

38315

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***AİLANTHUS ALTISSİMA*'DA KADMIYUM
TOLERANSI VE FİTOKELATİN OLUŞUMU**

DOKTORA TEZİ

Gülriz BAYÇU

Biyoloji Anabilim Dalı

(Bitki Ekolojisi Programı)

Danışman: Prof. Dr. Muazzez T. ÖNAL

ŞUBAT - 1995

ÖNSÖZ

"*Ailanthus altissima*'da kadmiyum toleransı ve fitokelatin oluşumu" adlı bu çalışmamda değerli fikirleriyle bana yol gösteren Tez Danışmanım Sayın Prof. Dr. Muazzez T.ÖNAL'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca, Oslo Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik A.B.D'nda sürdürmüş olduğum ön çalışmalarda gerek teknik ve gerekse bilimsel açıdan bana yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Sven Erik ROGNES'e ve sağladıkları imkanlardan dolayı Oslo Üniversitesi Biyoloji Bölümü'ne teşekkür etmek istiyorum.

Laboratuvar'larındaki teknik olanaklardan yararlanarak deneylerimi tamamlamamı sağlayan İ.Ü. Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji A.B.D'na, ve çalışmalarımın ilerlemesine katkıda bulunan herkese teşekkür ederim.

Son olarak, tez çalışmalarım boyunca özveri gösteren ve manevi destekleriyle bana yardımcı olan aileme teşekkürü bir vefa borcu sayıyorum.

Gülriiz BAYÇU

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZ ve ABSTRACT	IV
KISALTMALAR	VI
I. GİRİŞ	1
I.1. Cd'un bitkiler tarafından alınımı	2
I.2. Bitkilerde Cd birikimi	2
I.3. Cd'un bitkilerdeki toksik etkileri	2
I.4. Bitkilerde Cd toleransı	3
I.5. Fitokelatinler	5
II. MATERYAL VE METOD	10
II.1. Cd'un toksik etkileri, Cd birikimi ve Cd toleransının belirlenmesi	10
II.1.1. Bitki materyali	10
II.1.2. Bitkilerin çimlenme ve yetiştirme koşulları	10
II.1.3. Bitki köklerinde AAS ile Cd analizi	12
II.2. Cd tolerans mekanizmasında rol oynayan fitokelatinlerin varlığının araştırılması	13
II.2.1. Bitki materyali	13
II.2.2. Bitkilerin çimlenme ve yetiştirme koşulları	13
II.2.3. Bitki köklerinin ekstraksiyonu	14
II.2.4. Fitokelatinlerin kromatografik yöntemlerle saflaştırılması	14
II.2.5. Fitokelatinlerin jel elektroforez yöntemleri ile ayırımı ve saptanması	15
II.2.6. Spektrofotometre ile total protein miktarlarının belirlenmesi	17
III. BULGULAR	18
III.1. Cd'un toksik etkileri, Cd birikimi ve Cd toleransının incelenmesi	18

III.1.1. Ağaç türlerinde Cd'un toksik etkileri, Cd birikimi ve Cd toleransı	18
III.1.1.A. <i>A. Altissima</i>	18
III.1.1.B. <i>P.abies</i>	24
III.1.2. Kültür bitkilerinde Cd'un toksik etkileri, Cd birikimi ve Cd toleransı	29
III.1.2.A. <i>L. esculentum</i>	29
III.1.2.B. <i>Z. mays</i>	34
III.1.2.C. <i>V. radiata</i>	39
III.2. Cd- tolerans mekanizmasında rol oynayan fitokelatinlerin oluşumu	40
III.2.1. Su kültürlerinde yetiştirilen <i>A.altissima</i> 'da fitokelatin oluşumu	45
III.2.1.A. Kromatografik yöntemlerle saflaştırılan fitokelatinler	45
III.2.1.B. $^{109}\text{Cd}^{2+}$ bağlanması ve nativ poliakrilamid jel elektroforez yöntemiyle (PAGE) saptanan fitokelatinler	52
III.2.1.C. Denatüre poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ile moleküler ağırlığı belirlenen fitokelatinler	55
III.2.1.D. Kromatografik olarak saflaştırılan ve Cd içeren fraksiyonlarda total protein miktarı	57
III.2.2. Kum kültürlerinde yetiştirilen <i>A.altissima</i> 'da fitokelatin oluşumu	58
IV. TARTIŞMA VE SONUÇ	59
IV.1. Cd'un toksik etkileri, Cd birikimi ve Cd toleransı	59
IV.2. Fitokelatin oluşumu	63
V. TÜRKÇE ÖZET VE YABANCI DİLDE ÖZET	68
VI. KAYNAKLAR	72
VII. ÖZGEÇMİŞ	83

ÖZ

***Ailanthus altissima*'da kadmiyum toleransı ve fitokelatin oluşumu**

Bu araştırmamın ilk bölümünde 5 farklı bitki türüne (*A.altissima*, *P.abies*, *L. esculentum*, *Z.mays*, *V.radiata*) 6 değişik Cd konsantrasyonu (10, 30, 50, 100, 200, 500 μ M) uygulanmış ve bitkilerdeki Cd toksisitesi, Cd birikimi ve Cd toleransı incelenmiştir. İkinci bölümde ise, 200 μ M Cd uygulanan *A.altissima* bitkisinde Cd-tolerans mekanizmasında rol oynayan fitokelatinlerin oluşumu araştırılmıştır.

ABSTRACT

Cadmium tolerance and phytochelatin production in *Ailanthus altissima*

In the first part of this research, 6 different Cd concentrations (10, 30, 50, 100, 200, 500 μM) has been applied on to 5 different plant species (*A.altissima*, *P.abies*, *L. esculentum*, *Z.mays*, *V. radiata*), then the toxic effects, Cd accumulation and Cd-tolerance in plants were observed. In the second part, phytochelatins which plays role on Cd-tolerance mechanism for 200 μM Cd applied *A. altissima* plant was investigated.



KISALTMALAR

AAS	: Atomik Absorpsiyon Spektrofotometre
APS	: Amonyum persulfat
Cd	: Kadmiyum
Cd-BP	: Cd-bağlayan proteinler (peptidler)
Cd-PC	: Cd-bağlayan fitokelatinler
Cys	: Sistein
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
Glu	: Glutamik asit
Gly	: Glisin
HMW	: Yüksek moleküler ağırlık
KA	: Kuru ağırlık
LMW	: Düşük moleküler ağırlık
MT	: Metalotionein
PAGE	: Nativ poliakrilamid jel elektroforez
PC	: Fitokelatin
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	: Denatüre poliakrilamid jel elektroforez
SH	: Sülfhidril
Temed	: N,N,N,N-tetra-metiletildiamin
Tris	: Tris (Hidroksimetil) aminometan

I. GİRİŞ

19. Yüzyılda endüstrileşme ve getirdiği etkinlikler ile beraber çevre kirlenmesiyle ilgili sorunlar da ortaya çıkmaya başlamıştır. Ağırmetaller de bu yolla çevreye verilen ve olumsuz etkileri gün geçtikçe artan elementlerdir. Antropojenik kökenli etkinlikler sonucu ortama giren ağırmetaller, atmosfer kanalıyla emisyon kaynağından kilometrelerce uzağa taşınabilir ve gerek doğal gerekse yapay çevreye zarar verebilirler (TYLER & BALSBERG, 1989). Son yıllarda, çevre kirleticileri arasında önemli bir yeri olan kadmiyumun toksik etkileri üzerinde yoğun çalışmalar başlamıştır (KAHLE, 1988).

Kadmiyum (Cd), beyaz renkli, 112.41 atom ağırlığında ve +2 değerlikli bir ağırmetaldir. Periyodik tabloda II b grubunda Zn ve Hg arasında yer alır. İlk olarak bir Alman kimyacı olan Friedrich Stromeyer tarafından 1817'de, çinko eldesi sırasında baca tozlarında bulunmuştur. Çinko maden cevherinin eski adı olan "cadmia furnacum" dan üretilen kadmiyum adı aslında Yunanca "kadmeia gè", yani Kadmeia toprağı anlamına gelen kelimedenden türemiştir. Cd, günümüzde pil, plastik, boya yapımında, paslanma önleyici olarak metal kaplamada, oto sanayiinde kullanılır ve biosidlerin içeriğinde bulunur. Fosil yakıtların yanması, maden endüstrilerinin etkinlikleri, tarımda fosfat gübrelerin ve pestisidlerin kullanımı ile de büyük ölçüde çevrenin kirlenmesine neden olan bir kaynak oluşturur (JACKSON & ALLOWAY, 1992). Cd bileşiklerinin % 90'ının antropojenik olarak atmosfere verildiğı ve bu miktarın, 1985 ölçümlerine göre, bir yıllık ortalamasının 14.000 ton olduğı kaydedilmiştir (FERGUSSON, 1990). Ağırmetallerin % 98'inin topraktaki inorganik bileşiklere ve humusa bağlandığı, % 2'sinin ise toprak kolloidleri tarafından absorbe edildiğı veya toprak suyunda pH değerine göre çözündüğü belirtilmiştir. (PUNZ & SIEGHARDT, 1993).

Cd doğada, CdS, CdCO₃; CdSO₄, CdSe yapılarında veya ZnCO₃ gibi bileşiklerde % 0.1-5 oranında bulunmaktadır (LEPP, 1981). Kirlenmemiş topraktaki ortalama Cd değeri ise 0.2 ppm olarak belirlenmiştir (FERGUSSON, 1990).

I.1. Cd'un bitkiler tarafından alınımı

Genel olarak, Cd'un bitki kökleri tarafından hem aktif hem de pasif olarak alınabildiği öne sürülmektedir (LEPP, 1981; CATALDO ve diğ. 1983; CLARKSON & LÜTTGE, 1989; HAGEMEYER & WAISEL, 1989 a). Köklerdeki Cd'u membranlardan geçiren taşıyıcının ne olduğu henüz kesin olarak bilinmemekle birlikte, Cd, Zn, Ni ve Cu'nun aynı taşıyıcıyı paylaştıkları zannedilmektedir. (CLARKSON & LÜTTGE, 1989). Yaprak yüzeyinden Cd geçişi ise difüzyon yoluyla mümkün olabilmektedir, bu yolla alınan kadmiyum köklerle alınan kadmiyumla kıyaslanamayacak kadar azdır (STREIT & STUMM, 1993).

Büyük çoğunluğu köklerle alınan Cd'un bitki içinde çok hareketli olduğu ve ksilem ile kolayca taşındığı öne sürülmüştür. Bu bulgu, *Tamarix aphylla*'nın yapraklarından salgıladığı tuz çözeltisindeki Cd varlığıyla kanıtlanmıştır (HAGEMEYER & WAISEL, 1989; STREIT & STUMM, 1993).

I.2. Bitkilerde Cd birikimi

Cd birikimi, ortamdaki ağır metal konsantrasyonuna, metalin bileşimine, bitki ve organ türüne bağlıdır. Kökler genelde en fazla Cd biriktiren organlardır. Çünkü bitkinin yetiştirme ortamında bu toksik ağır metalle temas eden ilk bölge köklerdir (BRECKLE, 1991). Cd ile yapılan çalışmalarda, bu ağır metalin sırasıyla en çok köklerde, sonra gövde ve yapraklarda biriktiği belirlenmiştir (BERTELS, 1989; BAYÇU, 1992). Hücre düzeyinde yapılan çalışmalarda ise, Cd'un hücre çeperinde, özellikle de orta lamelde fikse olduğu (BARCELÓ & POSCHENRIEDER, 1990) ve en fazla vakuollerde biriktiği saptanmıştır (RAUSER & ACKERLY, 1987; VÖGELİ-LANGE & WAGNER, 1990).

I.3. Cd'un bitkilerdeki toksik etkileri

Cd'un bitkilerin metabolizmasında gerekli bir element olmadığı bilinmektedir. Bu ağırmetal çok düşük konsantrasyonlarda bile son derece zararlıdır. Molekül düzeyindeki toksik etkinin Cd²⁺'un ATP az gibi enzimlere ve ayrıca proteinlerin tiol gruplarına karşı olan yüksek afinitesi sonucu meydana geldiği ileri sürülmektedir (TYLER & BALSBERG, 1989). Hücre düzeyinde-

ki biyokimyasal işlevler dikkate alındığında ise, fotosentezin (GREGER & ÖGREN, 1991), Calvin çemberi enzimlerinin (MALİK ve diğ. 1992), hücre bölünmesinin (VÁZQUEZ ve diğ. 1992) inhibe olduğunu, hücre çeperi esnekliğinin bozulduğunu (BARCELÓ 1991; BRECKLE ve diğ. 1986), su metabolizmasının zarar gördüğünü ve kök solunumunun azaldığını (PUNZ & SIEGHARDT, 1993) görmekteyiz.

Cd'un bitkilerde organ seviyesinde saptanan görünür toksik etkileri ise, kök ve gövde büyümesindeki indirgenme (BARCELÓ ve diğ. , 1986; BAYÇU & ÖNAL, 1992), yapraklarda solma (LAMOREAUX & CHANEY, 1977, BAYÇU, 1992), kloroz ve nekroz (CUNNINGHAM ve diğ., 1975, BAYÇU & ÖNAL, 1992), kök ve yapraklarda beliren kahverengi-kırmızı renk oluşumlarıdır (RAUSER, 1978; BERTELS, 1989; BAYÇU, 1992).

I.4. Bitkilerde Cd toleransı

Stres, canlı organizma için uygun olmayan herhangi bir çevre faktörüdür (LEVİTT, 1972). Direnç ise, bir bitkinin stres faktörünün zararlı etkilerine karşı koyabilme kapasitesidir ve LEVİTT (1980)'e göre ikiye ayrılmaktadır:

1. Stresten kaçınma
2. Strese karşı tolerans gösterme

Kaçınma mekanizmaları, membran geçirgenliğinin değişimi, hücre çeperinin metal tutma kapasitesinin artması, metallerle kelat oluşturacak maddelerin salgılanması ile metal alımının sınırlandırılması esasına dayanmaktadır (FARAGO ve diğ. 1980; THURMAN & COLLINS, 1983; BAKER, 1990; VERKLEIJ & SCHAT, 1990).

Tolerans mekanizmaları ise, hücrede metal-bağlayan bileşiklerin (fitokelatin) oluşumu, metallerin vakuol ve hücre çeperi gibi belli bölmelerde birikimi, enzim sentezinin artması veya enzim yapısının değiştirilmesi gibi hücre metabolizmasında meydana gelen değişiklikler ile kökten gövdeye taşınmanın sınırlandırılması da içermektedir. (BAKER, 1978; GRILL ve diğ. 1985; RAUSER & ACKERLY, 1987; ROBINSON & JACKSON, 1990, VERKLEIJ ve diğ. 1990; VERKLEIJ & SCHAT, 1990).

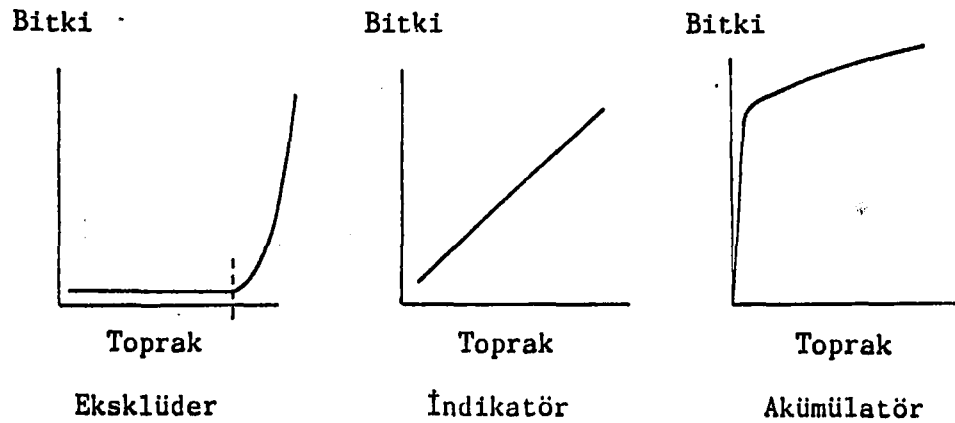
BAKER & WALKER(1989)'e göre bitkiler tolerans mekanizmalarına göre üçe ayrılmaktadır:

1. Eksklüder (dışarı atan) bitkiler
2. İndikatör bitkiler
3. Akümülatör (biriktiren) bitkiler

Eksklüder bitkilerde, kökün ve gövdenin metal konsantrasyonu ortamdaki belli bir metal konsantrasyonuna kadar sabit ve düşük seviyede tutulur. Genel olarak metal alımı regüle edilemediğinden, kökten gövdeye taşınmanın sınırlanması bir kontrol mekanizması oluşturur.

İndikatör bitkilerde ise metalin topraktan alınması ve gövdeye taşınması düzenlidir. Bunlarda pasif taşınma da görülebilir. Böylece bitkideki metal konsantrasyonu dış ortamdaki konsantrasyonu yansıtır.

Akümlatör bitkiler ise belirli fizyolojik özelliklere sahiptirler. Yetiştirme yerindeki konsantrasyondan çok daha fazla metali aktif olarak biriktirirler. Metalin alınımı ve taşınması dengelidir. Genellikle metaller köklerde birikir. Bitkilerin bu üç özelliği göstermesi, bitki türü kadar ortamdaki metal konsantrasyonuna da bağlıdır (BAKER, 1981) (Şekil 1).



Şekil 1. Subtrat konsantrasyonlarına bağlı olarak bitkilerin topraktaki organlarındaki ağırmetal konsantrasyonu (Baker, 1981'den)

Son yıllarda Cd toleransı ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda dikkatler Cd'un fitokelatinlerle kelat oluşturmada üzerinde yoğunlaşmaya başlamıştır (GRILL ve diğ., 1985; RAUSER, 1990; DE KNECHT ve diğ., 1992).

I.5. Fitokelatinler

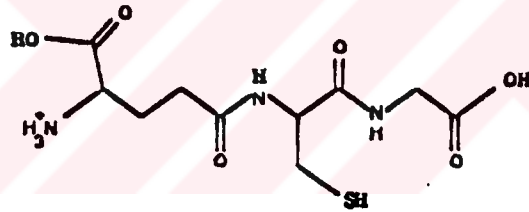
Ağırmetaller, bitki hücrelerinde fitokelatin (PC) olarak adlandırılan $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n \text{ Gly}$, $n= 2-11$ genel yapısındaki tiol içeren polipeptidlerin oluşumunu stimüle ederler (GRILL ve diğ., 1985; GEKELER ve diğ., 1989). Bu peptidler, kadistin (KONDO ve diğ., 1984, MUTOH & HAYASHI, 1991), metal-bağlayan peptidler (MURASUGI ve diğ., 1981), poli (γ -glutamil sisteinil) glisin [$(\gamma\text{-EC})_n \text{ Gs}$] (JACKSON ve diğ., 1987, DELHAIZE ve diğ., 1989), III. sınıf metalotioneinler (FOWLER ve diğ., 1987) ve γEC izopeptidleri (RAUSER, 1993) olarak da isimlendirilmektedir. Omurgalılarda ve *Neurospora crassa*'da sentezlenen I. sınıf metalotioneinler (MT), deniz kestanesi ve *Saccharomyces cerevisiae* ile bazı prokaryotlarda sentezlenen II. sınıf MT'ler gibi, yüksek bitkiler, alg ve mantarlarda sentezlenen III. sınıf MT'ler yani fitokelatinler (PC) de içerdikleri sistein nedeniyle ağırmetallere karşı yüksek bir afinite göstermektedirler (ROBINSON, 1989; STEFFENS, 1990). Bununla beraber PC yapısındaki γ - glutamik asit bağlarının varlığı, PC moleküllerinin I. ve II. sınıf MT'ler gibi yapısal genlerle mRNA'dan kodlanarak yani ribozomal yolla sentezlenmediğini, bu nedenle primer gen ürünleri kabul edilemeyeceğini ortaya koymuştur (GRILL ve diğ., 1985; ROBINSON ve diğ., 1988 , GRILL ve diğ., 1989).

PC'ler, enzimatik olarak PC-sentaz (glutamil-sistein dipeptidil transpeptidaz) katalizi ile glutation (GSH)'dan sentezlenen sekonder metabolitlerdir (GRILL ve diğ., 1989).

PC'lerin oluşması için ortamda ağırmetal iyonlarının bulunması ve PC sentezinin bu iyonlar tarafından stimüle edilmesi gerekmektedir (GRILL ve diğ., 1985; HUANG, 1987; LOEFFLER ve diğ., 1989; ABRAHAMSON ve diğ., 1992). PC- sentazın ağırmetal yokluğunda inaktif olduğu da ayrıca belirtilmiştir (GRILL ve diğ., 1987; GEKELER ve diğ., 1987). GSH sentezi ve GSH molekül yapısı Şekil 2 ve 3'te, PC sentezi ve ağır metal detoksifikasyonu ile PC molekül yapısı ise Şekil 4 ve 5'te gösterilmiştir.

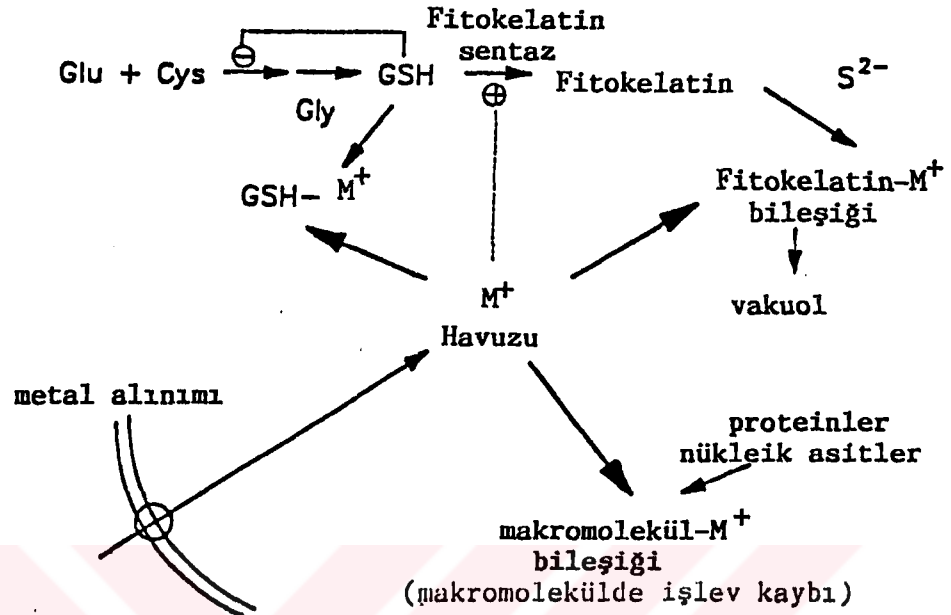


Şekil 2. GSH sentezi (Nardi & Cipollara, 1990'dan)

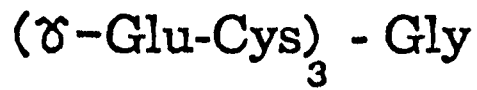
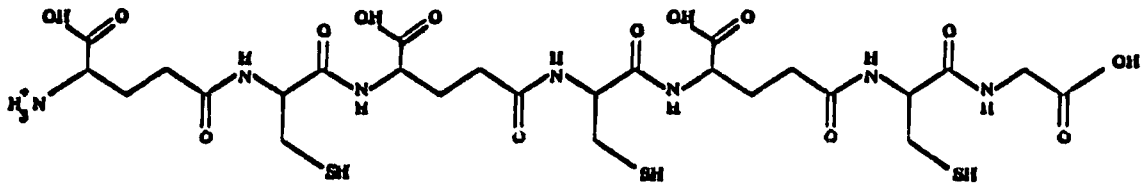


γ -Glu-Cys-Gly

Şekil 3. GSH molekül yapısı (Steffens, 1990'dan)

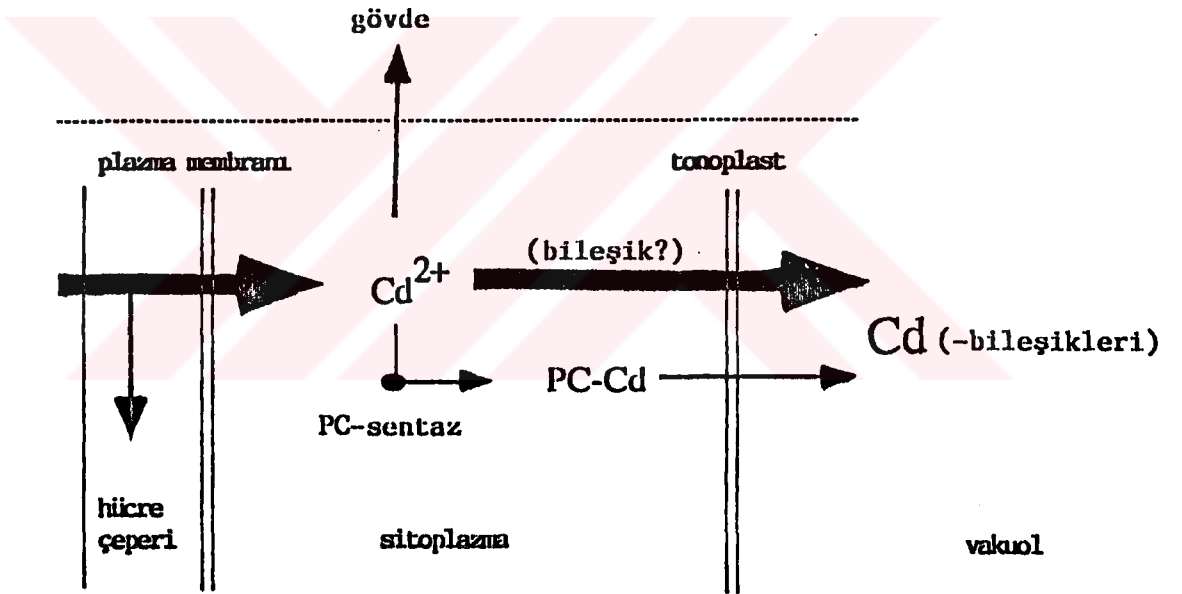


Şekil 4. PC sentezi ve ağır metal detoksifikasyonu . M⁺, ağır metali temsil etmektedir.
(Howe & Merchant, 1992'den)



Şekil 5. PC molekül yapısı (Steffens, 1990'dan)

Yapılan diğer araştırmalarda ise, UV, sıcak-soğuk şoku, H_2O_2 gibi oksidatif streslerin PC oluşumunu stimüle etmediği belirlenmiş ve PC biyosentezinin sadece ağırmetal iyonlarıyla bağlantılı olduğu yinelenmiştir (GRILL ve diğ., 1987; STEFFENS, 1990). PC'lerin Cd ile bileşik oluşturmasında yer alan en önemli metal ligandının sistein-tiol (Cys-SH) olduğu ve bu yapının Cd ile Cd-tiolat meydana getirdiği kaydedilmiştir (REESE ve diğ., 1992). VÖGELİ-LANGE & WAGNER (1990) ile DE KNECHT ve diğ. (1994), Cd-PC bileşiklerinin bitki hücrelerinin sitoplazmasında oluştuğunu ve daha sonra vakuollere taşındığını, böylece Cd'un toksik etkisini azaltarak Cd toleransı sağladığını kaydetmişlerdir. (şekil 6)



şekil 6. Kۆk hücrelerinde PC-Cd oluşumu ve bu bileşiklerin vakuole taşınması (De Knecht ve diğ., 1994'ten)

Genel yapısı daha önce belirtilen PC'lerin Fabales ve Poales gibi bazı bitki takımlarında homolog GSH'dan sentezlendiği ve glisin yerine β -alanin

veya serin içerek homofitokelatinleri (h-PC) oluşturduğu saptanmıştır (GRILL ve diğ., 1986; GEKELER ve diğ., 1989; KLAPHECK ve diğ., 1992).

