



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***Bryophyllum daigremontianum* Raym.-Hamet & H.
Perrier BİTKİSİNDE KADMIYUM STRESİNİN
FİZYOLOJİK, GENOTOKSİK VE MİNERAL
BESLENME ÜZERİNE ETKİLERİ**

SEÇİL YILMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı

DANIŞMAN
Doç. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT

İSTANBUL, 2013



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***Bryophyllum daigremontianum* Raym.-Hamet & H.
Perrier BİTKİSİNDE KADMIYUM STRESİNİN
FİZYOLOJİK, GENOTOKSİK VE MİNERAL
BESLENME ÜZERİNE ETKİLERİ**

SEÇİL YILMAZ
Biyoloji Öğretmeni

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı

DANIŞMAN
Doç. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT

İSTANBUL, 2013

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Seçil YILMAZ'ın “*Bryophyllum daigremontianum* Raym.-Hamet & H. Perrier BİTKİSİNDE KADMIYUM STRESİNİN FİZYOLOJİK, GENOTOKSİK VE MİNERAL BESLENME ÜZERİNE ETKİLERİ” başlıklı tez çalışması, ____ Haziran 2013 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT (Danışman)

Marmara Üniversitesi

..... (İMZA).....

_____ (Üye)

Marmara Üniversitesi

..... (İMZA).....

_____ (Üye)

Marmara Üniversitesi

..... (İMZA).....

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ____/05/2013 tarih ve 12345 sayılı kararı ile Seçil YILMAZ'ın Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. _____

ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarımın her aşamasında büyük bir titizlik ve özveriyle hiçbir fedakârlıktan çekinmeyen, bilgi ve deneyimleri ile bana yardımcı olan ve her türlü olanağı sağlayan danışmanım Sayın Doç. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT'e içtenlikle teşekkür ederim.

Deneylerin yürütülmesinde, bitki yetiştirme odası ve biyoloji laboratuvarlarından yararlanmamızı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Meral ÜNAL'a, deney sonuçlarının okunmasında yardımcı olan Doç. Dr. Filiz VARDAR'a, Yard. Doç. Dr. Zeki SEVEROĞLU'na, Araş. Gör. Güzin KEKEÇ ve Ertuğrul YALÇIN'a, deneylerin yürütülmesi sırasında deney için gerekli çözeltilerin hazırlanmasında ve bitkilerin bakımında bana yardımcı olan, yüksek lisans öğrencileri Sezen İĞDELİOĞLU, Onur ZORLUER ve Zeynep UZUNOVA'ya,

Tez çalışmam sırasında yardımlarını gördüğüm İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nden Yard. Doç. Dr. İlhan DOĞAN'a, ağır metal ve mineral element analizlerinin yapılmasında laboratuvarlarındaki imkânlardan yararlandırıran Bahçeşehir Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölüm Başkanı Doç. Dr. Göksel DEMİR'e, moleküler analizlerin yapılmasında laboratuvar imkânlarından faydalandıran Fatih Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden Doç. Dr. Serdal SAKÇALI'ya,

Yüksek lisans süresince her zaman bana tüm desteği, ilgiyi ve yardımı gösteren arkadaşlarım Meliha KOLDEMİR ve Birkan AÇIKGÖZ'e tez süresince bana büyük anlayış ve sabır gösteren **oğlum Suat**'a çok teşekkür ediyorum. Çalışmamı maddi olarak destekleyen Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu çalışanlarına, teşekkür ederim.

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAPKO) tarafından "*Bryophyllum daigremontianum* Raym.-Hamet & H. Perrier bitkisinde Cd stresinin fizyolojik, genotoksik ve mineral beslenme üzerine etkileri" isimli ve FEN-C-YLP-040712-0283 numaralı proje olarak desteklenmiş ve aşağıdaki konferanslarda sözlü sunum olarak sunulmuştur.

İ. İ. Özyiğit, İ. Doğan, S. Yılmaz, G. Demir, Cadmium stress alters nutrient status of *Bryophyllum daigremontianum*, International Conference of Young Scientist, “Advances in Botany and Ecology”, Shcholkine, Leninsky District of Crimea, Kazantip Nature Reserve, Haziran 18-22, 2013 (Sözlü Sunum)

İ. İ. Özyiğit, S. Yılmaz, İ. Doğan, M.S. Sakçali, G. Kekeç, G. Demir, Z. Severoğlu, Cadmium-induced physiological and genotoxic alterations in *Bryophyllum daigremontianum*, 13th International Conference on Environmental Science and Technology, Athens, Greece, Eylül 5-7 (Sözlü Sunum)

Haziran, 2013

Seçil YILMAZ

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
YENİLİK BEYANI	viii
SEMBOL LİSTESİ	viii
KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. <i>Bryophyllum daigremontianum</i> Raym.-Hamet & H. Perrier Bitkisinin Taksonomik Özellikleri	4
2.2. Ağır Metallerin Tanımı	4
2.3. Ağır Metallerle İlgili Genel Bilgiler	5
2.3.1. Ağır metallere maruz kalan bitkilerin gösterdiği stratejilere göre sınıflandırılmaları	7
2.4. Cd Elementi	8
2.4.1. Bitkilerde Cd	10
2.4.1.1. Cd'un bitkilerde alınması	11
2.4.1.2. Cd'un bitkilerde taşınması.....	12
2.5. Genotoksisite	13
2.6. Bitki Besin Elementleri ve Önemi	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. <i>Bryophyllum daigremontianum</i> Raym.-Hamet & H. Perrier Bitkisinin <i>in</i> <i>vitro</i> Ortamda Gelişimi	20
3.2. Büyüme Parametrelerinin Ölçülmesi.....	21
3.3. Fotosentetik Pigmentler	22

3.3.1. Klorofil a-b, a/b, toplam klorofil ve karotenoid miktarlarının belirlenmesi	22
3.4. Cd Akümülayonu ve Mineral Besin Elementlerinin Tayini.....	22
3.4.1. ICP (Inductively Coupled Plasma) tekniği.....	23
3.4.2. Laboratuvar alışmaları	24
3.5. İstatistik Analizler.....	25
3.6. Kadmiyum Stresinin Genotoksik Ölçümü.....	25
3.6.1. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) tekniği.....	26
3.6.2. Laboratuvar alışmaları	26
4. BULGULAR.....	28
4.1. Cd Stresinin <i>Bryophyllum daigremontianum</i> Raym.-Hamet & H. Perrier Bitkisi Büyüme Parametreleri Üzerine Etkisi.....	28
4.2. Klorofil a-b, Toplam Klorofil, a/b ve Karotenoid Miktarları	34
4.3. Cd Stresi ve Mineral Beslenme Üzerine Etkileri.....	37
4.4. <i>Bryophyllum daigremontianum</i> Bitkisinde Genotoksik Bulgular	52
5. TARTIşMA VE SONUÇ.....	53
KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEçMİş	

ÖZET

***Bryophyllum daigremontianum* Raym.-Hamet & H. Perrier BİTKİSİNDE KADMIYUM STRESİNİN FİZYOLOJİK, GENOTOKSİK VE MİNERAL BESLENME ÜZERİNE ETKİLERİ**

Çalışmada *Bryophyllum daigremontianum* Raym.-Hamet & H. Perrier bitkisinin Cd elementine karşı fizyolojik ve genotoksik ve mineral beslenme özellikleri bakımından ne gibi yanıtlar verdiği araştırılmıştır. Bitkiler 0, 50, 100, 200 ve 400 µM konsantrasyonlarda Cd içeren Hoagland çözeltileri ile iki ay boyunca gün aşırı sulandılar. Bu işlemten sonra hasat edilen bitkilerde bazı büyüme parametreleri (gövde kalınlığı ve uzunluğu, yaprak yüzey alanı, yaprak, kök ve gövde yaş ve kuru ağırlıklar), fotosentetik pigmentler (klorofil a, b, toplam klorofil, klorofil a/b ve karotenoidler), mineral besin elementleri (B, Ca, Cu, Fe, K, Mg ve Na) ölçüldü ve RAPD-PCR yöntemi ile genotoksisite analizleri yapıldı. Klorofil a-b ve karotenoid miktarları Arnon 1949 formülasyonuna göre hesaplandı. Mineral besin elementleri ölçümlerinde ICP-OES cihazı kullanılmıştır. Uygulanan Cd konsantrasyonları ile bitkilerin büyüme parametrelerinde düşüş gözlenmiştir. Cd uygulaması sonucu yaprak, gövde ve kök yaş ağırlıklarında sırasıyla (%) ~55.24, ~66.8 ve ~51.51 oranlarında, gövde uzunluğu ve kalınlığında sırasıyla ~29.74 ve ~68.0 oranlarında, özellikle 400 µM konsantrasyonlarda kontrole göre çok daha fazla düşüş gözlenmiştir. Cd stresi uygulanmış ve uygulanmamış bitkilerin analiz değerleri kıyaslandığında klorofil a % ~40.57, klorofil b % ~37.63, toplam klorofil % ~36.27, klorofil a/b % ~20.58, karotenoid % ~37.66 oranlarında düşüş gözlenmiştir.

Mineral besin elementlerinden K, Na ve Cu konsantrasyonları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artan Cd konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artmıştır. Mg ve Ca içeriğinde ise ters orantılı olarak düşüş gözlenmiştir. Bitki besin elementlerinden Fe değerlerinin kök ve yaprakta arttığı ancak gövdede azaldığı gözlenmiştir. B elementinin yaprak ve gövdede arttığı ancak kökte düştüğü tespit edilmiştir. Artan Cd'a bağlı olarak Fe ve B artış ve düşüşlerinde linear olarak artış veya düşüşler saptanmıştır. Yaptığımız çalışmada RAPD profil sonuçlarımıza göre yeni bant oluşumları ve bant yoğunluklarında değişim gözlenmiştir. Bu çalışma ile çevresel toksikoloji, genotoksisite ve Cd kirliliği araştırmalarında RAPD-DNA tekniğinin yararlı olabileceği görülmüştür.

