklaşım olarak ortaya çıkan fitoremediasyon umut verici teknik haline gelmiştir [87,88]. Şuana kadar dünyada yaklaşık 400' den fazla bitki türünün bu teknik için ideal aday olduğu tespit edilmiş ve bunların çoğunun *Brassica*, *Alyssums* ve *Thlaspi* cinsleri de dâhil olmak

üzere *Brassicaceae* ailesine ait olduğu bildirilmiştir [252]. *Brassicaceae'* nin *N. caeruleans*, *Alyssum murale*, *T. rotundifolium*, *Dicoma niccoliferafor* dâhil olmak üzere yaklaşık 80 türü içeren bir ailedir ve bu türler Ni, Cu, Zn, Cr, As, Pb karşı olan ilgilerinden dolayı bunları bünyesinde biriktirebilme özelliği göstererek "metal hiperakümülatörü" olarak tanımlanırlar [16,253,254]. Genellikle bu aile üyeleri metallere olan aşırı ilgilerinden dolayı diğer aile üyelerinde kolayca ayırt edilebilirler [135]. Aynı zamanda diğer bitkilere göre gelişmiş olan hızlı büyüme, metal birikim ve tolerans yetenekleri ile birlikte bu özellikleri taşıyan önemli genlere de sahiptirler [126,127]. Bu bağlamda, gelişen genetik mühendisliği teknikler sonucunda bu spesifik bitkilerin üreme, verimlilik ve yüksek biyokütle kapasitesi geliştirilebilecek aynı zamanda sahip oldukları özel genler diğer hızlı büyüyen bitki türlerine aktarılabilir. Bu nedenle bitkide ağır metal ile ilgili süreçler ve bu süreçlerin moleküler mekanizmaları hakkında elde edilecek olan bilgiler son derece önemli taşır [73,76]

Son yıllarda araştırmacılar tarafından odak konusu haline gelen *Brassicaceae* üyesi *B. juncea* L. çoğu özelliğinden dolayı dünya çapında araştırmalarda önemli bir yere sahiptir [244]. Kumar ve arkadaşları (1995), metal toleransı ve biriktirme kabiliyetleri açısından *B. juncea* L., *B. nigra* L. Koch, *B. campestris* L., *B. napus* L. ve *B. oleracea* L. türünü araştırmış ve hepsinin metal biriktirme kabiliyetine sahip olduğunu, ancak aralarında Cu, Zn, Cd, Ni, Pb ve Cr' yi en yüksek miktarda *B. juncea* (L.)' nin biriktirdiğini tespit etmiştir [254]. Çeşitli metallere karşı olan ilgileri nedeniyle bu bitkiler, fitoremediasyon için ideal bir materyal olacaktır. Ancak literatürde *B. juncea* L. ve *B. nigra* L.' ya ait metal giriş yolları, lokalizasyon depoları, tolerans dereceleri hakkında yeterli bilgi mevcut değildir. Bu süreçler hakkında elde edilecek bilgiler doğrultusunda hiperakümüstasyon olayı açıklığa kavuşturulabilecek ve bu gelişmelerle önemli birçok gen tespit edilmiş olacaktır. Bünyelerine aldıkları metal değerlerini fizyolojik sınırlar içinde tutmaya çalışan bu spesifik bitkiler sahip oldukları özel mekanizmalarında çeşitli gen ailelerini taşırlar, ancak bu ailelerin metal stresindeki rolleri ve oluşan strese karşı gösterdikleri yanıtta anlatım profilleri henüz tam olarak bilinmemektedir. Memon ve arkadaşlarının çalışmaları incelendiğinde, ülkemizde Güneydoğu Bölgesi' nde maden yataklarında yetişen *B. nigra*' nın gövdesinde aşırı miktarda Cu biriktirdiği ve bu bitkinin "Cu akümülatörü" olduğu tespit edilmiştir [231]. Bu bitki ile yapılan mikroarray analiz sonucu, bu türde çeşitli metal taşıyıcı ailelerin anlatımının uyarıldığı, özellikle bunlar

arasında metal taşıyıcı ATPaz (HMA1)' ın, kontrol grubuna kıyasla 500 µM Cu' da yetişen bitki gövdesinde anlatımının birkaç yüz kat (x300) arttığı rapor edilmiştir [15,231,234]. Elde edilen bu veriler, *B. nigra* L. ve diğer spesifik bitkilerde metal ile ilgili süreçlerde metal ATPaz' ların önemli rol oynadığını desteklemiştir.

Dolayısıyla bu çalışma dikkate alınarak, metal birikim ve gen anlatım çalışması için önemli bir Cu akümülatörü olan *B. nigra* L. ve bir tolerans tür olan *B. juncea* L. seçilmiştir. Bu çalışmada, farklı Cu seviyeleri uygulanan bu iki önemli türün yapraklarında Cu' nun metal taşıyıcı gen olan HMA1 ve HMA3' ün anlatım profili üzerine etkisi RT-PCR kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen veriler dâhilinde, Cu uygulanan bitkilerin yapraklarında bu iki genin anlatım farklılıklarının belirlenmesi, moleküler düzeyde bu iki genin anlaşılması hedeflenmiştir. Ayrıca Cu stresine neden olan zararlı reaktif oksijen türlerinin yol açtığı zararları önlemek için, bitkinin savunma mekanizmasında rol oynayan ve önemli antioksidanlar olarak bilinen glutasyon, fenolik ve flavonoid bileşiklerin değişimleri incelenmiştir.

İlk olarak farklı seviyelerde uygulanan Cu' ya karşı *B. nigra* L. ve *B. juncea* L.' nin toleransı araştırılmıştır. Elde edilen veriler, akümülatör bitki olan *B. nigra* L.' daki Cu birikim kapasitesi ve tolerans bitki *B. juncea* L.' nin Cu birikim kapasitesi ile farklılık göstermektedir ( $p<0.05$ ). *B. nigra* L.' da Cu yapraklara aktif bir şekilde taşınır ve yapraklardaki Cu içeriği köklere nazaran oldukça yüksektir. Aksine, *B. juncea* L. Cu' yu hem köklerde hem de yapraklarda eşit bir şekilde biriktirmiştir. Memon ve Zahiroyiç (2014) [231], *B. nigra* L. Diyarbakır ekotipinin köklere kıyasla yapraklarda yüksek miktarda Cu birikimi olduğunu bildirmiştir.

Ağır metaller bitki için ne kadar gerekli olsa da yüksek seviyelerde alındığında olumsuz etkilere neden olabilmektedirler. Bu etkilerden biri de oksidatif strese yol açan zararlı reaktif oksijen türlerin oluşmasına neden olmalarıdır [203]. Böylece bitki yaşamını sürdürebilmek için çeşitli metallerin yol açtığı strese karşı biyomoleküllerin oksidasyonunu yavaşlatması, oksidatif zincir reaksiyonlarını engellemesi gerekir ve bu olayları enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar aracılığıyla gerçekleştirebilir [77,204,205]. Bitki farklı metal iyonlarına karşı başa çıkabilmek için bir yandan hücrel metal içeriğini (metal dışlama, şelasyon), diğer yandan hücrel tepkilerin düzenlenmesine ilişkin (antioksidan) savunma stratejilerine geliştirir. Bu bağlamda, bitki reaktif oksijen türlerinin neden olduğu zararları önlemek için aktif rol oynayan düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar



(glutasyon, askorbik asit vb.) ve farklı spesifik enzimleri (katalaz, süperoksit dismutaz vb.) harekete geçirmektedir. Ayrıca serbest metal seviyeleri spesifik şelatörlerin sentezini ve metal komplekslerinin sekestrasyonunu sınırlandırmada oldukça önemlidir. Dolayısıyla metaller glutasyonun tiyol (-SH) grubuna yüksek afinite gösterir ve fitoşelatinin (PC) öncü bileşeni olması metal arındırıcılar arasında kilit bir rol oynamasını sağlar. Kloroplast, endoplazmik retikulum, vakuol, mitokondri ve sitosol gibi çeşitli hücre organellerinde saptanan glutasyon, bir tripeptir ( $\gamma$ -glutamil-sisteinil-glisin)' dir [213,214]. Glutasyon, bitki hücrelerinde milimolar konsantrasyonlarda (0.5-10 mM) bulunan yaygın bir tripeptir [255]. Fitoşelatinler,  $\gamma$ -EC transpeptidazı olan fitoşelatin sentaz (PCS) tarafından 2-11 üretilen GSH molekülünün polimerize edilmiş formlarıdır. Çoklu tiyol bağlanma bölgeleri metallere olan afiniteyi artırır ve PC' leri birkaç metal iyonunun şelatlanmasında daha verimli olmasını sağlar [215-217, 256,257]. Glutasyon da, fitoşelatin öncüsü olup, bitki hücrelerini ROS' a karşı koruyan kritik bir moleküldür ve bitkide abiyotik stres karşı yanıt açısından önemli antioksidanlardan biridir [208,256,258].

Bu çalışmada, kontrol grubuna (0  $\mu$ M Cu) kıyasla farklı Cu seviyeleri uygulanan bitkilerin oluşan Cu stresi karşısında glutasyon miktarı da önemli derecede artmıştır ( $p < 0.05$ ). *B. juncea* L.' da glutasyon miktarı 288,28-529,45  $\mu$ g/g değer aralığında; *B. nigra* L.' da ise 238,43-386,92  $\mu$ g/g değer aralığında olduğu saptanmıştır. Dayanıklı tür olan *B. juncea* L.' da, artan Cu seviyelerine bağlı olarak 100  $\mu$ M Cu' ya kadar glutasyon aktivitesinde önemli derece de artma gözlenmişken, yüksek seviyelerde (200, 500, 1000  $\mu$ M) uygulanan Cu' da azalma gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Genellikle, hiperakümülatör tür olan *B. nigra* L.' da artan Cu seviyelerine bağlı olarak glutasyon aktivitesinde de sürekli bir artış gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Bu bağlamda, antioksidanların durumunun bitki çeşidine ve metal seviyelerine göre aktivasyon veya inaktivasyon olarak farklılıklar gösterebileceğine ulaşılabilmektedir. Belirli metal seviyesine kadar aktif olan glutasyon, yüksek metal seviyesinde inaktif duruma geçerek değişiklik göstermesi, bu aşamada diğer bir antioksidanın aktivitesinin artmasından kaynaklanan bir durum olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan birçok çalışmada, metal uygulamasından sonra GSH-metal komplekslerinin uyarıldığını açıkça göstermektedir [20,21,259-261]. GSH ve PC gibi şelatörler, bitkide metal detoksifikasyon mekanizmasına önemli bir katkı sağlarlar. Bu nedenle metal toksisitesi (örneğin; Cu, Ag, Cd, Hg) metalleri bağlamak ve ardından ligand-

metal komplekslerini sekanslamak için konsantrasyonu arttırır [20]. Yapılan bir çalışmada, GSH biyosentezinde ana bileşen olan olan  $\gamma$ -EC, Cd uygulanan *B. juncea* ve *B. napus* bitkisinde önemli miktarda arttığı bildirilmiştir [262,263]. Diğer yandan başka bir çalışmada, Zn/Cd hiperakümülatörü *Arabis paniculata'* da GSH ve PC' lerin Cd alımını ve komplikasyonundaki potansiyel rolünün olduğu bildirilmiştir [264]. Bitkide yapılan son çalışmalar, GSH' nin ve diğer metabolize edici enzimlerin (GST, GPX) oksidatif strese karşı bitkiyi koruduğunu göstermektedir [73]. Khan ve ark. (2016), *B. juncea* L. çeşitlerinde, yüksek miktarda GSH üretiminin Ni stresini daha verimli hale getirerek olumluyu etkiye dönüştürmesine yardımcı olduğu ve yüksek bitkilerde kuru ağırlığını koruyarak fotosentezi koruduğunu açıklamıştır [265]. Bitkilerde glutatyon sentezi, Cd, As ve Ag gibi sayısız ağır metal stresine karşı koruma sağlayan anahtar tiyoller olduğu belirtilmiştir [266].

Antioksidanların her biri bitkide normal seviyesinin üzerinde metal alımında, oluşan oksidatif zarara karşı gelmek için tek başına yeterli olmayabilirler. Bu yüzden antioksidan enzimler ile birlikte güçlü birer antioksidan özellik gösteren fenolik ve flavonoidler, ağır metal stresine sırasında metal şelatör görevi üstlenerek reaktif oksijen türlerini ortamdan uzaklaştırılmasını sağlarlar. Günümüzde başta antioksidan aktivite olmak üzere birçok biyolojik sistemle ilişkilendirilen fenolik bileşikler yapılan birçok çalışmada öne çıkmaktadır. Dolayısıyla çalışmamızda da önemli iki tür olan *B. nigra* ve *B. juncea'* nın farklı Cu seviyelerinde toplam fenolik bileşik ve flavonoid miktarlarının belirlenmesi, bunların antioksidan savunma sistemi hakkında yapılacak çalışmaların şekillenmesi açısından önem taşımaktadır. Bu nedenle çalışmamızda bu türlerde Cu stresine karşı fenolik ve flavonoid bileşenin miktar tayini yapılmış ve Cu' dan nasıl etkilendikleri araştırılmıştır.

*B. nigra* L. ve *B. juncea* L. ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları, literatürden tespit edilen ve en sık kullanılan metot olan Folin yöntemi ile belirlenmiştir. Bitkiler kompleks canlılar olduğu için oldukça fazla fenolik madde içermektedir. Dolayısıyla bu yöntemde bitkilerin fenolik madde içeriği standartı olarak bir fenolik madde olan gallik asit eşdeğer olarak verilmiştir. Toplam fenolik madde miktarları gallik asit eşdeğerine göre belirlenerek elde edilen çalışma verileri sonucunda, artan Cu seviyeleri ile birlikte *B. nigra* L.' da bulunan miktarların 31,6-43,2 mg GAE/g değerleri arasında değiştiği hesaplanırken, bu değerlerin *B. juncea* L.' da 27,7-34,3 mg GAE/g arasında

değiştirdiği hesaplanmıştır. Toplam fenolik bileşen miktarı etanolik ekstraktta gallik asit eşdeğeri (mg GAE/ g ekstrakt) olarak incelendiğinde; *B. nigra* L.' da en yüksek 100 µM Cu seviyesi (43,2 mg GAE/g), *B. juncea* L.' da en yüksek 1000 µM Cu seviyesi (34,3 mg GAE/g) olduğu saptanmıştır. Benzer çalışmalar incelendiğinde; alabaş (*Brassicacea*) türünün yaprak ekstraktlarındaki toplam fenolik miktarının yaprak için 16,473-27,582 mg GAE/g arasında değiştiği gözlenmiştir [267]. Fenolik bileşik tayini için *B. rapa* ile yapılan başka bir çalışma da ethanol ekstraktının fenolik içeriği 42,32-42,92 mg GAE/g arasında değiştiği tespit edilmiştir [268]. Diğer yandan *Brassicacea* üyeleri ile yapılan fenolik bileşik tayini çalışmasında sekiz ayrı brokoli türündeki metanolik ekstraktların fenolik içeriği 19,60-41,40 mg GAE/g aralığında olduğu bildirilmiştir [269]. Yine benzer bir çalışmada, *Brassicacea*' ya ait iki üyenin metanolik ekstraktların fenolik içeriğinin 5,70-0,47 mg GAE/g kuru ağırlık değer aralığında değiştiği tespit edilmiştir [270].