Fitokelatinlerde metal:kükürt (M:S) oranı Cd için 1:2 olarak belirlenmiştir. Cd ile bileşik oluşturan PC'lerin molekül ağırlığı ise farklılıklar göstermektedir. Mayada 1800'Da olarak belirlenen molekül ağırlığı, bazı bitkilerde 3700, 6000, 14500, 33000 Da olarak saptanmıştır (WAGNER & TROTTER 1982; GRILL ve diğ., 1985; RAUSER 1990; DE KNECHT ve diğ., 1994). Bunun nedeni farklı sayıdaki PC dipeptidlerinin farklı uzunlukta zincirler meydana getirmesidir. Kısa zincirli olanların molekül ağırlığının daha düşük olduğu belirlenmiştir. Küçük moleküllü PC'lerin (PC₂) sentezi büyük moleküllü PC'lerden (PC₃, PC₄...) daha hızlıdır, böylece ilk oluşumunun bir dipeptid olduğu kanıtlanmıştır (RAUSER, 1990). PC'lerin genel olarak Cd'la bileşik oluşturarak bu toksik metalin etkilerini azalttığı, MT'ler gibi hücre homeostasisinde yer aldığı ve Cd toleransında önemli rol oynadığı saptanmış ancak bu konuda yeni çalışmalara gereksinim olduğu bildirilmiştir (JACKSON ve diğ., 1987; . GRILL ve diğ., 1988; TOMSETT & THURMAN, 1988, RAUSER, 1990; STEFFENS, 1990, VERKLEIJ ve diğ., 1990, SCHAT & KALFF, 1992).

Bu araştırmanın amacı, Cd'un yüksek bitkiler üzerindeki toksik etkilerini, Cd birikimini ve toleransını incelemek, buna bağlı olarak da Cd-tolerans mekanizmasında rol oynadığı öne sürülen fitokelatinlerin (PC) varlığını belirlemektir. Fitokelatinlerin özellikle *A.altissima* bitkisinde incelenmesinin nedeni ise, bu bitkinin hava kirliliğinin yoğun olduğu bölgelerde sağlıklı bir görünüme sahip olmasıdır. Bu konuda yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamasına karşın Çin kökenli bu bitkinin Amerika ve Avrupa'da kentsel ve endüstriyel kirlenmenin yoğun olduğu bölgelere yayılması nedeniyle ağırmetal biyomonitörü olabileceği öne sürülmüştür (WITTIG, 1993).

II. MATERİYAL VE METOD

Bu araştırmanın ilk bölümünde, 5 farklı bitki türü ile Cd'un toksik etkileri, Cd birikimi ve toleransı incelenmiştir. İkinci bölümde ise, ağır metal kirlenmesinde biyomonitör olduğu düşünülen *Ailanthus altissima* (Miller) bitkisi deney materyali olarak seçilmiş ve Cd tolerans mekanizmasında rol oynayan fitokelatinlerin varlığı araştırılmıştır. Çalışmamızın bir bölümü Oslo Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik A.B.D. laboratuvarlarında Prof. Dr. Sven Erik Rognes gözetiminde yürütülmüştür.

II.1. Cd'un toksik etkileri, Cd birikimi ve Cd toleransının belirlenmesi

II.1.1. Bitki materyali

Bu çalışmada 5 bitki türü kullanıldı. Kültür bitkilerinden *Lycopersicon esculentum* -Virosa EZ F1 (Solanaceae)- , *Zea mays* L.-Northern Belle (Gramineae = Poaceae), *Vigna radiata* = *Phaseolus aureus* (Leguminosae = Fabaceae) tohumları Oslo Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden temin edildi. *Picea abies* (Pinaceae) tohumları Oslo'da, *Ailanthus altissima* (Simaroubaceae) tohumları ise İstanbul'da doğal ortamlarından elde edildi.

II.1.2. Bitkilerin çimlenme ve yetiştirme koşulları

Bitki tohumları % 10'luk sodyum hipoklorid (NaOCl) çözeltisinde 20 dakika dezenfekte edildi. Distile su ile çalkalanan tohumlar nemli kağıtların bulunduğu petrilere karanlıkta ve 24°C'de çimlenmeye bırakıldı. Çimlenen bitkiler % 50 perlit + % 50 elenmiş ve yıkanmış kumun bulunduğu saksılara nakledildi ve 2 hafta süreyle % 0.2'lik Hydroflor NPK 5-1-4 (NORSK HYDRO, NORWAY) ve 57.4 µM 2 kalsiyum (Ca(NO₃)₂ · 4 H₂O, Merck)'dan oluşan besi çözeltisi ile sulandı (Tablo 1).

Tablo 1. Hydroflor NPK 5-1-4 (Norsk Hydro) hazır besi çözeltisi

% 5 N	(% 60.46 NO ₃ ve % 39.54 NH ₄)
% 1 P	
% 4 K	
% 0.2 Mg	
% 0.3 S	
% 0.5 Mikroelementler	(% 8 Fe, % 2 Mn, % 2.2 Cu, % 2 Zn, % 0.4 B, % 0.32 Mo)

Daha sonra, birbirine yakın büyüklükte ve sağlıklı olan bitkiler seçilerek değiştirilmiş Ingestad besi çözeltisi (Tablo 2) içeren 5 lt'lik kaplara transfer edildi. Her seriye 4 bitki gelecek şekilde düzenleme yapıldı ve kapların dış yüzeyi alg oluşumunu engellemek amacıyla siyah plâstikle sarıldı. Ayrıca olası oksijen eksikliğini giderebilmek için kompresörden hava temin edildi.

Tablo 2. Ingestad besi çözeltisi (değiştirilmiş)

makro ve mikroelementlerin tuzları	stok çözeltideki miktar (g/l)	besi çözeltisindeki stok çözelti miktarı (ml/l)
KH ₂ PO ₄	32.930	2.00
K ₂ SO ₄	29.070	2.00
MgSO ₄ · 7H ₂ O	30.420	4.00
CaCl ₂ · 2H ₂ O	11.000	4.00
NH ₄ NO ₃	56.000	5.00
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.443	1.00
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.018	1.00
H ₃ BO ₃	0.018	1.00
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.080	1.00
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.440	1.00
FeSO ₄ · 7H ₂ O	7.000	
+	+	1.00
Titriplex III EDTA	9.300	

Bitkilerin gelişme durumları gözönüne alınarak değiştirilmiş Ingestad besi çözeltisinde, NH_4NO_3 , MgSO_4 ve CaCl_2 miktarları asıl miktarlarına göre artırıldı, CoCl_2 yerine ZnSO_4 , Fe-sitrat yerine ise Fe-EDTA kullanıldı (ROGNES, ile kişisel söyleşi,1993).

Bitkilerin bulunduğu fitotron odasındaki ışık şiddeti 20.000 lux ($700\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$), sıcaklık $24 \pm 2^\circ\text{C}$, ışık periyodu 16 saat, karanlık periyodu 8 saat, nisbi nem % 60 olarak ayarlandı. Fideler 1 hafta süreyle bu koşullar altındaki su kültürlerinde yetiştirildiler. 1. haftanın sonunda ise, bitkilerin kök ve gövde uzunlukları belirlenerek bir bölümü kontrol olarak ayrıldı. Diğer bölümüne ise 10,30,50,100,200 ve 500 μM olmak üzere 6 farklı Cd serisi uygulandı. Cd çözeltilerinin hazırlanmasında $\text{CdSO}_4 \cdot 8/3 \text{H}_2\text{O}$ (SIGMA) kullanıldı. Kontrol ve Cd içeren besi çözeltileri her hafta yenilendi ve ayrıca pH'ları ölçüldü (E-512 pH-meter, Metrohm, Switzerland).

Gelişen fidelerde hergün düzenli olarak morfolojik gözlemler yapıldı ve bitkilerde meydana gelen değişiklikler izlendi. Aynı süreç içerisinde kök ve gövde uzunlukları saptandı. Bitkilerde beliren toksik etkilere göre hasat dönemi 27 gün olarak seçildi.

Deney sonunda bitkilerin fotoğrafları çekildi; Cd analizlerinde kullanılacak olan bitki kökleri distile su ile yıkandı, filtre kağıtları arasında suyu alındı ve taze ağırlıkları ölçüldü (Mettler PE 360). Kökler 105°C 'lik etüvde (Heraeus) 24 saat kurutuldu, ardından kuru ağırlıkları alınarak havanda toz haline getirildi. Elde edilen kuru materyal Cd konsantrasyonları ve bitki türlerine göre ayrılarak plastik torbalarda saklandı.

II.1.3. Bitki köklerinde AAS ile Cd analizi

Hazırlanmış olan kuru kök materyallerinden 10 mg tartıldı ve 2.5 ml konsantre nitrik asit (Scanpure HNO_3 (% 65), ChemScan A/S, Norway) ilâvesi ile 30 ml'lik kapaklı teflon şişelerde yaş yakma (wet-digestion) işlemi uygulandı. Örnekler mikrodalga fırında (AVM 902, Whirlpool/Philips) tamamen berraklaşınca kadar 2-3 saat kaynatıldı. Sıvı halde elde edilen örnekler 25 ml'lik balon jojelerde deiyonize su ile seyreltildi ve AAS ölçümlerine kadar polietilen kaplara (Super polyethylene vials, Packard, Germany) konularak 4°C 'lik buzdolabında saklandı (ERGON ile kişisel söyleşi üzerine,1993).

Cd ölçümleri için öncelikle stok Cd standard solüsyonundan (1025 μg Cd/ml Cd standard solution, SIGMA) 0.50, 1.00, 2.00 ppm konsantrasyonlarında standartlar hazırlandı. Örnekler gerekli miktarlarda seyreltildi ve alevli sistem (Flame AAS) atomik absorpsiyon spektrofotometresinde (SpectrAA-10 AAS, Varian, Australia) Cd ölçümleri yapıldı. Elde edilen veriler μg Cd/g kuru ağırlık (KA) üzerinden kaydedildi.

II.2. Cd tolerans mekanizmasında rol oynayan fitokelatinlerin varlığının araştırılması

II.2.1. Bitki materyali

Çalışmanın bu bölümünde toleranslı bir bitki olarak belirlenen *Ailanthus altissima* (Miller) Swingle kullanıldı. Tohumlar daha önce de belirtildiği gibi İstanbul'da doğal ortamlarından elde edildi.

II.2.2. Bitkilerin çimlenme ve yetiştirme koşulları

Araştırmanın 1. bölümündeki koşullar aynen uygulandı. Ancak fitokelatin varlığının (PC) saptanması için yürütülen deneylerde çok miktarda kök materyaline gereksinim olduğundan, fidelerin 19 hafta süreyle besi çözeltisinde yeterince gelişmeleri sağladı. Bu arada, aynı koşullarda dezenfekte edilen ve çimlendirilen bir başka grup *A. altissima* tohumu elenmiş ve yıkanmış kumun bulunduğu saksılara ekildi. Önce distile su ile sulanan bitkiler daha sonra değiştirilmiş Ingestad besi çözeltisi ile sulanarak 16 hafta boyunca kum kültürlerinde yetiştirildi.

19. hafta sonunda su kültürlerinin bir kısmı kontrol olarak ayrıldı, diğerlerine ise 1 hafta süreyle letal dozun altındaki değer olarak saptanan $200\mu\text{M}$ Cd uygulandı. Bu süre sonunda bitki kökleri ana kökün başladığı yerden kesilerek distile suda çalkalandı ve daha önce de belirtildiği gibi taze ağırlıkları alındı. Kökler alüminyum kağıtlar içinde -20°C 'de dondurularak saklandı.

Kum kültürleri ise 16. hafta sonunda 7 gün süreyle $200\mu\text{M}$ Cd uygulamasına tabi tutuldu. Bitkiler Cd uygulamasının ilk gününden itibaren hergün düzenli olarak hasat edildiler. Daha sonra köklerin taze ağırlıkları alındı ve ekstraksiyona hazır hale getirildi. Bu işlemle, bitkilerdeki fitokelatin (PC)

oluşumunda zaman faktörünün rolü incelendi (ROGNES, 1993).

II.2.3. Bitki köklerinin ekstraksiyonu

Su kültürlerinde 1 hafta süreyle 200 μ M Cd eklenerek yetiştirilmiş ve dondurulmuş olan bitki kökleri (total ağırlık: 31.531 g) soğuk odada (4°C), sıvı azot (-70°C, N₂) ve 100 ml soğuk ekstraksiyon tamponu (100 mM Tris (Tris-(hydroxymethyl) -aminomethan- HCl, pH 8.6; 100 mM KCl; 5 mM askorbik asit, 7 mM 2-merkaptoetanol, 1 mM KCN (SIGMA), d H₂O) ile ekstre edildi (Rauser, 1991). İyi bir süpernatant elde edebilmek için ekstre 15.000 rpm (27.000 G)'de 15 dakika ve 17.000 rpm (34.800 G)'de 15 dakika olmak üzere 2 kez 4°C'de sentrifüj edildi (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, DuPont Instruments). Berrak süpernatant kromatografik saflaştırmaya kadar -20°C'de polietilen kaplarda saklandı.

Kum kültürlerinde yetiştirilen bitki köklerinde ise 1,2,3,4,5,6 ve 7 günlük Cd uygulamalarından sonra ekstraksiyon işlemi uygulandı. Bunun için 1 g taze kök 10 ml soğuk ekstraksiyon tamponu ile havanda ve 4°C'de ekstre edildi. Ekstre 2-3 defa katlanmış olan tülbentten süzüldü ve 15.000 rpm (27.000 G)'de, 4°C'de 15 dakika sentrifüj edildi. Süpernatantlar elektroforez uygulanıncaya kadar -20°C'de saklandı.

II.2.4. Fitokelatinlerin kromatografik yöntemlerle saflaştırılması

Su kültürlerinde yetiştirilen bitkilerden elde edilen süpernatant kolon kromatografi yöntemleriyle ayırma tabi tutuldu. Fitokelatinler (PC) yüklerine ve molekül büyüklüklerine göre izole edildi (Rauser, 1991).

Saflaştırma işlemleri için anyon-değişimi kromatografisi (anion-exchange chromatography) ve jel filtrasyon yöntemi (gel filtration) uygulandı. Dietil- (2-hidroksi- propil) aminoetil yapısında ve kuvvetli bazik anyon-değişimi yapan QAE-Sephadex A-25 (Pharmacia), deiyonize su içinde, 4°C'de, 24 saat şişmeye bırakıldı. Şişen madde, ölçüleri 2 x 40 cm olan kolona dolduruldu. QAE-Sephadex A-25'in yüzeyinin bozulmasını önlemek ve stabil kılmak için Sephadex G-25 eklendi. Kolon daha sonra fraksiyon kolektörüne (7000 ultrarac fraction collector) bağlandı ve hazırlanmış olan A tamponu (50 mM Tris-HCl, pH 8.6; 50 mM KCl ; 5 mM askorbik asit, 7 mM

2-merkapttoetanol, dH₂O) ile yıkanarak dengelendi (20°C). Çözündürülmüş olan ham ekstre kolona uygulandı ve Sephadex G-25'ten geçtikten sonra tekrar A tamponu eklendi. Fraksiyonlar her tüpte 5 ml (100 damla) olmak üzere toplanmaya başladı. Ekstre 18. fraksiyondan itibaren kolondan ayrılmaya başladı. 19. fraksiyonda tekrar A tamponu eklendi. 26. fraksiyonda A tamponu ile birlikte B tamponunun (A tamponu + 2 M KCl) belli oranlarda karıştırılması ile elde edilen 0.54 M KCl gradienti uygulandı. Gradient, B tamponunun artan miktarıyla birlikte 31. fraksiyonda 1 M KCl'e, 34. fraksiyonda ise 1.5 M KCl'e yükseltildi. 37. fraksiyondan itibaren ise kolon B tamponu ile 50 fraksiyon toplanıncaya kadar yıkandı. Böylece, Cd-bağlayan bileşikler uygulanan KCl gradienti ile fraksiyonlar halinde ayrılarak saflaştırıldı. 50 fraksiyonun Cd miktarı alevli sistem AAS ile gerekli seyreltme yapılarak belirlendi ve fraksiyonlar polietilen kaplarda -20°C'de saklandı.

AAS ölçümlerine göre en fazla Cd'un bulunduğu fraksiyon (no 33), Sephadex G-75 jel filtrasyondan geçirildi ve Cd-bağlayan bileşiklerin tekrar saflaştırılması sağlandı. Bu işlem için, Sephadex G-75, A tamponunda 24 saat, 4°C'de şişirildi. Otomatik pipet yardımıyla 2x40 cm ölçülerindeki kolona dolduruldu ve yüzeyi Sephadex G-25 eklenerek düzgünleştirildi (RAUSER, 1991; ROGNES, 1993). Jel uzunluğu 34.5 cm olarak ölçüldü. Kolon, A tamponu ile yıkandı ve dengelendi. Tampon çözeltisi tamamen Sephadex'e girdikten sonra, saflaştırılmaya tabi tutulmuş olan 33 numaralı fraksiyon (5 ml) kolona uygulandı. Ardından A tamponu ilave edilerek 50 fraksiyon toplandı. Verileri net olarak elde edebilmek için fraksiyon ve tampon çözeltisi birbirine karıştırılmadı. Fraksiyonlardaki Cd miktarı alevli sistem AAS'de ölçüldü ve örnekler -20°C'de saklandı.

II.2.5. Fikotelatinlerin jel elektroforez yöntemleri ile ayırımı ve saptanması

Cd-PC'lerin varlığını saptayabilmek için, gerek saflaştırmaya tabi tutulmuş fraksiyonlar, gerekse sadece ekstre edilerek saklanmış örnekler nativ poliakrilamid jel elektroforez yöntemiyle ayırma tabi tutuldu.

Uygulanan yöntemin esası, Cd-bağlayan bileşikler (PC) içeren örneklerin radyoaktif Cd (¹⁰⁹Cd²⁺) ile inkübe edilmesi prensibine dayanmaktadır. (ABRAHAMSON ve diğ. 1992). Bunun için % 40'lık (monomer) poliakrilamid jel

çözeltisi (Ultrapure Acrylamide; Ultrapure N,N'-Methylenebisacrylamide-Electrophoresis Grade BRL, Bethesda Research Lab., U.S.A; 3 M Tris-HCl, pH 8.8, SIGMA, d H₂O) hazırlandı. Havası alınan çözeltiye Temed (N,N,N,N-tetramethylethylene diamine) ve % 10'luk amonyum persulfat (APS, (NH₄)₂S₂O₈) eklendi. 140x180x2.7 mm ölçülerindeki kasetlere (Pharmacia Gel Cassette Kits) boşaltılan jel çözeltisine taraklar yerleştirildi ve polimerize olması için soğuk odaya bırakıldı.

Polimerize olan jeller, içinde 5 lt tampon çözeltisi (135 mM Tris +90mM H₃BO₃, pH 8.0, dH₂O) bulunan elektroforez cihazına (Pharmacia Gel Electrophoresis Apparatus, GE-2/4 LS) yerleştirildi ve 15 mA elektrik akımı ile boş olarak ön elektroforeze tabi tutuldu. İşaretli ¹⁰⁹Cd²⁺ (¹⁰⁹CdCl₂, 100µCi carrier free, Amersham, England) ve boyalı tampon çözeltisi (% 0.01 bromophenol blue, % 50 glycerol, 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8) içindeki fraksiyon veya ekstrler, jelin altından 4 cm mesafeye gelinceye kadar elektroforez işlemi uygulandı. Jel daha sonra plastik bir tabaka ile sarılarak otoradyografi filminin (High Performance Autoradiography Film, MP, Amersham) üzerine yerleştirildi. Film ve jel özel kapalı kasetlerde (Hypercassettes/Hyperscreen, Amersham) 3 gün bırakıldı ve film banyo edilerek ¹⁰⁹Cd²⁺'un bileşik oluşturarak meydana getirdiği Cd-PC sinyalleri saptandı ve fotoğraf çekimi yapıldı.

Saflaştırılan fraksiyonlarda elde edilen Cd-PC'ler ve olası Cd-BP'lerin molekül ağırlığını tespit edebilmek için SDS (denatüre)- poliakrilamid jel elektroforez yöntemi uygulandı (LAEMMLI, 1970).

Jeller, üstte % 5 (Acrylamide, N,N'-Methylene bisacrylamide, 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 % 10 sodium dodecylsulphate (SDS), Temed, % 10 APS (SIGMA), d H₂O) altta ise % 16'luk (Acrylamide, N,N' - Methylenebisacrylamide, 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8, Temed, % 10 APS (SIGMA) d H₂O) iki farklı poliakrilamid konsantrasyonu olacak şekilde hazırlandı ve 5 defa sulandırılmış stok tampon çözeltisi (Tris-HCl, pH 8.3, Glycine, SDS (SIGMA), d H₂O) içeren elektroforez cihazına yerleştirilerek ön elektroforez işlemine tabi tutuldu.

Eppendorf tüplerinde 2 farklı boya içeren (% 0.05 Bromophenol Blue, %0.05 Coomassie Brilliant Blue G-250) tampon çözeltiyle karıştırılan fraksiyon örnekleri 2 değişik polipeptid standardıyla (SDS-molecular weight maker

kits: MW-SDS- 175, M-4038 (SIGMA) birlikte aynı jele uygulandı (LAEMMLI, 1970).

Yüklenen jeller 30 mA'den 180 mA'e kadar kademeli olarak artırılan güç (Electrophoresis Power Supply, EPS 500/400) ile 8-10 saat yürütüldüler. Bo-ya çözeltisi jelin altından 1 cm mesafeye gelince işlem durduruldu. Elektrofo-rez uygulamasından sonra jeller bir süre fiksatif çözeltisinde (metanol, asetik asit, d H₂O) tutuldu, daha sonra % 0.1 Coomassie Brilliant Blue R-250 (Flu-ka) içeren boyama çözeltisinde 1 gece bırakıldı. Boyanan jeller farklı oranlar-da metanol, glasial asetik asit ve distile sudan oluşan boya çözücüsünde bek-letildi. Standard ve örneklerdeki proteinler mavi bantlar halinde elde edilerek fotoğrafları çekildi. Standartların jelde ilerleme hızı ve mesafesine göre R_f değerleri hesaplandı ve örneklerin R_f değerleri yarı-logaritma kağıdında (semi-log paper) bulunarak molekül ağırlıkları saptandı.

$$R_f = \frac{\text{Polipeptidin ilerleme mesafesi}}{\text{Boyanın ilerleme mesafesi}}$$

II.2.6. Spektrofotometre ile total protein miktarlarının belirlenmesi

Saflaştırılan fraksiyonlarda en fazla Cd içerenler seçildi ve Cd-PC ile olası Cd-BP'lerin total protein miktarları spektrofotometrede (Shimadzu UV-Visible Recording Spectrophotometer, VV-160) belirlendi. Analizlerde standard olarak BSA (Bovine serum albumin) kullanıldı ve O.D 595 nm'ye ayarlandı. Elde edilen değerler µg cinsinden protein miktarı olarak hesaplandı (BRADFORD, 1976).