Haziran, 2013

Seçil YILMAZ

ABSTRACT

The EFFECTS OF CADMIUM STRESS ON PHYSIOLOGY, GENOTOXICITY AND MINERAL NUTRITION OF *Bryophyllum daigremontianum* Raym.-Hamet & H. Perrier

In this study, the effects of cadmium on physiological treatments, genotoxicity and mineral nutrition of *Bryophyllum daigremontianum* Raym.-Hamet & H. Perrier were examined. Plants were watered with Hoagland solution (20 ml) containing 0, 50, 100, 200 and 400 μM Cd in 2 day intervals for two months. After this period, they were harvested and the effects of Cd exposures on some growth parameters (fresh weights of leaves, stems and roots, lengths and thicknesses of stems), photosynthetic pigment contents (chlorophyll a-b, total chlorophyll and carotenoids) and some nutrients (B, Ca, Cu, Fe, K, Mg and Na) of *B. daigremontianum* in response to Cd stress were examined. The concentrations of chlorophyll a and b and carotenoids were calculated according to Arnon, 1949. ICP-OES were employed for the nutrient measurements during the study. Increasing Cd concentration gradually inhibited the growth parameters. Overall there were significant decreases (%) by ~ 55.24 , ~ 66.8 and ~ 51.51 in fresh weights of leaves, stems and roots and ~ 29.74 and ~ 68.0 in lengths and thicknesses of stems under severe Cd stress (400 μM Cd) respectively, compared with the controls. The comparison between unexposed and exposed *B. daigremontianum* groups revealed gradual reductions of photosynthetic pigment contents ($\sim 40.57\%$ for chlorophyll a, $\sim 37.63\%$ for chlorophyll b, $\sim 36.27\%$ for total chlorophyll, $\sim 20.58\%$ for chlorophyll a/b and $\sim 37.66\%$ for carotenoids at 400 μM). The concentrations of some nutrients (Mg and Ca) were reduced while concentrations of other elements were increased (Cu, Na, K) gradually by increasing of Cd exposures compared with controls. Accumulations for some nutrients (Fe and B) were seen in some parts of the plant and *vice versa*, the patterns being dependent on the nutrient and the plant part. The results indicated that changes in RAPD-PCR profiles following Cd treatments included a variation in band intensities, and the appearance of new bands compared to unexposed plants. The present study evidences that as an investigation tool for environmental toxicology, the RAPD technique can be useful and can be applied as a suitable biomarker assay for the detection of genotoxic effects of Cd pollution on plants.

June, 2013

Seçil YILMAZ

YENİLİK BEYANI

***Bryophyllum daigremontianum* Raym.-Hamet & H. Perrier BİTKİSİNDE KADMIYUM STRESİNİN FİZYOLOJİK, GENOTOKSİK VE MİNERAL BESLENME ÜZERİNE ETKİLERİ**

Bu çalışmada *Bryophyllum daigremontianum* Raym.-Hamet & H. Perrier bitkisi deney materyali olarak kullanılmış ve 2 aylık bir süre boyunca 0, 50, 100, 200 ve 400 μM Cd stresine tabi tutulmuştur. *B. daigremontianum* bitkisi ağır metal çalışmalarında yaygın kullanılan ve araştırılmış bir bitki değildir. Ancak yapraklardan eşeysiz olarak çoğalabilme (klonal çoğaltım) özelliğinden dolayı seçilen bitki Cd stresine tutulması, büyüme parametrelerinin, bazı fizyolojik parametrelerin ve RAPD-PCR moleküler tekniği ile de genotoksik etkilerin incelenmesi ile bu çalışma, orijinal bir çalışmadır.

Haziran, 2013

Doç. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT

Seçil YILMAZ

SEMBOL LİSTESİ

%	: Yüzde
Ca	: Kalsiyum
Cd	: Cd
Cl	: Klor
cm	: Santimetre
cm²	: Santimetre kare
CO₂	: Karbondioksit
Cu	: Bakır
°C	: Santigrad derece
dw	: Dry weight (Kuru Ağırlık)
Fe	: Demir
gr	: Gram
K	: Kelvin
kg	: Kilogram
M	: Molar
Mg	: Magnezyum
Mhz	: Megahertz
Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikro Molar
Ni	: Nikel
nm	: Nanometre
mM	: Milimolar
bp	: Baz çifti (Base pair)
ppb	: Part per billion (Milyarda bir)
ppm	: Part per million (Milyonda bir)

KISALTMALAR

BSA	: Bovine Serum albumin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinukleotid trifosfatlar
IARC	: International Agency for Research on Cancer (Uluslararası kanser araştırma merkezi)
ICP	: İndüktif eşleşmiş plazma
Taq DNA polimeraz	: <i>Thermus aquaticus</i> bakterisinden elde edilen DNA polimeraz enzimi
Kla	: Klorofil a
Klb	: Klorofil b
MN	: Mikro nucleus
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA)
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

ŞEKİL LİSTESİ

	SAYFA
Şekil 2.1. Avrupa’da Cd Yayılımı	9
Şekil 2.2. 2011 Yılındaki Dünyadaki Cd Rezervlerinin Ülkelere Göre Yüzde Değerleri	11
Şekil 3.1. a) Çalışmada Kullanılan Anne Bitki, b) Anne Bitkiden İzole Edilen ve Gelişime Bırakılan Genç Bitkicikler.	20
Şekil 3.2. Bitki Büyüme Odasında Gelişmeye Bırakılan Bitkiler	21
Şekil 3.3. ICP-OES Cihazı	24
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda (50, 100, 200 ve 400 µM) Cd Uygulanmış Bitkiler ve Cd Uygulanmamış Kontrol Grubu Bitkisi	28
Şekil 4.2. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Yaprak Yaş Ağırlık Değerleri	29
Şekil 4.3. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Gövde Yaş Ağırlık Değerleri	30
Şekil 4.4. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Kök Yaş Ağırlık Değerleri	30
Şekil 4.5. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Yaprak Kuru Ağırlık Değerleri	31
Şekil 4.6. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Gövde Kuru Ağırlık Değerleri	31
Şekil 4.7. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Kök Kuru Ağırlık Değerleri	32
Şekil 4.8. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Gövde Kalınlığı Değerleri.....	32
Şekil 4.9. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Gövde Boy Uzunluk Değerleri	33
Şekil 4.10. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Yaprak Alanı Değerleri.....	33
Şekil 4.11. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Kl a Miktarları	34
Şekil 4.12. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Kl b Miktarları	34

Şekil 4.13.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Toplam Kl Miktarları.....	35
Şekil 4.14.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Kl a/b Miktarları.....	35
Şekil 4.15.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Karotenoid Miktarları.....	36
Şekil 4.16.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Cd Mineralinin Miktarları.....	37
Şekil 4.17.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Fe Mineralinin Miktarları.....	37
Şekil 4.18.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Mg Mineralinin Miktarları.....	38
Şekil 4.19.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Ca Mineralinin Miktarları.....	38
Şekil 4.20.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Cu Mineralinin Miktarları.....	39
Şekil 4.21.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Na Mineralinin Miktarları.....	39
Şekil 4.22.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Köklerinde K Mineralinin Miktarları.....	40
Şekil 4.23.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Köklerinde B Mineralinin Miktarları.....	40
Şekil 4.24.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Cd Mineralinin Miktarları.....	42
Şekil 4.25.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Fe Mineralinin Miktarları.....	42
Şekil 4.26.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Mg Mineralinin Miktarları.....	43
Şekil 4.27.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Ca Mineralinin Miktarları.....	43
Şekil 4.28.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Cu Mineralinin Miktarları.....	44
Şekil 4.29.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Na Mineralinin Miktarları.....	44

Şekil 4.30.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında K Mineralinin Miktarları	45
Şekil 4.31.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında B Mineralinin Miktarları	45
Şekil 4.32.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Gövdelerinde Cd Mineralinin Miktarları	47
Şekil 4.33.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Gövdelerinde Fe Mineralinin Miktarları.....	47
Şekil 4.34.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Gövdelerinde Mg Mineralinin Miktarları	48
Şekil 4.35.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Gövdelerinde Ca Mineralinin Miktarları	48
Şekil 4.36.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Gövdelerinde Cu Mineralinin Miktarları	49
Şekil 4.37.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Gövdelerinde Na Mineralinin Miktarları	49
Şekil 4.38.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Gövdelerinde K Mineralinin Miktarları.....	50
Şekil 4.39.	Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Gövdelerinde B Mineralinin Miktarları.....	50
Şekil 4.40.	Farklı konsantrasyonlarda Cd (K: kontrol, 50: 50 µM, 100: 100 µM, 200: 200 µM, 400: 400 µM) uygulanan <i>B.daigremontianum</i> yapraklarından alınan DNA'nın RAPD sonuçları.....	52

TABLO LİSTESİ

	SAYFA
Tablo 2.1. Bitki besin elementleri (Epstein, 1972, 1999)	14
Tablo 4.1. <i>Bryophyllum daigremontianum</i> Raym.-Hamet & H. Perrier Bitkisinin Büyüme Parametreleri	29

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda tüm canlıların sağlığını tehdit eden en önemli tehlikelerin başında çevre sorunları gelmektedir. Bu sorunlar, her geçen gün artarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle sanayi devriminden sonra, ağır metal kökenli çevre kirliliğindeki artış ciddi ekolojik problemleri de beraberinde getirmiştir (Akgüç ve ark., 2008; Carfagna ve ark., 2013). Bakır (Cu), civa (Hg), çinko (Zn), demir (Fe), kadmiyum (Cd), kobalt (Co), krom (Cr), kurşun (Pb), mangan (Mn), nikel (Ni) ve selenyum (Se) gibi metallerin de içinde bulunduğu atom kütlesi nispeten büyük, kendine özgü fiziksel yapı gösteren ve özgül ağırlıkları 5 g/cm^3 'ten büyük olan metaller ağır metaller olarak adlandırılırlar. Altmıştan fazla element ağır metal olarak kabul edilir ve bu metaller periyodik cetvelin “geçiş elementleri” adı verilen geniş bir bölümünde yer alırlar (Azevedo ve Lea, 2005; Rivero-Huguet ve ark., 2006; Pohl ve ark., 2011).

Ağır metaller, çevreye bırakılmaları durumunda bitkiler, hayvanlar ve insanlar için büyük tehdit oluşturmakta ve besin zinciri yoluyla organizmalarda birikerek ciddi hastalıklara hatta ölümlere neden olmaktadır (Demirezen ve Aksoy, 2006; Farooq ve ark., 2008). Ağır metaller çevrede yayılarak insan yaşam alanının çok sınırlı olduğu, hatta yaşamın olmadığı Antarktika’da bile çevre kirliliğini olumsuz etkilemektedir (Elik ve Akçay, 2000; Corsolini, 2008). Bu nedenle, ağır metallerin canlılar üzerinde oluşturabileceği olumsuz etkilerin göz ardı edilmemesi gerekmektedir (Barylva ve ark., 2001; Aissa ve Kéloufi, 2012). Ağır metallerin çevreye yayılmasına neden olan etmenlerin başında endüstriyel faaliyetler, motorlu taşıtların egzozları, boyalar, metallerin katalizör olarak kullanılmaları, maden yatakları ve işletmeleri, volkanik faaliyetler, tarımda kullanılan gübre ve ilaçlar ile kentsel atıklar gelmektedir (Ozaki ve ark., 2004; Suzuki ve ark., 2009; Petrova, 2011).