*B. nigra* L. ve *B. juncea* L. ekstraktlarının toplam flavonoid madde miktarları, alüminyum kolorimetrik metodu kullanılarak standart bir flavonoid madde olan catechine (mg CE/g) göre belirlenmiştir. Bu çalışmada flavonoid içerikleri araştırılan *B. nigra* L. ve *B. juncea* L. taksonlarının, artan Cu seviyeleri ile birlikte *B. nigra* L.' da flavonoid içerik miktarı 136,90-171,30 mg CE/g aralığında değiştiği gözlenmiştir. *B. juncea* L.' nin flavonoid içerik miktarı ise 128,00-182,40 mg CE/g aralığında değiştiği hesaplanmıştır. *B. nigra* L.' da 171,30 mg CE/g en yüksek flavonoid içeriği 50 µM Cu seviyesinde gözlenirken, *B. juncea* L.' da 182,40 mg CE/g en yüksek flavonoid içeriği 100 µM Cu' da olduğu saptanmıştır. Flavonoidler ile ilgili yapılan bir çalışmada, *B. oleracea* cinsinin metanolik yaprak ekstraktlarının içeriği 90-780 mg CE/g arasında değiştiği bildirilmiştir [162]. Sonuçlar incelendiğinde, Cu stresine karşı *B. nigra* L.' da kontrole kıyasla flavonoid miktarı artış gösterirken, *B. juncea* L.' da genellikle azalma göstermiştir ( $p < 0.05$ ). Ali ve arkadaşları (2006), kök süspansiyon kültüründe  $Cu^{2+}$  'nın fazla olması nedeniyle flavonoid içeriğinde ve ROS temizleme aktivitesinde bir artış olduğunu göstermiştir. Yapılan başka bir çalışmada, ROS düzeyinde strese bağlı artış ile en yüksek antioksidan potansiyeli olan flavonoidlerin birikmesi arasında pozitif bir ilişki olduğu ve flavonoid metabolizmasının ROS homeostazında değişikliklere yanıt verdiği ve ROS seviyesini indirmeye katkıda sağladığı varsayılabilir [271]. Ancak yapılan çalışmalar, bitkide flavonoidlerin antioksidan işlevinin, çok özel deneysel ve gelişimsel koşullar altında birkaç bireysel flavonoidin sınırlı

olduğunu göstermektedir [272]. Bu nedenle, bitkilerde flavonoidlerin yaygın olarak kabul edilen antioksidan işlevi halen tartışma konusudur [273].

Elde veriler değerlendirildiğinde, *B. nigra* L. ve *B. juncea* L. bitkileri fenolik içerik, flavonoid ve glutatyon miktarı bakımından zengin ve antioksidan özellikte birer bitki oldukları, bu bitkilerin Cu stresine karşı savunma mekanizmalarında önemli rol oynayan antioksidanların miktarının değişebildiği, sonuç olarak Cu stresine karşı her iki bitkinin farklı şekilde uyarıldıkları gözlenmiştir. Ancak bu bitkilerin yapısında bulunan biyoaktif bileşiklerin daha detaylı bir şekilde aydınlatılarak, daha iyi tanımlanmaları gerektiği, böylece literatüre de katkı sağlanacağı kanaatindeyiz.

Bitkilerde metal alımı, translokasyonu, sekestrasyonu veya detoksifikasyonunda olsun, metal ile ilgili süreçlerde birçok gen rol oynar. Genellikle, bitkilerde hiperakümülyasyon olayı içerisinde yer alan bu süreçler de sorumlu taşıyıcı genlerin aşırı anlatımı moleküler çalışmalar için son derece önemlidir. Gen kaynağı olarak da bilinen *Brassicaceae*' da, metal iyonlarının taşınımında sorumlu taşıyıcı ailelerden biri olan P<sub>1B</sub>-ATPaz ailesinin bir alt grup olan HMA' ya ait üyelerin tanımlanmasını sağlamıştır. Yapılan birçok araştırmada, *A. thaliana*' da farklı metal taşıma yeteneğine sahip 1B tip alt familya (HMA1-HMA8) dahil sekiz tane üye içermektedir [120,151,163]. HMA1 kloroplast membranına lokalizedir, aynı zamanda kloroplastta Cu depolanması, detoksifikasyonu ve taşınımından sorumludur. Hücrede ağır metal kompleksinin oluşması durumunda sorumlu olan diğer bir gen ise HMA3' tür. AtHMA3 vakuol membranına lokalize olup, bu taşıyıcı gen vakuoldeki toksik ağır metal iyonlarının depolanma işleminde rol oynadığı çok açık bir göstergedir. Filogenetik ağaç bulguları, HMA1-HMA4 genlerinin yakın ilişkili olduğunu göstermektedir (Bkz. Şekil 5.7). Dolayısıyla *A. thaliana*' da gösterilen HMA2, HMA3 ve HMA4 genlerinin fonksiyonel çeşitliliği göz önüne alındığında, ilgilenilen her bitkide HMA genlerinin uygun ortologlarını belirlemek son derece önemlidir. Hücre içi bölmelerde metallerin taşınımında sorumlu HMA' ların, hem hücre içi farklı organellerde bulunması hem de taşıdıkları metal iyonları, sorumlu genin anlatımı ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir. Önceki çalışmalar dikkate alınarak, *B. nigra* L. ile yapılan mikroarray analiz sonucu, metal ATPaz (HMA1) ve diğer metal taşıyıcıların anlatımının, kontrole karşı 500 µM Cu' da yetişen bitki gövdesinde birkaç yüz kat (300) arttığını tespit edilmiş olması, *B. nigra*' da metal taşıyıcı ATPaz' ların metal birikimi ve detoksifikasyon mekanizmasında önemli bir rol oynadığını göstermiştir [234]. Dolayısıyla bu çalışmada,

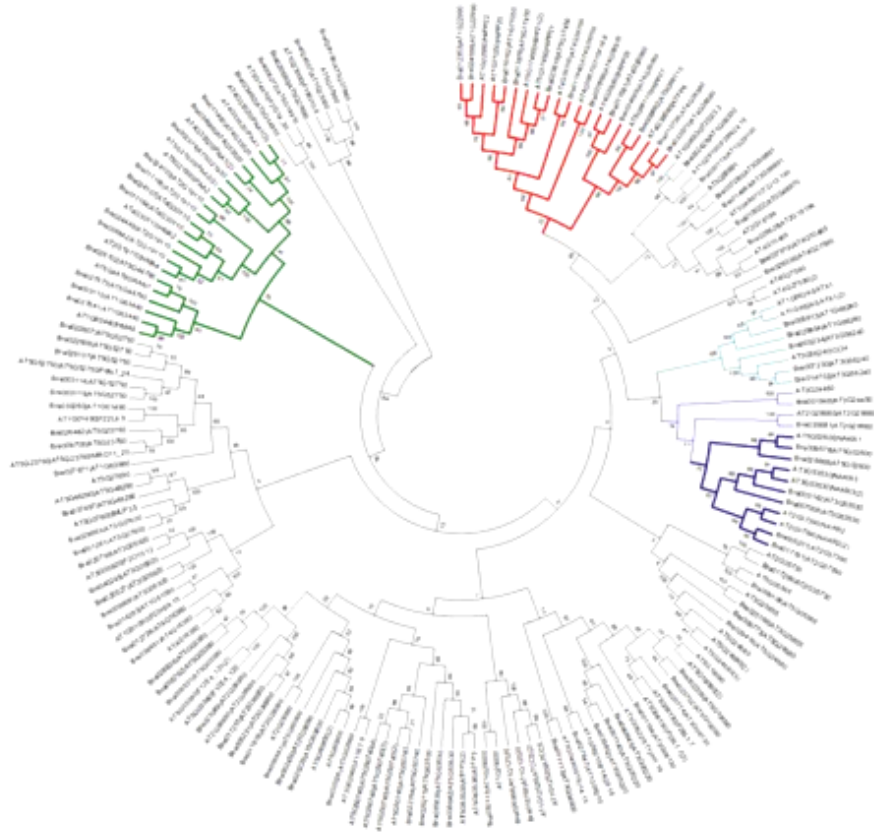
farklı Cu seviyelerinde uygulanan *B. nigra* L. ve *B. juncea* L.' nin (fitoremediasyon için potansiyel hedef bitkiler) HMA1 ve HMA3 anlatım profilinin analizi hedeflenmiştir. Elde edilen gen anlatım sonuçları incelendiğinde, her iki türünde artan Cu seviyesine bağlı olarak, 50 µM Cu' ya kadar HMA1 anlatım seviyesinde artış gözlenirken, diğer yüksek seviyelerde (100-1000µM) HMA1' in anlatım seviyesinde azalma olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde, HMA1 anlatım profili Cu' nun uygulanan bütün seviyeleri kontrol grubuna göre farklılık göstermiştir ve bunlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). Genel olarak, bu iki bitki yapraklarında HMA1 anlatım profilinin benzer olduğu gözlenmiştir. Her iki türde HMA3 anlatımı profili incelendiğinde, artan Cu seviyesine bağlı olarak, 200 µM Cu' ya kadar HMA3 anlatım seviyesinde artış saptanırken, diğer yüksek seviyelerde (500, 1000 µM) ise HMA3' in anlatım seviyesinde azalma olduğu saptanmıştır. HMA3' ün en yüksek anlatımının 200 µM Cu' da, en düşük anlatımının ise 1000 µM Cu' da olduğu belirlenmiştir. HMA3 anlatım profili, kontrol grubuna göre Cu' nun uygulanan bütün seviyelerinde farklılık göstermiş ve bunlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). Genel olarak, bu iki bitkinin HMA3 anlatım profili de benzerlik göstermiştir.

*A. thaliana* L., *A. halleri*, *B. rapa* ve *B. juncea* L. türlerinde HMA1-HMA4 ile yapılan detaylı biyoinformatik ve karşılaştırmalı yapısal analizlerin sonucu, bu bitkilerin diğer proteinler ile etkileşim halinde olduğu ve bu taşıyıcıların kimyasal bileşenlerinde benzerliklerin ve farklılıkların olduğunu göstermiştir (Bkz. Şekil 5.7, Şekil 5.8, Şekil 5.9). Bu bitki türleri arasındaki proteinlerin hücre içinde aktif oldukları organel ve metal iyonlarına afinitelerine olan farklılıkları etki analizinde belirlenmiştir. Moleküler temelli seçicilikteki bu farklılıklar hâlen bilinmemekle birlikte, ağır metal homeostazındaki rolleri veya toleransları henüz açıklanmamıştır. Kısmi dizilerin ve ifade edilen dizilim etiket verileri, bu ATPaz' ların çeşitli bitki türlerinde bulunduğunu ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak,

Bu çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda, HMA1 ve HMA3 geninin lokalize olduğu organel ve kimyasal bileşenlere göre farklılık göstermesinin, bu genlerin anlatım düzeylerindeki farklılıkları ile doğrulanmıştır. *Brassicacea* ailesine ait bu iki türde de, HMA1 ve HMA3 profilleri benzerlik göstermiştir (Bkz. Şekil 5.3, Şekil 5.4, Şekil 5.5, Şekil 5.6). Diğer yandan, bu iki genin farklı Cu seviyelerindeki anlatım profilleri de benzerlik göstermiştir. *B. juncea* L. ve *B. nigra* L.' nin farklı Cu seviyelerine karşı

uyarıldıkları, özellikle 1000  $\mu\text{M}$  Cu' da önemli derece inhibe olduklarını göstermektedir ( $p < 0.05$ ). Dolayısıyla gen anlatım analizi Cu' nun HMA1 ve HMA3 anlatımını tetiklediğini, bu genlerin *B. juncea* L. ve *B. nigra* L.' da Cu alınımı, detoksifikasyon mekanizmasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca yüksek Cu seviyelerinde (500 ve 1000  $\mu\text{M}$ ) her iki genin de anlatımı önemli derecede inhibe olmuş durumdadır. Bu inhibisyonun topraktaki metalin belirli bir seviyeye ulaşıldıktan sonra gerçekleşmesi, bu HMA' ların anlatım seviyeleri için daha fazla araştırmaya ihtiyacın olduğunu ve ağır metal alımı ve detoksifikasyonunda potansiyel olarak rol oynayan diğer genlerin de araştırılması gerektiğini göstermektedir. Çünkü belirli bir metal seviyesine ulaşıldıktan sonra, bu genlerin inhibisyonu gerçekleşmiştir. Bu da bu bitkilerde sadece metal ATPaz' ların değil, bunlarla birlikte diğer metal taşıyıcılarında metal tolerans ve birikiminde rol oynadığını gösterir ve bu biyoinformatik analizlerle de tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 6.0) [274]. Bu sonuçlar, bitkide metal birikimi ve toleransın fitoşelatin ve metalotiyonin gibi çeşitli taşıyıcıları ve poli peptidleri içeren karmaşık bir süreç olduğunu göstermektedir [274]. Bu tez çalışması, akümülatör bitkilerde metal birikim ve tolerans mekanizmasının anlaşılmasında yeni bilgiler sağlayacaktır.