III. BULGULAR

III.1. Cd'un toksik etkileri, Cd birikimi ve Cd toleransının incelenmesi

III.1.1. Ağaç türlerinde Cd'un toksik etkileri, Cd birikimi ve Cd toleransı

Araştırmamızın Cd toleransı ile ilgili bu bölümünde, ağaç türlerinden *A.altissima* üzerinde Cd'un toksik etkileri incelenmiş, bu ağır metalin köklerde birikimi, büyüme parametreleri ve bitkilerin tolerans sınırları saptanmıştır. Aynı amaçla *P.abies* ile de ayrı bir deney serisi yürütülmüştür.

III.1.1.A. *A.altissima*

Farklı Cd konsantrasyonları (10,30,50,100,200, 500 μ M) uygulanan *A.altissima* bitkisi 27 gün sonra hasat edilmiştir. Bu süre zarfında düzenli aralıklarla bitkide Cd etkisiyle oluşan toksik belirtiler gözlenerek kaydedilmiş ve yetiştirme ortamının pH'sı saptanmıştır. Kullanılan besi çözeltisinin pH'sı 4.7 olarak belirlenmiştir. Taze çözelti ile değiştirilmeden önce pH'sı ölçülen 1 haftalık çözeltide ise pH 4.1'dir. Bu bize köklerden salınan organik asitlerin pH'yı düşürmüş olabileceğini ve bu nedenle de Cd alımının artabileceğini düşündürmektedir.

Cd uygulamasının 3. gününde kontrol ve 10 μ M dışındaki bütün konsantrasyonlardaki yapraklarda, ana damar üzerinde ve çevresinde kahverengi noktalar şeklinde lekeler başlamıştır. 200 μ M'da diğerlerinden farklı olarak yaprak uçlarında sararma, 500 μ M'da ise yaşlı yapraklarda sararma ve solma, köklerde ise sarımsı renk gözlenmiştir. 7. günden ve 50 μ M'dan itibaren bütün Cd serilerindeki bitki köklerinde sararma belirtileri izlenmiş, 100 ve 200 μ M'da ise yapraklarda kuruma başlamıştır. Yukarıda açıklanan toksik belirtiler Cd'un etki süresi uzadıkça artarak devam etmiştir. 20 ve 27 gün sonra, 10-100 μ M'de yaprakların ana damarları üzerinde ve çevresinde kahveren-

gi noktalar, Cd konsantrasyonuna bağı olarak kloroz veya hafif kloroz, köklerde sarımsı renk; 200 μM 'da bu belirtilerin yanısıra özellikle yaprak damarları arasında ciddi kloroz, kuruma belirtileri ortaya çıkmış, 500 μM 'da ise yaprakların çoğunun kuruduğu belirlenmiştir (Şekil 7,8). Gözlenen kloroz yani sararma yaprak ucundan başlamakta ve petiole kadar tüm yaprak ayası boyunca dağılmaktadır. Bu sararmanın özellikle damarlar arasında baskın olduğu dikkat çekmiştir. Hafif kloroz ise açık sarımsı-yeşil bir görünüm sergilemektedir. Klorozla ilgili belirtilerin Cd'un toksik etkilerinin yanısıra iyon antagonizması nedeniyle meydana gelebilecek Fe eksikliğinden de olabileceği düşünülmektedir. Solma ise, sararma ile birlikte önce yaşlı yapraklarda etkisini göstermiş, daha sonra genç yapraklarda görülmüştür. Kuruma, sararma ve solmanın peşisıra yine yaşlı yapraklar öncelikli olmak üzere ortaya çıkmıştır. Solma ve kurumanın su metabolizmasındaki bozukluklar nedeniyle meydana geldiği sanılmaktadır.



Şekil 7. Kontrol ve 27 gün süre ile 10,30,50,100,200,500 μM Cd uygulanan *A.altissima* fideleri

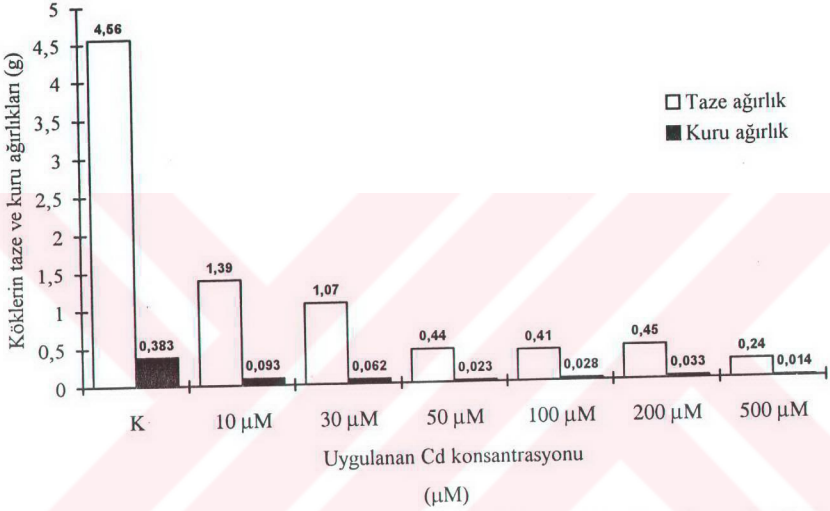


Şekil 8. 27 gün süre ile 30, 50, 100, 200, 500 μM Cd uygulanan *A.altissima* fidelerinin yakından görünümü

12 gün süreyle kök ve gövde büyümesinde belirlenen değerler Tablo 3'de gösterilmiştir. Kontrole göre kök büyümesi 10, 30, 50 μM 'da % 19, % 24, % 43; 100, 200, 500 μM 'da ise % 42.5, % 41.8, % 47 indirgenme göstermiştir. Aynı konsantrasyonlarda gövde büyümesi ise sırasıyla % 28.6, % 40.5, % 61, % 62, % 64,3 indirgenmiştir. Hasat tarihinde (27 gün), köklerde belirlenen taze ağırlıklar 10, 30, 50, 100, 200 ve 500 μM 'da sırasıyla % 69.5, % 76.7, % 90.4, % 91, % 90.1, % 94.7; kuru ağırlıklar ise % 75.7, % 83.8, % 94, % 92.7, % 91.4 % 96.3 olmak üzere indirgenme göstermiştir (Şekil 9). Özellikle kuru ağırlıklar dikkate alındığında, biyomas yapımının ortamdaki Cd konsantrasyonu arttıkça azaldığı görülmektedir. Bitki köklerinde AAS ölçümleriyle belirlenen Cd miktarı ($\mu\text{g/g}$ KA) ise ortamdaki Cd konsantrasyonu arttıkça artış göstermiştir (Şekil 10). Bu sonuçlar, yetiştirme ortamında ve buna paralel olarak bitki köklerinde artan Cd konsantrasyonlarının büyüme parametrelerinde belirli bir indirgenmeye neden olduğunu göstermektedir. 10 μM Cd uygulaması köklerde 1025 $\mu\text{g/gKA}$ Cd birikimine neden olurken kuru ağırlık (biyomas) % 75.7 indir-

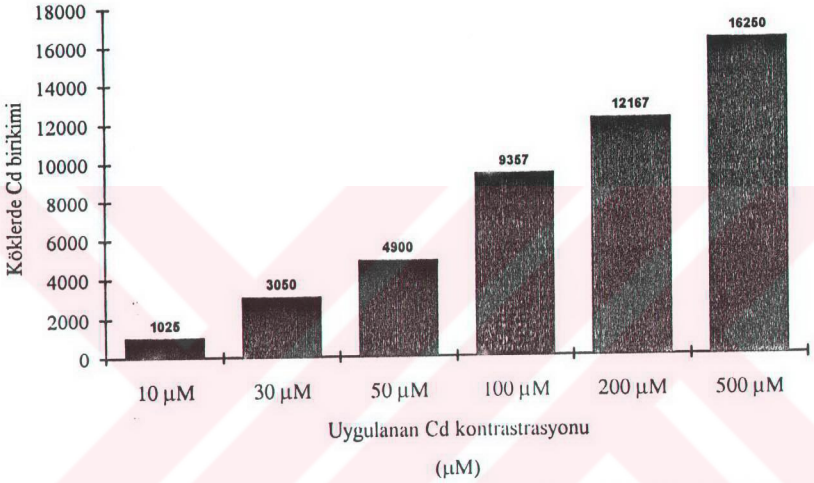
Tablo 3. Kontrol ve 10-500 μM arasında Cd uygulanan *A. altissima* bitkilerinde zamana bağı olarak belirlenen kök ve gövde uzunlukları (cm) (n=8, 12 gün)

Gün Cd μM	0		3		6		9		12	
	KÖK	GÖVDE	KÖK	GÖVDE	KÖK	GÖVDE	KÖK	GÖVDE	KÖK	GÖVDE
K	8.25 $\pm$ 0.65	3.00 $\pm$ 0.58	9.88 $\pm$ 0.95	4.75 $\pm$ 2.01	11.25 $\pm$ 1.40	5.00 $\pm$ 0.78	13.75 $\pm$ 1.73	7.13 $\pm$ 0.65	16.75 $\pm$ 1.89	10.50 $\pm$ 1.29
10	8.38 $\pm$ 1.47	3.38 $\pm$ 0.48	9.75 $\pm$ 0.40	4.13 $\pm$ 1.08	10.25 $\pm$ 1.48	4.38 $\pm$ 1.56	13.13 $\pm$ 0.78	5.38 $\pm$ 1.55	13.50 $\pm$ 1.29	7.50 $\pm$ 1.73
30	9.00 $\pm$ 1.35	3.38 $\pm$ 0.25	9.25 $\pm$ 1.80	4.00 $\pm$ 1.80	11.25 $\pm$ 0.78	3.60 $\pm$ 0.48	12.13 $\pm$ 0.71	4.63 $\pm$ 1.35	12.75 $\pm$ 3.40	6.25 $\pm$ 1.26
50	7.88 $\pm$ 1.60	2.88 $\pm$ 0.48	8.13 $\pm$ 1.00	3.50 $\pm$ 0.80	8.38 $\pm$ 1.96	4.00 $\pm$ 1.13	8.63 $\pm$ 1.49	3.75 $\pm$ 0.39	9.55 $\pm$ 0.96	4.10 $\pm$ 0.48
100	8.88 $\pm$ 1.55	3.38 $\pm$ 0.48	9.13 $\pm$ 0.80	3.80 $\pm$ 1.05	9.50 $\pm$ 1.13	4.00 $\pm$ 2.96	9.63 $\pm$ 3.20	4.00 $\pm$ 0.75	9.63 $\pm$ 1.49	4.00 $\pm$ 0.58
200	9.38 $\pm$ 0.75	3.25 $\pm$ 0.29	9.50 $\pm$ 1.45	3.90 $\pm$ 1.25	9.75 $\pm$ 0.73	4.00 $\pm$ 3.05	9.75 $\pm$ 1.89	4.00 $\pm$ 0.48	9.75 $\pm$ 2.70	4.00 $\pm$ 0.71
500	7.88 $\pm$ 2.05	2.88 $\pm$ 0.48	8.13 $\pm$ 0.95	3.75 $\pm$ 0.70	8.88 $\pm$ 1.40	3.75 $\pm$ 1.35	8.88 $\pm$ 0.90	3.75 $\pm$ 2.90	8.88 $\pm$ 4.75	3.75 $\pm$ 0.29



Şekil 9: Kontrol ve 27 gün süreyle 10-500 µM arasında Cd uygulanan *A. altissima* bitkisinde köklerin taze ve kuru ağırlıkları (g). n=8

($\mu\text{g/g KA}$)



Şekil 10: 27 gün süreyle 10-500 μM Cd uygulanan *A. altissima* bitkisinin köklerinde biriken Cd miktarı ($\mu\text{g/g KA}$). n=8.

genmiştir. 100 μM Cd uygulaması sırasında ise köklerde 9357 $\mu\text{g/gKA}$ Cd birikmiş ve kuru ağırlık % 92.7 oranında indirgenme kaydetmiştir. 500 μM Cd uygulamasında ise köklerde 16250 $\mu\text{g/g KA}$ Cd birikmiş ve kuru ağırlık % 96.3 oranında indirgenmiştir. Elde ettiğimiz verilerle birlikte bitkilerin canlılık durumu da gözönüne alındığında *A.altissima*'nın Cd-tolerans sınırı 200 μM olarak belirlenmektedir.

III. 1.1.B. *P. abies*

27 gün süreyle 6 farklı Cd konsantrasyonu (10, 30, 50, 100, 200, 500 μM) uygulanarak yetiştirilen *P.abies* fidelerinde Cd'un toksik etkileri gözlenmiş ve büyüme parametrelerindeki değişim ile köklerdeki Cd birikimi saptanmıştır. Besi çözeltisinin pH'sı 1 hafta içinde 4.7'den 4.5'a düşmüştür. İlk günlerde belirlenen toksik etkiler, kontrol hariç bütün köklerde Cd konsantrasyonu arttıkça koyulaşan kahverengi renk oluşumudur. Bu kahverengileşmenin fenolik bileşikler nedeniyle meydana geldiği düşünülmektedir. 200 ve 500 μM 'da ise bu belirtilerin yanısıra yaprak gelişiminde duraklama olduğu gözlenmiştir. Cd uygulama süresi arttıkça köklerdeki kahverengi renk oluşumu koyulaşmaya başlamış ve 9. günde 500 μM 'da siyaha dönüşmüştür. Aynı konsantrasyonda yaprak gelişmesi tamamen durmuştur. 27. gün ise 200 ve 500 μM 'da siyaha dönen köklerle birlikte 50 μM 'dan sonra yan kök oluşumu ve uzaması azalmış bazı yapraklarda kuruma başlamış ve gelişmenin durduğu saptanmıştır. Normalde krem rengi olan köklerin Cd etkisi ile kahverengiden siyaha dönüşümü oldukça belirgindir (Şekil 11,12). Kök ve gövde uzunluklarıyla ilgili ölçümlerle birlikte (Tablo 4), köklerin taze ve kuru ağırlıklarıyla yapılan saptamalarda bu parametrelerde indirgenmeler olduğunu kaydettik. (Şekil 13)

Verilere göre 10, 30, 50, 100, 200, 500 μM Cd uygulaması sonucu kök uzunluklarında belirlenen indirgenme, sırasıyla % 11.1, % 32, % 28, % 33.3, % 32, % 42.2; gövde uzunluklarındaki indirgenme ise sırasıyla % 7.15, % 9.50, % 10.7, % 15.5, % 17.86 ve % 23.8'dir. Bununla beraber kontrol fidelelerinin de çok yavaş büyüdüğünü ve bu nedenle ölçüm alınmasında güçlük çekildiğini belirtmek isteriz.



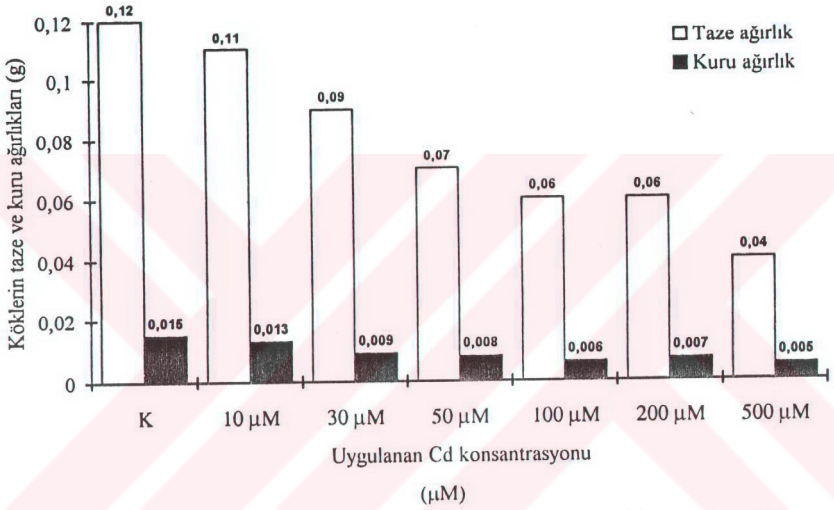
Şekil 11. Kontrol ve 27 gün süreyle 10, 30, 50, 100, 200 ve 500 μM Cd uygulanan *P.abies* fideleri



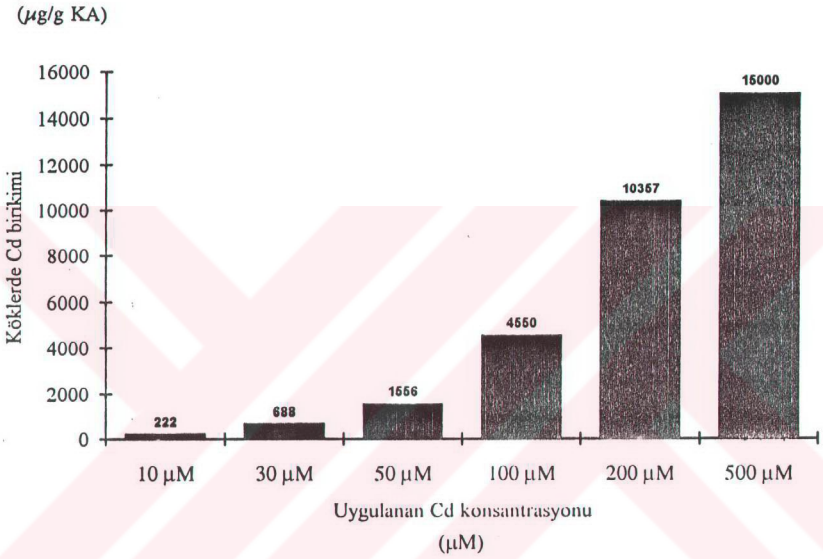
Şekil 12. 27 gün süre ile 10, 30, 100, 200 ve 500 μM Cd uygulanan *P.abies* fidelerinin yakından görünümü

Tablo 4. Kontrol ve 10-500 μM arasında Cd uygulanan *P. abies* bitkilerinde zamana bağılı olarak belirlenen kök ve gövde uzunlukları (cm). (n=8, 12 gün)

Gün Cd μM	0		3		6		9		12	
	KÖK	GÖVDE	KÖK	GÖVDE	KÖK	GÖVDE	KÖK	GÖVDE	KÖK	GÖVDE
K	4.25 $\pm$ 0.29	3.00 $\pm$ 0.58	5.63 $\pm$ 0.75	3.80 $\pm$ 1.36	6.50 $\pm$ 1.13	4.10 $\pm$ 0.73	7.88 $\pm$ 1.08	4.10 $\pm$ 0.39	9.00 $\pm$ 0.75	4.20 $\pm$ 1.29
10	5.25 $\pm$ 0.50	3.38 $\pm$ 0.48	6.00 $\pm$ 1.20	3.80 $\pm$ 0.45	6.63 $\pm$ 1.13	3.90 $\pm$ 0.58	7.50 $\pm$ 1.08	3.90 $\pm$ 0.40	8.00 $\pm$ 1.00	3.9 $\pm$ 1.73
30	4.63 $\pm$ 0.48	3.75 $\pm$ 0.25	5.75 $\pm$ 0.30	3.80 $\pm$ 0.75	5.88 $\pm$ 0.78	3.80 $\pm$ 0.49	6.13 $\pm$ 1.05	3.80 $\pm$ 1.38	6.13 $\pm$ 0.25	3.80 $\pm$ 1.26
50	4.88 $\pm$ 0.71	3.70 $\pm$ 0.48	5.75 $\pm$ 1.48	3.75 $\pm$ 1.20	6.50 $\pm$ 1.30	3.75 $\pm$ 0.88	6.50 $\pm$ 3.01	3.75 $\pm$ 0.44	6.50 $\pm$ 0.41	3.75 $\pm$ 0.48
100	5.50 $\pm$ 0.63	3.45 $\pm$ 0.48	5.63 $\pm$ 0.78	3.55 $\pm$ 0.50	5.75 $\pm$ 0.95	3.55 $\pm$ 0.85	6.00 $\pm$ 0.90	3.55 $\pm$ 1.08	6.00 $\pm$ 0.41	3.55 $\pm$ 0.58
200	5.75 $\pm$ 0.50	3.38 $\pm$ 0.29	5.88 $\pm$ 0.60	3.45 $\pm$ 1.75	6.00 $\pm$ 1.15	3.45 $\pm$ 0.81	6.13 $\pm$ 0.78	3.45 $\pm$ 0.50	6.13 $\pm$ 0.25	3.45 $\pm$ 0.71
500	4.90 $\pm$ 0.50	3.13 $\pm$ 0.48	5.10 $\pm$ 1.20	3.20 $\pm$ 0.65	5.20 $\pm$ 0.72	3.20 $\pm$ 1.40	5.20 $\pm$ 1.85	3.20 $\pm$ 1.06	5.20 $\pm$ 0.48	3.20 $\pm$ 0.29



Şekil 13: Kontrol ve 27 gün süreyle 10-500 µM arasında Cd uygulanan *P.abies* bitkisinde köklerin taze ve kuru ağırlıkları (g). n=8.



Şekil 14: 27 gün süreyle 10-500 μM arasında Cd uygulanan *P.abies* bitkisinin köklerinde biriken Cd miktarı ($\mu\text{g/g KA}$). n=8.

Köklerin taze ağırlıklarındaki indirgenme, aynı konsantrasyon sırasıyla % 8.3, % 25, % 41.6, % 50, % 50 ve % 66.6; kuru ağırlıklardaki indirgenme ise % 13.3, % 40, % 46.6, % 60, % 53.3, % 66.6'dır.

Köklerdeki Cd birikiminin, yetiştirme ortamındaki Cd konsantrasyonu arttıkça doğru orantılı olarak yükseldiğini belirledik (Şekil 14). 10 μM Cd uygulanan bitkilerde köklerin 222 $\mu\text{g/g}$ KA Cd birikimi ve kuru ağırlıklarında % 13.3 bir indirgenme; 100 μM Cd uygulamasından sonra ise 4550 $\mu\text{g/g}$ KA Cd birikimi ve % 60 kuru ağırlık indirgenmesi saptadık. 500 μM Cd'da ise Cd birikimi ve kuru ağırlık indirgenmesi sırasıyla 15000 $\mu\text{g/g}$ KA ve % 66.6'dır. *P.abies*'in Cd-tolerans sınırı 100 μM olarak gözlenmiştir.

III.1.2. Kültür bitkilerinde Cd'un toksik etkileri, Cd birikimi ve Cd toleransı

Ağaç türlerinin yanı sıra, yukarıda belirtilen parametreleri incelemek amacıyla kültür bitkilerinden *L. esculentum*, *Z. mays* ve *V. radiata* ile de ayrı bir deney serisi hazırlanmıştır.

III. 1.2.A. *L. esculentum*

Kültür bitkilerinden *L. esculentum* 27 gün süreyle 10, 30, 50, 100, 200, 500 μM Cd uygulamasına tabi tutulmuştur. Besi çözeltisinin pH'ı, 1 hafta içinde 4.7'den 4.5'e düşmüştür. Morfolojik olarak belirlenen ilk toksik etki 1. gün 500 μM 'da izlenmiştir. Bu konsantrasyondaki genç yapraklarda damarlararası hafif kloroz ve kıvrılma başlamıştır. 3. gün, 10 μM 'da yapraklarda hafif solma belirirken, 30, 50 ve 100 μM 'da solmanın yanı sıra hafif kloroz ve kök uçlarında gri-kahve renk oluşumu dikkat çekmiştir. 200 ve 500 μM 'de ise yaşlı yapraklarda ciddi boyutlarda olmak üzere, tüm yapraklar da kloroz ve solma ile gri-kahve kök uçları gözlenmiştir. Cd uygulamasının süresi arttıkça 10 μM 'da daha önceki belirtilerin yanı sıra yaşlı yapraklarda kıvrılma, 30,50 ve 100 μM 'da yaşlı yapraklarda kloroz, solma, kıvrılma ve bazılarında kuruma başlangıcı, 200 ve 500 μM 'da ise yaşlı yaprakların büyük çoğunluğunun kuruması, diğerlerinde solma ve sararma, grimsi-sarı kök rengi belirlenmiştir. Hasat tarihinde 100-200-500 μM 'daki bitkilerin yapraklarının büyük çoğunluğunun kuruduğunu saptadık. Bu arada yan kök

oluşumunda indirgenme olduğu ve gövde çaplarının incelendiği, bitkinin gelişmediği kaydedildi (Şekil 15).