Ekosistemde, en tehlikeli ağır metal kirleticilerinden olan ve periyodik cetvelin 2B grubunda yer alan Cd canlılar için oldukça toksik bir elementtir. Endüstriyel ve çevresel kirlenici olarak Cd’un önemi son yıllarda daha da belirginleşmiştir. Cd doğal kaynaklı bulunabileceği gibi endüstriyel faaliyetler, fosforlu gübreler, lağım atıkları ve atmosferik depozitler gibi insan faaliyetleri sonucunda da çevreye yayılabilmektedir. Bu etkenler bir kirlenici olarak Cd’un önemini artırmaktadır (Özyiğit ve Akıncı, 2009; Sabiha-Javied ve ark., 2009). Birleşik Devletler Çevresel Koruma Komisyon’unun

öncelikli zararlı maddeler listesinde yer alan Cd'a, canlılar çoğu kez doğrudan solunum yolu veya besin zinciri aracılığıyla maruz kalmaktadırlar. Maruziyet yolu, dozu ve süresine bağlı olarak Cd akciğer, karaciğer, böbrek, kemik, testis ve plasentada hasara neden olabilmektedir (Paustenbach ve ark., 2003; Prozialeck, 2006; Meravi ve Prajapati, 2013).

Cd emisyonu, yani bulaşmasına neden olan faktörler; Cd işleyen fabrikalar, mazot ile çalışan iş makineleri ve araçlar, oto lastiklerinin cııalanması, yağ ve kömür yakan tesisler, tarım alanlarına ve bahçelere uzun süre arıtma çamuru ve çöp gübresi uygulanması ve fosfat gübreleridir (Gupta ve ark., 2003; Akgüç ve ark., 2008).

Cd'un bitkilerdeki konsantrasyonu genellikle 0,1-1,0 ppm aralığında seyretmektedir (Kabata- Pendias ve Mukherjee, 2007). Bitkiler için gerekli olmayan bu elementin zehirli hali daha çok enzim inhibisyonu şeklindedir (Robinson ve ark., 2000; Carfagna ve ark., 2013). Bitkiler Cd'un daha yüksek dozlarını hayvanlara göre zarar görmeden, tolere edebilmektedirler. Aşırı alımı bitkileri olumsuz etkilemektedir. Bitkinin Cd alımını yavaşlatan topraktaki kireç miktarı, toprak pH'sı yüksek kil ve fazla humus oranı gibi bazı faktörler vardır (Deng ve ark., 2004).

Toksik miktarlardaki Cd'a maruz kalan bitkilerde yaprak yüzey alanı küçülmesi, sararma (kloroz), nekrotik leke oluşumu, yaprak büyümesinin inhibisyonu ve yapraklarda yuvarlanma görülmektedir. Bununla birlikte Cd kökenli demir, fosfor yetersizliği ya da mangan taşınımının engellenmesi yapraklardaki sararmanın nedeni olabilmektedir (Köleli ve ark., 2004; Benavides ve ark., 2005; Lombardi, 2005). Cd bitki fotosentez oranı, enzim aktivitesi ve iyon alımı üzerine olan engelleyici etkilerinden dolayı bitkisel üretimde verim ve kalitenin azalmasına neden olmaktadır (Hassan ve ark., 2005; Siatka ve ark., 2012).

Bu çalışmada *Bryophyllum daigremontianum* bitkisinin farklı derecelerdeki Cd stresinden nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Ayrıca bu çalışmada Cd'un bitkideki diğer mineral besin elementlerinin alınımını nasıl etkilediği de araştırılmıştır. Bu amaçla standart kompost içeren saksılarda yetiştirilen *B. daigremontianum* bitkisi iki aylık bir süre boyunca 0 (kontrol), 50, 100 200 ve 400 µM CdCl₂ içeren Hoagland çözeltisi ile gınaşırı olarak sulanmış ve Cd'un bazı fizyolojik, genotoksik ve mineral beslenme üzerine etkileri belirlenmiştir.

Stresin bitkiler üzerindeki etkilerinin incelenmesinde, farklı konsantrasyonlardaki ağır metal uygulamalarına maruz bırakılan bireyler ile ağır metal uygulamasına maruz kalmayan kontrol grubu bireylerin DNA'larındaki, büyüme parametrelerindeki ve fotosentetik pigment (klorofil a, klorofil b ve karotenoid) miktarlarındaki değişimler ile kök, gövde ve yapraklardaki ağır metal birikimi ve mevcut ağır metallerin diğer mineral besin elementlerinin alımlarına etkileri araştırılmıştır. Ayrıca bu çalışma ile *B. daigremontianum* bitkisinin ne kadar Cd'u organlarında biriktirdiği ve bir akümülatör bitki olarak kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Bryophyllum daigremontianum* Raym.-Hamet & H. Perrier

Bitkisinin Taksonomik Özellikleri

Regnum	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Klassis	: Dicotyledoneae / Magnoliopsida
Ordo	: Rosales
Familiya	: Crassulacea
Genus	: Kalanchoe
Species	: <i>Bryophyllum daigremontianum</i> Raym.-Hamet & H. Perrier

Bryophyllum daigremontianum bitkisi *Kalanchoe daigremontiana* Hamet & Perrier olarak ta adlandırılmaktadır. Kökeni Madagaskar olan sukkulent bir bitkidir. Ülkemizde gözyaşı bitkisi olarak adlandırılır. Diğer bazı ülkelerde şeytan omurgası, timsah bitkisi, Meksika şapkası bitkisi ve binlerin annesi isimleri ile anılır. Bitkinin uzunluğu 1 m'ye ulaşabilmektedir. Etli, oblongat-lanseolat yaprakları vardır. Yapraklar 15-20 cm uzunluğa, 3 cm genişliğe ulaşabilmektedir. Erişkin bitkiler gövdeleri üzerinden 10-15 cm toprağın üzerinde yan kökler oluştururlar. Çiçeklenme her yıl olmaz, bir kaç senede bir ana gövdenin üzerinde pembe renkli çiçekler açar. *B. daigremontianum* yaprağının kenarlarında meydana gelen tomurcuklardan küçük bitkicikler gelişir. Daha sonra ana bitkiden ayrılan ve toprağa düşen bu bitkiciklerden yeni gözyaşı bitkileri oluşur. Bitkinin tüm kısımları zehirlidir ve özellikle küçük hayvanlar için öldürücü olabilmektedir. *B. daigremontianum* bitkisi, kurak ortamlara uyum sağlamış bir CAM (Crassulacean asit metabolizması) bitkisidir (Everitt ve ark., 2007).

2.2. Ağır Metallerin Tanımı

Ağır metaller, yoğunluğu 5 g/cm³'ten daha yoğun metaller olarak tanımlanmaktadırlar. En çok tanınan ağır metaller Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb ve Zn'dir. Ağır

metallerin bazıları vitamin, enzim ve hormonların yapısına katılarak metabolizmada yer almakta, bazıları da emilim ve sindirimde görev almaktadırlar (Kahvecioğlu ve ark., 2001; Azevedo ve Lea, 2005; Pohl ve ark., 2011). Cu, Fe, Mn, Mo, Ni ve Zn gibi ağır metaller canlılar için belli bir doza kadar gereklidir, bu elementler iz veya eser element olarak adlandırılmaktadırlar. As, Au, Cd, Cr, Hg, Pb, Pd, Pt, Sb, Te, Tl ve U gibi ağır metaller canlılar için mutlak gerekli olmayıp eser miktarları bile toksik etki göstermektedir (Mercier ve Pinnavala, 1997; Demirezen ve Aksoy, 2006; Farooq ve ark., 2008).

2.3. Ağır Metallerle İlgili Genel Bilgiler

Günümüzde toprakta ağır metal kirliliği önemli çevresel problemlerden birisidir (Carfagna ve ark., 2013). Ağır metallerin toprakta birikmesinin sadece toprak verimliliği ve ekosistem fonksiyonları üzerinde değil aynı zamanda besin zinciri yoluyla hayvan ve insan sağlığı üzerinde de önemli etkileri vardır (Majer ve ark., 2002; Sayadi ve Sayyed, 2011).

Ağır metal ve iz element düzeylerini belirlemeye yönelik, Türkiye’de ballarda yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Tüzen ve arkadaşlarının 2007 yılında Türkiye’nin 6 farklı bölgesinden aldıkları bal örneklerinde Cd, Cu, Fe, Pb ve Zn miktarları sırasıyla 0,23-2,41 ppm, 1,1-12,7 ppm, 1,8-10,2 ppm, 8,4-106 ppb ve 0,9-17,9 ppb olarak bulunmuştur. Çalışma neticesinde Doğu Anadolu Bölgesi’nden alınan bal numunelerinde metal düzeylerinin diğer bölgelere göre daha düşük olduğu saptanmıştır.

Ağır metaller bitki bünyesinde fizyolojik aktiviteleri engellemekte, kalite ve miktarı azaltmakta ve bitkinin ölümüne neden olmaktadır (Siatka ve ark., 2012). Ağır metallere karşı bitkilerin toleransları birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Bu faktörler, bitki türü, element türü, strese maruz kalma süresi ve strese maruz kalan doku veya organın yapısıdır (Öktüren ve Sönmez, 2006).

Bitkiler ağır metalleri bünyelerinde toplamakta bu da hem bitki yaşamını hem de besin zincirini etkilemektedir. Bitki dokularında bu metallerin aşırı birikimi bitkilerde strese neden olmaktadır (Brekken ve Steinnes, 2004; Farooq ve ark., 2008; Prajapati, 2012).

Toprakta ağır metal miktarı fazlaysa burada yetişen bitkilerin bünyelerinde biriktirdikleri ağır metal miktarı da fazla olmakta bu yüzden şehirlerin ve kırsal alan

bitkilerinin biriktirdikleri ağır metal miktarı farklı olmaktadır. Yapılan bir çalışmada bu iki alandaki bazı tıbbi bitkiler toplanmış ve bitkilerdeki Zn, Cd, Pb, Ni, Mo gibi ağır metallerin birikme oranları tespit edilmiştir. Kırsal ve şehrsel alanlardan toplanan *Taraxacum officinale* (karahindiba), *Mentha* sp. (nane), *Urtica dioica* (ısırgan otu), *Populus nigra* (kara kavak) gibi tıbbi bitkilerde biriken ağır metal miktarının şehrsel alanlardan toplananlarda daha fazla olduğu bildirilmiştir (Baranowska ve ark., 2002).

Ağır metal stresi fotosentez metabolizmasını olumsuz etkilemektedir. Bu olumsuzluklar; kloroplast yapısının bozulması, klorofil ve karotenoid biyosentezinin inhibe olması, elektron taşıma sisteminin aksaması, Calvin döngüsü enzimlerinin aktivitelerinin inhibe olması, stoma sayısı ve işlevi değişimi, bunların sonucunda CO₂ yetersizliğidir (Macfarlane ve Burchett, 2001; Prasad ve diğ., 2001). Ağır metallerden Cd ve Pb'un artması, bitkilerin besin elementlerinden yararlanmasını engellemekte, bu besin elementlerinden Mg ve Fe klorofil sentezi için gerekli olup, eksiklikleri klorofil miktarının azalmasına neden olmaktadır. Bu sebepten fotosentez ve solunumdaki elektron taşınımı olumsuz etkilenmekte, sonuçta da enerji ve besin üretimi azalmaktadır (Bonnet ve Veisseire, 2000; Sharma ve Dubey, 2005).