Şekil 6.1. *B. rapa* ve *A. thaliana*'daki tüm ağır metal bağlayıcı genlerin filogenetik ağaç analizi (Karakterize edilen gen aileleri; HMA P<sub>1B</sub> ailesi yeşil, HIPP ailesi kırmızı, NAKR genleri mavi, ATX ve CCH genleri açık mavi olarak gösterilmiştir) [274]

## KAYNAKLAR

- [1] Jaishankar, M., Mathew, B.B., Shah, M.S., Gowda, K.R.S., 2014, "Biosorption of Few Heavy Metal Ions Using Agricultural Wastes", *Journal of Environment Pollution and Human Health*, 2(1):1–6.
- [2] Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M., 2010, "Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review", *Environ. Chem. Lett.*, 8(3):199–216.
- [3] Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B. , Beeregowda, K. N., 2014, "Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals", *Interdiscip Toxicol.*, Vol. 7(2): 60–72.
- [4] Morais, S., Costa, F.G., Pereira, M.L., 2012, "Heavy metals and human health", *Environmental health*, pp. 227–246,
- [5] Munzuroğlu, Ö., ve Gür, N., 2000, "Ağır metallerin elma (*Malus sylvestris* Miller cv. Golden)' da polen çimlenmesi ve polen tüpü gelişimi üzerine etkileri", *Turk Journal of Biology*, 24:677-684.
- [6] Chibuike, G.U., and Obiora, S.C., 2014, "Heavy Metal Polluted Soils: Effect on Plants and Bioremediation Methods", *Applied and Environmental Soil Science*, 752708, pp.12.
- [7] Garbisu, C., and Alkorta, I., 2003, "Basic concepts on heavy metal soil bioremediation", *The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection*, 3(1):58–66.
- [8] Memon, A.R., Schroder, P., 2009, " Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation", *Enviromental Science Pollution Rest. Int.*, 16:162-175.
- [9] Reeves, R.D., Baker, A.J.M., 2000, "Metal accumulating plants", *Phytoremediation of Toxic Metals Using: Plant to Clean up The Enviroment*", Wiley, New York.
- [10] Baker, A.J.M., Whiting, S.N., 2002, "In search of the Holy Grail- a further step in understanding metal hyperaccumulation?", *New Phytol.*, 155:1-4.
- [11] Memon, A.R., Yıldızhan, Y., and Keskin, B.C., 2008, "Enhanced Cu Tolerance in *Brassica nigra* (L) is Associated with Increased Transcription Level of  $\gamma$  –glutamyl Cysteine Synthetase ( $\Gamma$ -Ecs) and Phytochelatin and Degradation of Pollutants, June 5-6, *University of Verona, Italy*, pp:68.
- [12] Pilon-Smits, E., 2005, "Phytoremediation", *Annual Rewiew of Plant Biology*, 56:1539.



- [13] Memon, A.R., and Yatazawa, M., 1982, "Chemical nature of manganese in the leaves of manganese accumulator plants", *Soil Sci. Nutr.*, 28:401-412.
- [14] Raskin, I., and Ensley, 1999, "Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean up Environment", *Environmental Chemistry Wiley*, ISBN:978-0-471-19254-1.
- [15] Memon, A.R., Aktoprakligil, D., Özdemir, A., Vertii, A., 2001, "Heavy metal accumulation and detoxification mechanisms in plants", *Turk Journal of Botanical*, 25:111-121.
- [16] Hall, J.I., Williams, L.E., 2003, "Transition Metal Transporters in Plants", *Journal of Experimental Botany*, 54:2601-2613.
- [17] Dhanker, O.P., Li, Y., Rosen, B.P., Shi, J and Harden, P.N., 2002, "Engineering Tolerance and Hyperaccumulation of Arsenic in Plants by Combining Arsenate Reductase and Gamma-Glutamylcysteine Synthetase Expression", *Nature Biotechnology*, 20:1094-1095.
- [18] Rascio, N., Navari-Izzo, F., 2011, "Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting?", *Plant Science*, 180:169-181.
- [19] Clemens, S., 2006, "Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants", *Biochimie*, 88, 1707-1719.
- [20] Cobbett, C.S., 2000, "Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification", *Plant Physiology*, 123:825-832.
- [21] Cobbett, C., and Goldsbrough, P.B., 2002, "Phytochelatin and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis", *Annual Reviews of Plant Biology*, 53:159-182.
- [22] Duffus, J.H., 2002, "Heavy Metals A Meaningless Term?", *IUPAC. Tech. Rep. Pure Appl. Chem.*, 74(5):793-807.
- [23] Duffus, J.H., 2003, "Errata Heavy Metals A Meaningless Term?", *IUPAC. Tech. Rep. Pure Appl. Chem.*, 75(9):1357.
- [24] Stankovic, S., Kalaba, P., Stankovic, A.R., 2014, "Biota as Toxic Metal Indicators", *Environ. Chem. Lett.*, 12(1):63-84.
- [25] Kim, R.Y., Yoon, J.K., Kim, T.S., Yang, J.S., Owns, G., Kim, K.R., 2015, "Bioavailability of Heavy Metals in Soils: Definitions and Practical Implementation", *Environ. Geo. Chem. Health*, 37(6):1041-1061.

- [26] Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., ve Timur, S., 2003, "Metallerin çevresel etkileri I", *Metalurji Dergisi*, 136, 47-53.
- [27] Kahvecioğlu, Ö., Kartal G., Güven A. and Timur S., 2007, "Metallerin Çevresel Etkileri –I" (erişim adresi: [www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136\\_4753.pdf](http://www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136_4753.pdf), erişim tarihi: 13.05.2007).
- [28] Wagenet, R. J., Grenney, W. J., Asce, A. M. & Jurinak, J. J., 1978, "Environmental transport model of heavy metals", *ASCE J. environ. Eng. Div.*, 104(13541): 61-76.
- [29] He, Z.L., Yang, X.E., Stoffella, P.J., 2005, "Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment" *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 19(2-3):125-140.
- [30] Goyer, R.A., 2001, "Toxic effects of metals" In: CD Klaassen (eds.): *Cassarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. McGraw-Hill Publisher*, New York, 811-867.
- [31] Herawati, N., Suzuki, S., Hayashi, K., Rivai, I.F., Koyoma, H., 2000, "Cadmium, copper and zinc levels in rice and soil of Japan", Indonesia and China by soil type, *Bull Env. Contam. Toxicol.*, 64:33–39.
- [32] Shallari, S., Schwartz, C., Hasko, A., Morel, J.L., 1998, "Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania", *Sci Total Environ.*, 19(209):133–142.
- [33] Bradl, H., 2002, "Heavy Metals in the Environment: Origin, Interaction and Remediation", *Academic Press.*, London, Volume 6.
- [34] Tchounwou, Paul B., Yedjou, Clement G., Patlolla, Anita K., Sutton, Dwayne J., 2012, "Heavy Metals Toxicity and the Environment", *NIH-PA Author Manuscript*, 101: 133–164.
- [35] Alloway, B. J., 1990, Heavy Metal in soils, *Blackie Glasgow*, UK, 368 p.
- [36] Forstner, U., 1984, Changing metal cycles and human health, *Springer Verlag*, Berlin, 71-94.
- [37] Vousta, D., Grimmanins, A., Sammara, C., 1996, Trace elements in vegetable grown in an industrial areas in relation to soil and air particulate matter, *Environ. Pollut.*, 94(3):325–335.
- [38] Cuypers, A., Smeets, K., and Vangronsveld, J., 2009, "Heavy Metals Stress in Plants", *Plant Stress Biology: Form Genomics to Systems Biology*, 161-178.

- [39] Cunningham, S.D., Shann, J.R., Crowley, D.E. and Anderson, T.A., 1997, "Phytoremediation of Contaminated Water and Soil. Phytoremediation of Soil and Water Contaminants", *American Chemical Society*, Washington, D.C., 2-17.
- [40] Meagher, R.B., 2000, "Phytoremediation of Toxic elemental and organic pollutants". *Plant Biol.*, 3, 153-162.
- [41] Raskin, I. and Ensley (Ed), 2000, "Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up to environment", *John Wiley and Sons*, N. York, 303.
- [42] Raven, J.A., Evans, M.C.W., and Korb, R.E., 1999, "The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O<sub>2</sub>-evolving organism", *Photosynth. Res.*, 60:111-149.
- [43] Ali, H., Khan, E., Sajad M.A., 2013, "Phytoremediation of Heavy Metals- Concepts and Applications", *Chemosphere*, 91:869-881.
- [44] Wang, Y., Yan, A., Dai, J., Wang, N., Wu, D., 2012, "Accumulation and tolerance characteristics of cadmium in chlorophytum comosum: a popular ornamental plant and potential Cd hyperaccumulator", *Environmental Monitoring and Assessment*, 184:929-937.
- [45] Bera, A.K., Bera, A., and Roy, S.B., 2005, "Impact of heavy metal pollution in plants", *Development in Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 1: 105-124.
- [46] Favas P.J.C., Pratas J., Varun M., D'Souza R., Poul M.S., (2014), Phytoremediation of soils contaminated with metals and metalloids at mining areas: potential of native flore, Environmental Risk Assessment of Soil Contamination'nın içinde (Hernandez-Soriano M.C., Ed.), InTech Press, ss.485-517.
- [47] Arora, M., Kiran, B., Rani, S., Rani, A., Kaur, B., Mittal, N., 2008, "Heavy metal accumulation in vegetables irrigated with water from different sources", *Food Chemistry*, 111:811-815.
- [48] Wu, T.M., Hsu, Y.T., and Lee, T.M., 2009, "Effects of cadmium on the regulation of antioxidant enzyme activity, gene expression, and antioxidant defenses in the marine macroalga *Ulva fasciat*", *Bot. Studies*, 50:25-34.
- [49] Costa, G., Michaut, J.C. and Morel, J.L., 1994, "Influence of cadmium on water relations and gas exchanges in phosphorus deficient *Lupinus alba*", *Plant Physiol.*, 32:105.
- [50] Chugh, L.K., and Sawhney, S.K., 1993, "Effect of cadmium on activities of some enzymes of glycolysis and pentose phosphate pathway in pea", *Biologia Plantarum*, 42 (3):401-407.
- [51] Kennedy, C.D. and Gonsalves, F.A.N., 1987, "The action of divalent zinc, cadmium, mercury, copper and lead on the trans-root potential and efflux of excised roots", *J. Exp. Bot.*, 38:800-817.

- [52] Lidon, F.C., Ramalho, J., and Henriques, F.S., 1993, "Copper inhibition of rice photosynthesis", *J. Plant Physiol.*, 142:12-17.
- [53] Mohan, B.S., and Hosetti, B.B., 1997, "Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in sewage stabilization ponds", *Environ. Pollut.*, 98:233-238.
- [54] Kacar, B., Katkat, V., 2006, "Bitki Besleme", *Nobel Yayın*, s. 849.
- [55] Öktüren, A.F., Sönmez, S., 2007, "Ağır Metal Toksisitesinin Bitki Metabolizması Üzerine Etkileri", *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü*, Antalya.
- [56] Marschner, H., 1995, "Mineral nutrition of higher plants", *Academic Press*, pp. 899.
- [57] Prasad, M.N.V., and Strzalka, K., 1999, "Impact of heavy metals on photosynthesis, Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems", *Springer-Verlag*, Berlin, pp. 117-138.
- [58] Okcu, M., Tozlu, E., Kumlay, A.M. and Pehlivan, M., 2009, "Ağır Metallerin Bitkiler Üzerine Etkileri", *Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü*, Erzurum, Iğdır Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Iğdır, 14-26.
- [59] Mehmet Yaşar Ethem,  
[http://www.maden.org.tr/resimler/ekler/c0991344c3d760a\\_ek.pdf](http://www.maden.org.tr/resimler/ekler/c0991344c3d760a_ek.pdf)
- [60] Baker, A.J.M., 1981, "Accumulators and excluders strategies in the response of plants to heavy metals", *Journal of Plant Nutrition*, 3: 643-654.
- [61] Baker, A.J.M., and Walker, P.L., 1990, "Ecophysiology of Metal Uptake by Tolerant Plants: Heavy Metal Tolerance in Plants", *CRC Press*, Boca Raton, In: Shaw A.J. (ed.).
- [62] Stoltz, E., and Greger, M., 2002, "Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings", *Environmental and Experimental Botany*, 47:271-280.
- [63] Mehes-Smith, M., Nkongolo, K., Cholewa, E., 2013, "Coping mechanisms of plants to metal contaminated soil", *Environmental Change and Sustainability, In Tech*.
- [64] Lux, A., Martinka, M., Vaculik, M., and White, P.J., 2011, "Root responses to cadmium in the rhizosphere", A review, *Journal Exp. Bot.*, 62:21-37.
- [65] Van Hoof, N.A.L.M., Koevoets, P.L.M., Hakvoort, H.W.J., Ten Bookum, W.M., Schat, H., Verkleij, J.A.C., et.al., 2001, "Enhanced ATP-dependent copper efflux across the root cell plasma membrane in copper-tolerant *Silene vulgaris*", *Physiol. Plant*, 113: 225-232.

- [66] Cannon, Helen L., 1957, "Description of Indicator Plants and Methods of Botanical Prospecting for Uranium Deposits on the Colorado Plateau", *Geological Survey bulletin*, United States Government Printing Office, Washington.
- [67] Sachs, J., 1865, "Handbuch der Experimental-Physiologie der Pflanzen, Leipzig, Germany: *Verlag von Wilhelm Engelmann*, 153-154, pp: 47.
- [68] Brooks, R.R., Lee, J., Reeves, R.D., and Jaffre, T., 1977, "Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium species of indicator plants, *J. Geochem Explor.*, 7: 49-57.
- [69] 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.
- [70] Macnair, M.R., Tilstone, G.H., and Smith, S.E., 2000, "The genetics of metal tolerance and accumulation in higher plants", *Phytoremediation of contaminated soil and water.*, Boca Raton, Florida, U.S.A., pp. 235–250.
- [71] Hodson, Martin J., 2012, "Metal toxicity and tolerance in plants", *Biochemist*, 34(5):28-32.
- [72] Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V.P., and Prasad, S.M., 2015, "Heavy metal tolerance in plants: Role of transcriptomics, proteomics, metabolomics and ionomics", *Front. Plant Sci.*, 6:1143.
- [73] Hossain, M.A., Piyatida, P., da Silva, J.A.T., and Fujita, M., 2012, "Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation", *J. Bot.*, 1–37.
- [74] Irving, H.R., and Gehring, C. , 2012, "Plant Signaling Peptides, Signaling and Communication in Plants", *Springer-Verlag*, Berlin Heidelberg , 183-197.
- [75] Sharma, P., Dubey, R.S., 2005, "Lead toxicity in plants", *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 35-52.
- [76] Zhu, X., Ohtsubo, M., Bohmer, R. M., Roberts, J. M. & Assoian, R. K., 1996, "Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein", *J. Cell Biol.*, 133, 391-403.
- [77] Hall, J.L., 2002, "Cellular mechanism for heavy metal detoxification and tolerance", *Journal of Experimental Botany*, 53:1-11.