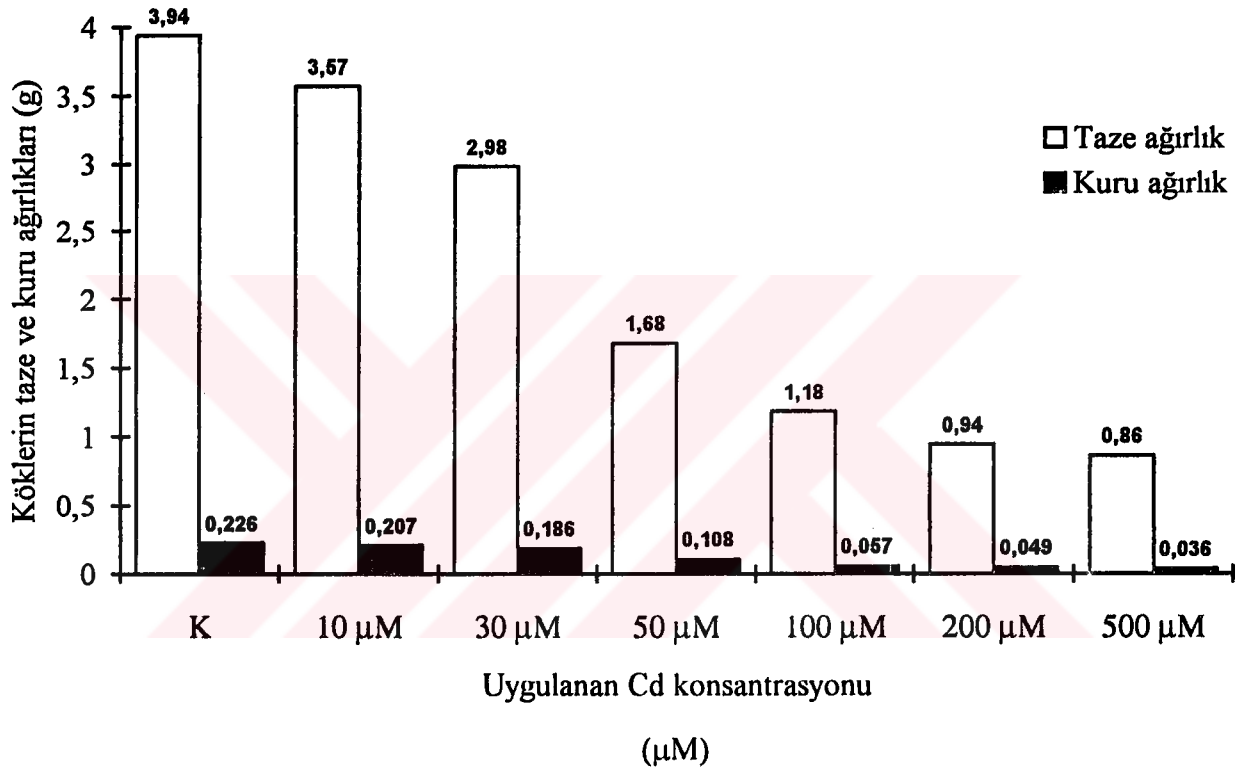


Şekil 15. Kontrol ve 27 gün süre ile 10, 30, 50, 100, 200 ve 500 μM Cd uygulanan *L. esculentum* fideleri

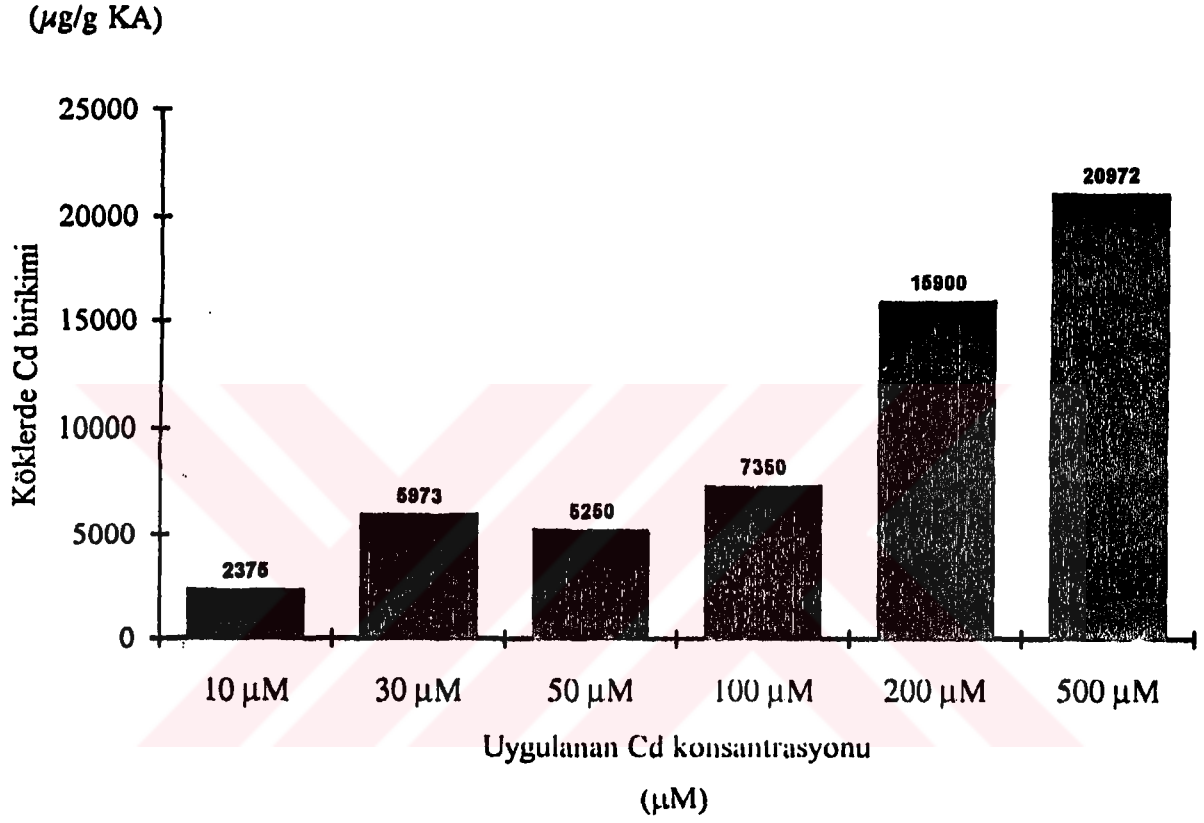
Büyüme parametreleriyle ilgili yaptığımız ölçümlerde genel olarak kontrole göre kök ve gövde büyümesinde bir indirgenme olduğu, ancak 10 μM 'da gövde büyümesinde kontrole göre % 7.5'luk bir artış bulunduğu saptanmıştır. Tablo 5'te gösterildiği gibi yukarıda belirtilen Cd konsantrasyonlarında kök uzunluklarında kaydedilen indirgenme sırasıyla % 2.6, % 12.7, % 24.6, % 25.9, % 39, % 40.5'dir. Gövde uzunluğunda ise 30, 50, 100 200 ve 500 μM 'da sırasıyla % 31.9, % 59.3, % 64.8, % 67 ve % 69.1'lik bir indirgenme vardır. 10-500 μM arasında Cd uygulanan bitkilerin köklerinin taze ağırlıkları kontrole göre % 9.4, % 24.4, % 57.4, % 70.1, % 76.1, % 97.8 indirgenme göstermiş; kuru ağırlıklar ise % 8.4, % 17.7, % 47.8, % 74.8, % 78.3 ve % 84.1 indirgenmiştir (Şekil 16). Köklerdeki Cd birikimi ortamdaki Cd konsantrasyonunun artışına göre artış göstermiş ve 500 μM 'da oldukça yüksek bir değere ulaşmıştır (Şekil 17). Buna göre 10 μM Cd uygulaması ile köklerde 2375 $\mu\text{g/g}$ KA Cd birikmiş ve kuru ağırlık % 8.4

Tablo 5. Kontrol ve 10-500 μM arasında Cd uygulanan *L.esculentum* bitkilerinde zamana bağı olarak belirlenen kök ve gövde uzunlukları (cm). (n=8, 12 gün)

Gün Cd μM	0		3		6		9		12	
	KÖK	GÖVDE	KÖK	GÖVDE	KÖK	GÖVDE	KÖK	GÖVDE	KÖK	GÖVDE
K	9.25 $\pm$ 0.65	6.25 $\pm$ 0.29	10.63 $\pm$ 0.95	9.13 $\pm$ 1.80	17.75 $\pm$ 3.41	12.50 $\pm$ 3.01	17.90 $\pm$ 0.77	14.25 $\pm$ 1.48	18.90 $\pm$ 2.25	23.50 $\pm$ 3.87
10	11.00 $\pm$ 3.50	6.00 $\pm$ 0.58	13.50 $\pm$ 1.50	9.38 $\pm$ 1.08	16.00 $\pm$ 1.02	11.00 $\pm$ 2.77	17.75 $\pm$ 0.85	14.13 $\pm$ 1.99	18.40 $\pm$ 1.31	25.25 $\pm$ 1.26
30	12.40 $\pm$ 1.60	6.75 $\pm$ 3.17	13.10 $\pm$ 3.06	10.00 $\pm$ 1.32	13.75 $\pm$ 3.04	11.00 $\pm$ 2.44	14.25 $\pm$ 0.60	12.88 $\pm$ 2.95	16.50 $\pm$ 3.05	16.00 $\pm$ 1.15
50	9.20 $\pm$ 1.32	6.13 $\pm$ 0.25	12.50 $\pm$ 1.60	7.88 $\pm$ 0.75	13.10 $\pm$ 1.13	8.75 $\pm$ 1.08	14.00 $\pm$ 1.05	9.25 $\pm$ 0.47	14.25 $\pm$ 1.41	10.75 $\pm$ 0.96
100	10.30 $\pm$ 2.21	5.88 $\pm$ 0.48	11.30 $\pm$ 2.25	8.00 $\pm$ 2.01	13.75 $\pm$ 0.73	8.25 $\pm$ 1.50	14.00 $\pm$ 2.05	8.25 $\pm$ 1.56	14.00 $\pm$ 2.64	8.25 $\pm$ 0.50
200	9.60 $\pm$ 1.08	6.13 $\pm$ 0.25	10.30 $\pm$ 3.50	7.75 $\pm$ 1.80	11.25 $\pm$ 2.48	7.75 $\pm$ 1.35	11.50 $\pm$ 1.72	7.75 $\pm$ 2.36	11.50 $\pm$ 1.83	7.75 $\pm$ 0.50
500	9.80 $\pm$ 1.26	5.88 $\pm$ 2.29	9.85 $\pm$ 1.65	7.25 $\pm$ 0.90	11.25 $\pm$ 2.44	7.25 $\pm$ 1.75	11.25 $\pm$ 0.45	7.25 $\pm$ 1.07	11.25 $\pm$ 4.00	7.25 $\pm$ 1.19



Şekil 16: Kontrol ve 27 gün süreyle 10-500 µM arasında Cd uygulanan *L. esculentum* bitkisinde köklerin taze ve kuru ağırlıkları (g). n=8.



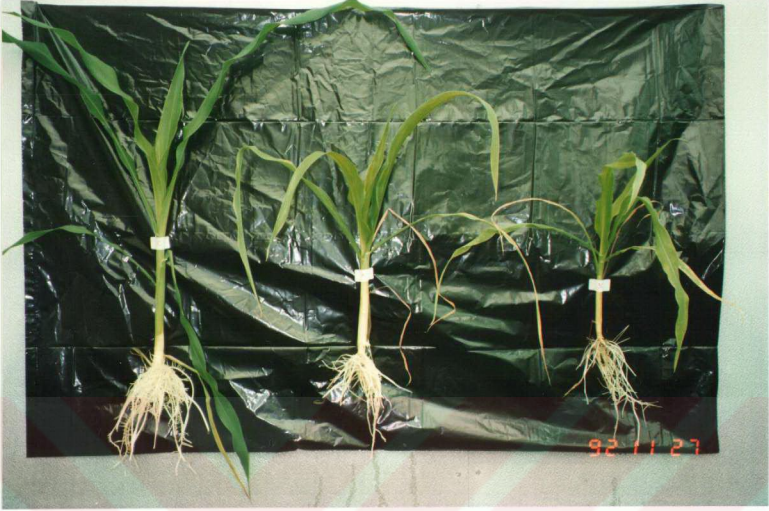
Şekil 17: 27 gün süreyle 10-500 μM arasında Cd uygulanan *L. esculentum* bitkisinin köklerinde biriken Cd miktarı ($\mu\text{g/g KA}$). n=8.

azalmıştır. 100 μM Cd uygulandığında ise köklerde 7350 $\mu\text{g/g}$ KA Cd birikimi olmuş ve kuru ağırlıkta % 74.8'lik bir indirgenme kaydedilmiştir. 500 μM Cd'da ise köklerde birikim ve köklerin kuru ağırlığının indirgenme yüzdesi sırasıyla 20972 $\mu\text{g/gKA}$ ve % 84.1'dir. *L.esculentum*'un Cd-tolerans sınırı 50 μM olarak belirlenmiştir.

III. 1.2.B. *Z. mays*

27 gün süre ile yukarıda belirtildiği gibi, 10-500 μM arasında Cd konsantrasyonları uygulanarak yetiştirilen *Z.mays*'da pH4.7 olan besi çözeltisinin 1 hafta sonra pH 3.5 olduğunu belirledik. İlk gün bitkilerde saptanan toksik etkiler bütün konsantrasyonlarda genç yaprakların uçlarının sararması, yaşlı yaprakların kuruması şeklindedir. 3. gün ise 10, 30 μM 'da genç yapraklarda hafif kloroz, 50, 100 μM 'da klorozla birlikte solma, 200, 500 μM 'da ciddi kloroz, solma, kuruma başlangıcı, sarımsı renkte kök görünümü belirlenmiştir. Cd uygulama süresi arttıkça bu etkiler şiddetlenmiş, 9. günde ise 200 ve 500 μM 'daki bitkilerin çoğu kurumuştur. Hasat tarihinde ise 10 μM 'da yaprak damarları arasında ve yaprak boyunca gözlenen kloroz, 30 μM 'da özellikle yaprak ucu ve kenarlarından başlayarak yaprak damarları arasına yayılan klorozla birlikte yaşlı yapraklarda kuruma, yan köklerin oluşumunda indirgenme gözlenmiştir. 50 μM 'da bu etkiler daha şiddetli gözlenmiş ve köklerdeki cılızlık dikkat çekmiştir. 100 μM 'daki bitkilerin bir çoğu, 200, 500 μM 'dakilerin ise tümü kurumuştur (Şekil 18, 19).

Tablo 6'da kök ve gövde uzunlukları, Şekil 20'de ise köklerin taze ve kuru ağırlıkları belirtilmektedir. 10-500 μM arasında artış gösteren Cd konsantrasyonlarına göre kök ve gövde büyümesinde saptanan indirgenmeler sırasıyla, kökler için % 4.5, % 10, % 31.1, % 30, % 41.1, % 41.1; gövdeler içinse % 16.7, % 32.4, % 52.4, % 57.2, % 55.9'dur. Taze ağırlıklar yine sırasıyla % 38.5, % 58.3, % 90.6, % 92, % 94.8, % 95.1; kuru ağırlıklar ise % 46.2, % 51.7, % 93, % 95.4, % 97.3, % 97.6'lık bir indirgenme göstermiştir. Köklerdeki Cd birikimi uygulanan Cd konsantrasyonuyla artmış ancak özellikle 500 μM 'de anormal bir seviyeye ulaşmıştır. 10 μM Cd uygulanan bitkilerin köklerinde 306 $\mu\text{g/gKA}$ Cd birikmesi ve kuru ağırlığın % 46.2 indirgenmesi kaydedilirken, 100 μM Cd uygulananlarda ise 10688 $\mu\text{g/gKA}$ Cd



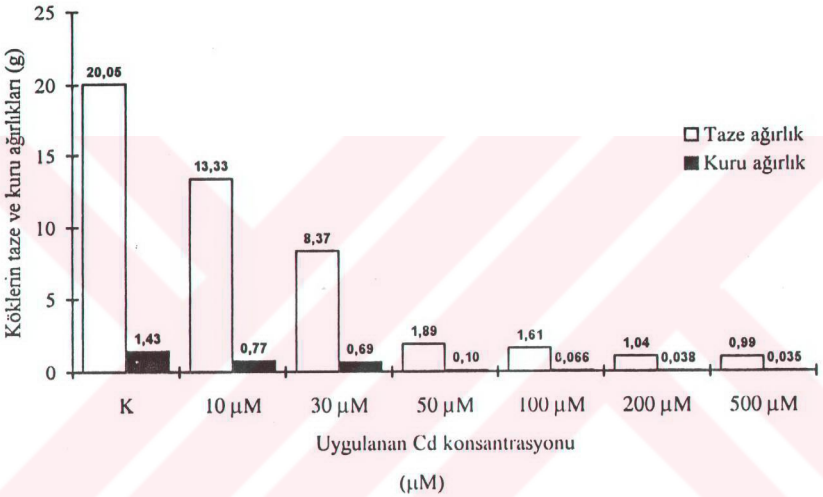
Şekil 18. Kontrol ve 27 gün süre ile 10, 30 μM Cd uygulanan *Z.mays* fideleri.



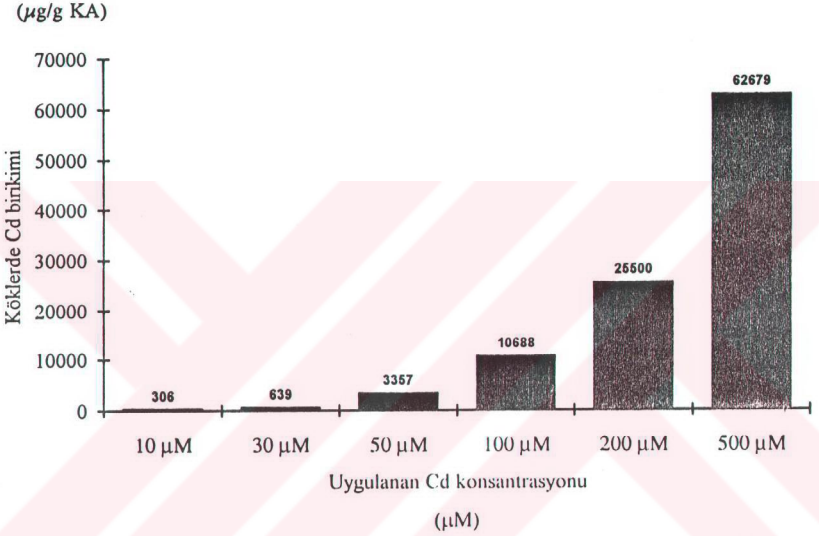
Şekil 19. 27 gün süre ile 50, 100, 200, 500 μM Cd uygulanan *Z.mays* fideleri.

Tablo 6. Kontrol ve 10-500 μ M arasında Cd uygulanan *Z.mays* bitkilerinde zamana bağılı olarak belirlenen kök ve gövde uzunlukları (cm). (n=8, 12 gün)

Gün Cd μ M	0		3		6		9		12	
	KÖK	GÖVDE	KÖK	GÖVDE	KÖK	GÖVDE	KÖK	GÖVDE	KÖK	GÖVDE
K	13.50 $\pm$ 1.73	11.38 $\pm$ 1.10	15.50 $\pm$ 1.80	18.25 $\pm$ 0.60	16.88 $\pm$ 3.05	28.75 $\pm$ 2.70	19.00 $\pm$ 0.86	33.50 $\pm$ 3.50	22.50 $\pm$ 1.91	36.25 $\pm$ 1.04
10	12.50 $\pm$ 2.51	12.75 $\pm$ 1.50	14.00 $\pm$ 1.49	18.75 $\pm$ 0.72	16.25 $\pm$ 3.06	22.00 $\pm$ 2.06	20.25 $\pm$ 1.48	23.50 $\pm$ 2.90	21.50 $\pm$ 2.08	32.00 $\pm$ 7.50
30	17.50 $\pm$ 0.57	11.00 $\pm$ 3.36	18.25 $\pm$ 0.46	14.25 $\pm$ 1.70	18.50 $\pm$ 3.02	18.25 $\pm$ 1.86	19.50 $\pm$ 0.47	19.25 $\pm$ 3.07	20.25 $\pm$ 1.71	24.50 $\pm$ 5.80
50	13.75 $\pm$ 3.86	10.25 $\pm$ 0.95	14.50 $\pm$ 1.70	11.62 $\pm$ 2.90	15.25 $\pm$ 1.88	14.88 $\pm$ 1.08	15.50 $\pm$ 0.86	16.75 $\pm$ 4.01	15.50 $\pm$ 3.10	17.25 $\pm$ 0.96
100	14.50 $\pm$ 2.88	11.75 $\pm$ 0.96	15.25 $\pm$ 1.86	13.00 $\pm$ 0.41	15.75 $\pm$ 0.98	15.50 $\pm$ 1.50	15.75 $\pm$ 1.08	15.50 $\pm$ 2.71	15.75 $\pm$ 2.21	15.50 $\pm$ 1.84
200	13.00 $\pm$ 3.55	11.50 $\pm$ 1.07	13.25 $\pm$ 0.74	13.75 $\pm$ 0.38	13.25 $\pm$ 0.90	16.00 $\pm$ 0.44	13.25 $\pm$ 1.98	16.00 $\pm$ 1.05	13.25 $\pm$ 2.75	16.00 $\pm$ 1.82
500	13.25 $\pm$ 0.95	10.88 $\pm$ 4.25	13.25 $\pm$ 0.95	11.50 $\pm$ 1.06	13.25 $\pm$ 1.00	12.75 $\pm$ 0.90	13.25 $\pm$ 0.95	12.75 $\pm$ 1.08	13.25 $\pm$ 0.95	12.75 $\pm$ 1.70



Şekil 20: Kontrol ve 27 gün süreyle 10-500 µM arasında Cd uygulanan *Z.mays* bitkisinde köklerin taze ve kuru ağırlıkları (g). n=8 .



Şekil 21: 27 gün süreyle 10-500 μM arasında Cd uygulanan *Z. mays* bitkisinin köklerinde biriken Cd miktarı ($\mu\text{g/g KA}$). n=8.

birikimi saptanmış ve kuru ağırlıklar % 95.4 indirgenmiştir. 500 μM 'de ise köklerde 62679 $\mu\text{g/gKA}$ Cd birikmiş ve kuru ağırlık % 97.6 indirgenmiştir. Bu sonuç, köklerin zarar görmesiyle pasif Cd girişinin olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 21). *Z.mays*, 30 μM sınır değere kadar Cd-toleransı gösterebilmektedir.

III. 1.2.C. *V.radiata*

Yukarıda belirtilen koşullarda yetiştirilmeye başlanan *V.radiata* bitkilerinin bulunduğu besi çözeltisinin pH'sı 1. hafta bitiminde pH 4.7'den pH 4.0'e düşmüştür. *V.radiata*, ilk günden itibaren toksik belirtileri göstermeye başlayan ve incelediğimiz kültür bitkileri arasında Cd'a karşı en duyarlı olan bitki olarak saptanmıştır. Buna göre 1. gün, 10-100 μM 'da yaşlı yaprakların ana damarları üzerinde kahverengi benek oluşumu, tüm yaprakta uçtan başlayan damarlar arası kloroz, solma, grimsi-sarı kökler dikkat çekmiştir. 200-500 μM 'de ise bu belirtilerle birlikte yaşlı yapraklarda ciddi kloroz ve kuruma başlangıcı ve sadece 500 μM 'da apekteki genç yapraklarda solma kaydedilmiştir. Cd uygulanan süre arttıkça bu etkiler şiddetlenmiş ve bunun yanısıra yapraklarda kıvrılma başlamıştır. Hasat tarihinde 10 μM 'da kloroz ve solma, 30, 50 μM 'da ciddi kloroz, solma ve kuruma belirlenmiş, 100 μM 'de bitkilerin çoğunun, 200-500 μM 'da ise tümünün kuruduğu saptanmıştır. Ayrıca, gövde çaplarının inceliği ve sarı-kahve köklerin cılızlığı dikkati çekmiştir (Şekil 22).

Tablo 7'ye göre Cd uygulaması ile kök ve gövde uzunluklarında bir indirgenme olduğu saptanmıştır. 10-500 μM arasında köklerde belirlenen indirgenme sırasıyla % 27, % 38.8, % 39.4, % 38.8, % 40.1, % 42.3'dür. Gövdelerde ise, % 20.8, % 27.3, % 28.8, % 29.2, % 29.9'luk bir indirgenme kaydedilmiştir. Taze ağırlıklardaki indirgenme aynı konsantrasyonlar için sırasıyla % 46.5, % 56.5, % 61.5, % 65.5, % 66, % 77.5'dur. Kuru ağırlıklarda saptanan indirgenme ise % 48.6, % 65.9, % 74.6, % 76.8, % 73.9 ve % 88.4 olarak belirlenmiştir. (Şekil 23).