Bitkilerin ağır metal stresine karşı geliştirdiği bazı mekanizmalar vardır. Ağır metaller gibi stres koşullarının bitkilerde oluşturduğu sinyaller vardır. Bu sinyaller sayesinde bitkinin savunma mekanizması aktif hale gelmektedir. Ağır metal stresine karşı bitkilerin geliştirdiği en öncelikli mekanizmalar kaçınma ve toleranstır (Bray ve ark., 2000).

Kaçınma, ağır metallerin bitkiye girişinin, bitki morfolojisinde ve metabolizmasında değişiklikler meydana getirerek önlenmesi veya azaltılmasıdır. Bitkiler kaçınmayı çevre ile temas halinde olduğu yüzeylerini, yaprak ayasının alanı ve kalınlığını, stoma büyüklüğü ve yoğunluğunu, kütikula kalınlığı gibi morfolojik yapılarını, yaprak ve kök salgılarındaki toksik ve engelleyici bileşenlerin oluşumunu ve kütikulanın kimyasal yapısını değiştirerek gerçekleştirmektedirler. pH artınca metallerin hareketliliği (mobilitesi) azalmaktadır. Bazı bitkiler de bu durumdan rizosferdeki pH'yı artırarak yararlanmaktadırlar (Kotrba ve ark., 2009).

Bu bariyerleri aşan ağır metaller hücre duvarına ulaşmaktadır. Kök hücre duvarı metal iyonları ile doğrudan temasta olup bu iyonların hücre duvarındaki Emilimi sınırlıdır. Bu

yüzden plazma membranında metal aktivitesinin çok fazla etkisi olmamaktadır. Ağır metalleri tolere edebilen bitkiler, bunları hücre duvarında depolamaktadırlar. Metal toleransına sahip olan *Silene vulgaris* subsp. *humulis* bitkisinde ağır metaller epidermal hücre duvarında bulunan protein ya da silikata bağlanarak depolanmaktadır (Hall, 2002).

Tolerans, ağır metal gibi stres faktörlerinin etkisini ortadan kaldırma, azaltma ya da onarmaya çalışmadır. Bitkilerin çevresel stres faktörlerine karşı toleransları bitki türüne, stres faktörüne, strese maruz kalma süresine ve strese maruz kalan doku veya organının yapısına bağlı olarak değişmektedir (Gür ve ark., 2004). Doku seviyesindeki (yara peridermisinin oluşumu gibi), subselüler seviyedeki değişiklikler (membran, kloroplast ve hücre duvarı modifikasyonlarının oluşumu gibi), antioksidan enzimlerin, stres proteinlerinin oluşumu ve fenol polimerlerin (sekonder metabolitlerin) seviyelerindeki değişiklikleri yaparak bitki tolerans gösterir.

Bitkide ağır metaller hem doğrudan, hem de serbest radikal oluşumuna sebep olarak dolaylı yoldan oksidatif strese neden olmaktadır. Oksidatif hasara karşı antioksidan enzimler ve bazı metabolitlerin mevcut stres dönemlerinde bitkilerin yaşaması için adaptasyonda rol oynadığı bilinmektedir (Giannakoula ve ark., 2010).

Ağır metal stresine maruz kalan bitkilerde reaktif oksijen türleri bitkiye zarar verecek düzeylere ulaşabilmektedir. Bu yüzden serbest radikallerin zararlarından kendilerini korumak için bitkiler bir antioksidan savunma sistemine sahiptirler (Shah ve ark., 2001). Bu anlamda karotenoidler enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemi olarak görev yaparken, singlet oksijen türlerini gidererek, lipid peroksidasyon ürünü olan lipid peroksil radikali ile reaksiyona girerek ve doğrudan serbest radikalleri süpürerek yüksek antioksidan aktivite gösterirler. Bu sayede fotosentetik yapıları korurlar (Mittler ve ark., 2004; Smirnoff, 2005; Dankov ve ark., 2009; Çulha ve Çakırlar, 2011).

2.3.1. Ağır metallere maruz kalan bitkilerin gösterdiği stratejilere göre sınıflandırılmaları

İndikatör bitkiler, yetiştirme ortamındaki metal konsantrasyonu ile orantılı olarak bu ağır metalleri toprak üstü dokularında biriktirmektedirler. Dokularda biriken metal toprağın

içerdiği metal miktarını göstermektedir. İndikatör türler çok küçük çevresel değişimlere duyarlı olan, çevre koşulları hakkında bilgi sağlayan ve erken uyarılarda bulunan türlerdir (Özdemir ve Demir, 2010).

Ekskluder bitkiler, geniş bir alandaki toksik metallerin alınımını sınırlamaktadırlar. Bu bitkiler ağır metallerle kirlenmiş toprakta ya toksik sınırların altında ağır metal bulundurmakta ya da yüksek konsantrasyondaki ağır metalleri daha çok köklerinde tutup toprak üstü kısımlara iletmemektedirler. Birçok ekskluder bitki kirlenmiş topraklarda çok az bir miktar bünyelerinde bulundurarak canlı kalmaktadırlar. Örneğin; *Silene vulgaris* Ni- ekskluder (Wenzel ve ark., 2003).

Bünyesinde toksik semptomları göstermeden topraktaki metal konsantrasyonunu yansıtan bitkilere akümülatör bitkiler denmektedir (Özdemir, 2009; Özdemir ve Demir, 2010). Akümülatör bitkiler, belirli ağır metalleri topraktaki konsantrasyonlarına göre daha yüksek oranda biriktirmektedirler. Topraktaki Cd konsantrasyonu bitkidekinden çok daha fazla olabilmektedir.

Toprak üstü organlarında topraktaki metal konsantrasyonundan 50 ila 500 kat daha fazla metal biriktirebilen bitkiler hiperakümülatör olarak adlandırılmaktadır (Demirezen ve Aksoy, 2004; Clemens, 2006).

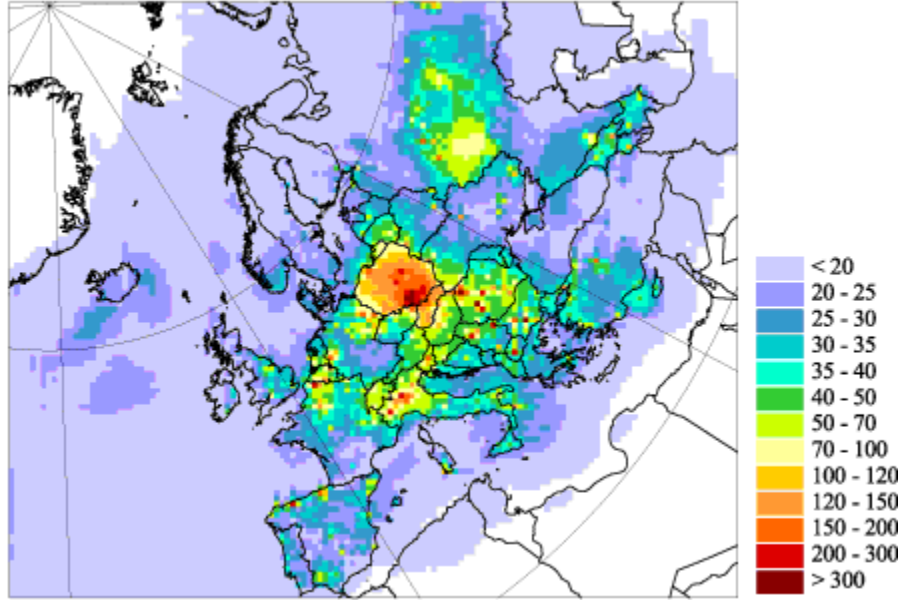
2.4. Cd Elementi

Ağır metaller grubuna giren Cd elementi önemli bir çevre kirletici olarak bilinmektedir. Cd kimyasal özellikleri, bitki tarafından alınması ve metabolik fonksiyonları bakımından çinkoya benzemektedir. Ancak çinkodan farklı olarak bitkiler, hayvanlar ve insanlar için toksik etkiye sahip bir elementtir (Garbisu ve Alkorta, 2001).

Cd, atom numarası 48, atom ağırlığı 112.41 g/mol, yoğunluğu 8.65 g/cm³, kaynama noktası 767°C ve erime noktası 321°C olan, gümüş renginde, yumuşak, işlenebilir ve doğada tek başına bulunamayan bir ağır metaldir. CdS, CdCl₂ ve CdSO₄, Cd tuzlarının başında gelir. Cd, çinko filizlerinin çoğunda bulunmaktadır ve çinko üretimi sırasında yan ürün olarak da elde edilmektedir (Kabata- Pendias ve Mukherjee, 2007).

Zehirlilik oranı yüksek olan Cd ve bileşikleri çevre kirliliğine sebebiyet vererek insan sağlığını tehdit etmektedir (Kahvecioğlu ve ark., 2001; Kabata- Pendias ve Mukherjee, 2007; Méndez-Armenta ve Ríos, 2007). Cd, ağır metaller içerisinde suda çözünme

özelliği en fazla olanıdır. Suda çözünmüş olarak bulunan Cd, besin zincirine katılıp tüm canlılarda birikime neden olmaktadır (Kayhan, 2006; DalCorso ve ark., 2008). Yapılan çalışmalar sonucunda günlük 40–50 µg Cd alınımının canlılara zarar vermediği tespit edilmiştir (Elson ve Hass 2001).



Şekil 2.1. Avrupa’da Cd Yayılmı (Kahvecioğlu, Ö., ve Ark. 2001)

Cd’un kullanım alanı oldukça geniştir. En sık kullanım alanları:

1. Paslanmayı önlemek amacıyla elektrolizle kaplama ve galvanizleme işlemlerinde,
2. Ni-Cd pillerinin yapımında,
3. Metallerin aşınmalara karşı korunması için kaplanmalarında,
4. Akülerde,
5. Plastik üretiminde sağlamlaştırıcı ve dayanıklılık arttırıcı olarak,
6. Seramik yapımı ve cam endüstrisinde,
7. Metal alaşımı hazırlanmasında,
8. Çinko, bakır ve kurşun cevherlerinin arındırılmasında,
9. Boya maddesi yapımında,
10. Ev eşyalarının, otomobillerin, zirai ve endüstriyel aletlerin, tutturucu özelliği olan malzemelerin (vida, çivi vb.) yüzeylerini kaplamada,
11. Fotoğrafçılıkta kullanılmaktadır (Murugavel ve ark., 2007).