- [78] Puig, S., 2014, "Function and Regulation of the Plant COPT Family of High-Affinity Copper Transport Proteins", *Hindawi Publishing Corporation Advances in Botany*, Article ID: 476917, pp: 9.
- [79] Yang, X., Feng, Y., He, Z., Stofella, P.J., 2005, "Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation", *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18:339-353.
- [80] 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.
- [81] Guerrero, M.G., Escudero, V., Saéz, A., and Jiménez, M.A., 2016, "Transition Metal Transport in Plants and Associated Endosymbionts: Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Rhizobia", *Front. Plant Sci.*, 7: 1088.
- [82] Aleel, K., 2009, "Grennan identification of genes involved in metal transport in plants", *Plant Physiol.*, 149(4):1623–1624.
- [83] Jan, S., & Parray, J.A., 2016, "Approaches to Heavy Metal Tolerance in Plants", doi:10.1007/978-981-10-1693-6.
- [84] Annamalainathan, K., Joseph, J., Alam, B., Satheesh, P.R., Jacob, J., 2013, "Seasonal changes in xylem sap flow rate in mature rubber plants", *J. Plant Crops*, 41(3):343–349.
- [85] Emamverdian1, A., Ding, Y., 2017, "Effects of heavy metals' toxicity on plants and enhancement of plant defense mechanisms of Si-mediation", *International Journal of Environmental & Agriculture Research (IJOEAR)*, 3(4) 2454-1850.
- [86] Cheng, S., 2016b, " Effects of Heavy Metals on Plants and Resistance Mechanisms", *Environ Sci. Pollut. Res. Int.* , 10(4):256– 264.
- [87] Memon, A.R., Yildizhan, Y., and Keskin, B.C., 2008, "Phytoremediation Of Heavy Metals From Contaminated Areas Of Turkey", *4th European Bioremediation Conference*.
- [88] Greipsson, S., 2011, "Phytoremediation", *Nat. Educ. Know.*, 2:7.
- [89] 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", *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Lewis, Boca, pp. 85-107.
- [90] Salt, D.E. ve Krämer, U., 2000, "Mechanisms of Metal Hyperaccumulation in Plants", *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean-up the Environment*. Wiley, New York, pp. 231-246.

- [91] Rulkens, W.H., Tichy, R., Grotenhuis, J.T.C., 1998, "Remediation of polluted soil and sediment: perspectives and failures", *Water Science and Technology*, London, 37(8):27-35.
- [92] Gerhardt, K.E., Huang, X.D., Glick, B.R., Greenberg, B.M., 2009, "Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges", *Plant Sci.*, 176(1):20–30.
- [93] Sheoran, V., Sheoran, A.S., Poonia, P., 2012, "Phytoremediation technologies", *Environ. Res. J.*, 393:168–214.
- [94] EPA (Environmental Protection Agency), 2000, "Introduction to Phytoremediation", EPA/600/R-99/107, *National Risk Management Research Laboratory Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency Cincinnati, Ohio*, 45268, USA.
- [95] Kushwaha, A., Rani, R., Kumar, S., and Gautam A., 2015, "Heavy metal detoxification and tolerance mechanisms in plants: Its implications for Phytoremediation", *Environmental Reviews*, 23: 1–13.
- [96] Milner, M.J., Kochian, L.V., 2008, "Investigating heavy-metal hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a model system, *Ann. Bot.*, 102: 3-13.
- [97] A. P. G. C. Marques, A. O. S. S. Rangel, and P. M. L. Castro, 2009, "Remediation of heavy metal contaminated soils: phytoremediation as a potentially promising clean-up technology", *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 38(9):622–654.
- [98] Schnoor, J., 1997, "Phytoremediation: ground water remediation technologies analysis center evaluation report", *TE-98-01*, 37.
- [99] Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I., 1998, "Phytoremediation", *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49:643-668.
- [100] Suresh, B., Ravishankar, G., 2004, "Phytoremediation - A novel and promising approach for environmental clean-up", *Crit. Rev. Biotech.*, 24:97-124.
- [101] Peer, W.A., Baxter, I.R., Richards, E.L., Freeman, J.L., Murphy, A.S., 2005, "Phytoremediation and hyperaccumulator plants", *Chapter in Topics in current genetics*.
- [102] Doty, S.L., Shang, Q.T., Wilson, A.M., Moore, A.L., Newman, L.A., Strand, S.E., 2007, "Enhanced metabolism of halogenated hydrocarbons in transgenic plants containing mammalian P450 2E1", *Proceeding of the national academy of science, USA*, 97, 6287-6291.
- [103] Kocaer, F.O., Başkaya, H.S., 2003, "Metallerle kirlenmiş toprakların temizlenmesinde uygulanan teknolojiler", *Uluudağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 8(1):121-131.

- [104] Bert, V., Girondelot, B., Quatanens, V., Laboudigue, A., 2005, "A phytostabilisation of a metal polluted dredged sediment deposit-mesocosm experiment and field trial, In: Uhlmann, O., Annokkée, G.J., and Arendt, F. (eds), *Proceedings of the 9th International FZK/TNO Conference on Soil-Water Systems, Remediation Concepts and Technologies*, Bordeaux, pp: 1544-1550.
- [105] Wu, G., Kang, H., Zhang, X., Shao, H., Chu, L., Ruan, C., 2010, "A critical review on the bioremoval of hazardous heavy metals from contaminated soils: issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities", *Journal of Hazardous Materials*, 174: 1-8.
- [106] Davis, L.C., Vanderhoof, S., Dana, J., Selk, K., Smith, K., Goplen, B., Erickson, L.E., 1998, "Movement of chlorinated solvents and other volatile organics through plants monitored by Fourier transform infrared (FT-IR) spectrometry", *J. Hazardous Subst. Research*, 1:4-1, 4-26.
- [107] Newman, L., Strand, S., Choe, N., Duffy, J., Ekuan, G., Ruszaj, M., Shurtleff, B., Wilmoth, J., Heilman, P., Gordon, M., 1997, "Uptake and biotransformation of trichloroethylene by hybrid poplars", *Environ. Sci. Tech.*, 31:1062-1067.
- [108] Tollsten, L., Muller, P., 1996, "Volatile organic compounds emitted from beech leaves", *Phytochem*, 43:759-762.
- [109] Rugh, C.L., Senecoff, J.F., Meagher, R.B., Merkle, S.A., 1998, "Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation", *Nat. Biotechnol.*, 16:925-928.
- [110] Rugh, C.L., Wilde, H.D., Stack, N.M., Thompson, D.M., Summers, A.O., Meagher, R.B., 1996, "Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial *merA* gene", *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93:3182-3187.
- [111] Ghosh, M., Singh, S.P., 2005, "A review of phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts", *Applied Ecology and Environmental Research*, 3(1):1-18.
- [112] Dushenkov, V., and Kapulnik, Y., 2000, "Phytofiltration of metals", *Phytoremediation of Toxic Metals - Using Plants to Clean-up The Environment*. Wiley, New York, pp. 89- 106.
- [113] Lee, M. ve Yang, M., 2010, "Rhizofiltration Using Sunflower (*Helianthus annuus* L.) and Bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. *vulgaris*) to Remediate Uranium Contaminated Groundwater", *Journal of Hazardous Materials*, 173:589-596.
- [114] Dushenkov, V., Kumar, P.B.A.N., Motto, H. ve Raskin, I., 1995, "Rhizofiltration: The Use of Plants to Remove Heavy Metals from Aqueous Streams", *Environmental Science and Technology*, 29, 1239-1245.



- [115] Bailey, C.D., Koch, M.A., Mayer, M., Mummenhoff, K., O’Kane, Jr. S.L., et al., 2006, "Toward a global phylogeny of the Brassicaceae", *Mol. Biol. Evol.*, 23: 2142–2160.
- [116] Koch, M., Mummenhoff, K., 2006, " Evolution and phylogeny of the Brassicaceae", *Plant Syst. Evol.*, 259: 81-83.
- [117] Al-Shehbaz, I., Beilstein, M., Kellogg, E., 2006, "Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae)", An overview, *Plant Syst. Evol.*, 259: 89-120.
- [118] Zeshan Ali, Hina Waheed, Alvina Gul, Farzana Afzal, Kiran Anwaar, and Saiqa Imran, 2017, "Brassicaceae plants: Metal accumulation and their role in phytoremediation", *Oilseed Crops: Yield and Adaptations under Environmental Stress*, First Edition, Chapter 11.
- [119] Nagaharu, U., 1935, "Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of B.napus and peculiar mode of fertilization", *Jap. J. Bot.*, 7:389-452.
- [120] 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.
- [121] Thompson, L., 1997, "Exciting Environmental Technologies", Web sitesi; <http://www.betterworld.com/BWZ/9608/cover.htm#Phytoremediation>.
- [122] Nazir, A., Malik, R.N., Ajaib, M., Khan N., Siddiqui, M.F., 2011, "Hyperaccumulators of Heavy Metals of Industrial Areas of Islamabad and Rawalpindi", *Pakistan Journal Of Botany*, 43 (4): 1925-1933.
- [123] Alford, E.R, Pilon-Smits, E. ve Paschke, M.W., 2010, "Metallophytes—a View from the Rhizosphere", *Plant Soil*, 337: 33–50.
- [124] Vamerali, T., Bandiera, M, ve Mosca, G., 2010, "Field Crops for Phytoremediation of Metal-Contaminated Land. A Review", *Environmental Chemistry Letters*, 8: 1– 17.
- [125] Mudgal, V., Madaan, N. ve Mudgal, A., 2010, "Heavy Metals in Plants: Phytoremediation: Plants Used to Remediate Heavy Metal Pollution", *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1 (1): 40-46.
- [126] Dhankher, O.P., Li, Y., Rosen, B.P., Shi, J. and Harden, P.N., 2002, Engineering Tolerance and Hyperaccumulation of Arsenic in Plants by Combining Arsenate Reductase and Gamma-Glutamylcysteine Synthetase Expression, *Nature Biotechnology*, 20, 1094-1095.
- [127] Weber, M., Harada, E., Vess, C., Roepenack-Lahaye, E.V. and Clemens, S., 2004, Comparative Microarray Analysis of Arabidopsis thaliana and Arabidopsis halleri Roots

Identifies Nicotianamine Synthase, a ZIP Transporter and Other Genes as Potential Metal Hyperaccumulation Factors, *The Plant Journal*, 37(2):269-281.

[128] Urano, K., Kurihara, Y., Seki, M., and Shinozaki, K., 2010, "Omics analyses of regulatory networks in plant abiotic stress response", *Current opinion in plant biology*, 13(2):132-138.

[129] Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Lasat, M.M., Letham, D.L.D., Garvin, D.F., 2000, "The molecular physiology of heavy metal transport in the Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*", *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 97:4956-4960.

[130] Assunção, Agl., Schat, H., Aarts, Mgm., 2003, "*Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants", *New Phytologist*, 159:351-360.

[131] Colangelo, E.P., Guerinot, M.L., 2006, "Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants", *Current Opinion Plant Biology*, 9:322-330.

[132] 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.

[133] Argüello, J.M., 2003, "Identification of ion selectivity determinants in heavy metal transport P1B-type ATPases", *J. Membrane Biol.*, 195:93-108.

[134] Forbes, J.R., Gros, P., 2001, "Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions", *Trends Microbiol.*, 9(8):397-403.

[135] Van Ho, A., Ward, D.M., Kaplan, J., 2002, "Transition metal transport in yeast", *Annu. Rev. Microbiol.*, 56:237-261.

[136] Goswami, T., Rolfs, A., Hediger, M.A., 2002, "Iron transport: emerging roles in health and disease", *Biochem. Cell. Biol.*, 80:679-689.

[137] Agranoff, D., Collins, L., Kehres, D., Harrison, T., Maguire, M., Krishna, S., 2005, "The Nramp orthologue of *Cryptococcus neoformans* is a pH-dependent transporter of manganese, iron, cobalt and nickel", *Biochemical Journal*, 385(1), 225-232.

[138] Belouchi, A., Cellier, M., Kwan, T., Saini, H.S., Leroux, G., Gros, P., 1995, "The macrophage-specific membrane protein Nramp controlling natural resistance to infections in mice has homologues expressed in the root system of plants", *Plant Molecular Biology*, 29: 1181-1196.

[139] 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.

- [140] Curie, C., Alonso, J.M., Le Jean, M., Ecker, J.R., and Briat, J.F., 2000, "Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport", *Biochem. J.*, 347:749-755.
- [141] Eng, B.H., Guerinot, M.L., Eide, D., Saier, M.H.J., 1998, *J. Membr. Biol.*, 166:1-7.
- [142] Eide, D., Broderius, M., Fett, J., Guerinot, M.L., 1996, "A novel iron regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 5624-5628.
- [143] Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M.L., Eide, D., 1998, "Identification of family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 7220-7224.
- [144] Wintz, H., Fox, T., Wu, Y.Y., Feng, V., Chen, W., Chang, H.S., Zhu, T., Vulpe, C., 2003, "Expression profiles of *Arabidopsis thaliana* in mineral deficiencies reveal novel transporters involved in metal homeostasis", *Journal of Biological Chemistry*, 278: 47644-47653.
- [145] Cohen, C.K., Garvin, D.F., Kochian, L.V., 2004, "Kinetic properties of a micronutrient transporter from *Pisum sativum* indicate a primary function in Fe uptake from the soil", *Planta*, 218:(5): 784-792.
- [146] Pedas, Pai, Cecilie K. Ytting, Anja T. Fuglsang, Thomas P. Jahn, Jan K. Schjoerring, and Søren Husted, 2008, "Manganese Efficiency in Barley: Identification and Characterization of the Metal Ion Transporter HvIRT1", *Plant physiology*, 148 (1):455-466.
- [147] Lin, Y.F., Liang, H.M., Yang, S.Y., Boch, A., Clemens, S., Chen, C.C., 2009, "*Arabidopsis* IRT3 is a zinc-regulated and plasma membrane localized zinc/iron transporter", *New Phytol*, 182: 392-404
- [148] Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Lasat, M.M., Letham, D.L.D., Garvin, D.F., 2000, "The molecular physiology of heavy metal transport in the Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*", *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 97:4956-4960.
- [149] Guerinot, M.L., 2000, "The ZIP family of metal transporters", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465: 190-198.
- [150] Rogers, E. E., Eide, D. J., and Guerinot, M. L., 2000, "Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter", *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 97: 12356–12360.
- [151] Eide, D., Broderius, M., Fett, J., Guerinot, M.L., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 5624-5628.