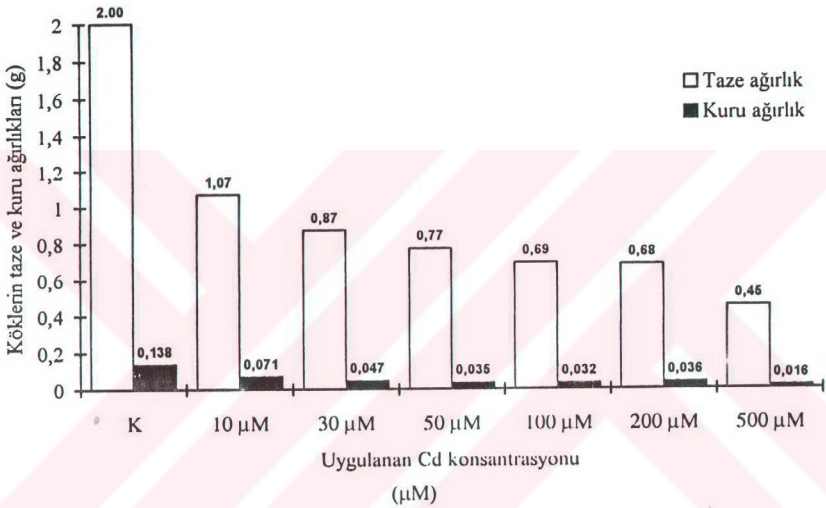
Şekil 22. Kontrol ve 27 gün süre ile 10, 30, 50, 100, 200, 500 μM Cd uygulanan *V.radiata* fideleri

Köklerdeki Cd birikimi ise diğer bitkilerde olduğu gibi ortamdaki Cd konsantrasyonunun artmasıyla artış göstermiştir. Bitkilerin canlılığını kaybetmesi ile özellikle 500 μM 'da yüksek miktarda Cd birikimi olmuştur (Şekil 24) 10 μM Cd uygulamasındaki köklerde 2333 $\mu\text{g/g}$ KA Cd birikmiş ve kuru ağırlıklar % 48.6 indirgenmiştir.

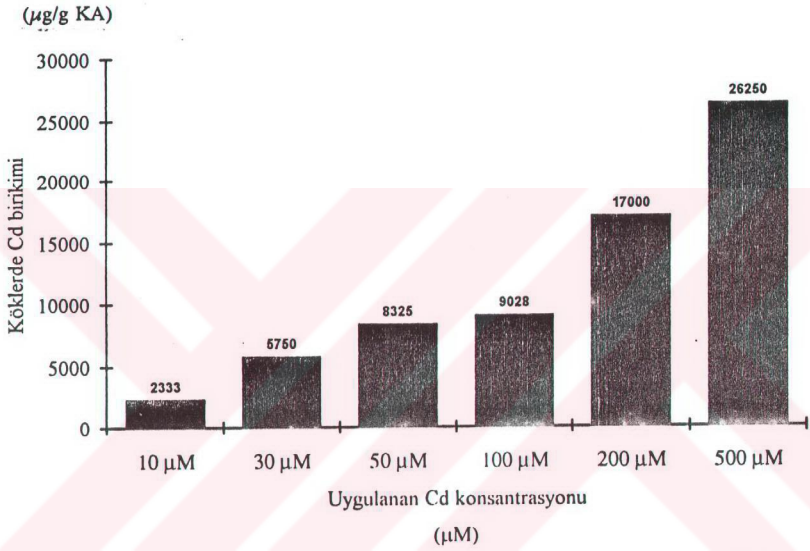
100 μM 'da ise 9028 $\mu\text{g/g}$ KA Cd birikerek kuru ağırlık % 74.6 indirgenme göstermiştir. 500 μM 'de ise 26250 $\mu\text{g/g}$ KA Cd birikimi olduğu ve % 88.4 kuru ağırlık indirgenmesi bulunduğu kaydedilmiştir. Bu sonuç *V.radiata*'da da zarar gören köklerin pasif olarak Cd biriktirmiş olabileceğini göstermektedir. Cd'a en duyarlı bitki olarak gözlenen *V.radiata*'nın tolerans sınırı 10 μM 'dur.

Tablo 7. Kontrol ve 10-500 μM arasında Cd uygulanan *V. radiata* bitkilerinde zamana bağılı olarak belirlenen kök ve gövde uzunlukları (cm). (n=8, 12 gün)

Gün Cd μM	0		3		6		9		12	
	KÖK	GÖVDE	KÖK	GÖVDE	KÖK	GÖVDE	KÖK	GÖVDE	KÖK	GÖVDE
K	11.00±1.41	14.50±2.01	11.75±0.90	16.75±1.08	12.25±2.02	17.50±1.30	13.50±0.85	18.25±2.01	13.70±1.41	19.25±1.54
10	8.63±0.48	14.50±1.22	9.50±1.50	15.00±1.00	9.75±1.55	15.25±0.28	10.00±0.90	15.25±1.07	10.00±3.16	15.25±0.87
30	8.13±1.75	13.40±1.55	8.25±1.45	13.60±0.44	8.38±0.83	14.00±0.58	8.38±2.00	14.00±0.76	8.38±1.38	14.00±1.25
50	7.90±0.85	13.60±1.04	8.00±0.85	13.70±0.70	8.30±1.49	13.70±1.03	8.30±0.87	13.70±0.98	8.30±3.11	13.70±0.85
100	8.00±1.15	13.65±1.49	8.00±2.00	13.65±1.30	8.38±1.50	13.65±2.04	8.38±1.41	13.65±3.04	8.38±1.37	13.65±1.49
200	8.00±1.50	13.50±0.94	8.20±1.75	13.50±1.15	8.20±0.40	13.50±0.90	8.20±1.25	13.50±1.05	8.10±1.35	13.50±0.94
500	7.80±0.58	13.55±1.25	7.90±0.68	13.55±0.96	7.90±1.02	13.55±1.04	7.90±0.85	13.55±0.48	7.90±2.21	13.55±1.25



Şekil 23: Kontrol ve 27 gün süreyle 10-500 µM arasında Cd uygulanan *V.radiata* bitkisinde köklerin taze ve kuru ağırlıkları (g). n=8.



Şekil 24: 27 gün süreyle 10-500 µM arasında Cd uygulanan *V.radiata* bitkisinin köklerinde biriken Cd miktarı (µg/g KA). n=8.

III.2. Cd-tolerans mekanizmasında rol oynayan fitokelatinlerin oluşumu

Daha önce *A.altissima* ile kum kültürlerinde yaptığımız çalışmada bu bitkinin Cd'a karşı toleranslı olduğunu saptamıştık (BAYÇU, 1992). III.1.1.A'da *A.altissima* ile su kültürlerinde yürütülen araştırmamızda ise, özellikle 500 μM Cd'un bu bitki için letal doz olduğunu belirledik. Bulgularımıza göre 200 μM Cd, *A.altissima* için letal dozun altındaki değerdir. Uygulanan Cd konsantrasyonlarının toksik etkilerine rağmen yaşamını sürdürebilen bu bitkinin toleranslı olmasını sağlayan bir mekanizmaya sahip olabileceğini düşündük. Son yıllardaki literatür bilgilerimize göre, Cd-tolerans mekanizması ile fitokelatin (PC) oluşumu arasında bir ilişki olduğu öne sürülmüş ve PC'lerin saptanabilmesi için ağırmetallere toleransı olan yüksek bitkilerle çalışmak gerektiği vurgulanmıştır. Bu nedenle araştırmamızda Cd'a toleranslı *A.altissima* bitkisi seçilmiş ve PC oluşumunu saptayabilmek için letal dozun altındaki Cd konsantrasyonu (200 μM) tercih edilmiştir (Şekil 25).



Şekil 25. *A.altissima* fideleri .

III.2.1. Su kültürlerinde yetiştirilen *A.altissima*'da fitokelatin oluşumu

III.2.1.A. Kromatografik yöntemlerle saflaştırılan fitokelatinler

Araştırmamızda 200 μ M Cd uygulanarak 1 hafta süreyle Ingestad (değiştirilmiş) besi çözeltisinde yetiştirilen *A.altissima* fidelerinin total olarak 31.531 gram ağırlığındaki köklerinden elde edilen ham ekstre kromatografik saflaştırmaya tabi tutulmuştur. Böylece çok miktarda materyal uygulanabilmiş ve Cd-BP'lerin yoğunlaşması sağlanmıştır. Ekstraksiyon sırasında kullanılan askorbik asit, merkaptoetanol, KCN ve sıvı N₂, intra veya intermoleküler disülfid köprülerinde metal kaybına neden olabilecek oksidatif değişimleri önlemek amacıyla tampon çözeltiye eklenmiştir. pH'sı 7 olan QAE-Sephadex A-25, pH 8.6 olan A tamponu ile dengelenmiş ve köklerden elde edilen supernatant halindeki ham ekstre (100 ml) kolona uygulanmıştır. Ekstrenin uygulanması sırasında, QAE-Sephadex A-25'in üst bölümünde sarımsı-kahve renk oluşumu dikkati çekmiştir. Bu veri, Cd uygulaması nedeniyle, oksidaz ürünü olabilecek kahverengi fenolik bileşiklerin ya da polifenollerin meydana geldiğini düşündürmektedir. Bu maddeler etkin anyon-değişimi yapan QAE-Sephadex A-25'te tutulmaktadır.

Kolondan ayrılmaya başlayan fraksiyonların bazılarında proteinlerin varlığı nedeniyle köpüklenme meydana gelmiştir. Proteinlerin yüzey aktif özelliği nedeniyle 100 damla halinde toplanan fraksiyonların bir bölümünde hacimlerin düştüğü gözlenmiştir. Total olarak 50 fraksiyon elde edilmiş ve ilk fraksiyon grupları ile son fraksiyon grupları açık sarı veya renksiz olarak belirlenmiştir.

Cd-bağlayan bileşikler özellikle KCl gradienti uygulanan fraksiyonlarda belirlenmiştir (KCl uygulaması, kuvvetli anyonik yapıda bilinen Cd-BP'lerin Cd'a bağlanmama olasılığını en aza indirir). KCl gradienti ile elde edilen fraksiyonlar değişik renklerde gözlenmiştir. 26. fraksiyonda uygulanan 0.54 M KCl gradientinden sonra 28, 29 ve 30 numaralı fraksiyonlar koyu sarı, köpüklü ve hacimleri düşük olarak kolondan ayrılmışlardır. 1M KCl gradienti ise 31. fraksiyonda uygulanmış ve 33, 34 numaralı fraksiyonlar sarımsı-gri pembe renkte elde edilmiştir. 34. fraksiyonda 1.5 M KCl, 37.fraksiyonda ise 2 M KCl uygulanmıştır. 36. fraksiyon sarı renkte ayrılmaya başlarken diğerlerinin rengi 50. fraksiyona ulaşınca kadar kay-

bolmuştur (akış hızı: 0.46 ml/dakika).

Köpük ve renk oluşumu, fraksiyonlarda protein bulunduğunu göstermekte, uygulanan KCl gradienti ile artırılan anyonik güç ise Cd-BP'lerin kolonda tutulduğunu ve izole edildiğini belirtmektedir. Toplanan 50 fraksiyonda AAS ile Cd konsantrasyonları ($\mu\text{g/ml}$) ölçülmüş ve Cd'un 27no'lu fraksiyonda artmaya başladığı, bu artış sırasında çeşitli çıkıntılar (shoulder) yaparak 33 no'lu fraksiyonda en üst değere (peak) ulaştığı, 36. fraksiyondan sonra ise azalmaya başladığı saptanmıştır. Belirlenen çıkıntılar, Cd'u yüksek afinite ile bağlayan PC'lerin dışında, yine Cd-bağlayan molekül ağırlığı yüksek proteinlerin varlığını düşündürmektedir (Tablo 8).

Tablo 8. QAE-Sephadex A-25 anyon-değişimi kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlardaki Cd miktarı ($\mu\text{g/ml}$) ve uygulanan KCl gradienti (M). Akış hızı: 0.46 ml/dakika

Fraksiyon no.	Cd ($\mu\text{g/ml}$)	KCl gradienti (M)
1	0.06	
2	0.08	
3	0.09	
4	0.09	
5	0.11	
6	0.14	
7	0.34	
8	0.32	
9	0.34	
10	0.34	
11	0.29	
12	0.27	
13	0.28	
14	0.28	
15	0.29	
16	0.28	
17	0.31	

Fraksiyon no.	Cd ($\mu\text{g/ml}$)	KCl gradienti (M)
18	0.32	
19	0.38	
20	0.35	
21	0.44	
22	0.47	
23	0.46	
24	0.45	
25	0.49	
26	0.52	0.54
27	0.61	
28	3.35	
29	11.23	
30	31.25	
31	51.23	1.00
32	51.95	
33	119.18	
34	76.75	1.50
35	58.4	
36	32.1	
37	20.7	2.00
38	21.1	
39	18.6	
40	18.3	
41	23.2	
42	20.7	
43	18.6	
44	18.7	
45	18.2	
46	18.3	
47	17.7	
48	17.5	
49	16.8	
50	15.2	

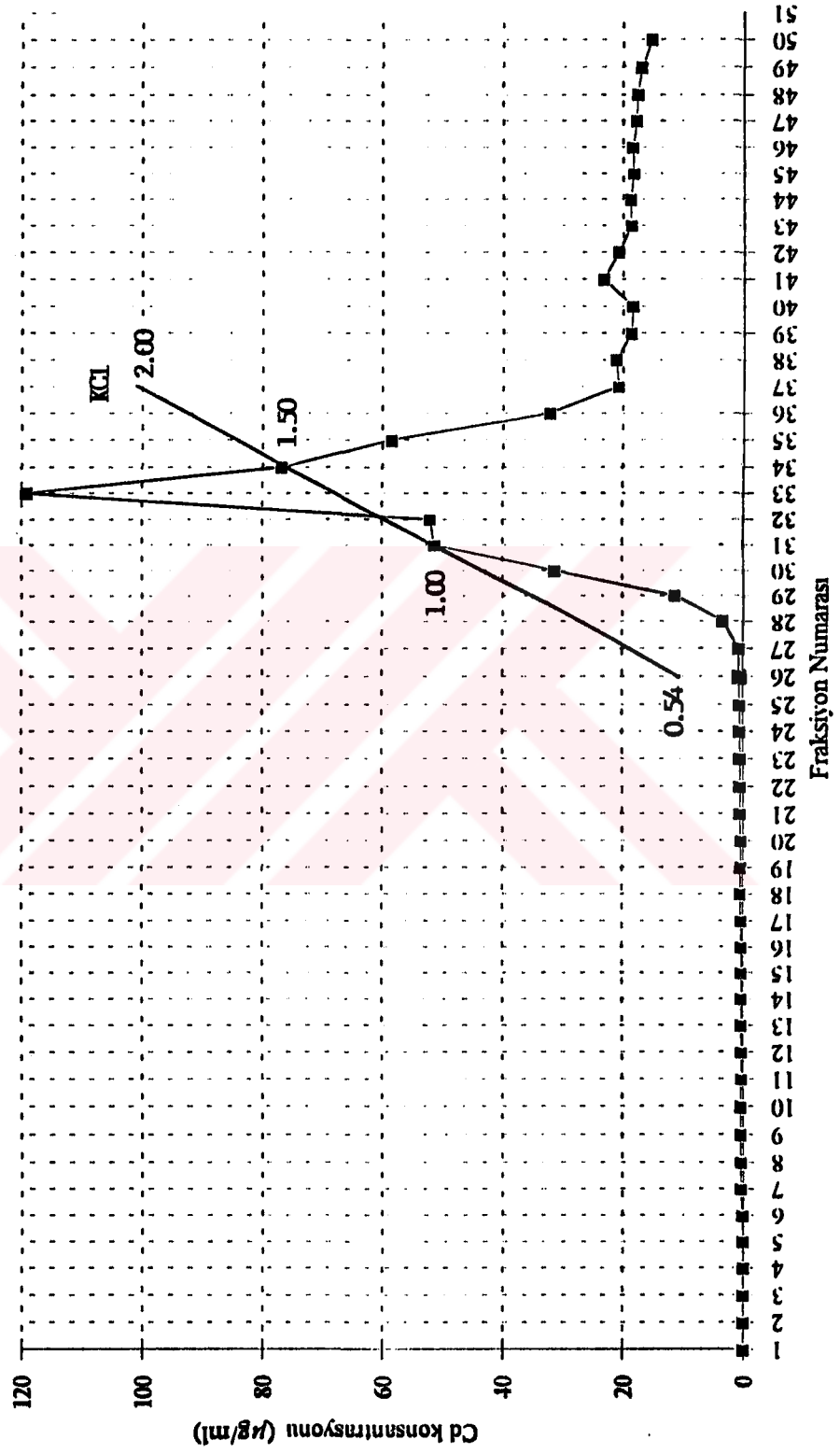
KCl gradientleriyle karşılaştırdığımızda en fazla Cd'un 0.54, 1.00 ve 1.5 M KCl uygulanan fraksiyonlarda bulunduğu ve bu fraksiyonların Cd-PC ya da Cd-BP içeren fraksiyonlar olduğu tahmin edilmiştir (Şekil 26). Grafik üzerinde de incelenebileceği gibi en fazla Cd, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ve 36 numaralı fraksiyonlarda bulunmakta, 1.00 M KCl gradienti uygulanmış 33 no'lu fraksiyon ise 119.18 µg/ml değerle en üst Cd miktarını içermektedir.

Elde edilen verilere göre 1-27 arasındaki fraksiyonlar, 50 fraksiyonda belirlenen total Cd miktarının sadece % 1'ini içermektedir. Bu miktar büyük bir olasılıkla madde uygulanması ve tampon çözelti ile yıkama sırasında ayrılan serbest Cd iyonlarından ibarettir. 37-50 no'lu fraksiyonlarda ise total Cd miktarının % 33.7'si belirlenmiştir. Bu değer hem serbest Cd²⁺ iyonlarını ve hem de merkaptid bileşiklere bağlı olan Cd'u içerdiğini düşünmekteyiz.

Fitokelatin ve olası diğer Cd-bağlayan bileşiklerin bulunduğunu tahmin ettiğimiz 28-36 no'lu fraksiyonlar ise total Cd değerinin % 65.3'ünü içermektedir. Cd'un büyük yüzdesinin KCl gradienti ile ayrılmış olduğunu gördük. Buna göre, en fazla Cd içeren 33 no'lu fraksiyon (5 ml), Cd-bağlayan bileşikler molekül büyüklüklerine göre tekrar saflaştırabilmek amacıyla Sephadex G-75 jel filtrasyondan geçirilmiştir.

Elde edilen 50 fraksiyonda protein içerenlerin yine köpüklü olduğu dikkati çekmiştir. Bu fraksiyonlardaki renklerin genelde açık sarı olduğu gözlenmiştir (Jel hacmi -bed volume: 164 ml, akış hızı: 0.92 ml/dakika). Bu yöntemle önce molekül ağırlığı yüksek (HMW) olan proteinler, daha sonra ise düşük molekül ağırlıklı (LMW) küçük proteinler ayrılmıştır.

Şekil 26. QAE -Sephadex A-25 anyon değişimi kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlardaki Cd miktarı (μ g/ml) ve uygulanan KCl gradienti (M). (31.531 gr kökten elde edilen 100 ml ham ekstre, akış hızı; 0,46 ml/dakika)

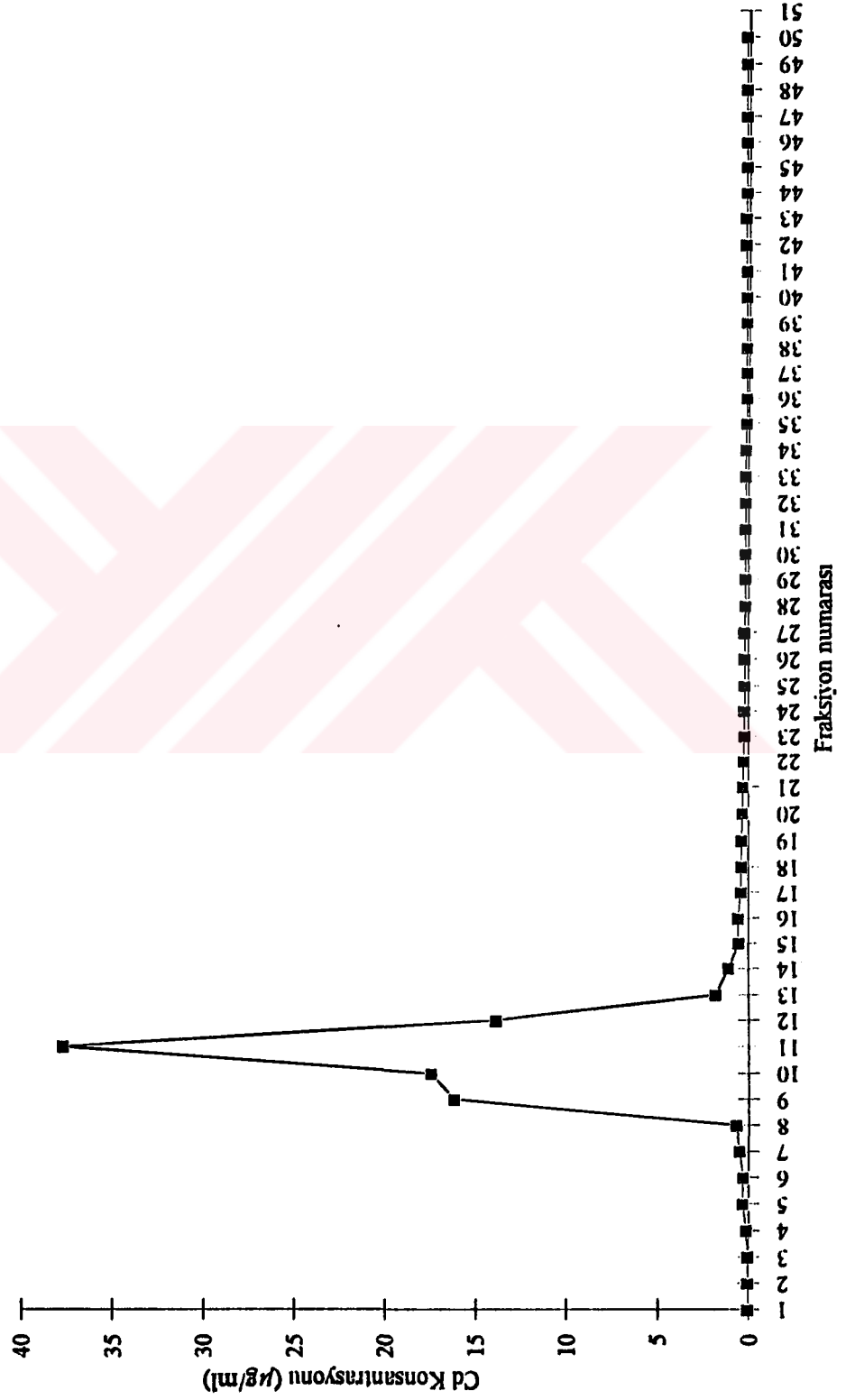


AAS le ölçülen Cd miktarı ($\mu\text{g/ml}$), 9, 10, 11 ve 12 numaralı fraksiyonlarda en yüksek değerlere ulaşmıştır (Tablo 9). 11 no.'da "peak" meydana getiren Cd miktarı ($33.73 \mu\text{g/ml}$), 9 no.'da bir "shoulder" oluşturmuştur. Bu bize fraksiyonlarda HMW yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerin de olabileceğini göstermektedir (şekil 27). Fraksiyonlarda belirlenen düşük Cd konsantrasyonları ise serbest olarak kolondan geçen Cd^{2+} iyonlarını belirtmektedir. 9, 10, 11 ve 12 no.'lu fraksiyonlardaki Cd miktarı 50 fraksiyondaki total Cd'un % 85'ini oluşturmaktadır. Böylece daha önceden saflaştırılarak jel filtrasyon uygulanan 33 no.'lu fraksiyondaki Cd'un hemen hepsi elde edilmiştir.