Gübrelerin tarım topraklarına eklenmesi, endüstriyel faaliyetler, lağım atıkları, sigara izmaritleri ve atmosferik depozitler Cd'un toprağa geçmesine neden olmaktadır. Ayrıca mazot ile çalışan makineler, tarım alanlarına uzun süreli arıtma çamuru, çöp gübre uygulanması ve pestisitlerin kullanımı topraklarda Cd birikimine sebep vermektedir (Kirkham, 2006; Sekeroğlu ve ark., 2008).

2.4.1. Bitkilerde Cd

Toksik konsantrasyonlarda ağır metale maruz kalan bitkilerde bitkinin gelişiminde fizyolojik bozukluklar ve şekil bozuklukları gibi birçok değişiklik gözlemlenmektedir. Bu değişikliklerin bir bölümü morfolojik düzeyde iken önemli bir bölümünü saptayabilmek için biyokimyasal analizler uygulamak gerekmektedir (Lombardi, 2005).

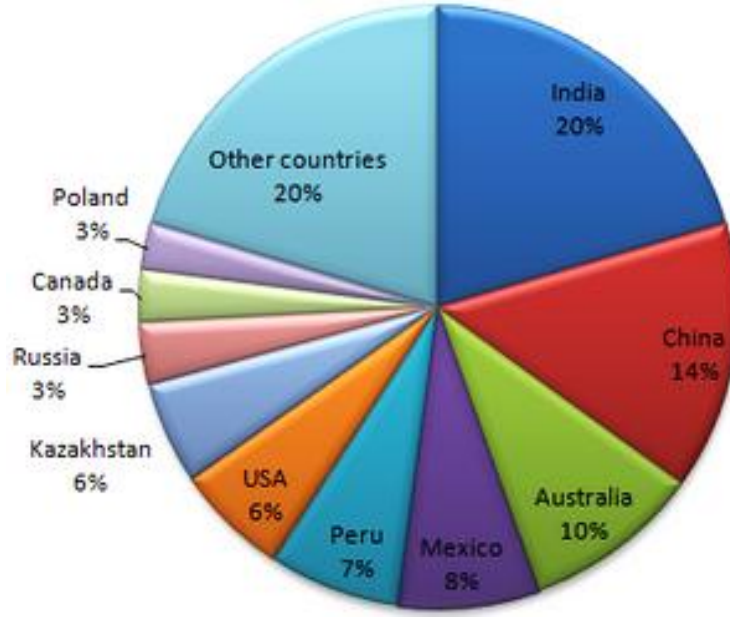
Cd içeriği bitkide genellikle en fazla kökte sonra gövdede sonra yaprakta sonra meyve ve tohumda tespit edilmiştir (Benavides ve diğ. 2005). Topraktaki Cd oranındaki artış bitkinin Cd alımını arttırmaktadır ve çok düşük konsantrasyonlardaki Cd bile bitkiler tarafından kolaylıkla alınmaktadır. Cd, bitkilerin kök, gövde ve yaprak gibi yenen kısımlarında birikmesi nedeniyle canlılar açısından oldukça tehlikelidir (Köleli ve Kantar, 2006).

Ağır metaller topraktan kökler vasıtasıyla alınmaktadır ve ilk zarar köklerdeki plazma membranında oluşmaktadır (Hall, 2002). Ağır metale maruz kalmış bitkilerin köklerinin normal bitki köklerine göre daha kısa olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yan köklerde artma ya da azalma ve saçak kök sayısında azalma gözlemlenebilmektedir. Ağır metale maruz kalan bitkide büyüme yavaşlarken kök ve gövdenin taze ve kuru ağırlıklarında azalma meydana gelmektedir (Köleli ve ark., 2004; Sharma ve ark., 2004; Chaoui ve Ferjani, 2005; Lombardi, 2005).

Cd, klorofil biyosentezinde görev alan protoklorofil reduktaz ve aminolevulinik asit sentezini engellemektedir. Bu nedenle aşırı Cd dozları klorofil biyosentezini bozar. Ayrıca ağır metaller, serbest radikal oluşumuna yol açarak tilakoid membran lipidlerinin oksidatif yıkımına neden olurlar ve klorofil yıkımını arttırarak klorofil sentezini engellemektedirler (Zengin ve Munzuroğlu, 2005).

Azot metabolizması enzimleri olan nitrat redüktaz ve nitrit redüktaz aktiviteleri Cd stresi durumunda azalmaktadır. Yapılan araştırma sonucunda Cd stresine maruz kalan

bitkilerin nitrat asimilasyonunu azalttığı tespit edilmiştir (Gouia ve ark., 2000). Chaffei ve ark. 2004, domates yaprak ve köklerine Cd uyguladıkları çalışmada, 50 μ M Cd uygulanan domates yaprak ve köklerinin nitrat içeriği kontrol bitkilerine göre %24 ve %62 oranında daha düşük saptanırken, toplam aminoasit miktarının arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 2.2. 2011 Yılındaki Dünyadaki Cd Rezervlerinin Ükelere Göre Yüzde Değerleri (Anonim 1)

2.4.1.1. Cd'un bitkilerde alınması

Toprakta ağır metaller kolloidlere tutunmuş, organik maddelere bağlı ve toprak çözeltisi içinde iyon halinde bulunurlar. Toprakta iyon halinde bulunan ağır metaller bitkilerin kökleri ile alınır diğerleri alınamaz. Koşulların değişmesi (pH, sıcaklık, organik madde miktarı, diğer metallerin varlığı, mikroorganizmalar vb.) toprak çözeltisi içindeki ağır metal konsantrasyonunu değiştireceğinden ağır metal alınımını da etkiler. Ağır metal alınımı, bitki türüne bağlı olarak da değişiklik göstermektedir. Bitkiler Cd'u farklı derecelerde alırlar. Mobil bir element olan Cd apoplastik (kök endodermis hücrelerinin duvarlarından) yol ile taşınmaktadır. Cd kök sitoplazmasına geçerek simplastik taşımayla floeme ve ksileme geçmektedir. Birçok ağır metalin köklerdeki konsantrasyonu topraktaki bitki dokularından daha yüksektir. Çünkü kök epidermal

hücrelerinin zarının iç kısmında oluşan -200 mV'luk negatif zar potansiyeli ağır metallerin alımına yardımcı olmaktadır.

Bazı durumlarda bir ağır metal diğer bir ağır metalin alımını arttırabilmekte ya da azaltabilmektedir (He ve ark., 2005; Lombardi, ve ark., 2005). Pb ve Cd gibi ağır metallerinin topraktaki ve bitkideki konsantrasyonunun artmasının, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu ve Zn gibi besin elementlerinin alınmasını ve kullanılmasını etkilediği bildirilmiştir (Sharma ve Dubey, 2005).

2.4.1.2. Cd'un bitkilerde taşınması

Ağır metaller, köklerden alınıp apoplastik ve/veya simplastik yolla ksileme ulaşmakta, ksilem ile gövde ve yapraklara iletilmektedir. Kökte bulunan endodermal hücre tabakası, ağır metallerin ksileme ulaşımını apoplastik yoldan engelleyen bir bariyer görevi yapmaktadır. Genellikle ağır metaller simplastik yoldan ksileme ulaşmaktadırlar (Tester ve Leigh, 2001).

Ksilem ile ağır metal iletimi bitki türüne ve metal çeşidine bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Cd iyon halinde ksilemde taşınmaktadır. ağır metallerin taşınmasını floemin, muhtemelen ağır metalleri bağlayabilen iyon ve moleküllere sahip protoplazma içermesi zorlaştırmaktadır (Greger, 1999; Peng ve ark., 2006).

Cd hücre zarının geçirgenliğini etkilemekte, su alımını ve hücre zarındaki ADPaz aktivitesini azaltmakta, fotosentezin karanlık evresinde karbondioksit fiksasyonu aşamasında görevli enzimlerin aktivitesini kısıtlamakta, klorofil biyosentezini inhibe etmekte ve lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır (Benavides ve ark., 2005). Cd köke girince organik asit ve fitokelatinler gibi bileşiklere bağlanmaktadır. Köklerde Cd tarafından Fe (III) redüktaz enziminin inhibisyonu Fe^{2+} eksikliğine sebep olmaktadır. Cd, gövdede nitrat redüktaz enzimini inhibe eder. Bu da nitrat absorpsiyonunu kısıtlar (Benavides ve ark., 2005). Cd toksitesi serbest radikal oluşumunu arttırarak ya da enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların oluşumunu azaltarak oksidatif strese neden olmaktadır. Oksidatif stres sonucu ortaya çıkan en önemli fizyolojik olay senesestir. Bitkilerde Cd birikimi sonucu klorofil miktarı etkilenmekte, peroksidaz aktivitesinde bir artış gözlenmektedir (Özden ve Bayçu 2004).

2.5. Genotoksisite

Organizmaların genomlarında, mutajenik veya karsinojenik maddelerin (kimyasal bileşikler, radyasyon vb.) meydana getirdiği değişikliklere genotoksisite denir. Toksik maddelerin hücre genomlarında meydana getirdiği değişimler, mutasyon olarak da isimlendirilir. Meydana gelen değişim onarılan veya onarılamayan bir hasara neden olabilir ve buna bağlı olarak yaşamsal faaliyetlerini etkileyebilir. Bitkiler yerlerinden hareket edemedikleri için çevresel kirliliğe ve mutajenik kimyasallara maruz kalma olasılığı yüksek canlılardır. Bu faktörler bitkiler üzerindeki genotoksik etkileri ile bitki genomlarında mutasyon oluşmasına sebep olmaktadır. Ağır metallerin artışına bağlı olarak hücre zarında, protein veya DNA gibi hücre bileşenlerinin yapısında zararlar oluşabilmektedir. Genotoksik zararların çeşitleri arasında DNA tek zincir kırılmaları, DNA çift zincir kırılmaları, kromozom ayrılmamaları, mikro çekirdek oluşumu (MN), nükleotid kayıpları veya eklenmeleri, DNA onarım mekanizmasında bozulmalar, fenotipik mutasyonlar, gen duplikasyonları, çerçeve kayma mutasyonları, kromozom kararsızlığı örnek verilebilir (Waisberg ve ark., 2003).

2.6. Bitki Besin Elementleri ve Önemi

Bitkilerin büyümesi ve gelişimi için bazı elementlerin mutlaka gerekli olduğu (esansiyel) belirlenmiştir. Bu elementler eksikliğinde bitkinin yaşam döngüsünü tamamlamasını engelleyen veya bir fizyolojik görevi olan elementlerdir (Epstein, 1999). Güneş ışığıyla birlikte bu esansiyel elementler verildiğinde bitki büyümesi için gerekli tüm maddeleri sentezleyebilir. Tablo 2. 1’de yüksek bitkilerin büyük çoğunluğu için gerekli olan elementler verilmektedir.