- [152] Zhao, H., Eide, D., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 2454-2458.
- [153] Zhao, H., Eide, D., 1996, *J. Biol. Chem.*, 271:23203-23210.
- [154] Jung, H., Gayomba, S.R., Rutzke, M.A., Craft, E., Kochian, L.V., and Vatamaniuk, O.K., 2012, "COPT6 is a plasma membrane transporter that functions in copper homeostasis in Arabidopsis and is a novel target of SQUAMOSA promoter-binding protein-like 7", *Journal of Biological Chemistry*, 287 (40):33252–33267.
- [155] Sancenon, V., Puig, S., Mira, H., Thiele, D.J., and Penarrubia, L., 2003, "Identification of a copper transporter family in Arabidopsis thaliana", *Plant Molecular Biology*, 51(4):577–587.
- [156] Gayomba, S.R., Jung, H., Yan, J., et al., 2013, "The CTR/COPT dependent copper uptake and SPL7-dependent copper deficiency responses are required for basal cadmium tolerance in A. thaliana", *Metallomics*, 5(9):1262–1275.
- [157] Perea-Garcia, A., Garcia-Molina, A., Andres-Colás, N., et al., 2013, "Arabidopsis copper transport protein COPT2 participates in the cross talk between iron deficiency responses and low phosphate signaling", *Plant Physiology*, 162(1):180–194.
- [158] Garcia-Molina, A., Andres-Colás, N., Perea-García A., et al., 2013, "The arabidopsis COPT6 transport protein functions in copper distribution under copper-deficient conditions," *Plant and Cell Physiology*, 54(8):1378–1390.
- [159] Andres-Colás, N., Perea-García, A., Puig, S. and Penarrubia, L., 2010, "Deregulated copper transport affects Arabidopsis development especially in the absence of environmental cycles," *Plant Physiology*, 153(1):170–184.
- [160] Klaumann, S., Nickolaus, S. D.S., Furst, H., et al., 2011, "The tonoplast copper transporter COPT5 acts as an exporter and is required for interorgan allocation of copper in Arabidopsis thaliana," *New Phytologist*, 192(2):393–404.
- [161] Garcia-Molina, A., Andres-Colás, N., Perea-García, A., Del Valle-Tascon, S., Penarrubia, L., and Puig, S., 2011, "The intracellular Arabidopsis COPT5 transport protein is required for photosynthetic electron transport under severe copper deficiency," *Plant Journal*, 65(6):848–860.
- [162] Yuan, M., Li, X., Xiao, J., & Wang, S., 2011, "Molecular and functional analyses of COPT/Ctr-type copper transporter-like gene family in rice", *BMC Plant Biology*, 11(1), 69.
- [163] Dai, J., Wang, N., Xiong, H., Qiu, W., Nakanishi, H., Kobayashi, T., Nishizawa K. N., and Zuo, Y., 2018, "The Yellow Stripe-Like (YSL) Gene Functions in Internal Copper Transport in Peanut", *Genes*, 9, 635.

- [164] DiDonato, R.J. Jr., Roberts, L.A., Sanderson, T., Eislely, R.B., Walker, E.L., 2004, "Arabidopsis yellow stripe-like2 (YSL2): a metal-regulated gene encoding a plasma membrane transporter of nicotianamine-metal complexes", *Plant J.*, 39, 403-414.
- [165] Curie, C., Panaviene, Z., Loulergue, C., Dellaporta, S.L., Briat, J.F., Walker, E.L., 2001 "Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake" , *Nature*, 409:346-349.
- [166] Gendre, D., Czernic, P., Conéjéro, G., Pianelli, K., Briat, J-F., Lebrun, M., Mari, S., 2007, "TcYSL3, a member of the YSL gene family from the hyperaccumulator specie *Thlaspi caerulescens*, encodes a nicotinamine-Ni/Fe transporter", *Plant Journal*, 49: 1-15.
- [167] Haydon, M.J., Cobbett, C.S., 2007, "Transporters of ligands for essential metal ions in plants", *New Phytologist*, 174:499–506.
- [168] Childs, S., Ling, V., 1994, "The MDR superfamily of genes and its biological implications", In *Important Advances in Oncology*, Edited by DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Philadelphia: Lippincott Company*; 21-36.
- [169] Ames, G., Lecar, H., 1992, "ATP-dependent bacterial transporters and cystic fibrosis: analogy between channels and transporters", *FASEB J.*, 6:2660-2666.7
- [170] Dean, M., 1995, "Evolution of ATP-binding cassette transporter genes", *Current Opinion in Genetics & Development*, 5(6), 779–785.
- [171] Rea, P.A., Li, Z.S., Lu, Y.P., Drozdowicz, Y.M., 1998, From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 727-760.
- [172] Theodoulou, F.L., 2000, "Plant ABC transporters", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465: 79-103.
- [173] Gustin et al., 2011, "Structure and evolution of the plant cation diffusion facilitator family of ion transporters", *BMC Evolutionary Biology*, 11(76):1471-2148.
- [174] Paulsen, I.T., Saier, M., 1997, "A Novel Family of Ubiquitous Heavy Metal Ion Transport Proteins", *J. Membrane Biol.*, 156:99-103.
- [175] Haney, C.J., Grass, G., Franke, S., Rensing, C., 2005, "New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32:215-226.
- [176] Maser, P., Thomine, S., Schroeder, J.I., Ward, J.M., Hirschi, K., Sze, H., Talke, I.N., Amtmann, A., Maathuis, F.J., Sanders, D., Harper, J.F., Tchieu, J., Gribskov, M., Persans, M.W., Salt, D.E., Kim, S.A., Guerinot, M.L., 2001, "Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis", *Plant Physiol.*, 126:1646-1667.

- [177] Bruinsma, J., Jirakulaporn, T., Muslin, A., Kornfeld, K., 2002, "Zinc ions and cation diffusion facilitator proteins regulate Ras-mediated signaling", *Developmental Cell*, 2:567-578.
- [178] Manohar, M., Shigaki, T., & Hirschi, K. D., 2011, "Plant cation/H<sup>+</sup> exchangers (CAXs): biological functions and genetic manipulations", *Plant Biology*, 13(4):561–569.
- [179] Pardo, J.M., Cubero, B., Leidi, E.O., and Quintero, F.J., 2006, "Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance", *J. Exp. Bot.*, 57: 1181–1199.
- [180] Sze, H., Padmanaban, S., Cellier, F., et al., 2004, "Expression patterns of a novel AtCHX gene family highlight potential roles in osmotic adjustment and K<sup>+</sup> homeostasis in pollen development", *Plant Physiology*, 136: 2532–2547.
- [181] White, P.J., Bowen, H.C., Demidchik, V., Nichols, C., Davies, J.M., 2002, Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1564, 299-309.
- [182] Evans, A.R., et al., 2012, "The roles of the cation transporters CHX21 and CHX23 in the development of *Arabidopsis thaliana*", *J. Exp. Bot.*, 63(1):59-67.
- [183] Bassil, E., & Blumwald, E., 2014, "The ins and outs of intracellular ion homeostasis: NHX-type cation/H<sup>+</sup> transporters", *Current Opinion in Plant Biology*, 22:1–6.
- [184]. Axelsen, K.B., Palmgren, M.G., 2001, "Inventory of The Superfamily of P-type Ion Pumps in *Arabidopsis*", *Plant Physiology*, 126, 696±706.
- [185] Pedersen, P., Carafoli, E., 1987, "Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function", *Trends in Biochemical Sciences*, 4:146–150.
- [186] 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.
- [187] Williams, L. E., & Mills, R. F., 2005, "P1B-ATPases – an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants", *Trends in Plant Science*, 10(10):491–502.
- [188] Subasic, L., Gavranovic, H., Muhovic, I., and Memon, A. R., 2012, "Heavy metal induced gene expression in Brassicacea", *3<sup>rd</sup> International Symposium on Sustainable Development*, May 31-June 1, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.
- [189] 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.

- [190] Solioz, M., Odermatt, A., 1995, "Copper and silver transport by Cop B-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*", *Journal of Biological Chemistry*, 270: 9217-9221.
- [191] Beard, S.J., Hashim, R., Membrillo-Hernandez, J., Hughes, M.N., Poole, R.K., 1997, "Zinc (II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that the *zntA* gene (o732) encodes a cation transport ATPase", *Molecular Microbiology*, 25: 883-891.
- [192] Axelsen, K.B., Palmgren, M.G., 2001, "Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*", *Plant Physiology*, 126: 696-706.
- [193] Mills, R.F., Krijger, G.C., Baccarini, P.J., Hall, J.L., Williams, L.E., 2003, "Functional expression of AtHMA4, a P1B-type ATPase in the Zn/Co/Cd/Pb subclass", *The Plant Journal*, 35: 164-175.
- [194] Argüello, J., Eren, E., González-Guerrero, M., 2007, "The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases", *BioMetals*, 20: 233-248.
- [195] Møller, J.V., et al., 1996, "Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases", *Biochim. Biophys. Acta*, 1286:1-51
- [196] Smith, A.T., Smith, K.P., and Rosenzweig A.C., 2014, "Diversity of the metal-transporting P1B-type ATPases", *J. Biol. Inorg. Chem.*, 19(6): 947-960.
- [197] Garbisu, C., Alkorta, I., 2001, "Phytoextraction: a cost effective plant-based technology for the removal of metals from the environment", *Biores. Technol.*, 77(3):229-236.
- [198] Gisbert, C., Ros, R., de Haro, A., Walker, D.J., Pilar, Bernal, M., Serrano, R., Avino, J.N., 2003, "A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation", *Biochem. Biophys Res. Commun.*, 303(2):440-445.
- [199] Lone, M.I., He, Z.L., Stoffella, P.J., Yang, X.E., 2008, "Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: progresses and perspectives", *J. Zhejiang Univ. Sci. B.*, 9(3):210-220.
- [200] Van, Assche, F., Clijsters, H., 1990, "Effects of metals on enzyme activity in plants", *Plant Cell Environ.*, 13:195-206.
- [201] Li, M., Hu, C.W., Zhu, Q., Chen, L., Kong, Z.M., Liu, Z.L., 2006, "Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the micro-alga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae)", *Chemosphere*, 62:565-572.
- [202] Srivastava, H.S., 1999, "Biochemical defence mechanisms of plants to increased levels of ozone and other atmospheric pollutants", *Curr. Sci.*, 76:525-533.

- [203] Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J-F., Scott, I.M., 1997, "Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signalling", *Physiol. Plant*, 100:241–254.
- [204] Larson, R.A., 1988, "The Antioksidants of Higher Plants", *Phytochemistry*, 27: 96978.
- [205] Caregnato, F.F., Koller, C.E., MacFarlane, G.R., Moreira, J.C.F., 2008, "The glutathione antioxidant system as a biomarker suite for the assessment of heavy metal exposure and effect in the grey mangrove", *Avicennia marina (Forsk.) Vierh. Mar Pollut. Bull.*, 56:1119–1127.
- [206] Tausz, M., Sircelj, H., Gril, D., 2004, "The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid?", *Journal of Experimental Botany*, 55:1955-1962.
- [207] Blokhina, O., Virolainen, E., Fafarstedt, K.V., 2003, "Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review", *Annals of Botany*, 91:179-194.
- [208] Foyer, C.H. ve Noctor, G., 2005, "Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A metabolic Interface Between Stress Perception and Physiological Responses", *The Plant Cell*, 17:1866-1875.
- [209] Cobbett, C.S. ve Golsbrough, P., 2002, "Phytochelatin and Metallothioneins: Roles in Heavy Metals Detoxification and Homeostasis", *Annual Reviews of Plant Biology*, 53, 159-182.
- [210] Dixon, D.P., Cummins, L., Cole, D.J. and Edwards, R., 1998, "Glutathione-mediated detoxification systems in plants", *Current Opinions in Plant Biology*, 1, 258- 266.
- [211] Meister, A., 1988, "Glutathione metabolism and its selective modification", *Journal of Biological Chemistry*, 263, 17 205–8.
- [212] McBean, G.J., "Cysteine, Glutathione, and Thiol Redox Balance in Astrocytes", *Antioxidants, MDPI*, 6:62.
- [213] Jimenez, A., Hernandez, J.A., Pastori, G., del Rio, L.A., Sevilla, F., 1998, "Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves", *Plant Physiol.*, 118: 1327-35.
- [214] Rausch, T., Wachter, A., 2005, "Sulfur metabolism: A versatile platform for launching defence operations", *Trends Plant Sci.*, 10: 503-9.



- [215] Wingate, V.P.M., Lawton, M.A., Lamb, C.J., 1988, "Glutathione of barley (*Hordeum vulgare* L.) causes a massive and selective induction of plant defence genes", *Plant Physiology*, 3:1205–11.
- [216] Baier, M., Dietz, K.J., 1997, "The plant 2-cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear encoded chloroplast protein: its expression regulation, phylogenetic origin and implications for its specific function in plants", *The Plant Journal*, 12:179–90.
- [217] Grill, E., Loßfler, S., Winnacker, E.L., Zenk, M.H., 1989, "Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific g-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase)", *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 86: 6838–6842.
- [218] Marrs, K.A., 1996, "The functions and regulation of glutathione-S-transferases in plants", *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 47, 127–158.
- [219] Liang J., Tian Y.X., Yang F., Zhang J.P., Skibsted L.H., 2009, "Antioxidant synergism between carotenoids in membranes", Astaxanthin as a radical transfer bridge, *Food Chemistry*, 115:1437–1442.
- [220] Kim, S.J., Shin, Y.H., Park, E.H., Sa, J.H., Lim, C.J., 2003, "Regulation of the gene encoding glutathione synthetase from fission yeast", *J. Biochem. Mol. Biol.* 36:326–331.
- [221] Tungmunnithum, D.; Thongboonyou, A.; Pholboon, A.; Yangsabai, A., 2018, "Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects", An overview. *Medicines*, 5:93.
- [222] Bendary, E.; Francis, R.R.; Ali, H.M.G.; Sarwat, M.I.; El Hady, 2013, "S. Antioxidant and structure–activity relationships (SARs) of some phenolic and anilines compounds.", *Ann. Agric. Sci.*, 58:173–181.
- [223] Nunes, P.X., Silva, S.F., Guedes, R.J., Almeida, S., 2012, "Biological oxidations and antioxidant activity of natural products, Phytochemicals as nutraceuticals", *Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*.
- [224] Bravo, L., 1998, "Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance", *Nutr. Reviews*, 56:317–333.
- [225] Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1938, "The water culture method for growing plants without soil", *Cal. Agri. Exp. Station Circular*, 347: 1-39.
- [226] Memon, A.R., Ito, S., Yatazawa, M., 1980b, "Distribution of zinc and cadmium in temperate forest taxa of central Japan", *Soil Sci. Plant Nutr.*, 26:281-290.