Tablo 9: Sephadex G-75 jel filtrasyonu ile elde edilen fraksiyonlardaki Cd miktarı ($\mu\text{g/ml}$) Akış hızı: 0.92 ml/dakika

Fraksiyon no.	Cd ($\mu\text{g/ml}$)	Fraksiyon no.	Cd($\mu\text{g/ml}$)
1	0.05	26	0.20
2	0.05	27	0.20
3	0.08	28	0.19
4	0.15	29	0.16
5	0.32	30	0.19
6	0.31	31	0.16
7	0.48	32	0.17
8	2.69	33	0.16
9	16.20	34	0.16
10	17.47	35	0.15
11	37.73	36	0.15
12	13.90	37	0.15
13	1.82	38	0.36
14	1.08	39	0.17
15	0.16	40	0.17
16	0.60	41	0.19
17	0.41	42	0.21
18	0.39	43	0.21
19	0.39	44	0.17
20	0.35	45	0.18
21	0.29	46	0.17
22	0.28	47	0.16
23	0.25	48	0.16
24	0.21	49	0.16
25	0.22	50	0.18

Şekil 27. Sephadex G-75 jel filtrasyonu ile elde edilen fraksiyonlardaki Cd miktarı ($\mu\text{g/ml}$). (33 no.lu fraksiyon: 5 ml, akış hızı: 0.92 ml/dakika, jel hacmi (bed volume): 164 ml)



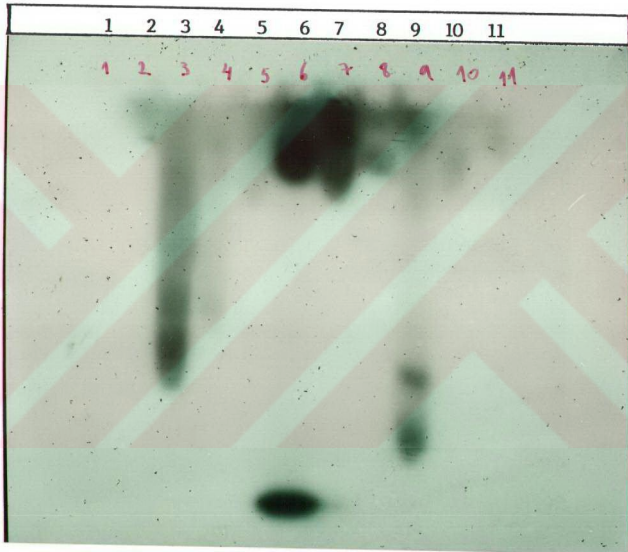
Bununla beraber Sephadex G-75'e sadece 33 no.'lu fraksiyon uygulandığından, bazı LMW (düşük molekül ağırlıklı) Cd- bağlayan bileşiklerin tümünün bu kromatografik saflaştırmalarda elde edilemeyebileceğini düşündük ve $^{109}\text{Cd}^{2+}$ bağlanması esasına dayanan nativ (non-denaturing) poliakrilamid jel elektroforez uyguladık. LMW Cd-PC'ler veya HMW Cd-BP'lerde bulunan Cd'un $^{109}\text{Cd}^{2+}$ izotopu ile yer değiştirmesi esasına dayanan bu metodla LMW Cd-PC bileşikleri ve diğer HMW Cd-BP'lerin varlığını kanıtlamaya çalıştık.

III. 2.1.B. $^{109}\text{Cd}^{2+}$ bağlanması ve nativ poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) yöntemiyle saptanan fitokelatinler

Özellikle küçük molekülü PC'leri tutabilmek için geliştirilmiş olan %40'lık poliakrilamid jele uygulanan işaretli $^{109}\text{Cd}^{2+}$ 'un otoradyografi filmde meydana getirdiği sinyallerde Cd ile yer değiştirdiği ve daha önce Cd'un bağlı olduğu yapılara bağlandığı saptanmıştır. $^{109}\text{Cd}^{2+}$ 'un sinyal oluşturmada yeralan reaksiyonun temeli, bu izotopta bulunan radyoaktif ışının otoradyografi filmdeki gümüş tuzlarını gümüş taneciklerine dönüştürmesine ve böylece koyu renk sinyaller vermesine dayanmaktadır. Sinyal oluşturmeyen beyaz görünümlü bölümler ise bu reaksiyonun gerçekleşmediği boş alanlardır. Eğer bağlı bir Cd varsa, bu $^{109}\text{Cd}^{2+}$ ile yer değiştirmiş ve sinyal oluşturmuştur, bağlı bir Cd yoksa yer değiştirme olayı mümkün olmayacağından sinyal meydana gelmemiştir. Kontrol olarak sadece $^{109}\text{Cd}^{2+}$ ve tampon bulunan örnekte de herhangi bir sinyal oluşmaması bunu kanıtlamıştır.

Otoradyogramda, $^{109}\text{Cd}^{2+}$ reaksiyonu ile gelişen sinyallerin ya da siyah bantların, heterojen yapıdaki LMW Cd-PC'ler ile HMW Cd-BP'ler olduğu belirlenmiştir. Cd-PC bileşiklerinde, PC zincir sayısı, zincir uzunluğu, bağlanan Cd^{2+} iyonlarının sayısı, S^{2-} iyonlarının farklı yük/kütle oranında ve farklı fiziksel boyutlarda olmaları doğal olarak heterojen bir yapı meydana getirmektedir. Bu heterojen yapı, PC'lerin elektroforezde farklı hızda ilerlemelerine neden olmaktadır.

Otoradyografi filminde, 6,7,8,9,10,11 numarayla belirtilen şeritler 30, 31, 32, 34, 35, 36 no.'lu QAE Sephadex A-25 fraksiyonlarını; 2,3,4,5, numarayla belirtilenler 9,10,11,12 no.'lu Sephadex G-75 fraksiyonlarını; 1 numara ise kontrol olarak uygulanan ve sadece $^{109}\text{Cd}^{2+}$ içeren tampon çözeltiyi göstermektedirler (Şekil 28).



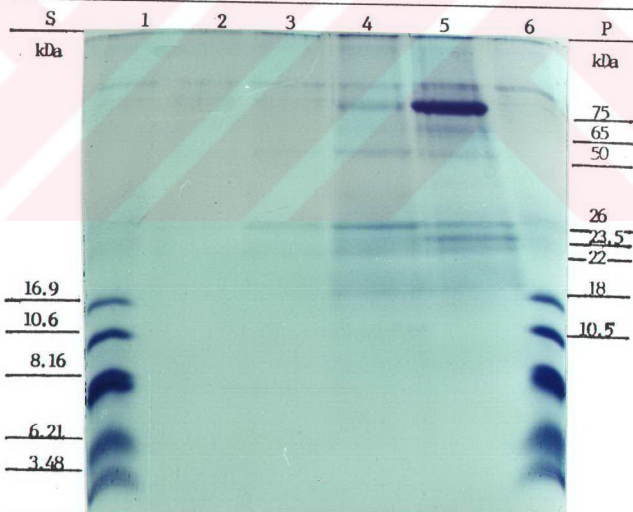
Şekil 28. % 40 poliakrilamid jelde $^{109}\text{Cd}^{2+}$ ile birlikte yürütülen fraksiyon örnekleri. (1): Sadece $^{109}\text{Cd}^{2+}$ içeren tampon; (2,3,4,5): 9,10, 11, 12 no.'lu Sephadex G-75 fraksiyonları; (6,7,8,9,10,11): 30,31,32,34,35,36 no.'lu QAE-Sephadex A-25 fraksiyonları. (6): LMW Cd-PC ve HMW Cd-BP; (7): HMW Cd-BP; (8): HMW Cd-BP; (9): LMW Cd-PC ve HMW Cd-BP; (3): ve LMW Cd-PC ile HMW Cd-BP'leri göstermektedir.

Bulgulara göre, 30,31,32 ve 34 no'lu fraksiyonlarda belirsiz bir şekilde Cd'a bağlanan HMW proteinler yer almaktadır. 30 ve 34 no.'da ayrıca PC olarak belirlediğimiz bazı LMW bileşikler saptanmıştır. 30 no.'da saptanan çok hızlı ilerlemiş ve yoğun sinyal vermiş olan bu bandın PC₂ olabileceği tahmin edilmektedir. Küçük moleküler yapısı ve düşük net negatif yükü nedeniyle bu bileşiğin anyon değişimi sırasında yeterince kuvvetli tutunmadığını ve KCl gradienti ile kolondan ayrıldığını düşünmekteyiz. Bunun yanı sıra ¹⁰⁹Cd²⁺ ile çok güçlü sinyal meydana getirmesi fitokelatinin ortamdaki Cd-izotopunun büyük kısmı ile bileşik oluşturması sonucuna bağlanabilir. Ancak bu arada HMW Cd-BP'lerinde ¹⁰⁹Cd²⁺ ile oldukça güçlü sinyaller oluşturduğunu belirtmek gerekir. 34 no.'da saptanan 2 farklı bant ise zayıf sinyal veren HMW proteinin önünden hızla ilerlemiş olan PC₃ ve PC₄ olarak tanımlanabilir. Bu PC'ler PC₂'ye göre daha yavaş ilerleyen, daha yüksek moleküler ağırlığa ve uzun zincirlere sahip polipeptidlerdir. 10 no.'lu Sephadex G-75 fraksiyonunda daha karmaşık olarak gözlenen 2 bant ise 34 no.'daki PC'lerden biraz daha ağır ilerleyen ve daha büyük moleküllerden oluşan PC₅ ve PC₆ yapılarıdır.

Bu bileşiklerin ardından ilerleyen ve daha yüksek molekül ağırlığına sahip başka moleküller de bulunmaktadır. Bu HMW proteinler ¹⁰⁹Cd²⁺ ile tam bir bileşik oluşturmamış ve bu nedenle PC'lerin ardından kuyruk (tail, smear) oluşturarak ilerlemişlerdir. 31 no'daki HMW protein bantlarında ise güçlü sinyaller görülmektedir. 32 ve 34 no'da bu HMW protein sinyalleri kuvvetini biraz kaybetmiştir. Geri kalan örneklerde ise bağlı Cd'un bulunması veya sadece serbest Cd²⁺ iyonlarının bulunması, ya da hiç Cd bulunması nedeniyle ¹⁰⁹Cd²⁺'un gerçekleştirdiği bir sinyal belirlenememiştir. Cd-bağlanması az olduğunda ise çok zayıf sinyallerin meydana geldiği gözlenmiştir. Sinyallerin zayıf bantlar halinde belirmesi, tüm ¹⁰⁹Cd²⁺un bileşik oluşturmamış olmasına bağlanabildiği gibi, PC'lerin total miktarı ile işaretli iyonun aktivitesinden de olabilir. Genel olarak toparlamak gerektiğinde, *A.altissima* köklerinde 5 farklı LMW Cd-PC ve ayrıca HMW Cd-BP'lerin varlığı kanıtlanmıştır. Buna göre, (γ-Glu-Cys)_n-Gly, n=2-6, yapısındaki fitokelatinlerin (PC₂, PC₃, PC₄, PC₅, PC₆) bu bitkide bulunduğu ve aktif olarak Cd bağladığını düşünmekteyiz. Heterojen yapıda saptadığımız PC'lerin detaylı moleküler özelliklerini belirleyebilmek için ise daha başka analizlere gereksinim olduğunu belirtmek isteriz.

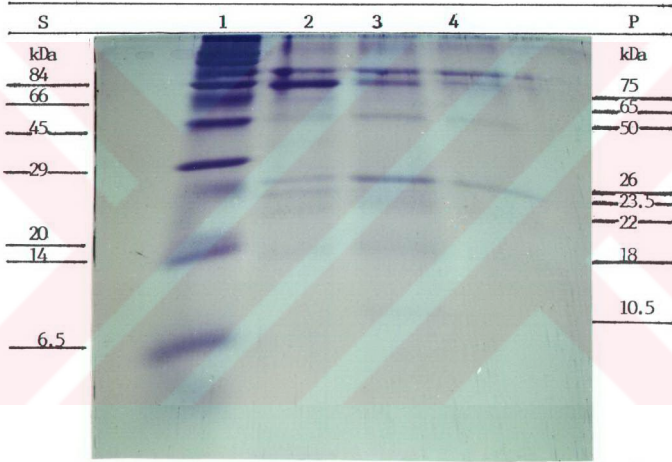
III. 2.1.C. Denatüre poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ile moleküler ağırlığı belirlenen fitokelatinler

Saflaştırılan fraksiyonlardaki PC'lerin molekül ağırlıkları ise SDS-PAGE ile saptanmaya çalışılmıştır. Bulgulara göre, iki farklı standard kullanılarak yürütülen jellerde, Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyanan protein bantları birbirine yakın 5 farklı LMW yapı olduğunu göstermektedir. Cd-PC olarak belirlenen bu proteinlerin, HMW Cd-BP'lerden daha az miktarda bulunma olasılığı ve küçük moleküler yapıya sahip olmaları silik bantlar meydana gitirmelerine neden olmuştur. (Şekil 29, 30). Buna göre Şekil 28'de, 1,2,3,4,5,6, numara ile belirtilen şeritlerde sırasıyla MW-SDS- 17S kit, 10 no., 32 no., 30 no., ve 28 no.'lu fraksiyon, ve yine MW-SDS- 175 kit bulunmaktadır. Şekil 29'da ise 1,2,3,4, olarak numaralandırılan şeritlerde sırasıyla M-4038 kit, 28 no., 30. no., 34 no'lu fraksiyonlar belirtilmiştir. Otoradyografide uygulanmayan 28 numaralı fraksiyon ise içerdği yüksek protein miktarı nedeniyle SDS poliakrilamid jel elektroforezde yürütülmüş ve HMW protein içeren koyu ve kalın bir bant elde edilmiştir.



Şekil 29. (1,6): MW-SDS-17S kit; (2): 10 no. (3): 32 no., (4): 30 no., (5): 28 no'lu fraksiyonlardaki proteinlerin SDS-PAGE'de bantlar halinde boyanmış görüntüleri. S.standard, P: protein, kDa: moleküler ağırlık.

Yapılan Rf ölçümlerine göre 10.5, 18.0, 22.0, 23.5 ve 26.0 kDa molekül ağırlığında ve heterojen yapıda olan LMW fitokelatinleri ve aynı zamanda >50 kDa molekül ağırlığındaki (50, 65, 75 kDa) HMW diğer Cd-bağlayan proteinleri belirlemiş olduk.



Şekil 30. (1): M-4038 kit; (2): 28 no., (3): 30 no, (4): 34 no'lu fraksiyonlardaki proteinlerin SDS-PAGE'de bantlar halinde boyanmış görüntümleri. S. Standard, P: protein, kDa : moleküler ağırlık .

III. 2.1.D. Kromatografik olarak saflaştırılan ve Cd içeren fraksiyonlarda total protein miktarı

Fraksiyonlarda Bio-Rad yöntemine göre kantitatif olarak ölçülen protein miktarları Tablo 10'da gösterilmiştir. QAE-Sephadex A-25 ve Sephadex G-75 ile saflaştırılan fraksiyonlardaki Cd miktarına göre elde ettiğimiz değerlerde önce HMW proteinlerin kolondan ayrıldığını belirtmiştik. Verilere göre en üst değeri veren Cd miktarını içermemekle birlikte "shoulder" meydana getiren ve belli bir Cd konsantrasyonuna sahip olan fraksiyonların diğerlerine göre daha fazla protein içerdiğini saptadık.

Tablo 10. Kromatografik tekniklerle saflaştırılan fraksiyonlarda saptanan protein miktarı ($\mu\text{g/ml}$).

Fraksiyon No:	Total Protein Miktarı ($\mu\text{g/ml}$)
28	357.82
29	312.93
30	201.36
31	100.68
32	61.22
34	QAE-Sephadex 54.42
35	A-25 61.22
36	65.30
37	59.86
38	53.06
39	28.57
9	27.21
10	25.85
11	Sephadex 24.48
12	G-75 23.13

30 numaralı fraksiyonda 201.36 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenen protein miktarına hem HMW proteinler ve hem de PC_2 miktarı girmektedir. 31 ve 32 no'da ise, 100.68 ve 61.22 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptanan protein miktarında sadece

HMW proteinler bulunmaktadır. 34 no'da, 61.22 $\mu\text{g/ml}$ ile gerek HMW Cd-BP'ler ve gerekse PC₃ ve PC₄'lerin total protein miktarı belirlenmiştir. 10 no'da ise PC₅ ve PC₆ ile elektroforez sırasında sürüklenen diğer HMW proteinlerin miktarı saptanmıştır. Kantitatif olarak yalnızca LMW PC'lerin miktarını saptamak ise bu tekniklerle mümkün değildir ve daha başka analizlere gerek vardır.

III.2.2. Kum kültürlerinde yetiştirilen *A.altissima*'da fitokelatin oluşumu

1 hafta süreyle 200 μM Cd uygulanarak kum kültürlerinde yetiştirilen bitkilerin köklerinden hergün düzenli olarak yapılan ekstraksiyonlarla elde edilen ham ekstrenin $^{109}\text{Cd}^{2+}$ ile birlikte % 40 poliakrilamid jele uygulanması ve otoradyogramlarının çıkarılması esasına dayanan deneyde, III. 2.1.'e göre farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Cd uygulamasının 1,2,3,4,5 ve 6. günlerinde herhangi bir Cd-bağlanma reaksiyonunun gerçekleşmediği ve bu nedenle otoradyografi filminde sinyaller meydana gelmediğini saptadık. 7. günde ise HMW Cd-BP'lerin Cd bağlamaya başladığını ancak son derece zayıf sinyaller oluştuğunu kaydettik (veriler fotoğraflanamadı). Sadece $^{109}\text{Cd}^{2+}$ 'un bulunduğu kontrol örneği ise yine herhangi bir sinyal vermemiştir.

Bulgulara göre, PC'lerin sentezlenmesi ve Cd-bağlaması, ayrıca olası diğer HMW Cd-BP'lerin de aktif hale geçebilmesi için belli bir süre gerektiği; bu sürenin de kum kültürlerinde en az 1 hafta olabileceği belirlenmiştir. Kum kültürlerinde bitki tarafından alınan Cd'un su kültürlerine göre çok daha az miktarda olduğunu gözönüne alırsak, hücrede yeterince Cd bulunmadığını ve bu nedenle Cd-bağlayan peptidlerden oluşan tolerans mekanizmasını harekete geçirmediğini düşünmekteyiz.

IV. TARTIŞMA VE SONUÇ

Endüstrileşme ve kentleşmenin doğada meydana getirdiği en önemli sorun "çevre kirlenmesi"dir. Antropojenik kökenli aktivitelerle diğer kirleticilerin yanında ağır metaller de ortama verilmekte ve bunların toksik etkilerinde ekosistemler zarar göstermektedir. Bazı ağır metaller (Fe, Zn, Mn, Cu, Co) bitki metabolizmasında gerekli olan mikroelementler olduğu halde, bazılarının (Cd, Al, Pb, Hg, Cr) bitki metabolizmasında yer almadığı ve düşük konsantrasyonlarda bile toksik etki gösterdiği belirlenmiştir (BAKER & WALKER, 1990). Fitotoksitesitesi en yüksek ağır metallerden olan Cd'un toksik etkileri, yetiştirme ortamındaki farklı Cd konsantrasyonları ve bitkilerin özelliklerine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Bununla ilgili olarak bitkilerdeki Cd-tolerans sınırları ve olası tolerans mekanizmaları da farklı boyutlarda gelişmektedir. Bu araştırmanın 1. bölümünde farklı Cd konsantrasyonlarında yetiştirilen değişik bitki türlerinde (*A.altissima*, *P.abies*, *L.esculentum*, *Z.mays*, *V.radiata*) kadmiyumun uygulama süresine ve konsantrasyonuna bağlı olarak organlarda oluşturduğu toksik etkiler, Cd birikimi ve bitkinin Cd- toleransı incelenmiştir.

Araştırmamızın 2. bölümünde ise, yukarıda belirtilen çalışmamızdaki bulgular da gözönüne alınarak kentsel ve endüstriyel kirlenmenin yoğun olduğu bölgelerde yetiştirilmesiyle dikkat çeken (BAYÇU, 1992; WITTIG, 1993) *A.altissima* bitkisinde Cd-tolerans mekanizmasında rol oynadığı ileri sürülen fitokelatinlerin oluşumu araştırılmıştır.

IV.1. Cd'un toksik etkileri, Cd birikimi ve Cd toleransı

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre deney bitkilerimizin türüne, yetiştirme ortamındaki Cd konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlı olarak bitki yapraklarında kahverengi benek oluşumu, kıvrılma, kloroz ve damarlar arası kloroz ile nekroz belirtileri saptanmıştır. Kadmiyumun genel olarak hem otsu hem de odunlu bitkilerde kloroza neden olduğu öne sürülmüştür (BERGMANN, 1983).

Bazı araştırmalara göre, 1-100 ppm Cd uygulanan *Quercus palustris* (RUSSO & BRENNAN, 1979), 5-20 ppm Cd'da yetiştirilen *Acer saccharinum* (SMITH & BRENNAN, 1974), yine Cd uygulanan *Acer rubrum*, *Picea abies*, *Pinus strobus* (MITCHELL & FRETZ, 1977) ve *Fagus Sylvatica* (HAGEMEYER ve diğ., 1986) türlerinin yapraklarında kloroz, kıvrılma, nekroz gibi benzer belirtiler kaydedilmiştir. HAGEMEYER ve diğ., (1986) ayrıca yapraklarda kahverengi beneklerin oluştuğunu bildirmiştir. 50, 100 ve 200 μ M Cd uygulanan *Zea mays* bitkisinin (NUSSBAUM ve diğ., 1988), 2 ve 2.5 mM Cd'da ise *Phaseolus vulgaris*'in (LEİTA ve diğ., 1991) yaprak dokularında kloroz ve nekroz oluşumuna rastlanmıştır. Aynı yöndeki semptomlar, 0.05 ve 0.30 ppm Cd uygulaması ile *Glycine max*'da (SMITH ve diğ., 1985); 0.5-50 μ M Cd'da ise *Beta vulgaris*'te (GREGER & ÖGREN, 1988) saptanmıştır.

Araştırmamızda elde ettiğimiz bulgular diğer araştırmacıların bulgularıyla kısmen benzerlik göstermektedir.

Cd'un toksik etkisiyle bitkilerde oluşan kloroz, solma ve nekroz gibi belirtilerin, Cd'un kofaktör olarak demire gereksinim duyan enzim sistemlerini olumsuz yönde etkilemesi (MALONE ve diğ. 1977; GREGER & LINDBERG, 1987); Mg ve Fe taşınmasını engelleyerek fotosentezle ilgili metabolik işlemlere zarar vermesi (GREGER & LINDBERG, 1987; GREGER & ÖGREN, 1991), bitkideki su metabolizmasını bozması (BARCELÓ ve diğ., 1986) nedeniyle meydana geldiği düşünülmektedir.

Cd'un yapraklardaki toksik etkilerinin yanısıra, *Picea abies* dışında bütün deney bitkilerimizin köklerinde sarımsı bir renk izlenmiştir. *P.abies*'de ise farklı olarak ilk günlerden itibaren önce kök uçlarının daha sonra tüm kökün kahverengine dönüştüğü, Cd uygulama süresi arttıkça özellikle 200 ve 500 μ M'deki köklerin siyahlaştığı izlenmiştir.

Genelde, kök sisteminin zayıf bir görünüm alması (BAKER & WALKER, 1990) hücre bölünmesinin engellendiğini düşündürmektedir. (VÁZQUEZ ve diğ., 1992), köklerin renklerinin koyulaşması ya da kahverengileşmesi (HAGEMEYER ve diğ., 1986, HAGEMEYER & WAISEL, 1989) ise Cd'un etkisiyle fenolik maddelerin biriktiği (BERTELS, 1989) veya su alımını engelleyen süberizasyon meydana geldiği (FOY ve diğ., 1978) sonucuna bağlanmaktadır.

Bitkilerin büyüme parametreleriyle ilgili bulgularımıza ve diğer bazı araştırmacılara göre gerek ağaç türlerinde gerekse kültür bitkilerinde, yetiştirme ortamındaki Cd konsantrasyonu ve uygulama süresi arttıkça kök ve gövde uzunlukları ile köklerin taze ve kuru ağırlığında bir indirgenme meydana gelmiştir (KELLY ve diğ., 1979; BURTON ve diğ., 1986; CATALDO ve diğ., 1987; GODBOLD ve diğ., 1987, GREGER & LINDBERG, 1987; GREGER ve diğ., 1988; RÜEGSEGER ve diğ., 1990; BRECKLE, 1991; BAYÇU, 1992; MEUWLY & RAUSER, 1992).

CLARKE ve BRENNAN (1980), 30 gün süreyle 1 ppm Cd uygulanan-*Populus tremuloides* bitkisinin gövde uzunluğunda kontrole göre artış gösterdiğini kaydetmişlerdir. Aynı sonuç, *Fagus sylvatica*'da Kahle (1988) tarafından kanıtlanmıştır. *L. esculentum* bitkisiyle yaptığımız araştırmada da, 10 μ M Cd uygulanan bitkilerin gövde uzunluklarında kontrole göre % 7.5'luk bir artış saptamıştık. Bu bulgumuz yukarıdaki araştırmacıların bulgularıyla benzerlik göstermektedir. Ancak, düşük konsantrasyonlardaki kadmiyumun gövde büyümesini teşvik edici etkisinin nedenlerine bir yorum getirelememiştir (KAHLE, 1988).

Araştırma bitkilerimizde Cd birikimi köklerde ölçülmüştür. Daha önceki çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre en fazla Cd köklerde, sırasıyla gövde ve yapraklarda birikmektedir. (HAGEMEYER ve diğ., 1986; KAHLE & BRECKLE, 1986; KAZIMIR & BRENNAN, 1986; BAYÇU, 1992).