İnorganik maddeler, fotosentezde organik madde yapımında ve birçok metabolik olayda önemli görevler yapmaktadırlar. Bu yüzden bitki bünyesinde bulunan inorganik elementler besleyiciler veya besin elementleri olarak adlandırılmaktadırlar. Besin elementi içeriklerinin bitkilerde bilinmesi büyük önem taşımaktadır (Kaçar ve Katkat, 2007). Bitkilerin kullandığı besin maddeleri, bitkinin kullandığı miktarına göre makro ve mikro besin maddeleri olarak gruplandırılır. Makro besin maddeleri azot (N), fosfor (P), potasyum (K), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg) ve sülfür (S)’dür. Bitkiler bu besin maddelerini mikro besin maddelerine göre daha fazla miktarda kullanmaktadırlar.

Mikro besin maddelerine bitkiler makrolara oranla daha az ihtiyaç duymaktadırlar. Bu elementler demir (Fe), mangan (Mn), çinko (Zn), bakır (Cu), bor (B), molibden (Mo)'dir (Tucker, 1999; Hosier ve Bradley, 1999). Sodyum (Na) ve klor (Cl) elementlerinin ise bazı bitkiler için gerekli olduğu düşünülmektedir (Tucker, 1999). Tüm bu besin maddeleri arasındaki ilişkiler bir elementin diğerlerinin alımını artırması veya engellemesi açısından önemlidir. Bu elementlerin arasındaki dengenin bozulması bitkide kimyasal bir strese neden olabilir.

Tablo 2.1. Bitki besin elementleri (Epstein, 1972, 1999). ^a Makro besin maddelerinin değerleri yüzde olarak verilmiştir. Mikro besin maddelerinin değerleri milyonda bir kısım (ppm) olarak verilmiştir.

Element	Kimyasal Sembolü	Kuru maddedeki konsantrasyonu(% veya ppm) ^a	Molibdene göre nisbi atom sayısı
Sudan veya Karbon dioksitten elde edilenler			
Hidrojen	H	6	60,000,000
Karbon	C	45	40,000,000
Oksijen	O	45	30,000,000
Topraktan elde edilenler			
<i>Makro besin elementleri</i>			
Azot	N	1.5	1,000,000
Potasyum	K	1.0	250,000
Kalsiyum	Ca	0.5	125,000
Magnezyum	Mg	0.2	80,000
Fosfor	P	0.2	60,000
Sülfür	S	0.1	30,000
Silisyum	Si	0.1	30,000
<i>Mikro besin elementleri</i>			
Klor	Cl	100	3,000
Demir	Fe	100	2,000
Bor	B	20	2,000
Mangan	Mn	50	1,000
Sodyum	Na	10	400
Çinko	Zn	20	300
Bakır	Cu	6	100
Nikel	Ni	0.1	2
Molibden	Mo	0.1	1

Çalışmamızda Cd'un minerel element alımı ve taşınmasına etkilerinin araştırıldığı besin elementleri olan potasyum, kalsiyum, magnezyum, demir, bakır, bor ve sodyumun bitkilerdeki görevleri, eksiklikleri durumunda bitkilerde ortaya çıkan morfolojik ve fizyolojik değişiklikler alt başlıklarla belirtilmiştir.

Bor: B elementi, bitkiler tarafından borik asit formunda alınmaktadır. 1923 yılında bitki için gerekli olduğu keşfedilen B'un bitki bünyesindeki fonksiyonları günümüze kadar yapılan çalışmalarla anlaşılmaya çalışılmaktadır. B'un bitkide hücre duvarı sentezinde, şekerlerin taşınmasında, membran permeabilitesinde, karbonhidrat ve protein metabolizmasında, solunumda, oksin ve fenol metabolizmasında olmak üzere birçok görevi vardır (Kaçar ve Katkat, 1998). B'un hücre uzamasında, zar işlevlerinde, nükleik asit sentezinde ve hormon tepkilerinde rol oynadığı bilinmektedir (Shelp, 1993). B eksikliğinde bitki hücre duvarında şekil bozuklukları kök uzamalarında gerileme ya da durma ve köklerin çalılışmış bir görünüm alma durumu, genç yaprak ve tepe tomurcuklarında siyah nekrotik lekeler görülmektedir. Bitki gerek duyulan B'un fazlasını alınca da bitkinin gelişmesi olumsuz etkilenmekte (Harite, 2008) ve gelişme çoğu kez durmaktadır (Karaömerlioğlu, 2011).

Kalsiyum: Ca hücre duvarında değişebilir formlarda ve plazma membranının dış yüzeyinde bulunabilen, kolaylıkla apoplastlara girebilen bir bitki besin maddesidir (Öktüren ve Sönmez, 2005). Ca, hücre duvarı ve bitkinin yapısı için oldukça gerekli bir makro elementtir (White ve Broadley, 2003). Hücre duvarlarında mevcut Ca'un yaklaşık %90'ı bulunmaktadır. Ca, bitki hücrelerini bir arada tutan kohezyon etmeni olarak görev yapmaktadır. Ca, bitkilerde kalsiyum pektat şeklinde bulunarak çeperin önemli bir yapıtaşını oluşturmaktadır. Yeteri kadar Ca olmazsa, hücre çeperinin orta lameli dolayısıyla çekirdek bölünmesi olsa dahi yeni hücre çeperi oluşmamaktadır. Kalsiyum, köklerin ve sürgünlerin gelişimini, gövde uzamasını, damarların gelişimini (Matschi ve ark., 2013) yaprakların uzun süre dayanıklılığını bu sayede fotosentezin devamlılığını sağlamakta azot metabolizmasında ve karbonhidratların taşınmasında, bitkinin büyüme ve gelişme merkezi düzenleyicisi olarak görev almaktadır (Hepler, 2005). Ca eksikliği genç yapraklarda kloroza sebep olmaktadır. Ca'un şiddetli eksikliğinde ise yapraklarda nekrozlar da görülmektedir. Dış stres etmenlerinin algılanmasını böylece bitki savunma mekanizmasının işlemlerini sağlamaktadır. Örneğin; tuza toleransın arttırılmasında Ca'un önemli bir rolünün olduğu pek çok

çalışmada ortaya konmuştur (Navarro ve ark., 2000; Türkmen ve ark., 2002; Parida ve Das, 2005; Tuna ve ark., 2007; Akat ve Özzambak, 2013).

Bakır: Cu, bitki, hayvan ve insan dâhil bütün canlılar için mutlak gerekli bir elementtir. (Güler ve Çobanoğlu, 2001). Bakır, Cu^+ 'dan Cu^{2+} 'ya oksitlenen redoks olaylarında görev alan enzimlerle alakalıdır. Fotosentezde ışık reaksiyonlarında elektron taşıyan plastosiyanin bu enzimlere örnektir (Haehnel, 1984). Bitkinin kök dokularında daha fazla birikme eğiliminde olan Cu'nun, gövdeye iletimi çok daha az olmakta (Kartal ve ark., 2004) ve bitkiler için Cu eser miktarda gerekmektedir. Cu, eksikliğinde başlangıç belirtiler olarak nekrotik benekler önce genç yaprakların uçlarında belirmekte, ardından yaprak kenarları boyunca ilerleyip yaprağın tabanına ulaşmaktadır. Cu'nun bitkide azlığında, stres; fazlalığında ise klorozis, nekrozis, büyüme inhibisyonu gibi sorunlar görülmekte, Cu hücrelere toksik etki yapmaktadır (Marschner, 1995; Clemens, 2001). Cu'nun şiddetli eksikliğinde yapraklar olgunlaşmadan dökülmektedirler. Ayrıca, toksik seviyelerde; kök kütikulasında kalınlaşmalar, köklerde büyümenin baskılanması, yan kök oluşumunda azalma ve koyu renkli benekler oluştuğu gözlenmektedir (Kartal ve ark., 2004).

Demir: Fe, dünya üzerinde oldukça bol bulunan bir element olmasına rağmen, çok kararlı olup suda çözünmez. Bitkiler bu elementi alabilmek için çeşitli yollar geliştirmişlerdir (Walker ve Connolly, 2008; Palmer ve Guerinot, 2009; Long ve ark., 2010). Fe, bitkilerde önemli fizyolojik işlevleri olan ve pek çok biyokimyasal tepkimeyi katalize eden enzimleri aktive eder (Kacar ve Katkat, 1998; Curie ve Briat, 2003). Fe eksikliği dikotiledon bitkilerde birçok morfolojik ve fizyolojik olaya sebep olmaktadır. Biber ve bezelye gibi bitkiler Fe eksikliğinde daha fazla etilen üretmektedirler. Bu da kök saçaklarının gelişimini ve köklerin diğer morfolojik özelliklerini değiştirmektedir (Schenkeveld ve ark., 2007).

Fe, bitkide mobil bir element olmadığından yaşlı yapraklardan genç yapraklara aktarılamaz bu sebepten Fe eksikliği belirtileri öncelikle genç yapraklarda ve özellikle de son çıkan yapraklarda gözlenmekte, eksiklik devam ederse yaşlı yapraklar da etkilenmektedir.

Protein sentezinde Fe çok önemlidir. Yeterli miktarda Fe içermeyen bitkilerde protein miktarının azaldığı, buna karşın çözünebilir organik azotlu bileşiklerin arttığı gözlenmiştir (Kaçar ve Katkat, 2007).

Bitkilerde Fe alımını azaltan faktörler uzun süreli sulama, aşırı yağışlar, toprağın çok sıkı olması, yüksek pH' lı veya Cu içerikli topraklar, çok fazla metal iyonları içeren topraklar, düşük K düzeyine sahip topraklardır. CO₂ topraktaki kirecin çözünmesinde çok etkilidir. Havasız koşullar toprak içerisinde CO₂ oluşumuna neden olarak, bitkide dolaylı olarak Fe eksikliğine yol açar. Toprakta fazla miktarda ağır metal olması da Fe eksikliğine yol açmaktadır. Örneğin yüksek Cu, Mn ve Zn miktarlarının Fe alımını azalttığı bilinmektedir (Yılmaz, 2004).

Potasyum: K, bitkilerde fotosentez reaksiyonlarında, osmotik potansiyelin ayarlanmasında, stomaların açılıp kapanma mekanizmasının düzenlenmesinde, bitki besin elementlerinin ve fotosentez ürünlerinin taşınmalarında, enzim aktivitesinde, hücre bölünmesinde rol oynar (Kaçar, 2006). K, kök sisteminden suyun alınmasını ksilem taşıma sistemine iletilmesini sağlar. K iyonunun alınmasıyla stomalar açılmakta, boşalımı ise stomaların kapanmasını sağlamaktadır. Bitkiler yeteri kadar K alıyorsa suyu idareli kullanabilmekte ve üretim yüksek olmaktadır (Fırat, 1998). K, soğuğa, donlara, kuraklığa toleransı, azotun etkinliğini, hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılığı, meyvenin dayanma ömrünü, meyvedeki yağ, şeker ve nişasta miktarını artırır (Tucker, 1999; Bozcuk, 2000). Gıda ve yem bitkilerinin protein değerlerini yükseltmek için K kullanılır (Kaçar, 2006). Diğer besin elementlerine göre bitkiler K' u daha fazla almaktadırlar. Kıbağ ve Munzuroğlu (2003), baklagillerdeki K içeriğinin baklagil olmayanlara oranla daha fazla olduğunu belirtmektedir.