- [227] Kähkönen M.P., Hopia A.I., Heikki J.V., Rauha J.P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M., 1999, "Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds", *J. Agric. Food Chem.*, 47:3954–3962.
- [228] Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J., 2002, "Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods", *J. Food Drug Anal.*, 10:178-182.
- [229] Newton, G.L., Fahey, R.C., 1995, "Determination of biothiols by bromobimane labeling and high-performance liquid chromatography", *Methods in Enzymology*, 251:148–166.
- [230] Chandna, R., Augustine, R., and Bisht, N.C., 2012, "Evaluation of Candidate Reference Genes for Gene Normalization in *Brassica juncea* Using Real Time Quantitative RT-PCR", *PLoS One*, 7(5): e36918.
- [231] Memon, A.R., Zahirovic, E., 2014, "Genomics and Transcriptomics Analysis of Cu Accumulator Plant *Brassica nigra* L.", *Journal of Applied Biological Sciences*, 8(2): 1-8.
- [232] Koressaar, T., and Remm, M., 2007, "Enhancements and modifications of primer design program Primer3", *Bioinformatics*, 23(10): 1289-1291.
- [233] Untergrasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., 2012, "Primer3-new capabilities and interfaces", *Nucleic Acids Research*, 40(15): e115.
- [234] Cevher-Keskin, B., Yıldızhan, Y., Yüksel, B., Dalyan, E., Memon A.R., 2019, Characterization of differentially expressed genes to Cu stress in *Brassica nigra* by Arabidopsis genome arrays, *Environmental Science and Pollution Research*, 26(1):299-311.
- [235] Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D.G., 2011, "Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega", *Molecular Systems Biology*, 7:539.
- [236] Cemanovic, A., Sutkovic, J., Elamawi, R., 2014, "3D structure prediction of histone acetyltransferase (HAC) proteins of the p300/CBP family and their interactome in *Arabidopsis thaliana*", *Network Biology*, 4(3): 109-122.
- [237] Lesk, A.M., 2002, "Introduction to Bioinformatics", *Oxford University Press Inc.*, New York, U.S.A.
- [238] Bawono, P., Dijkstra, M., Pirovano, W., Feenstra, A., Abeln, S., & Heringa, J., 2016, "Multiple Sequence Alignment", *Bioinformatics*, 167–189.

[239] Jusovic, M., et. al., 2015, "Comparative structural analysis of heavy metal ATPases in *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis halleri*, and *Brassica rapa* species", Yüksek lisans, *International University of Sarajevo*, Sarajevo.

[240] Claverie, J.M., Notredame, C., 2007, "Bioinformatics for Dummies", Second Edition, *Wiley Publishing Inc.*, Indianapolis, U.S.A.

[241] Dereeper, A., Guignon, V., Claverie, J.M., Blanc, G., 2010, "Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist", *Nucleic Acids Research* 36 (Web Server Issue): W465-9.

[242] Dereeper, A., Audic, S., Blanc, G., 2008, "Blast-Explorer helps you building datasets for phylogenetic analysis", *BMC Evol. Biol.*, 12;10:8.

[243] Angelova, V., Ivanov, K., 2008, "Bio-accumulation and distribution of heavy metals in black mustard (*Brassica nigra* Koch)", *Environmental Monitoring and Assessment*, 153:449-459.

[244] Rathore, S.S., Kapila, S., Premi, O.P., Kandpal, B.K., 2013, "Water-use efficiency, productivity, photosynthesis and sustainability of pressurized irrigation systems for Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czernj and Cosson) under semi-arid conditions of Rajasthan", *Res. Crops*, 14:140–150.

[245] Han, F.X., Banin, A., et al., 2002, "Industrial age anthropogenic inputs of heavy metals into the pedosphere", *Naturwissenschaften*, 89(11):497-504.

[246] Sayyed, M.R.G., Sayadi, M.H., 2011, "Variations in the heavy metal accumulations within the surface soils from the Chitgar industrial area of Tehran", *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 1(1): 36-46.

[247] Jean-Philippe S.R., Labbé, N., Franklin, J.A., et al., 2012, "Detection of mercury and other metals in mercury contaminated soils using mid-infrared spectroscopy", *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 2(3): 139-149.

[248] Raju, K.V., Somashekar, R.K., Prakash, K.L., 2013, "Spatio-temporal variation of heavy metals in Cauvery River basin", *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 3(1): 59-75.

[249] Prajapati, S.K., Meravi, N., 2014, "Heavy metal speciation of soil and *Calotropis procera* from thermal power plant area", *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 4(2): 68-71.

[250] Sayadi, M.H., Rezaei, M.R., 2014, "Impact of land use on the distribution of toxic metals in surface soils in Birjand city, Iran", *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 4(1): 18-29.

- [251] Zojaji, F., Hassani, A.H., Sayadi, M.H., 2014, "Bioaccumulation of chromium by Zea mays in wastewater-irrigated soil: An experimental study", *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 4(2): 62-67.
- [252] Xin, Q.G., Pan, W.B., Zhang, T.P., 2003, "On phytoremediation of heavy metal contaminated soils", *Ecologic Science*, 22(3): 275-279.
- [253] Tappero, R., Peltier, E., Gräfe, M., Heidel, K., Ginder-Vogel, M., Livi, K. J. T., ... Sparks, D. L., 2007, "Hyperaccumulator *Alyssum murale* relies on a different metal storage mechanism for cobalt than for nickel", *New Phytologist*, 175(4), 641–654.
- [254] Kumar, P.B.A.N., Dushenkov, V., Motto, H., and Raskin, I., 1995, "Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils", *Environmental Science and Technology*, 29:1232-1238.
- [255] Millar A.H., Mittova V., Kiddle G., Heazlewood J.L., Bartoli C.G., Theodoulou F.L., Foyer C.H., 2003. Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiology*, 133: 443-447.
- [256] Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., Foyer, C.H., 2012, "Glutathione in plants: An integrated overview", *Plant Cell Environ.*, 35:454–484.
- [257] Noctor, G., Arisi, A.M., Jouanin, L., Kunert, K.J., Rennenberg, H., Foyer, C.H., 1998, "Glutathione: Biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants", *J. Exp. Bot.*, 49:623–647.
- [258] Foyer, C.H., Noctor, G., 2003, "Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria", *Physiol Plantarum*, 119:355–364.
- [259] Semane, B., Cuypers, A., Smeets, K., van Belleghem, F.; Horemans, N., Schat, H., Vangronsveld, J., 2007, "Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana*: Glutathione metabolism and antioxidative defence system", *Physiol. Plant.*, 129:1519–528.
- [260] Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H., 2009, "Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants", *Curr. Opin. Plant Biol.*, 12:364–372.
- [261] van Belleghem, F., Cuypers, A., Semane, B., Smeets, K., Vangronsveld, J., d'Haen, J.; Valcke, R., 2007, "Subcellular localization of cadmium in roots and leaves of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.*, 173:495–508.
- [262] Mendoza-Cozatl, D.G., Butko, E., Springer, F., Torpey, J.W., Komives, E.A., Kehr, J., Schroeder, J.I., 2008, "Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation", *Plant J.*, 54:249–259.

- [263] Zhu, Y.L., Pilon-Smits, E.A., Tarun, A.S., Weber, S.U., Jouanin, L., Terry, N., 1999, "Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase", *Plant Physiol.*, 121:1169–1178.
- [264] Zeng, X., Ma, L.Q., Qiu, R., et al., 2009, "Responses of non-protein thiols to Cd exposure in Cd hyperaccumulator *Arabis paniculata*", *Franch. Environ. Exp. Bot.*, 66:242–248.
- [265] Khan. M.I.R., Khan, N.A., Masood, A., et. al., 2016, "Hydrogen peroxide alleviates nickel-inhibited photosynthetic responses through increase in use-efficiency of nitrogen and sulfur, and glutathione production in mustard", *Front. Plant Sci.*, 7:44.
- [266] Herna'ndez, L.E., Sobrino-Plata, J., Montero-Palmero, M.B., et. al., 2015, "Contribution of glutathione to the control of cellular redox homeostasis under toxic metal and metalloid stress", *J. Exp. Bot.*
- [267] Akagün, G., 2009, "Alabaş (B. oleracea var. Gonglylodes) Bitkisinin Antioksidan Aktivitesinin İncelenmesi, *Yüksek lisans tezi*, Kimya Anabilim Dalı, ss.79.
- [268] Kaur, C., Kumar, K., Anıl, D., Kapoor, H.C., 2007, "Varations in antioxidant activity in broccoli (*Brassica oleracea* L.) cultivars", *Journal of Food Biochemistry*, 31:621-638
- [269] Unal, K., Susanti, D., Taher, M., 2014, "Polyphenol content and antioxidant capacity in organically and cnventionally grown vegetables", *Journal of coast life medicine*, 2:864-871.
- [270] Li, Z., Lee, H.W., Liang, X., Liang , D., Wang, Q., Huang, D, and Ong, C.,N, 2018, "Profiling of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of 12 Cruciferous Vegetables", *Molecules*, 23, 1139.
- [271] Ali, R.M., Singh, N., Shohael, A.M., Hahn, E.J., Paek, K-Y., 2006, "Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress", *Plant Sci.*, 17:147–154.
- [272] Samanta, A., Das, G., Das, S.K., 2011, "Roles Of Flavonoids In Plants", *Int. J. Pharm Sci. Tech.* , 6:1.
- [273] Hernández, I., Alegre, L., Breusegem, F.V., MunnéBosch, S., 2009, "How relevant are flavonoids as antioxidants in plants?", *Trends Plant Sci.*, 14(3): 125-132.
- [274] Memon, A. R., 2016., "Metal hyper-accumulators: Mechanism of hyper-accumulation and metal tolerance" *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants*, *Springer-Verlag*, 3:239-268.



EK-1 7 gün boyunca kontrol grubu ve belirlenen farklı Cu seviyelerinde uygulanan *B. nigra* bitkisinin genel görünümü (2. Tekerrür/R2)



EK-2 7 gün boyunca kontrol grubu ve belirlenen farklı Cu seviyelerinde uygulanan *B. nigra* bitkisinin kök kısımlarının genel görünümü (2. tekerrür/R2)



EK-3 7 gün boyunca kontrol grubu ve belirlenen farklı seviyelerinde uygulanan *B. juncea* bitkisinin genel görünümü (2. tekerrür/R2)



EK-4 7 gün boyunca kontrol grubu ve belirlenen farklı Cu seviyelerinde uygulanan *B. juncea* bitkisinin kök kısımlarının genel görünümü (2. Tekerrür/R2)





EK-5 Farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. juncea*' nın yapraklarında HMA1' in anlatımından elde edilen verilerin ANOVA analizi

**ANOVA**

B. juncea HMA1 ANOVA Analizi

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	28,014	6	4,669	79,715	,000
Within Groups	,820	14	,059		
Total	28,834	20			

EK- 6 Farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. juncea*' nın yapraklarında HMA1' in anlatımından elde edilen verilerin Turkey ve Duncan analizi

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: B.juncea/HMA1

(I) treatment	(J) treatment	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
Tukey HSD	,00	25,00	-2,02667*	,19760	,000	-2,7014	-1,3519
		50,00	-3,64000*	,19760	,000	-4,3147	-2,9653
		100,00	-2,83667*	,19760	,000	-3,5114	-2,1619
		200,00	-3,14000*	,19760	,000	-3,8147	-2,4653
		500,00	-3,17000*	,19760	,000	-3,8447	-2,4953
		1000,00	-1,63333*	,19760	,000	-2,3081	-,9586
25,00	,00	,00	2,02667*	,19760	,000	1,3519	2,7014
		50,00	-1,61333*	,19760	,000	-2,2881	-,9386
		100,00	-,81000*	,19760	,014	-1,4847	-,1353
		200,00	-1,11333*	,19760	,001	-1,7881	-,4386
		500,00	-1,14333*	,19760	,001	-1,8181	-,4686
		1000,00	,39333	,19760	,460	-,2814	1,0681
50,00	,00	,00	3,64000*	,19760	,000	2,9653	4,3147
		25,00	1,61333*	,19760	,000	,9386	2,2881
		100,00	,80333*	,19760	,015	,1286	1,4781
		200,00	,50000	,19760	,220	-,1747	1,1747
		500,00	,47000	,19760	,276	-,2047	1,1447

		1000,00	2,00667*	,19760	,000	1,3319	2,6814
100,00		,00	2,83667*	,19760	,000	2,1619	3,5114
		25,00	,81000*	,19760	,014	,1353	1,4847
		50,00	-,80333*	,19760	,015	-1,4781	-,1286
		200,00	-,30333	,19760	,721	-,9781	,3714
		500,00	-,33333	,19760	,634	-1,0081	,3414
		1000,00	1,20333*	,19760	,000	,5286	1,8781
200,00		,00	3,14000*	,19760	,000	2,4653	3,8147
		25,00	1,11333*	,19760	,001	,4386	1,7881
		50,00	-,50000	,19760	,220	-1,1747	,1747
		100,00	,30333	,19760	,721	-,3714	,9781
		500,00	-,03000	,19760	1,000	-,7047	,6447
		1000,00	1,50667*	,19760	,000	,8319	2,1814
500,00		,00	3,17000*	,19760	,000	2,4953	3,8447
		25,00	1,14333*	,19760	,001	,4686	1,8181
		50,00	-,47000	,19760	,276	-1,1447	,2047
		100,00	,33333	,19760	,634	-,3414	1,0081
		200,00	,03000	,19760	1,000	-,6447	,7047
		1000,00	1,53667*	,19760	,000	,8619	2,2114
1000,00		,00	1,63333*	,19760	,000	,9586	2,3081
		25,00	-,39333	,19760	,460	-1,0681	,2814
		50,00	-2,00667*	,19760	,000	-2,6814	-1,3319
		100,00	-1,20333*	,19760	,000	-1,8781	-,5286
		200,00	-1,50667*	,19760	,000	-2,1814	-,8319
		500,00	-1,53667*	,19760	,000	-2,2114	-,8619
LSD	,00	25,00	-2,02667*	,19760	,000	-2,4505	-1,6028
		50,00	-3,64000*	,19760	,000	-4,0638	-3,2162
		100,00	-2,83667*	,19760	,000	-3,2605	-2,4128
		200,00	-3,14000*	,19760	,000	-3,5638	-2,7162
		500,00	-3,17000*	,19760	,000	-3,5938	-2,7462
		1000,00	-1,63333*	,19760	,000	-2,0572	-1,2095
	25,00	,00	2,02667*	,19760	,000	1,6028	2,4505