Ağaç türlerinde elde ettiğimiz bulgulara göre, 27 gün süre ile 10, 30, 50, 100, 200, 500 μ M Cd uygulaması sonucu *A. altissima* köklerindeki birikim 1 gram kuru madde esasına göre sırasıyla 1025, 3050, 4900, 9357, 12167 ve 16250 μ g'dır. *P.abies*'te bu değerler sırasıyla 222, 688, 1556, 4550, 10357 ve 15000 μ g'a karşılık gelmektedir.

Yukarıdaki değerlerden de anlaşıldığı gibi yetiştirme ortamındaki Cd konsantrasyonu arttıkça köklerdeki Cd birikimi de artmıştır. Bununla beraber, ortamdaki Cd konsantrasyonunun artışı ile Cd alımının düşmesi de iyon transfer faktörünün etkilendiğini göstermektedir (STRICKLAND ve diğ., 1979; KAHLE, 1988; BAYÇU, 1992). Kahle (1993)'nin *Acer rubrum*, *Pinus strobus* ve *Picea abies* ile yaptığı araştırmalara göre 16 mg/l Cd çözeltisinde

yetiştirilen bitkilerden *Acer* köklerinde 677.2, *Pinus*'da 815.8 ve *Picea*'da 697.8 ppm Cd birikmiştir. Bu bitkilerin köklerinin bodurlaştığı, yeni köklerin ve kök tüylerinin gelişmediği, su alımının indirgendiği, hücre membranlarının zarar gördüğü ve hücre bölünmesi ile hücre büyümesinin olumsuz etkilendiği ileri sürülmektedir. Ayrıca, Cd etkisiyle besin elementlerinin alımının da inhibe olduğu bildirilmiştir (KAHLE, 1993).

Kültür bitkilerinden *L. esculentum*, *Z.mays*, ve *V.radiata* ile yaptığımız deneylerden elde ettiğimiz bulgulara göre ortamda Cd konsantrasyonu arttıkça köklerdeki Cd birikimi de artmaktadır. *L.esculentum* ve *V.radiata*'da Cd alımına göre ölçülen transfer faktörü, yani bitki köklerindeki Cd iyonu miktarının yetiştirme ortamındaki Cd iyonu miktarına oranı, diğer bitkilerde de saptamış olduğumuz gibi düşmüştür. Ancak bu oran, *Z.mays* bitkisinde 30 μ M Cd'dan sonra artarak ilginç bir sonuç ortaya çıkarmıştır. Bu konsantrasyondan sonra köklerin aşırı derecede zarar görmesi, pasif bir iyon alımının olabileceğini düşündürmektedir (LEPP, 1981; CATALDO ve diğ., 1983; CLARKSON & LÜTTGE, 1989; HAGEMEYER & WAISEL, 1989). *Zea mays*'ın köklerinde biriken Cd miktarı 500 μ M'da 62679 μ g/g KA'dır. bu miktar, *L.esculentum*'da 20972, *V.radiata*'da ise 26250 μ g/gKA olarak ölçülmüştür. *Z.mays* bitkisinde köklerin kuru madde miktarında kontrole göre 10 μ M'da % 46; 30 μ M'da % 52, 50 μ M'da % 93 ve 500 μ M'da ise % 98'lik bir indirgenme saptanmıştır. Bu değerler, *L. esculentum*'da 10 ve 500 μ M'de % 8.4 ve % 84.1'e, *V.radiata*'da ise % 48.6 ve % 88.4'e karşılık gelmektedir. Bazı araştırmacılarda benzer sonuçlara ulaşmışlardır (NUSSBAUM ve diğ., 1988; RAUSER ve diğ., 1991).

Bulgularımıza göre incelediğimiz kültür bitkileri arasında kadmiyuma karşı en toleranslı olan *L.esculentum*'dur, bu bitki için tolerans sınırı 50 μ M Cd olarak belirlenmiştir (REESE ve diğ. 1992). *Z. mays* ve *V.radiata*'daki Cd tolerans sınırları ise sırasıyla 30 μ M ve 10 μ M olarak saptanmıştır. Odunlu bitkilerden *A. altissima* için tolerans sınırının 200 μ M Cd, *P.abies* için ise 100 μ M Cd olduğu gözlenmiştir (bkz. bulgular, şekil: 7,8,11,12,15,18,19 ve 22). *A.altissima* bitkisinin, toksik semptomlar göstermesine rağmen en yüksek Cd konsantrasyonlarında bile (200 ve 500 μ M) hayatta kalmayı başarması, Cd'a karşı toleranslı bir bitki olarak kabul edilebileceğini göstermektedir.

IV.2. Fitokelatin oluşumu

Stresin canlı organizma için uygun olmayan herhangi bir çevre faktörü olduğunu (LEVITT, 1972), ve bir bitkinin stres faktörünün zararlı etkilerine karşı koyabilme kapasitesine "direnç" adı verildiğini, bunun ise "stresten kaçınma" veya "strese karşı tolerans gösterme" olarak ikiye ayrıldığını belirtmiştik (LEVITT, 1980). Tolerans mekanizmalarının, hücrede metal-bağlayan bileşiklerin (fitokelatin) oluşumu, metallerin vakuol ve hücre çeperi gibi belli bölmelerde birikimi, enzim sentezinin artması, hücre metabolizmasında oluşan değişiklikler ve kökten gövdeye iletimde meydana gelen sınırlanmalar ile ilgili olduğu öne sürülmektedir (BAKER, 1978; GRILL ve diğ. 1985; ROBINSON & JACKSON, 1986; RAUSER & ACKERLY, 1987; VERKLEIJ ve diğ., 1990; VERKLEIJ ve SCHAT, 1990; ERNST ve diğ. 1992). Son yıllarda Cd toleransı ile ilgili olarak, özellikle Cd'un fitokelatin ile kelat oluşturma mekanizmasını esas alan araştırmalar sürdürülmektedir (GRILL ve diğ., 1985; RAUSER ve diğ., 1991; De KNECHT ve diğ., 1992).

Ağırmetaller, bitki hücrelerinde PC olarak adlandırılan (γ -Glu-Cys)_n Gly, n=2-11 yapısındaki SH içeren polipeptid sentezini stimüle ederler (GEKELER ve diğ., 1989). Glutathiondan sentezlenen bu polipeptidler ağırmetal detoksifikasyonu ve homeostasis olayında yer alan sekonder metabolitlerdir (GRILL ve diğ., 1989; STEFFENS, 1990). Bitki hücrelerinin sitoplazmasında oluşan bu bileşiklerin daha sonra vakuole taşındığı ve böylece toksik etkileri azalttığı belirtilmiştir. (VÖGELI-LANGE & WAGNER, 1990; DE KNECHT ve diğ., 1994) UV, sıcak-soğuk şoku ve diğer stres kaynaklarının PC oluşumunu stimüle etmediği, bu yapının sentezinde yer alan PC-sentazın sadece ağırmetal varlığı ve özellikle de Cd ile stimüle edilerek PC meydana getirdiği ve tolerans mekanizmasında rol oynadığı saptanmıştır. (GRILL ve diğ., 1987; STEFFENS, 1990; ABRAHAMSON ve diğ., 1992).

Araştırmamızda kullandığımız *A. altissima*, Asya kökenli termofilik bir neofittir. Özelliği, şehir kirliliğinin yüksek olduğu bölgelerde, demiryolu ve otoyol kenarlarında, endüstri bölgelerinin çevresinde yetişebilmesidir. Çin'de hava kirliliğine karşı dayanıklılığı nedeniyle yetiştirilmiştir (POLUNIN & EVERARD, 1976); Avrupa ve A.B.D'de ise kirli bölgelerde dağılım gösteren iyi bir ağır metal biomonitörü olduğu (WITTIG, 1993) ve Cd'a karşı toleransı nedeniyle çevre kirliliğinde bir filtre rolü oynayabileceği (BAYÇU

& ÖNAL, 1992) literatürde belirtilmiştir.

Bununla beraber, yapılan literatür taramasında, *A.altissima*'da Cd toksisitesi, Cd toleransı ve PC oluşumu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlamadık. Gerek daha önceki çalışmamız (BAYÇU, 1992) ve gerekse bu araştırmanın 1. bölümünde yer alan Cd toksisitesi ve Cd toleransı ile ilgili bulgularımıza dayanarak Cd-tolerans mekanizmasında rol oynayan fitokelatinleri bu bitkide saptamak ve konuyu aydınlatmak istedik.

Araştırmamızın bu bölümünde *A.altissima*'da PC oluşumunu saptayabilmek için letal dozun altındaki değer olarak belirlediğimiz 200 μ M Cd konsantrasyonunu kullandık. Bu amaçla, *A.altissima* fideleri Ingstad (değiştirilmiş) besi çözeltisi ile 19 hafta su kültürlerinde ve 16 hafta da kum kültürlerinde yetiştirilmiş, ve 1 hafta süreyle 200 μ M Cd uygulanmıştır. Su kültürlerinde yetiştirilen bitkilerden elde edilen ham ekstre, QAE-Sephadex A-25 ve Sephadex G-75 ile kromatografik saflaşmaya tabi tutulmuş (RAUSER, 1991) ve fraksiyonlarda Cd miktarı ölçülmüştür. QAE- Sephadex A-25 anyon-değişim kromatografisi ile saflaştırılan fraksiyonlarda total Cd miktarının % 65.3'ünün, 0.54, 1.00 ve 1.50 M KCl gradienti uygulanan 28 ile 36 numaralı fraksiyonlar arasında belirlendiği ve en yüksek Cd değerinin 119.18 μ g/ml ile 33 numarada bulunduğu saptanmıştır. (bkz. bulgular, şekil 25). 33 numaralı fraksiyonun sarımsı-gri pembe renkte, bu fraksiyonun etrafındaki fraksiyonların ise koyu sarı renkte olduğu gözlenmiştir.

Benzer bir sonuç RAUSER (1991) tarafından elde edilmiştir. Araştırmacı, aynı yöntemle ayırma tabi tuttuğu fraksiyonlar içinde en fazla Cd içerenin morumsu bir renkte olduğunu bildirmiş ve Cd-bağlayan proteinlerin bu fraksiyonda olabileceğini öne sürmüştür.

Çalışmamızda en yüksek Cd miktarını içeren 33 no'lu fraksiyonda Cd-bağlayan proteinler (PC) olduğu düşünülerek bu fraksiyon Sephadex G-75 ile tekrar saflaştırılmıştır. Bu ayırım ile de total Cd'un % 85'i 9 ile 12 numaralı fraksiyonlar arasında elde edilmiştir. Diğer fraksiyonlarda belirlenen Cd'un ise serbest Cd iyonları veya merkaptobileşiklere bağlı olan Cd olduğu tahmin edilmektedir (RAUSER, 1991).

Cd-BP'lerin saflaştırılması ile ilgili olarak yapılan araştırmalarda genelde benzer teknikler kullanılmış (QAE-Sephadex A-25, DEAE-Toyopearl DE-52, FPLC-Mono Q anyon değişim kromatografisi, Sephadex G-50, Sephadex G-75, Superose 12 jel filtrasyon, HPLC) ve 1 veya 2 "peak" halinde gözlenen en yüksek Cd miktarına sahip Cd-BP (PC) içeren fraksiyonlar belirlenmiştir (GRILL ve diğ. 1985; GRILL ve diğ., 1987, 1989; GUPTA & GOLDSBROUGH; 1991; HAYASHI ve diğ., 1991; RAUSER, 1991; PLOCKE & KÄGI 1992; ABRAHAMSON ve diğ., 1992; DE KNECHT ve diğ., 1994).

Elde ettiğimiz verilere göre düşük moleküler ağırlıklı (LMW) Cd-bağlayan peptidler ya da fitokelatin içeren fraksiyonların en yüksek Cd değerini verdiği, bunun yanı sıra Cd içeren diğer fraksiyonlarda yüksek moleküler ağırlıklı (HMW) Cd-bağlayan proteinlerin de bulunduğu saptanmıştır. (ROGNES ile kişisel söyleşi, 1993) Bu HMW Cd-BP'ler daha az Cd içermekte ve LMW Cd-PC (fitokelatin)'lerden daha önce kolondan ayrılmaktadır. HMW Cd-bağlayan proteinlerin içerdikleri Cd miktarı nedeniyle LMW yapılardan önce bir "shoulder" oluşturduğu gözlenmiştir (Bak. bulgular, Şekil 25,26) (LEITA ve diğ., 1991; MUTOH ve HAYASHI, 1991; PLOCKE & KÄGI, 1992).

Saflaştırılan fraksiyonlardaki Cd-bağlayan proteinleri ayırabilmek ve PC olduğunu belirleyebilmek amacıyla $^{109}\text{Cd}^{2+}$ 'un Cd-BP bileşiklerindeki Cd ile yer değiştirerek bağlanması esasına dayanan % 40'lık poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) yöntemini uyguladık (ABRAHAMSON, 1992).

Sonuçlarımıza göre fraksiyonlarda hem LMW ve hem de HMW Cd-bağlayan proteinler bulunmaktadır. $^{109}\text{Cd}^{2+}$ ile bileşik oluşturarak çok kuvvetli radyoaktif sinyal veren ve jelde çok hızlı ilerlemiş olan yapının fraksiyonlardaki en küçük PC olduğunu, bu PC'nin yanı sıra yine kuvvetli sayılabilecek sinyaller veren ve biraz daha yavaş ilerlemiş 4 ayrı PC bulunduğunu saptadık. Cd-PC'ler dışında ise gerek aynı gerekse farklı fraksiyonlarda $^{109}\text{Cd}^{2+}$ 'a bağlanmış ancak yüksek moleküler ağırlığa sahip oldukları için jelde ilerleyememiş Cd-BP'ler olduğunu kaydettik. Veriler Cd ile birleşik oluşturan ve n=2-6 olarak tanımlayabileceğimiz heterojen yapıdaki 5 farklı düşük moleküler ağırlıklı Cd-PC olduğunu, ayrıca yüksek moleküler ağırlıklı Cd-BP'lerin bulunduğunu göstermektedir (ABRAHAMSON ve diğ.,

1992; ÅAS ile kişisel söyleşi, 1993; ROGNES ile kişisel söyleşi, 1993).

LEITA ve diğ., (1991), saflaştırdığı *P.vulgaris* ekstralarında tek tip LMW Cd -BP (fitokelatin) belirlemiş, bu yapıların total Cd'un % 17'si ile % 43'ünü bağladığını kaydetmişlerdir. Ayrıca, yalnızca köklerde belirledikleri ve Cd'un % 27.2'sini bağlayan HMW Cd-BP'lerin de olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, köklerde LMW PC'lerden başka HMW özel proteinlerin de sentezlendiğini saptamış köklerin yüksek miktarda Cd tutma kapasitesinin HMW proteinler nedeniyle olabileceğini öne sürmüşlerdir.

PLOCKE & KÄGI (1992), *S. pombe*'de 3 farklı LMW fitokelatin olduğunu, ancak HMW yapıların da bulunduğunu bildirmişlerdir.

ABRAHAMSON ve diğ., (1992), $^{109}\text{Cd}^{2+}$ ile yürüttükleri PAGE yönteminde 2 farklı PC saptamışlar, bu Cd-PC'lerin heterojen yapıda olduğunu belirlemişler ve LMW olanların çok hızlı ilerlediğini kaydetmişlerdir. $^{109}\text{Cd}^{2+}$ ile bağlanmayan yapıların otoradyogramda sinyal vermediğini belirtmiş ve ayrıca sadece $^{109}\text{Cd}^{2+}$ 'un radyoaktif sinyal oluşturmadığını saptamışlardır. Cd izotopu ile zayıf bileşik oluşturanlar ise güçsüz sinyaller meydana getirmiştir.

Bizim çalışmamızda da bazı PC'lerin daha güçlü bileşik oluşturduğunu gördük. Bu sonuç yukarıdaki nedene bağlanabileceği gibi PC'nin miktarına, zincir uzunluğu ve Cd-bağlama kapasitesi ile de ilgili olabilir. KNEER ve diğ. (1992), ortamda Cd bulunmadığında PC oluşmadığını belirlemişlerdir. RAUSER (1990), uzun zincirli PC'lerin daha fazla Cd tutabildiğini bildirmiştir. Fraksiyonlardaki Cd miktarı gözönüne alındığında büyük moleküllü PC'lerin bulunduğu fraksiyonlarda daha fazla Cd olduğu saptanmıştır. Bununla beraber elektroforezde küçük moleküllü PC, Cd ile daha güçlü bileşik oluşturmuştur. Araştırmacıların bulguları bizim bulgularımızla uyum içindedir.

Molekül ağırlığını saptamak için yürüttüğümüz SDS-PAGE ile elde edilen verilerde, Coomassie Brilliant Blue R-250 ile koyu boyanan HMW Cd-bağlayan proteinler (>50 kDa) ve heterojen yapıda 10.5 ile 26 kDa arasında molekül ağırlığına sahip 5 farklı fitokelatin belirlenmiştir.

Benzer bir çalışma yürüten LEITA ve diğ. (1991), *P. vulgaris* köklerinde 9.2 kDa molekül ağırlığında fitokelatin olduğunu kaydetmişler ve

koyu bir bant oluşturarak boyanan 42 kDa ağırlığa sahip HMW Cd-BP saptamışlardır. RAUSER (1984), vasküler bitkilerde 10-33 kDa ağırlığında Cd-BP'ler bulunduğunu, DE KNECHT ve diğ., (1994) ise *Silene vulgaris*'te 14.5 kDa'luk Cd-PC belirlediklerini kaydetmişlerdir. GRILL ve diğ. (1985), Cd uygulama süresi, Cd konsantrasyonu ve farklı bitki türlerinin değişik yapıdaki PC oluşumuna neden olabileceğini ileri sürmüştür. Verilerimiz bu araştırmacıların bulgularıyla paralellik göstermektedir.

En yüksek Cd içeren saflaştırılmış fraksiyonlarda hem HMW Cd-BP ve hem de LMW Cd-PC'ler içeren total protein miktarları saptanmış (RÜEGSEGGGER ve diğ., 1990) ancak sadece PC'lerin miktarını ölçmek için daha başka tekniklere gereksinim duyulduğu bildirilmiştir. (ABRAHAMSON, 1992).

Kum kültürlerinde aynı düzeyde Cd uygulayarak yetiştirdiğimiz bitkilerden elde edilen ekstraler $^{109}\text{Cd}^{2+}$ ile % 40 PAGE'e uygulandığında benzer sinyalleri vermemiş olması, 7 günlük Cd uygulaması süresi içinde bitki köklerinin yeterli Cd alamadığını ve bu nedenle fitokelatin oluşumunun gerçekleşmediğini düşündürmektedir. Bu verilerimiz literatürdeki bazı araştırmalarla uyum içindedir. (RAUSER, 1991; ROGNES ile kişisel söyleşi, 1993).

Sonuç olarak, *A.altissima* köklerinin, LMW fitokelatin ve HMW Cd-bağlayan proteinler içerdiğini belirlemiş olduk.

Fitokelatinlerin Cd-bağlama kapasitesi ile hücrelerde Cd'la kelat oluşturduğu ve büyük olasılıkla Cd'u vakuole taşıyarak toksik etkilerini azalttığı öne sürülmüş ancak, Cd-detoksifikasyonu ve homeostasisinin yalnızca PC miktarı ile değil, PC'nin Cd ile bileşik oluşturmasına da bağlı olduğu belirtilmiştir (VÖGELI-LANGE & WAGNER, 1990; DE KNECHT ve diğ.. 1994).

İncelenen yayınlarda *A.altissima* bitkisinde Cd-toleransı ve fitokelatin oluşumu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Gelecek yıllarda bu konunun diğer yönlerini açıklığa kavuşturmayı amaçlıyoruz. Ülkemizde geniş bir yayılım alanı gösteren bu bitkinin çevre kirliliğinin giderilmesinde etkin bir rol oynayabileceği kanısındayız.

V. ÖZET

Ailanthus altissima'da kadmiyum toleransı ve fitokelatin oluşumu

Bu çalışmada bitkilerde Cd toksisitesi, Cd birikimi ve Cd toleransı incelenmiş ve Cd toleransında rol oynayan fitokelatinlerin oluşumu saptanmıştır.

Araştırmamızın ilk bölümünde 5 farklı bitki türünde (*A.altissima*, *P.abies*, *L.esculentum*, *Z.mays*, *V.radiata*) Cd toksisitesi, Cd birikimi ve Cd toleransı belirlenmiştir.

Su kültürlerindeki fidelere, 27 gün süreyle, değiştirilmiş Ingestad besi çözeltisi içinde 6 farklı Cd konsantrasyonu (10, 30, 50, 100, 200, 500 μ M) uygulandı. Deney süresince, düzenli aralıklarla kök ve gövde uzunlukları ölçüldü, bitkilerin genel durumu ve görünümleri kaydedildi. Deney sonunda bitkiler hasat edildi, köklerin taze ve kuru ağırlıkları alındı ve kök örneklerindeki Cd miktarı AAS ile saptandı. Uygulanan Cd konsantrasyonu arttıkça kök ve gövde uzunlukları, aynı zamanda taze ve kuru ağırlıklar indirgendi, ancak köklerdeki Cd miktarında artış oldu. Yukarıdaki verilerle bitkilerin Cd toleransı belirlendi. Sonuçlara göre, *A.altissima*, *P.abies*, *Z.mays*, *L.esculentum*, *V.radiata* için tolerans sınırları sırasıyla 200, 100, 50, 30 ve 10 μ M olarak saptandı.

Araştırmanın ikinci bölümünde *A.altissima* bitkisinde fitokelatin (PC) oluşumu incelendi. Su kültürlerindeki bitkilere 1 hafta süreyle letal dozunda Cd (200 μ M) uygulandı ve bitki kökleri ekstre edildi. Ekstredeki Cd-bağlayan proteinler kromatografik yöntemlerle saflaştırıldı (QAE-Sephadex A-25, Sephadex G-75) ve elde edilen fraksiyonlardaki Cd miktarı alevli AAS ile ölçüldü. Cd'un gerek küçük polipeptidlere ve gerekse büyük proteinlere bağlandığı belirlendi. Bu fraksiyonlar, $^{109}\text{Cd}^{2+}$ bağlanma esasına dayanan, nativ poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) ve otoradyografi yöntemleriyle analiz edildi.

Otoradyografik incelemelerde, gerek düşük gerekse yüksek moleküler ağırlıklı proteinlerin $^{109}\text{Cd}^{2+}$ ile bileşik oluşturduğu saptandı. Verilere göre, düşük moleküler ağırlıklı bu bileşiklerin $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, $n=2-6$, yapısındaki fitokelatinler olduğu düşünülmektedir.

Saptanan fitokelatinlerin ve diğer Cd-bağlayan proteinlerin(Cd-BP) moleküler ağırlıklarını bulabilmek amacıyla SDS-PAGE uygulandı. PC değerleri 10.5-26 kDa arasında değişim gösterdi ve Cd-BP'ler > 50 kDa olarak belirlendi. Cd içeren saflaştırılmış fraksiyonlardaki total protein miktarı da spektrofotometre ile ayrıca ölçüldü.

A.altissima ile benzer koşullar altında yürütülen bir diğer deney serisi de kum kültürlerinde yapıldı. Cd-bağlayan proteinlerin oluşumunda zamanın etkisini inceleyebilmek için Cd uygulanan fidelerin kökleri 1 hafta boyunca hergün ekstre edildi. Ancak, kum kültürlerinde Cd alımının yavaş olması nedeniyle otoradyografi filminde sadece çok zayıf sinyaller elde edilebildi.

Sonuç olarak *A.altissima*'da Cd-tolerans mekanizmasında rol oynayan fitokelatinleri saptamış olduk. Literatürde bu bitkiyle ilgili benzer nitelikte herhangi bir çalışmaya ise rastlamadık. Özellikle kentsel ve endüstriyel kirliliğin bulunduğu bölgelerde dağılımı dikkat çeken *A.altissima*'nın, araştırmamızda elde edilen veriler de gözönüne alındığında, çevre kirlenmesi ile ilgili sorunların çözümünde önemli yer tutacağı kanısındayız.

SUMMARY

Cadmium tolerance and phytochelatin production in *Ailanthus altissima*

In this investigation, Cd toxicity, Cd accumulation and Cd-tolerance in plants has been observed, and then phytochelatin production which plays role on Cd-tolerance been detected.

In the first part of the research, Cd toxicity, Cd accumulation Cd tolerance of 5 different plant species (*A.altissima*, *P.abies*, *L.esculentum* *Z.mays*, *V.radiata*) were monitored. Hydroponic cultures of the seedlings were exposed to 6 different Cd concentrations (10, 30, 50, 100, 200, 500 μ M) in a modified Ingestad solution for 27 days. Root lengths and shoot heights of plants were measured and general conditions and appearances were registered regularly during the experimental period. At the end of the experiment, fresh and dry weights of roots were surveyed and the Cd content of root samples determined using AAS. Root and shoot lengths, as well as fresh and dry weights were reduced, but Cd content of the roots increased with the increasing concentrations of Cd treatment.

By the using of above mentioned datas, Cd tolerance of plants were detected. According to these results, Cd-tolerance limits for *A.altissima*, *P.abies*, *L.esculentum*, *Z.mays*, *V. radiata* are found 200, 100, 50, 30, and 10 μ M, respectively.