K, hareketli bir element olduğundan yapraktan yaprağa hareket edebilmektedir. Bitki K' u yeteri kadar alamıyorsa klorozis görülmektedir. K' un bitkinin yaşlı kısımlarından genç ve yeni gelişmekte olan kısımlarına taşınmasından dolayı klorozis öncelikle yaşlı yapraklarda, eksikliğin devamı halinde genç yapraklarda görülmektedir. K' un aşırı eksikliğinde yapraklar aşağı doğru kıvrılmakta, yaprak kenarları rulo şeklini almaktadır ve beslenemediği için yapraklar küçük kalmaktadır. Tahıllarda taneler zayıf ve az sayıda olmakta, mısır bitkisinin köklerinin toprakta bulunan, kökleri çürüterek zarar veren zararlılara karşı gösterdiği direnç azalmakta, gövde yere eğilmektedir (Bozcuk, 2000).

K eksikliği genç bitkilerde gövdenin zayıf olmasına, köklerin zarar görmesine bundan dolayı bitkinin kolaylıkla yere devrilmesine neden olmaktadır. (Aybak, 2005). K azlığında protein metabolizması ve buna bağlı olarak karbonhidrat metabolizması bozulmakta, bitkiler bu durumda ihtiyacından fazla karbonhidrat depolamaktadır. Bunun sebebi proteinlerin yapısına katılacak olan C iskeleti karbonhidrat olarak depo edilmektedir (Bozcuk, 2000).

Magnezyum: Mg toprakta iyonik halde (Mg^{2+}) bulunan mobil bir element olup, makro element olarak bitkiler için çok önemlidir. Bitkide bulunan birçok enzimin aktivitesinde Mg kofaktör olarak görevlidir. Mg, DNA ve RNA sentezinde, fotosentezde klorofilin yapısında bulunarak organik bileşiklerin sentezinde, bitki metabolizmasının enerji kaynağı olan solunumda ATP üretiminde, bitkilerin fosfor alımında görevlidir (Elmlund ve ark., 2008; Müller ve Hansson, 2009; Kacar ve Katkat 2010). Mg'un hücre sel savunma reaksiyonlarını aktive ettiği düşünülmektedir. Yapılan bir çalışmada, Mg gübrelemesinin *Solanum tuberosum*'da (patates) *Phytophthora infestans* ve *Rhizoctonia solani* enfeksiyonunu, *Triticum* sp. (buğday) bitkisinde pas hastalığını azalttığı gözlenmiştir. K/Mg oranındaki Mg'un azalması sonucu asmalarda "stem dieback" hastalığı oluşmaktadır (Uçgun ve Gezgin 2008). Mg eksikliği belirtileri öncelikle yaşlı yapraklarda gözlenmekte, bu yaprakların damarları arasında klorozis olmakta, kök gelişimi olumsuz etkilenmekte, verim ve kalite düşmektedir. Eksikliğin en ayırıcı belirtisi yaprak damarları arasında görülen sararmalardır. Şiddetli noksanlıkta yapraklar sarı beyaz olabilmekte, olgunlaşmamış yapraklar dökülmektedir. Mg eksikliğinde ayrıca yapraklar ışığa karşı hassas oldukları için erken dökülmektedirler. (Marschner 2008).

Sodyum: Sodyum bitkiler tarafından kökleri ile topraktan Na^+ iyonu olarak pasif şekilde alınmakta, ksilem ve floemde taşınmaktadır. Na hareketli bir elementtir ve bitkinin her yerinde bulunur, özel bir depolanma yeri yoktur. Na potasyuma kimyasal olarak benzer (Kaçar ve Katkat, 2007) ve genellikle Na'un potasyumla olan rekabeti nedeniyle Na, K noksanlığına neden olabilmektedir (Kaya ve ark., 2002). Bitkilerde element bağlama Na ile özellikle K ve Ca gibi elementlerin rekabete girmesinden dolayı Na/K ve Na/Ca dengesi hızla bozulmaktadır. Na bu elementlerin topraktan alınımı ve bitkisel dokularda taşınımını azaltmaktadır. Bu durum K eksikliğine sebep olmakta, bitkide osmoregülasyonu bozmakta, enzimlerin aktivasyonunu engellemektedir.

Sonuçta da metabolizma olumsuz etkilenmektedir. Bitkinin stresten etkilenme derecesini azaltmak için bitkiye dışarıdan K takviyesi verilmektedir (Cramer, 2002).

Toprakta çok fazla miktarda Na bulunması bitkilerde Na'un kök merkez silindiri ile gövde dokularında birikmesine neden olmakta, bu durum da bitkinin su almasını ve suyu taşımasını engellemektedir (Fırat, 1998).

Bitkiler için toprakta önemliliklerine göre katyonlar, $Ca^{2+} > Mg^{2+} > K^+ = Na^+$ şeklinde olmaktadır. Na toprakta Na bileşikleri halinde çözülmüş olarak bulunur. Bu bileşikler NaCl, $NaNO_3$, boraks, albit ve diorittir (Kaçar ve Katkat, 2007).

Fasulye bitkisi yüksek Na içeren veya tuzluluk problemi olan topraklarda yetiştirildiğinde bitkide büyümede durgunluk, yapraklarda yanıklık ve hassas çeşitlerde ölüm meydana gelebilmektedir. Bu sorunlar özellikle çimlenme ve fide gelişimi esnasında olmaktadır. Bu yüzden bitkiler önemli ölçüde cılız gelişim göstermektedirler. Suyun önemi ve kullanımı toprakta birikmiş tuz problemi olduğunda daha da artmaktadır (Aybak, 2005). Kaçar ve Katkat (2007), Na miktarının buğday ve yonca bitkilerinde %0.15, genç fasulye bitkisi yapraklarında %0.40 ve arpa bitkisinde %0.40 toksik etki yapacak düzeyler olduğunu saptamışlardır.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. *Bryophyllum daigremontianum* Raym.-Hamet & H. Perrier Bitkisinin *in vitro* Ortamda Gelişimi

Çalışmada kullanılan *Bryophyllum daigremontianum* Raym.-Hamet & H. Perrier örnekleri tek bir ana bitkiden aynı dönemde izole edildi (Şekil 3.1. a). Anne bitkiye ait yaprakların üzerinde gelişen yavru bitkicikler önce distile su ile beş kez yıkanıp kurutma kâğıtları arasında kurutuldu, daha sonra nemlendirilmiş süzgeç kâğıtları üzerine yerleştirilip cam petriler içinde gelişime bırakıldı (Şekil 3.2. b) ve iki hafta süre ile günde 20 ml Hoagland besleyici solüsyonu ile sulandı (Hoagland ve Arnon, 1952). Tüm bitkiler 23 ± 2 °C sıcaklıkta, % 55 $\pm$ 5 nemlilikte, 4000 - 4200 lux arası ışık şiddetine sahip bitki yetiştirme odasında 14 saat gündüz ve 10 saat gece periyodunda yetiştirildi. İki hafta sonra genç bitkicikler içinden boyca birbirine yakın olan 80 birey seçildi ve 161.5 g toprak (Gardol® marka) içeren 10 cm çaplı ve 19.5-20 g ağırlığındaki plastik saksılara transfer edildi.



Şekil 3.3. a) Çalışmada Kullanılan Anne Bitki, b) Anne Bitkiden İzole Edilen ve Gelişime Bırakılan Genç Bitkicikler.

Hoagland çözeltisini hazırlamak için kullanılacak olan mikroelementler 2.86 gr H_3BO_3 , 1.86 gr $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.11 gr $ZnCl_2$, 0.05 gr $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ve 0.025 gr $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 1 litre distile suda çözündürüldü. Sonra 5.22 gr EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit) 53.6 ml 1N KOH içinde çözülüp bu karışıma 4.98 gr $FeSO_4/H_2O$ konularak distile su ile 200 ml'ye tamamlandı ve FeEDTA hazırlandı. En son 5 ml 1 M $Ca(NO_3)_2$, 5 ml 1 M

KNO_3 , 2 ml 1 M MgSO_4 , 1 ml KH_2PO_4 ile 2 ml FeEDTA ve 1 ml mikro element sırasıyla eklenerek 1 litre distile suya tamamlandı ve Hoagland çözeltisi elde edildi.

Saksılara yerleştirilen genç bitkicikler iki hafta boyunca (ikinci yaprakları gelişinceye kadar) yine 20 ml Hoagland solüsyonu ile gūnaşırı sulandılar. Daha sonra 80 birey, biri kontrol grubu olmak üzere 5 farklı deney grubuna ayrıldı ve kontrol grupları deney sonuna kadar Hoagland solüsyonu ile deney grupları ise 50, 100, 200 ve 400 μM CdCl_2 içeren Hoagland solüsyonu ile gūnaşırı 2 ay boyunca sulandılar. İki aylık Cd uygulaması sonucunda bitkiler hasat edildiler. Bazı büyüme parametreleri (gövde uzunluğu ve kalınlığı, yaprak yüzey alanı, kök, yaprak ve gövdeye ait yaş ve kuru ağırlıklar), fotosentetik pigmentler (klorofil a, b, toplam klorofil, klorofil a/b ve karotenoidler), bazı mineral besin elementleri (Fe, Mg, Ca, Cu, Na, K ve B) ile kök, gövde ve yapraktaki Cd miktarları ölçüldü. Genotoksisite çalışmaları RAPD tekniğiyle analiz edildi.



Şekil 3.4. Bitki Büyüme Odasında Gelişmeye Bırakılan Bitkiler

3.2. Büyüme Parametrelerinin Ölçülmesi

Hasat işleminden sonra, kontrol ve deney gruplarına ait bitkilerde kök, gövde ve yapraklara ait yaş ağırlıklar hassas terazi ile ölçüldü. Kök ve gövde uzunlukları cetvel yardımı ile ölçüldü ve ortalama değerler hesaplandı. Kuru ağırlık tayini için kök, gövde ve yaprak örnekleri 80 °C'lik etüvde 48 saat boyunca bekletildi ve hassas terazi ile kuru

ağırlıklar ölçüldü. Yaprak yüzey alanı “leaf hunter®” programı ile taze yapraklar kullanılarak hesaplandı.