	50,00	-1,61333 <sup>+</sup>	,19760	,000	-2,0372	-1,1895
	100,00	-,81000 <sup>+</sup>	,19760	,001	-1,2338	-,3862
	200,00	-1,11333 <sup>+</sup>	,19760	,000	-1,5372	-,6895
	500,00	-1,14333 <sup>+</sup>	,19760	,000	-1,5672	-,7195
	1000,00	,39333	,19760	,066	-,0305	,8172
50,00	,00	3,64000 <sup>+</sup>	,19760	,000	3,2162	4,0638
	25,00	1,61333 <sup>+</sup>	,19760	,000	1,1895	2,0372
	100,00	,80333 <sup>+</sup>	,19760	,001	,3795	1,2272
	200,00	,50000 <sup>+</sup>	,19760	,024	,0762	,9238
	500,00	,47000 <sup>+</sup>	,19760	,032	,0462	,8938
	1000,00	2,00667 <sup>+</sup>	,19760	,000	1,5828	2,4305
100,00	,00	2,83667 <sup>+</sup>	,19760	,000	2,4128	3,2605
	25,00	,81000 <sup>+</sup>	,19760	,001	,3862	1,2338
	50,00	-,80333 <sup>+</sup>	,19760	,001	-1,2272	-,3795
	200,00	-,30333	,19760	,147	-,7272	,1205
	500,00	-,33333	,19760	,114	-,7572	,0905
	1000,00	1,20333 <sup>+</sup>	,19760	,000	,7795	1,6272
200,00	,00	3,14000 <sup>+</sup>	,19760	,000	2,7162	3,5638
	25,00	1,11333 <sup>+</sup>	,19760	,000	,6895	1,5372
	50,00	-,50000 <sup>+</sup>	,19760	,024	-,9238	-,0762
	100,00	,30333	,19760	,147	-,1205	,7272
	500,00	-,03000	,19760	,881	-,4538	,3938
	1000,00	1,50667 <sup>+</sup>	,19760	,000	1,0828	1,9305
500,00	,00	3,17000 <sup>+</sup>	,19760	,000	2,7462	3,5938
	25,00	1,14333 <sup>+</sup>	,19760	,000	,7195	1,5672
	50,00	-,47000 <sup>+</sup>	,19760	,032	-,8938	-,0462
	100,00	,33333	,19760	,114	-,0905	,7572
	200,00	,03000	,19760	,881	-,3938	,4538
	1000,00	1,53667 <sup>+</sup>	,19760	,000	1,1128	1,9605
1000,00	,00	1,63333 <sup>+</sup>	,19760	,000	1,2095	2,0572
	25,00	-,39333	,19760	,066	-,8172	,0305
	50,00	-2,00667 <sup>+</sup>	,19760	,000	-2,4305	-1,5828

100,00	-1,20333*	,19760	,000	-1,6272	-,7795
200,00	-1,50667*	,19760	,000	-1,9305	-1,0828
500,00	-1,53667*	,19760	,000	-1,9605	-1,1128

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

**B.juncea HMA1**

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Tukey HSD <sup>a</sup>					
,00	3	1,3900			
1000,00	3		3,0233		
25,00	3		3,4167		
100,00	3			4,2267	
200,00	3			4,5300	4,5300
500,00	3			4,5600	4,5600
50,00	3				5,0300
Sig.		1,000	,460	,634	,220
Duncan <sup>a</sup>					
,00	3	1,3900			
1000,00	3		3,0233		
25,00	3		3,4167		
100,00	3			4,2267	
200,00	3			4,5300	
500,00	3			4,5600	
50,00	3				5,0300
Sig.		1,000	,066	,131	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

EK-7 Farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. nigra*'nın yapraklarında HMA1' in anlatımından elde edilen verilerin ANOVA analizi

**ANOVA**

B.nigra/ HMA1 ANOVA Analizi

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	22,662	6	3,777	67,314	,000
Within Groups	,786	14	,056		
Total	23,447	20			

EK-8 Farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. nigra*'nın yapraklarında HMA1' in anlatımından elde edilen verilerin Turkey ve Duncan analizi

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: B.nigra/ HMA1

(I) treatment	(J) treatment	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
Tukey HSD	,00	25,00	-1,26333*	,19341	,000	-1,9237	-,6029
		50,00	-3,74333*	,19341	,000	-4,4037	-3,0829
		100,00	-2,21667*	,19341	,000	-2,8771	-1,5563
		200,00	-1,78333*	,19341	,000	-2,4437	-1,1229
		500,00	-1,85000*	,19341	,000	-2,5104	-1,1896
		1000,00	-1,51667*	,19341	,000	-2,1771	-,8563
25,00	,00	,00	1,26333*	,19341	,000	,6029	1,9237
		50,00	-2,48000*	,19341	,000	-3,1404	-1,8196
		100,00	-,95333*	,19341	,003	-1,6137	-,2929
		200,00	-,52000	,19341	,172	-1,1804	,1404
		500,00	-,58667	,19341	,097	-1,2471	,0737
		1000,00	-,25333	,19341	,837	-,9137	,4071
50,00	,00	,00	3,74333*	,19341	,000	3,0829	4,4037
		25,00	2,48000*	,19341	,000	1,8196	3,1404
		100,00	1,52667*	,19341	,000	,8663	2,1871
		200,00	1,96000*	,19341	,000	1,2996	2,6204
		500,00	1,89333*	,19341	,000	1,2329	2,5537

		1000,00	2,22667*	,19341	,000	1,5663	2,8871	
100,00		,00	2,21667*	,19341	,000	1,5563	2,8771	
		25,00	,95333*	,19341	,003	,2929	1,6137	
		50,00	-1,52667*	,19341	,000	-2,1871	-,8663	
		200,00	,43333	,19341	,335	-,2271	1,0937	
		500,00	,36667	,19341	,513	-,2937	1,0271	
		1000,00	,70000*	,19341	,035	,0396	1,3604	
200,00		,00	1,78333*	,19341	,000	1,1229	2,4437	
		25,00	,52000	,19341	,172	-,1404	1,1804	
		50,00	-1,96000*	,19341	,000	-2,6204	-1,2996	
		100,00	-,43333	,19341	,335	-1,0937	,2271	
		500,00	-,06667	,19341	1,000	-,7271	,5937	
		1000,00	,26667	,19341	,804	-,3937	,9271	
500,00		,00	1,85000*	,19341	,000	1,1896	2,5104	
		25,00	,58667	,19341	,097	-,0737	1,2471	
		50,00	-1,89333*	,19341	,000	-2,5537	-1,2329	
		100,00	-,36667	,19341	,513	-1,0271	,2937	
		200,00	,06667	,19341	1,000	-,5937	,7271	
		1000,00	,33333	,19341	,613	-,3271	,9937	
1000,00		,00	1,51667*	,19341	,000	,8563	2,1771	
		25,00	,25333	,19341	,837	-,4071	,9137	
		50,00	-2,22667*	,19341	,000	-2,8871	-1,5663	
		100,00	-,70000*	,19341	,035	-1,3604	-,0396	
		200,00	-,26667	,19341	,804	-,9271	,3937	
		500,00	-,33333	,19341	,613	-,9937	,3271	
LSD		,00	25,00	-1,26333*	,19341	,000	-1,6782	-,8485
			50,00	-3,74333*	,19341	,000	-4,1582	-3,3285
			100,00	-2,21667*	,19341	,000	-2,6315	-1,8018
			200,00	-1,78333*	,19341	,000	-2,1982	-1,3685
			500,00	-1,85000*	,19341	,000	-2,2648	-1,4352
			1000,00	-1,51667*	,19341	,000	-1,9315	-1,1018
	25,00	,00	1,26333*	,19341	,000	,8485	1,6782	

	50,00	-2,48000*	,19341	,000	-2,8948	-2,0652
	100,00	-,95333*	,19341	,000	-1,3682	-,5385
	200,00	-,52000*	,19341	,018	-,9348	-,1052
	500,00	-,58667*	,19341	,009	-1,0015	-,1718
	1000,00	-,25333	,19341	,211	-,6682	,1615
50,00	,00	3,74333*	,19341	,000	3,3285	4,1582
	25,00	2,48000*	,19341	,000	2,0652	2,8948
	100,00	1,52667*	,19341	,000	1,1118	1,9415
	200,00	1,96000*	,19341	,000	1,5452	2,3748
	500,00	1,89333*	,19341	,000	1,4785	2,3082
	1000,00	2,22667*	,19341	,000	1,8118	2,6415
100,00	,00	2,21667*	,19341	,000	1,8018	2,6315
	25,00	,95333*	,19341	,000	,5385	1,3682
	50,00	-1,52667*	,19341	,000	-1,9415	-1,1118
	200,00	,43333*	,19341	,042	,0185	,8482
	500,00	,36667	,19341	,079	-,0482	,7815
	1000,00	,70000*	,19341	,003	,2852	1,1148
200,00	,00	1,78333*	,19341	,000	1,3685	2,1982
	25,00	,52000*	,19341	,018	,1052	,9348
	50,00	-1,96000*	,19341	,000	-2,3748	-1,5452
	100,00	-,43333*	,19341	,042	-,8482	-,0185
	500,00	-,06667	,19341	,735	-,4815	,3482
	1000,00	,26667	,19341	,190	-,1482	,6815
500,00	,00	1,85000*	,19341	,000	1,4352	2,2648
	25,00	,58667*	,19341	,009	,1718	1,0015
	50,00	-1,89333*	,19341	,000	-2,3082	-1,4785
	100,00	-,36667	,19341	,079	-,7815	,0482
	200,00	,06667	,19341	,735	-,3482	,4815
	1000,00	,33333	,19341	,107	-,0815	,7482
1000,00	,00	1,51667*	,19341	,000	1,1018	1,9315
	25,00	,25333	,19341	,211	-,1615	,6682
	50,00	-2,22667*	,19341	,000	-2,6415	-1,8118

100,00	-,70000*	,19341	,003	-1,1148	-,2852
200,00	-,26667	,19341	,190	-,6815	,1482
500,00	-,33333	,19341	,107	-,7482	,0815

B.nigra/ HMA1

treatment	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Tukey HSD <sup>a</sup>						
,00	3	,8500				
25,00	3		2,1133			
1000,00	3		2,3667			
200,00	3		2,6333	2,6333		
500,00	3		2,7000	2,7000		
100,00	3			3,0667		
50,00	3				4,5933	
Sig.		1,000	,097	,335	1,000	
Duncan <sup>a</sup>						
,00	3	,8500				
25,00	3		2,1133			
1000,00	3		2,3667	2,3667		
200,00	3			2,6333	2,6333	
500,00	3			2,7000	2,7000	
100,00	3				3,0667	
50,00	3					4,5933
Sig.		1,000	,211	,123	,051	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



EK-9 Farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. juncea*'nın yapraklarında HMA3'ün anlatımından elde edilen verilerin Turkey ve Duncan analizi

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: B.juncea/ HMA3

(I) treatment	(J) treatment	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
Tukey HSD	,00	25,00	-3,30000*	,11684	,000	-3,6989	-2,9011
		50,00	-6,60000*	,11684	,000	-6,9989	-6,2011
		100,00	-6,36667*	,11684	,000	-6,7656	-5,9677
		200,00	-8,80000*	,11684	,000	-9,1989	-8,4011
		500,00	-5,60000*	,11684	,000	-5,9989	-5,2011
		1000,00	-3,00000*	,11684	,000	-3,3989	-2,6011
25,00	,00	50,00	3,30000*	,11684	,000	2,9011	3,6989
		100,00	-3,30000*	,11684	,000	-3,6989	-2,9011
		200,00	-3,06667*	,11684	,000	-3,4656	-2,6677
		500,00	-5,50000*	,11684	,000	-5,8989	-5,1011
		1000,00	-2,30000*	,11684	,000	-2,6989	-1,9011
		1000,00	,30000	,11684	,208	-,0989	,6989
50,00	,00	100,00	6,60000*	,11684	,000	6,2011	6,9989
		200,00	3,30000*	,11684	,000	2,9011	3,6989
		500,00	,23333	,11684	,457	-,1656	,6323
		1000,00	-2,20000*	,11684	,000	-2,5989	-1,8011
		1000,00	1,00000*	,11684	,000	,6011	1,3989
		1000,00	3,60000*	,11684	,000	3,2011	3,9989
100,00	,00	200,00	6,36667*	,11684	,000	5,9677	6,7656
		500,00	3,06667*	,11684	,000	2,6677	3,4656
		1000,00	-,23333	,11684	,457	-,6323	,1656
		1000,00	-2,43333*	,11684	,000	-2,8323	-2,0344
		1000,00	,76667*	,11684	,000	,3677	1,1656
		1000,00	3,36667*	,11684	,000	2,9677	3,7656
200,00	,00	500,00	8,80000*	,11684	,000	8,4011	9,1989
		1000,00	5,50000*	,11684	,000	5,1011	5,8989