As a second part of investigation, phytochelatin (PC) production in *A.altissima* plant was observed. Plants were treated with sublethal dose of Cd (200 μ M) in hydroponic cultures for a week and those plant roots were extracted. Cd-binding proteins in the extract was purified by chromatographic techniques (QAE-Sephadex A-25, Sephadex G-75) and the Cd content of the eluted fractions was determined using flame AAS. Cd was apparently bound to both smaller polypeptides and to larger proteins.

These fractions were analyzed with a $^{109}\text{Cd}^{2+}$ binding assay using non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and autoradiography. Due to the autoradiographic observations both low and high molecular weight proteins which make complex with $^{109}\text{Cd}^{2+}$ were detected. We estimated that the data indicated low molecular weight compounds, belongs to phytochelatins of the type $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, where $n=2-6$.

Then, SDS-PAGE were applied to detect the molecular weights of these phytochelatins and other Cd-binding proteins. PC values fluctuated between 10.5 - 26 kDa and Cd-BPs were found as > 50 kDa.

Total protein amounts of the Cd-containing purified fractions were also determined by using spectrophotometer.

Other serial of investigation carried out in sand culture with *A.altissima* plant and similar experimental conditions. The roots of the Cd-exposed Seedlings were extracted daily for a week to observe the time course of induction of these Cd-binding proteins. However, only very faint signals were obtained on the autoradiography film perhaps due to slow uptake of Cd in sand culture.

In conclusion, we found out the phytochelatins which play role on Cd-tolerance mechanisms of *A.altissima*. As we searched entire literature, none of similar investigations carried out with this plant haven't been sighted.

Especially urban and industrially polluted areas which *A.altissima* vast spread around, encourage and supports the ideas that it is likely going to be play a major role on solving environmental pollution problems.

VI. KAYNAKLAR

- ÅAS, S.T. (1993):** Jel elektroforez ve otoradyografi teknikleri üzerine kişisel söyleşi. University of Oslo, Department of Biology, Division of Botany.
- ABRAHAMSON, S.L. SPEISER, D.M. & OW, D.W. (1992):** A Gel Electrophoresis Assay for Phytochelatins. *Analytical Biochem.*, 200, 239-243.
- BAKER, A.J.M. (1978):** Ecophysiological Aspects of Zinc Tolerance in *Silene maritima* With. *New Phytol.*, 80, 635.
- BAKER, A.J.M. (1981):** Accumulators and Excluders-Strategies in the Response of Plants to Heavy Metals. *J. Plant Nutr.*, 3 (1-4), 643-654.
- BAKER, A.J.M. & WALKER, P.L. (1989):** Physiological Responses of Plants to Heavy Metals and the Quantification of Tolerance and Toxicity. *Bioavailability*, 1, 7-17.
- BAKER, A.J.M. & WALKER, P.L. (1990):** Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects* (A.J.Shaw ed.) pp.155-178. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- BARCELÓ, J., R POSCHENRIEDER, C. (1990).** Plant Water Relations as Affected by Heavy Metal Stress: A Review. *J. Plant. Nutr.* 13, 1-37.
- BARCELÓ, J., POSCHENRIEDER, C., ANDREU, E. & GUNSÉ, B. (1986):** Cadmium-Induced Decrease of Water Stress Resistance in Bush Plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv- Contender) I. Effects of Cd on Water Potential, Relative Water Content and Cell Wall Elasticity. *J. Plant Physiol.* 125, 17-25.

- BAYÇU, G. (1992): *Ailanthus altissima*'da Kadmiyum, Kurşun Birikimi ve Kadmiyumun Bitki Gelişmesine Etkisi Yüksek Lisans Tezi.
- BAYÇU, G. & ÖNAL, M. (1992): The Effects and the Accumulation of Cadmium in *Ailanthus altissima*. Abstract. *Physio. Planta.*, 85 (3), Part 2: A74. 8.FESPP Congress, Antwerpen, Belgium.
- BERTELS, C. (1989): Untersuchungen Zur Wirkung Von Cadmium auf die Wurzelentwicklung von Buchenkeimlingen (*Fagus sylvatica* L.). Ph.D. thesis, University of Bielefeld, Germany.
- BRADFORD, M.M. (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye-Binding. *Anal. Biochem.* 72, 228-234.
- BRECKLE, S.-W. (1991): Growth under stress: Heavy metals. In: *Plant roots: The hidden half* (Y.Waisel, A. Eshel and U. Kafkafi eds.), pp. 351-373. Marcel Dekker, New York.
- BURTON, K.W., MORGAN, E. & ROIG, A (1986) Interactive Effects of Cadmium, Copper and Nickel on the Growth of Sitka Spruce and Studies of Metal Uptake from Nutrient Solutions. *New Phytol.* 103, 549-557.
- CATALDO, D.A., GARLAND, T.R. & WILDUNG, R.E. (1981): Cadmium Distribution and Chemical Fate in Soybean Plants. *Plant Physiol.* 68, 835-839.
- CATALDO, D.A., GARLAND, T.R. & WILDUNG, R.E. (1983): Cadmium Uptake Kinetics in Intact Soybean Plants. *Plant Physiol.* 73, 844-848.
- CLARKSON, D.T. & LÜTTGE, U. (1989) III. Mineral Nutrition: Divalent Cations, Transport and Compartmentation. *Prog. Bot.* 51, 93-112.
- CLARKE, B. & BRENNAN, E. (1980): Evidence for a Cadmium and Ozone Interaction on *Populus tremuloides*. *J. Arboricult.* 6, 130-134.

- CUNNINGHAM, L.M., COLLINS, F.W. & HUTCHINSON, T.C. (1975): Physiological and Biochemical Aspects of Cadmium Toxicity in Soybean. I. Toxicity Symptoms and Autoradiographic Distribution of Cd in Roots, Stems and Leaves. Proc. Int. Conf. Heavy Metals in the Environment, Vol II Part I, pp 97-120. Toronto, Canada.
- DE KNECHT, J.A., KOEVOETS, P.L.M., VERKLEIJ, J.A.C. & ERNST, W.H.O. (1992): Evidence Against a Role for Phytochelatins in Naturally Selected Increased Cadmium Tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. New Phytol. 122, 681-688.
- DE KNECHT, J.A., BOOKUM, W.M., CORNELISSE, E., SCHAT, H. & VERKLEIJ, J.A.C. (1994): Uptake And Translocation of Cadmium in Cadmium-sensitive and Cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. Manuscript.
- DELHAIZE, E., JACKSON, P.J., LUJAN, L.D. & ROBINSON, N.J. (1989): Poly (γ -glutamylcysteinyl) glycine Synthesis in *Datura innoxia* and Binding of Cadmium. Plant Physiol. 89, 700-706.
- ERGON, Å. (1993): Ecotypic Copper resistance in *Lychnis alpina* L. MSc.. Thesis. University of Oslo, Department of Biology Division of Botany, Norway.
- ERNST, W.H.O., VERKLEIJ, J.A.C. & SCHAT, H. (1992): Metal Tolerance in plants. Acta Bot. Neerl. 41, 229-248.
- FARAGO, M.E., MULLON, W.A., COLE, M.M. & SMITH, R.F. (1980): A Study of *Armeria maritima* (Mill) Widdenow Growing in a Copper-Impregnated Bog. Environ-Pollut-Ser. A, 21, 225.
- FERGUSON, J.E. (1990): The heavy elements chemistry, environmental impact and health effects, pp. 13-51. Pergamon Press, Oxford.
- FOWLER, B.A., HILLEBRAND, C.E., KOIJIMA, I. & WEBB, M. (1987): Nomenclature of Metallothionein. Experientia Suppl. 52, 19-61.

- FOY, C.D., CHANEY, R.L. & WHITE, M.C. (1978): The Physiology of Metal Toxicity in Plants. *A Rev. Plant Physiol.* 29, 511-566.
- GEKELER, W., GRILL, E., WINNACKER, E., -L. & ZENK, M.H. (1989): Survey of the Plant Kingdom for the Ability to Bind Heavy Metals through Phytochelatins. *Z. Naturforsch.* 44, 361-369.
- GREGER, M. & LINDBERG, S. (1987): Effects of Cd^{2+} and EDTA on Young Sugar Beets (*Beta vulgaris*). II. Net Uptake of Mg^{2+} , Ca^{2+} and $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ *Physiol. Plant.* 69, 81-86.
- GREGER, M. & ÖGREN, E. (1991): Direct and Indirect Effects of Cd^{2+} on Photosynthesis in Sugar Beet (*Beta vulgaris*). *Physiol. Plant*, 83, 129-135.
- GODBOLD, D.L., TISCHNER, R. & HÜTTERMANN, A. (1987): Effects of heavy metals and aluminium on the root physiology of spruce (*Picea abies* Karst.) seedlings. In: Effects of atmospheric pollutants on forests, wetlands and agricultural ecosystems (T.C. Huthinson & K.M. Meema eds.), NATO ASI series, Vol. G 16, pp. 387-400, Springer, Berlin.
- GRILL, E., GEKELER, W., WINNACKER, E.-L. & ZENK, M.H. (1986): Homo-Phytochelatins are Heavy Metal-Binding Peptides of Homo-Glutathione Containing Fabales. *FEBS*, 205, 47-50.
- GRILL, E., LÖFFLER, S., WINNACKER, E.-L. & ZENK, M.H. (1989): Phytochelatins, the Heavy-Metal-Binding Peptides of Plants, are synthesized from Glutathione by a Specific γ -Glutamylcysteine Dipeptidyl Transpeptidase (Phytochelatin Synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6838-6842.
- GRILL, E., WINNACKER E.-L. & ZENK, M.H. (1985): Phytochelatins: The Principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher Plants. *Science* 230, 674-676.

- GRILL, E., WINNACKER, E.-L. & ZENK, M.H. (1987): Phytochelatins, a Class of Heavy-Metal- Binding Peptides from Plants, are Functionally Analogous to Metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 439-443.
- GUPTA, S.C. & GOLDSBROUGH, P.B. (1991): Phytochelatin Accumulation and Cadmium Tolerance in Selected Tomato Cell Lines. *Plant Physiol.* 97, 306-312.
- HAGEMEYER, J., KAHLE, H., BRECKLE, S.W. & WASEL, Y. (1986): Cadmium in *Fagus Syluatica* L. Trees and Seedlings: Leaching, Uptake and Interconnection With Transpiration. *Water, Air and Soil Pollution*, 29, 347-359.
- HAGEMEYER, J. & WASEL, Y. (1989; a) Uptake of Cd^{2+} and Fe^{2+} by Excised Roots of *Tamarix aphylla*. *Physiol. Plant.* 77, 257-263.
- HAYASHI, Y., NAKAGAWA, C.W. & MUTOH, N. (1991): Two Pathways in the Biosynthesis of Cadystins (γ EC)_n G in the Cell-Free System of the Fission Yeast. *Biochem Cell Biol.* 69, 115-121.
- HOWE, G. & MERCHANT, S. (1992): Heavy Metal-Activated Synthesis of Peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 98, 127-136.
- HUANG, B., HATCH, E., & GOLDSBROUGH, P.B. (1987): Selection and Characterization of Cadmium Tolerant Cells in Tomato. *Plant Sci.* 52, 211-221.
- JACKSON, A.P. & ALLOWAY, B. J. (1990): The transfer of cadmium from agricultural soils to the human food chain. In: *Biogeochemistry of trace metals* (D.C. Adriano, ed.), pp. 109-158. Lewis Publishers, Boca Raton, London.
- JACKSON, P.J., UNKEFER, C.J., DOOLEN, J.A., WATT, K. & ROBINSON, N.J. (1987): Poly (γ -glutamyl-cysteinyl) glycine: its Role in Cadmium Resistance in Plant Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 84, 6619-6623.

- KAHLE, H. & BRECKLE, S. -W. (1986): Wirkungen Ökotoxischer Schwermetalle auf Buchenwungwuchs. Statutuskolloquium "Luftverunreinigungen und Waldschaden", pp. 84-90, Düsseldorf.
- KAHLE, H. (1988): Wirkungen von Blei und Cadmium auf Wachstum and Mineralstoffhaushalt von Jungbuchen (*Fagus sylvatica* L.) in Sandkultur, in *Dissertationes Botanicae* Band 127, J. Cramer, Berlin.
- KAHLE, H. (1993): Response of roots of trees to heavy metals. *Environ. and Experim. Bot.* 33 (1), 99-119.
- KAZIMIR, J. & BRENNAN, E. (1986): The Impact of Chronic Cadmium Exposure on Growth of Pin Oak Seedlings. *Forest Sci.* 32 (4), 1061-1066.
- KELLY, J.M., PARKER, G.R., Mc FEE, W.W. (1979): Heavy Metal Accumulation and Growth of Seedlings of Five Forest Species as Influenced by Soil Cadmium Level. *J. Environ Qual.* 8 (3) , 361-364.
- KLAPHECK, S., CHROST, B., STARKE, J. & ZIMMERMAN, H. (1992): γ -Glutamylcysteinylserine -a New Homologue of Glutathione in Plants of the Family Poaceae. *Bot. Acta* 105, 174-179.
- KNEER, R., KUTCHAN, T.M., HOCHBERGER, A. & ZENK, M.H. (1992): *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* Contain Heavy Metal Sequestering Phytochelatins. *Arch. Microbiol.* 157, 305-310.
- KONDO, N., IMAI, K., ISOBO, M. & GOTO, T. (1984): Cadystin A and B, Major Unit Peptides Comprising Cadmium Binding Peptides Induced in a Fission Yeast-separation, Revision of Structures and synthesis. *Tetrahedron Letters* 25, 3869-3872.
- LAEMMLI, U.K. (1970): *Nature*, 227, 680.
- LAMOREAUX, R.J. & CHANEY, W. R. (1977): Growth and Water Movement in Silver Maple Seedlings Affected by Cadmium. *J. Environ. Qual.* 6, 201-205.

- LEITA, L., CONTIN, M. & MAGGIONI, A. (1991): Distribution of Cadmium and Induced Cd-binding Proteins in Roots, stems and Leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Sci*: 77, 139-147.
- LEPP, N.W. (ed.) (1981): Effect of heavy metal pollution on plants, Vol. 2: Metals in the environment. Applied Sci. Publish., London.
- LEVITT, J. (1972): Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York.
- LEVITT, J. (1980): Responses of plants to environmental stresses. 2nd ed. Vol. 1 and 2. Academic Press, New York.
- LOEFFLER, S., HOCHBERGER, A., GRILL, E., WINNACKER, E.-L. & ZENK, M.H. (1989): Termination of the Phytochelatase Reaction through Sequestration of Heavy Metals by the Reaction product. *FEBS Letters* 258, 42-46.
- MALIK, D., SHEORAN, I.S. & SINGH, R. (1992): Carbon Metabolism in Leaves of Cadmium Treated Wheat Seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 30 (2), 223-229.
- MALONE, C.D., MILLER, R.J. & KOEPPE, D.E. (1977): Root Growth in Corn and Soybeans: Effects of Cadmium and Lead on Lateral Root Initiation. *Can. J. Bot.* 56, 277-281.
- MEUWLY, P. & RAUSER, W.E., (1992): Alteration of Thiol Pools in Roots and Shoots of Maize Seedlings Exposed to Cadmium. *Plant Physiol.* 99, 8-15.
- MITCHELL, C.D., & FRETZ, T.A. (1977): Cadmium and Zinc Toxicity in White pine, Red maple and Norway spruce. *J. Amer.Soc. Hort. Sci.* 102 (1), 81-84.
- MURASUGI, A., WADA, C. & HAYASHI, Y. (1981): Purification and Unique Properties in UV and CD Spectra of Cd-binding peptide 1 from *Schizosaccharomyces pombe*-*Biochem. Biophys. Res. Commun.*

103, 1021-1028.

MUTOH, N. & HAYASHI, Y. (1991): Sulfur-containing cadystin-cadmium complexes. In: Metallobiochemistry Part B, metallothionein and related molecules (J.F. Riordan Vallee eds.). Methods in Enzymology, Vol. 205, pp. 341-359. Academic Press Inc., California,

NUSSBAUM, S., SCHMUTZ, D. & BRUNOLD, C. (1988): Regulation of Assimilatory Sulfate Reduction by Cadmium in *Zea mays* L. Plant Physiol. 88, 1407-1410.

NARDI, G. & CIPOLLARO, M. (1990): Assay of γ -Glutamylcysteine Synthetase and Glutathione Synthetase in Erythrocytes by High-performance Liquid Chromatography with Fluorimetric Detection. J. Chromatog. 530, 122-128.

PLOCKE, D.J. & KÄGI, J.H.R. (1992): Spectral Characteristics of Cadmium-containing Phytochelatin Complexes Isolated from *S. pombe*. Eur. J. Biochem., 207, 201-205.

POLUNIN, O. & EVERARD, B. (1976): Trees and bushes of Europe. Oxford Univ. Press, p. 117.

PUNZ, W.F. & SIEGHARDT, H. (1993): The Response of Roots of Herbaceous Plant Species to Heavy Metals. Environ. and Experim. Bot. 33 (1), 85-98.

RAUSER, W.E. (1978): Early Effects of Phytotoxic Burdens of Cadmium, Cobalt, Nickel and Zinc in White Beans. Can. J. Bot. 56, 1744-1749.

RAUSER, W.E. (1984): Isolation and Partial Purification of Cadmium-Binding Protein From Roots of the Grass *Agrostis gigantea*. Plant Physiol. 74, 1025-1029.

RAUSER, W.E., & ACKERLY, C.A. (1987): Localization of Cadmium in Granules within Differentiating and Mature Root Cells. Can. J. Bot. 65, 643-646.

- RAUSER, W.E. (1990): Phytochelatins. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 61-86.
- RAUSER, W.E. (1991): Cadmium-binding peptides from plants. In: *Metallobiochemistry, Part B metallothionein and related molecules* (J.F. Riordan & B.L. Vallee. eds.). *Methods in Enzymology*, Vol. 205, pp. 319-341. Academic Press, Inc., California.
- RAUSER, W.E., & MEUWLY, P. (1993): Part of the Cadmium Bound by Certain Thiolate Isopeptides. *Plant Physiol.* 102:163.
- RAUSER, W.E., SCHUPP, R. & RENNENBERG, H. (1991): Cysteine, γ -Glutamylcysteine, and Glutathione Levels in Maize Seedlings. *Plant Physiol.* 97, 128-138.
- REESE, R.N., WHITE, C.A. & WINGE, D.R. (1992): Cadmium-Sulfide Crystallites in Cd-(γ EC)_n G Peptide Complexes from Tomato. *Plant Physiol.* 98, 225-229.
- ROBINSON, N.J. (1989): Algal metallothioneins: Secondary Metabolites and Proteins. *J. Appl. Phycol.* 1, 5-18.
- ROBINSON, N.J. (1990): Metal-binding polypaptides in plants. In: *Heavy metal tolerance in plants: Evolutionary aspects* (A.J. Shaw ed.), pp. 195-214. CRC Press, Boca Raton.
- ROBINSON, N.J., RATLIFF, R.L., ANDERSON, P.J., DELHALZE, E., BERGER, J.M. & JACKSON, P.J. (1988): Biosynthesis of Poly (γ -glutamylcysteinyl) glycines in Cadmium-tolerant *Datura innoxia* (Will.) Cells. *Plant Sci.* 56, 197-204.
- ROGNES, S.E. (1993): Fitokelatinlerin saflaştırılması üzerine kişisel söyleşi. University of Oslo Department of Biology, Division of Botany.
- RÜEGSEGG, A., SCHMUTZ, D. & BRUNOLD, C. (1990): Regulation of Glutathione Synthesis by Cadmium in *Pisum sativum* L. *Plant Physiol.* 93, 1579-1584.

- SCHAT, H. & KALFF, M.M.A. (1992): Are Phytochelatins Involved in Differential Metal Tolerance or Do They Merely Reflect Metal-Imposed Strain? *Plant Physiol.* 99, 1745-1480.
- SMITH, G.C. & BRENNAN, E. (1984): Response of Silver Maple Seedlings to an Acute Dose of Root Applied Cadmium. *For. Sci.* 30, 582-586.
- SMITH, G.C., BRENNAN, E. & GREENHALE, B.J. (1985): Cadmium Sensitivity of Soybean Related to Efficiency in Iron Utilization. *Environ. Experim. Bot.* 25, 99-106.
- STEFFENS, J.C. (1990); The Heavy Metal-Binding Peptides of Plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 553-575.
- STREIT, B. & STUMM, W. (1993): Chemical Properties of metals. In: *Plants as biomonitors: Indicators for heavy metals in the terrestrial environment* (B. Market ed.), pp. 27-60. VCH, Weinheim.
- STRICKLAND, R.C., CHANEY, W.R. & LAMOREAUX, R.J. (1979): Cadmium uptake by *Pinus resinosa* Ait. Pollen and Effect on Release and Membrane permeability. *Plant. Physiol.* 64, 366-370.
- THURMAN, D.A. & COLLINS, J.C. (1983): Metal tolerance mechanisms in higher plants-review, In *Proc. Int. Conf. Heavy metal in the environment*, 298, Heidelberg.
- TOMSETT, A.B. & THURMAN, D.A. (1988): Molecular Biology of Metal Tolerance of Plant. *Plant Cell Environ.* 11, 383-394.
- TYLER, G., BALSBERG, P.A.M., BENETSSON, G., BÅÅTH, E. & TRANVIK, L. (1989): Heavy Metal Ecology of Terrestrial Plants, Microorganisms and Invertebrates. *Water, Air and soil Pollut.* 47, 187-215.
- VÁZQUEZ, M.D., POSCHENRIEDER, C. & BARCELÓ, J. (1992): Ultrastructural Effects and Localization off Low Cadmium Concentrations in Bean Roots. *New Phytol.* 120, 215-226.

- VERKLEIJ, J.A.C. & SCHAT, H. (1990): Mechanisms of metal tolerance in higher plants. In: Heavy metal tolerance in plants. Evolutionary aspects (A.J. Shaw, ed.), pp. 179-193, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- VERKLEIJ, J.A.C., KOEVOETS, P., VAN'T RIET, J., BANK, R.J. NIJDAM, Y. & ERNST, W.H.O. (1990): Poly (γ -glutamylcysteinyl) glycines or phytochelatins and Their Role in Cadmium Tolerance of *Silene vulgaris*, Plant Cell Environ. 13, 913-921.
- VÖGELI-LANGE, R. & WAGNER, G.J. (1990): Subcellular localization of Cadmium and Cadmium-Binding Peptides in Tobacco Leaves. Plant Physiol. 92, 1086-1093.
- WAGNER, G.J., & TROTTER, M.M. (1982): Inducible Cadmium-Binding Complexes of Cabbage and Tobacco. Plant Physiol. 69: 804-809.
- WITTIG, R. (1993): General aspects of biomonitoring. In: Plants as biomonitors: Indicators for heavy metals in the terrestrial environment (B. Market ed.), pp. 1-26. VCH, Weinheim.

VII. ÖZGEÇMİŞ

1962 İzmir doğumluyum. İlköğrenimimi Ankara'da Mimar Kemal İlkokulu'nda, orta ve lise öğrenimimi ise A.Ö.D. Tevfik Fikret Lisesi'nde tamamladım. 1986 yılında O.D.T.Ü. Biyoloji Bölümü'nden mezun oldum. Bir süre için özel bir şirkette süpervizör görevini üstlendim.

1990'da İ.Ü. Biyoloji Bölümü Botanik A.B.D'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım. "Ailanthus altissima'da kadmiyum, kurşun birikimi ve kadmiyumun bitki gelişmesine etkisi" adlı tezimle 1992'de Yüksek Lisans'ımı tamamladım.

Norveç Hükümeti Bursu (NAVF/SEP Cultural Exchange Programme) ile 1992/1993 Akademik Yılı'nı içeren sürede OSLO Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Botanik A.B.D'nda Doktora için gerekli ön çalışmalarımı sürdürdüm.

5-10 Haziran 1991 tarihlerinde Didim'de yapılan "Uluslararası Kentsel Ekolojisi Sempozyumu"na dinleyici olarak, 23-28 Ağustos 1992'de Antwerpen-Belçika'da "8. FESPP Kongresi"ne ve 5-7 Ekim 1993'de İzmir'deki "1. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi"ne birer poster ile katıldım.

Halen İ.Ü. Biyoloji Bölümü, Botanik A.B.D'nda Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktayım.

Yayınlar:

BAYÇU, G., & ÖNAL, M. (1992): The Effects and the Accumulation of Cadmium in *Ailanthus altissima* Abstract. *Physio. Planta*. 85 (3), Part 2: 74.

BAYÇU, G. & ÖNAL, M. (1994): An Investigation of the Levels of Cadmium and Lead in the Soil and in the Leaves of Selected Specimens of *Ailanthus altissima* Found Growing Beside a Freeway in Istanbul. (İ.Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Dergisinde baskıda)

BAYÇU, G. & ÖNAL, M. (1994): Cd Accumulation in Roots and Effects of Cd on Growth of Different Plants. Abstract. *Biol. Planta*. 36 (Suppl.), 260.