		50,00	2,20000*	,11684	,000	1,8011	2,5989
		100,00	2,43333*	,11684	,000	2,0344	2,8323
		500,00	3,20000*	,11684	,000	2,8011	3,5989
		1000,00	5,80000*	,11684	,000	5,4011	6,1989
	500,00	,00	5,60000*	,11684	,000	5,2011	5,9989
		25,00	2,30000*	,11684	,000	1,9011	2,6989
		50,00	-1,00000*	,11684	,000	-1,3989	-,6011
		100,00	-,76667*	,11684	,000	-1,1656	-,3677
		200,00	-3,20000*	,11684	,000	-3,5989	-2,8011
		1000,00	2,60000*	,11684	,000	2,2011	2,9989
	1000,00	,00	3,00000*	,11684	,000	2,6011	3,3989
		25,00	-,30000	,11684	,208	-,6989	,0989
		50,00	-3,60000*	,11684	,000	-3,9989	-3,2011
		100,00	-3,36667*	,11684	,000	-3,7656	-2,9677
		200,00	-5,80000*	,11684	,000	-6,1989	-5,4011
		500,00	-2,60000*	,11684	,000	-2,9989	-2,2011
LSD	,00	25,00	-3,30000*	,11684	,000	-3,5506	-3,0494
		50,00	-6,60000*	,11684	,000	-6,8506	-6,3494
		100,00	-6,36667*	,11684	,000	-6,6173	-6,1161
		200,00	-8,80000*	,11684	,000	-9,0506	-8,5494
		500,00	-5,60000*	,11684	,000	-5,8506	-5,3494
		1000,00	-3,00000*	,11684	,000	-3,2506	-2,7494
	25,00	,00	3,30000*	,11684	,000	3,0494	3,5506
		50,00	-3,30000*	,11684	,000	-3,5506	-3,0494
		100,00	-3,06667*	,11684	,000	-3,3173	-2,8161
		200,00	-5,50000*	,11684	,000	-5,7506	-5,2494
		500,00	-2,30000*	,11684	,000	-2,5506	-2,0494
		1000,00	,30000*	,11684	,022	,0494	,5506
	50,00	,00	6,60000*	,11684	,000	6,3494	6,8506
		25,00	3,30000*	,11684	,000	3,0494	3,5506
		100,00	,23333	,11684	,066	-,0173	,4839
		200,00	-2,20000*	,11684	,000	-2,4506	-1,9494

	500,00	1,00000*	,11684	,000	,7494	1,2506
	1000,00	3,60000*	,11684	,000	3,3494	3,8506
100,00	,00	6,36667*	,11684	,000	6,1161	6,6173
	25,00	3,06667*	,11684	,000	2,8161	3,3173
	50,00	-,23333	,11684	,066	-,4839	,0173
	200,00	-2,43333*	,11684	,000	-2,6839	-2,1827
	500,00	,76667*	,11684	,000	,5161	1,0173
	1000,00	3,36667*	,11684	,000	3,1161	3,6173
200,00	,00	8,80000*	,11684	,000	8,5494	9,0506
	25,00	5,50000*	,11684	,000	5,2494	5,7506
	50,00	2,20000*	,11684	,000	1,9494	2,4506
	100,00	2,43333*	,11684	,000	2,1827	2,6839
	500,00	3,20000*	,11684	,000	2,9494	3,4506
	1000,00	5,80000*	,11684	,000	5,5494	6,0506
500,00	,00	5,60000*	,11684	,000	5,3494	5,8506
	25,00	2,30000*	,11684	,000	2,0494	2,5506
	50,00	-1,00000*	,11684	,000	-1,2506	-,7494
	100,00	-,76667*	,11684	,000	-1,0173	-,5161
	200,00	-3,20000*	,11684	,000	-3,4506	-2,9494
	1000,00	2,60000*	,11684	,000	2,3494	2,8506
1000,00	,00	3,00000*	,11684	,000	2,7494	3,2506
	25,00	-,30000*	,11684	,022	-,5506	-,0494
	50,00	-3,60000*	,11684	,000	-3,8506	-3,3494
	100,00	-3,36667*	,11684	,000	-3,6173	-3,1161
	200,00	-5,80000*	,11684	,000	-6,0506	-5,5494
	500,00	-2,60000*	,11684	,000	-2,8506	-2,3494

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

### B.juncea/ HMA3

treatment	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	
Tukey HSD <sup>a</sup> ,00	3	1,3000					

	1000,00	3		4,3000				
	25,00	3		4,6000				
	500,00	3			6,9000			
	100,00	3				7,6667		
	50,00	3				7,9000		
	200,00	3					10,1000	
	Sig.		1,000	,208	1,000	,457	1,000	
Duncan <sup>a</sup>	,00	3	1,3000					
	1000,00	3		4,3000				
	25,00	3			4,6000			
	500,00	3				6,9000		
	100,00	3					7,6667	
	50,00	3					7,9000	
	200,00	3						
	Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	,066	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

EK-10 Farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. nigra'* nin yapraklarında HMA3' ün anlatımında ANOVA analizi

**ANOVA**  
B. nigra/ HMA3

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	69,620	6	11,603	207,484	,000
Within Groups	,783	14	,056		
Total	70,403	20			

EK-11 Farklı Cu seviyeleri uygulanan *B. nigra*'nın yapraklarında HMA3'ün anlatımında Turkey ve Duncan analizi

Multiple Comparisons

Dependent Variable: B.nigra/ HMA3

(I) treatment	(J) treatment	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
					Lower Bound	Upper Bound	
Tukey HSD	,00	25,00	-2,99333*	,19309	,000	-3,6526	-2,3340
		50,00	-2,59333*	,19309	,000	-3,2526	-1,9340
		100,00	-2,89333*	,19309	,000	-3,5526	-2,2340
		200,00	-4,99333*	,19309	,000	-5,6526	-4,3340
		500,00	-4,12667*	,19309	,000	-4,7860	-3,4674
		1000,00	,27333	,19309	,785	-,3860	,9326
25,00	,00	,00	2,99333*	,19309	,000	2,3340	3,6526
		50,00	,40000	,19309	,417	-,2593	1,0593
		100,00	,10000	,19309	,998	-,5593	,7593
		200,00	-2,00000*	,19309	,000	-2,6593	-1,3407
		500,00	-1,13333*	,19309	,001	-1,7926	-,4740
		1000,00	3,26667*	,19309	,000	2,6074	3,9260
50,00	,00	,00	2,59333*	,19309	,000	1,9340	3,2526
		25,00	-,40000	,19309	,417	-1,0593	,2593
		100,00	-,30000	,19309	,711	-,9593	,3593
		200,00	-2,40000*	,19309	,000	-3,0593	-1,7407
		500,00	-1,53333*	,19309	,000	-2,1926	-,8740
		1000,00	2,86667*	,19309	,000	2,2074	3,5260
100,00	,00	,00	2,89333*	,19309	,000	2,2340	3,5526
		25,00	-,10000	,19309	,998	-,7593	,5593
		50,00	,30000	,19309	,711	-,3593	,9593
		200,00	-2,10000*	,19309	,000	-2,7593	-1,4407
		500,00	-1,23333*	,19309	,000	-1,8926	-,5740
		1000,00	3,16667*	,19309	,000	2,5074	3,8260
200,00	,00	,00	4,99333*	,19309	,000	4,3340	5,6526
		25,00	2,00000*	,19309	,000	1,3407	2,6593

		50,00	2,40000*	,19309	,000	1,7407	3,0593
		100,00	2,10000*	,19309	,000	1,4407	2,7593
		500,00	,86667*	,19309	,007	,2074	1,5260
		1000,00	5,26667*	,19309	,000	4,6074	5,9260
	500,00	,00	4,12667*	,19309	,000	3,4674	4,7860
		25,00	1,13333*	,19309	,001	,4740	1,7926
		50,00	1,53333*	,19309	,000	,8740	2,1926
		100,00	1,23333*	,19309	,000	,5740	1,8926
		200,00	-,86667*	,19309	,007	-1,5260	-,2074
		1000,00	4,40000*	,19309	,000	3,7407	5,0593
	1000,00	,00	-,27333	,19309	,785	-,9326	,3860
		25,00	-3,26667*	,19309	,000	-3,9260	-2,6074
		50,00	-2,86667*	,19309	,000	-3,5260	-2,2074
		100,00	-3,16667*	,19309	,000	-3,8260	-2,5074
		200,00	-5,26667*	,19309	,000	-5,9260	-4,6074
		500,00	-4,40000*	,19309	,000	-5,0593	-3,7407
LSD	,00	25,00	-2,99333*	,19309	,000	-3,4075	-2,5792
		50,00	-2,59333*	,19309	,000	-3,0075	-2,1792
		100,00	-2,89333*	,19309	,000	-3,3075	-2,4792
		200,00	-4,99333*	,19309	,000	-5,4075	-4,5792
		500,00	-4,12667*	,19309	,000	-4,5408	-3,7125
		1000,00	,27333	,19309	,179	-,1408	,6875
	25,00	,00	2,99333*	,19309	,000	2,5792	3,4075
		50,00	,40000	,19309	,057	-,0141	,8141
		100,00	,10000	,19309	,613	-,3141	,5141
		200,00	-2,00000*	,19309	,000	-2,4141	-1,5859
		500,00	-1,13333*	,19309	,000	-1,5475	-,7192
		1000,00	3,26667*	,19309	,000	2,8525	3,6808
	50,00	,00	2,59333*	,19309	,000	2,1792	3,0075
		25,00	-,40000	,19309	,057	-,8141	,0141
		100,00	-,30000	,19309	,143	-,7141	,1141
		200,00	-2,40000*	,19309	,000	-2,8141	-1,9859

	500,00	-1,53333*	,19309	,000	-1,9475	-1,1192
	1000,00	2,86667*	,19309	,000	2,4525	3,2808
100,00	,00	2,89333*	,19309	,000	2,4792	3,3075
	25,00	-,10000	,19309	,613	-,5141	,3141
	50,00	,30000	,19309	,143	-,1141	,7141
	200,00	-2,10000*	,19309	,000	-2,5141	-1,6859
	500,00	-1,23333*	,19309	,000	-1,6475	-,8192
	1000,00	3,16667*	,19309	,000	2,7525	3,5808
200,00	,00	4,99333*	,19309	,000	4,5792	5,4075
	25,00	2,00000*	,19309	,000	1,5859	2,4141
	50,00	2,40000*	,19309	,000	1,9859	2,8141
	100,00	2,10000*	,19309	,000	1,6859	2,5141
	500,00	,86667*	,19309	,001	,4525	1,2808
	1000,00	5,26667*	,19309	,000	4,8525	5,6808
500,00	,00	4,12667*	,19309	,000	3,7125	4,5408
	25,00	1,13333*	,19309	,000	,7192	1,5475
	50,00	1,53333*	,19309	,000	1,1192	1,9475
	100,00	1,23333*	,19309	,000	,8192	1,6475
	200,00	-,86667*	,19309	,001	-1,2808	-,4525
	1000,00	4,40000*	,19309	,000	3,9859	4,8141
1000,00	,00	-,27333	,19309	,179	-,6875	,1408
	25,00	-3,26667*	,19309	,000	-3,6808	-2,8525
	50,00	-2,86667*	,19309	,000	-3,2808	-2,4525
	100,00	-3,16667*	,19309	,000	-3,5808	-2,7525
	200,00	-5,26667*	,19309	,000	-5,6808	-4,8525
	500,00	-4,40000*	,19309	,000	-4,8141	-3,9859

**B.nigra/ HMA3**

Treatment	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Tukey HSD <sup>a</sup> 1000,00	3	1,7000			
,00	3	1,9733			
50,00	3		4,5667		

	100,00	3		4,8667		
	25,00	3		4,9667		
	500,00	3			6,1000	
	200,00	3				6,9667
	Sig.		,785	,417	1,000	1,000
Duncan <sup>a</sup>	1000,00	3	1,7000			
	,00	3	1,9733			
	50,00	3		4,5667		
	100,00	3		4,8667		
	25,00	3		4,9667		
	500,00	3			6,1000	
	200,00	3				6,9667
	Sig.		,179	,068	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : MERAKLI, Nuriye  
Uyruğu : T.C.  
Doğum Tarihi ve Yeri : 24.01.1994/ MANİSA  
Medeni Durum : Bekâr  
E-posta : nuriyemrkli004@hotmail.com

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Uşak Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	Hâlen
Lisans	Uşak Üniversitesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2016
Lise	Adnan Menderes Lisesi	2012

### Bildiriler

1. Meraklı, N., Iltas, O, Memon, A. R. 2016, "Structural and functional analysis of heavy metal transporting ATPases in *Brassica* sps.", Poster Presentation, International Conference on Biological Sciences (ICBS)", Konya/ Turkey, October 21-23, PP-77.
2. Meraklı, N., Şahan M. N., Memon, A. R. 2017, "Expression of Heavy Metal ATPase HMA1 and HMA2 in *Brassica juncea* and *Brassica nigra* grown at Different Levels of Cu and Cd", Poster Presentation, Global Conference on Plant Science and Molecular Biology, Valencia/Spain, September 11-13.
3. Meraklı, N., Çetindoğan M., Memon, A. R. 2017, Poster Presentation, "Metal Induced Gene Expression In Medically Important Crop Plants in *Brassica* sps." 1st International Congress On Medicinal and Aromatic Plants (TABKON17), Konya/Turkey, May 10-12.
4. Meraklı, N., Çetindoğan M., Memon, A.R. 2017, "Expression of Heavy Metal ATPase HMA1 (PAA1), HMA2 and HMA4 in *Brassica juncea* grown at Different Levels of Cu and Zn", Poster Presentation, Plant Biology (ASPB), Honolulu/ Hawaii, June 24-28.

## Projeler

1. 2016/ MF010- Transcriptome analysis of metal accumulator and non-accumulator ecotype of *Brassica nigra* grown at different levels of Cu. BAP project, Project supervisor: Prof. Dr. Abdülrezzak Memon, Turkey, October 2016-September 2018.
2. 2016/ MF005- Expression of Heavy metal ATPases (HMA1, HMA2 and HMA4) in *B. juncea* and *B. nigra* grown at different levels of Cu, Cd and Zn. BAP project, Project supervisor: Prof. Dr. Abdülrezzak Memon, Turkey, June 2016-May 2018.
3. 2017/ TP042- Expression of genes encoding ( $\gamma$ -glutamyl EC ( $\gamma$ -EC) and phytochelatase) two enzymes important in the glutathione (GSH) pathway, of metal transporting of P<sub>1B</sub>-type ATPases, in *B. nigra* and *B. juncea* grown at different Cu levels. BAP project (Yüksek Lisans Projesi), Project supervisor: Prof. Dr. Abdülrezzak Memon, Turkey, 2017-2018.