3.3. Fotosentetik Pigmentler

3.3.1. Klorofil a-b, a/b, toplam klorofil ve karotenoid miktarlarının belirlenmesi

Toplam klorofil miktarının belirlenebilmesi için kontrol ve deney grubu bitkilerine ait yaş yaprak örneklerinden 0.5 g tartıldı. Daha sonra üzerlerine bir miktar kalsiyum karbonat (CaCO₃) ve 15 ml %80’lik (hacim/hacim) aseton ilave edildi ve buz kalıbı üzerine yerleştirilmiş soğuk havan içerisinde parçalandı. Parçalanmış dokular (homojenat) 3000 X g’de +4 °C’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra elde edilen üst sıvının hacmi ölçüldü ve içerdiği toplam klorofil-karotenoid miktarının belirlenebilmesi için 645, 663 ve 470 nm dalga boylarına ayarlanmış spektrofotometrede absorbansları ölçüldü. Arnon (1949)’a göre örneklerin 1 litresindeki total klorofil miktarları mg cinsinden aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$C_a = [12.7 \times D_{663} - 2.69 \times D_{645}] \times \frac{\text{ml}}{1000}$$

$$C_b = [22.9 \times D_{645} - 4.68 \times D_{663}] \times \frac{\text{ml}}{1000}$$

$$\text{Total C} = [20.2 \times D_{645} + 8.02 \times D_{663}] \times \frac{\text{ml}}{1000}$$

$$C_{x+c} = \frac{1000 A_{470} - 1.90 C_a - 63.14 C_b}{214} \times \frac{\text{ml}}{1000}$$

3.4. Cd Akümülayonu ve Mineral Besin Elementlerinin Tayini

İki ay kontrol ve boyunca dört farklı konsantrasyonda (50, 100, 200 ve 400 µM) CdCl₂ ile muamele edilen *B. daigremontianum* bitkilerinin kök, gövde ve yapraklarındaki Cd akümülayonu ve buna bağlı olarak Fe, Mg, Ca, Cu, Na, K ve B elementlerinin bitkideki miktarları aşağıda temel özellikleri anlatılan ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometers) cihazı ve tekniği ile ölçüldü.

3.4.1. ICP (Inductively Coupled Plasma) tekniği

Son yıllarda, analiz için örneklerin atomlaştırılması ve oluşan atomların uyarılması amacıyla kullanılan, elektriksel boşalımına dayanan Atomik emisyon spektroskopisi, yerini plazmalara bırakmıştır. ICP tekniğindeki plazma argon gazı ile oluşturulur. ICP torch'u üç kuartz tüpten oluşur. Çoğunlukla argon olan inert bir gaz tübe doğru akar. Bu akıcı gaz plazmayı destekleyen gaz olarak ve kuartz tüp için bir soğutucu görevi yapar. Plazma elektromanyetik olarak, argon gazının indüksiyon sarımlarında bir radyo frekans jeneratörünün etkileşmesi ile elde edilir. Radyo indüksiyon jeneratörünün gücü 27 veya 41 Mhz de 0.5-2 kw'tır. Argon gazı akımında ilk elektronların oluşturulması, bir elektron kaynağı ile sağlanır ve argon atomları ile çarpışır böylece argon iyonları daha fazla sayıda elektronun oluşmasını sağlar. Bu etkileşim sonucunda iyonlar ve elektronlar aynı yöne doğru akmaya başlar. Ortamın bu akmaya karşı gösterdiği direnç ile ortamın sıcaklığı 10000 K'e (+ 273°C) kadar yükselir. Plazmanın içine giren örnek çözeltisi, atomlaşır ve uyarılır. ICP yönteminin avantajları; yüksek sıcaklıklara ulaşabilmesi, plazma sıcaklığı her bölgede aynıdır ve bu nedenle self absorpsiyon ve self dönüşüm etkileriyle karşılaşılması, örnek çözeltinin plazma içersinde oldukça uzun alıkonma süresine sahip olması ve atomlaştırılması, uyarma işlemlerinin inert kimyasal çevrede gerçekleştirilmesidir. Alevin kullanıldığı absorpsiyon ve emisyon spektroskopisi yöntemlerinde, oksijenin yüksek kısmi basıncı nedeniyle, toprak alkali elementleri, nadir toprak elementleri ve bor, silisyum gibi bozunmayan oksit ve hidroksit radikaller oluşturan elementlerin analizinde duyarlılık düşüktür. Fakat argon gazı ile oluşturulan plazmada böyle bir sorun yoktur. ICP yöntemi ile ise, aynı anda analizi mümkün olan tüm elementlerin nitel ve nicel tayinleri yapılabilir (Yıldız, 1993; Hou ve Jones, 2000).

Plazmada oluşan atom ve iyonların emisyonu değişik şekillerde ölçülebilir. ICP-OES (İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektroskopisi) cihazları, sırayla; ölçüm yapanlar (İng.: sequential) ve aynı anda ölçüm yapanlar (İng.: simultaneous) olmak üzere iki bölümde incelenebilir. Bizim çalışmamızda Perkin Elmer marka ICP-OES Optima 7000 DV kullanılmıştır (Şekil III.7.)



Şekil 3.5. ICP-OES Cihazı

3.4.2. Laboratuvar çalışmaları

B. daigremontianum bitkilerinin kontrol ve deney gruplarına ait kök, gövde ve yapraklarındaki Cd akümüasyonu ve buna bağlı olarak Fe, Mg, Ca, Cu, Na, K ve B elementlerinin ölçülmesi için seçilen bitki kısımları çürüme ve kontaminasyonu önlemek için bitki örnekleri (kök, gövde ve yapraklar) kurutma kâğıtlarından yapılmış zarflara konularak 80 °C sıcaklıkta çalışan etüvde 24 saat bekletildi. Kurutma işleminden sonra örnekler, Cd ve diğer mineral besin elementlerin dağılımını homojenize etmek için öğütücü ile öğütülüp, 1.5 mm'lik elekten geçirildi. Her işlem öncesi, öğütücü aparatları ve ince elek muhtemel bir kontaminasyonu engellemek için %96'lık etil alkolle temizlendi, daha sonra distile sudan geçirilerek kurulandı. Öğütülen örnekler, etiketlenerek kilitli plastik poşetlere konuldular.

Ağır metal ve mineral besin elementlerinin tayini için ön analiz çalışmaları, Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne ait Araştırma Laboratuvarları'nda yapılmıştır. Kök, gövde ve yaprak örnekleri hassas terazide tartılarak çözme sistemindeki teflon hücrelere konulmuştur. Çalışmamızda kapalı sistem mikrodalga çözme sistemi kullanılarak, hassas terazide tartılan kök, gövde, yaprak ve

toprak örnekleri sıvılaştırılmıştır. Çözme işleminde yüksek sıcaklığa ve basınca dayanıklı teflon kaplar kullanılmıştır.

Bitki örneklerinden 0.2 gram tartılarak teflon hürelere (vessel) konuldu. Daha sonra üzerlerine 8 ml. HNO_3 ilave edilip, Erghof marka Mws2 model mikrodalga fırında kademeli olarak önce 145 derece 5 dakika, 165 derece 5 dakika ve son olarak 175 derece 20 dakika ile çözme işlemi yapıldı. Hücreler mikrodalgadan sonra oda sıcaklığında su banyosunda 20 dakika soğumaya bırakıldı. Hücreler ultrasaf su ile yıkanarak 50 ml'lik falcon tüplere 50 ml oluncaya kadar süzülerek aktarıldı. Merck marka 1000 ppm'lik multi element kullanılarak hazırlanan standart çözeltiler ile element tayin işlemleri için Perkin Elmer marka ICP-OES Optima 7000 DV ile analizleri Bahçeşehir Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü Laboratuvarı'nda yapıldı.

Çalışmamızda Cd'a ilaveten Fe, Mg, Ca, Cu, Na, K ve B elementlerinin tayini yapılmıştır. Analizler için kullanılan dalga boyları, Cd 228.802, Fe 238.204, Mg 285.213, Ca 317.933, Cu 327.393, Na 589.592, K 766.490 ve B 249.677'dir.

3.5. İstatistik Analizler

Yetiştirme odasında her deney grubuna ait 8 er örnek tamamen rastlantısal olarak yerleştirilmiş ve her ölçüm sonunda aynı metoda göre geri konulmuştur. Örneklerle ait büyüme parametreleri ve ağır metal ve mineral besin element miktarları oranları SPSS (11.5 for windows) programı ile Paired-Samples T Test (Çiftli örnekli T test) uygulanarak, %95 güvenirlik ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Programdan elde edilen ortalamalar ile hazırlanan şekillerde hata çubukları halinde gösterilmiştir.

3.6. Kadmiyum Stresinin Genotoksik Ölçümü

Çalışmamızda, kontrol grubuna ait ve dört farklı konsantrasyonda (50, 100, 200 ve 400 μM) CdCl_2 ile muamele edilen *B. daigremontianum* bitkilerinde Cd stresinin genotoksik olarak belirlenmesi RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) tekniği kullanılarak yapıldı.

3.6.1. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) tekniği

Çalışmamızda kontrol ve deney grubu bitkilerde DNA'daki değışimler tespit edilirken moleküler markör (belirteç) tekniklerinden olan RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) kullanıldı. RAPD ilk defa 1990 yılında rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nu (Polymerase Chain Reaction) temel alan bir teknik olarak ortaya çıkmıştır (Williams ve ark., 1990; Welsh vd., 1990). RAPD yönteminin temel prensibi ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 9-10 bp (baz çifti) oligonükleotidin (primer), düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanarak Polimer Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltma yapmasıdır. Tekniğın devamında elde edilen çoğaltma ürünü radyoaktif olmayan standart jel elektroforezinde yürütölür ve çoğaltma ürünleri bantlar halinde gözlemlenerek incelenir (Weising ve ark., 1995).

RAPD metodunun güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini etkileyen pek çok farklı çoğaltma değışkeni vardır ve en önemli değışkenlerden birisi hedef DNA'dır. MgCl₂ konsantrasyonu, Taq DNA polimeraz konsantrasyonu, primer konsantrasyonu, dNTP konsantrasyonu ve primer bağlanması RAPD tekniğini etkileyen diğerk temel değışkenlerdir (Aydın, 2004). RAPD çalışmaları *in vivo* ve *in vitro* koşullarda meydana gelen DNA zararlarının ve değışimlerinin tespitinde, karsinojenik instabilite analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, RAPD tekniğinde çok az miktarda DNA ihtiyacı olması, tek primer kullanılması, çok gelişmiş cihaz gerektirmemesi ve pahalı bir teknik olmaması genetik çalışmalarında avantaj oluşturmaktadır (Atienzar ve Jha, 2006).

3.6.2. Laboratuvar çalışmaları

DNA izolasyonu Dneasy bitki DNA izolasyon kiti (Qiagen) prosedürü uygulanarak elde edilen DNA'ların konsantrasyonlarının ve bant profillerinin belirlenmesi için %2 agoroz jel hazırlandı ve standart gen cetveli (GeneRuler™ 100bp, MBI Fermentas) ile karşılaştırıldı. RAPD-PCR çoğaltması 25 µl PCR karışımı, 1 x PCR tamponu (NH₄)₂SO₄, 0.2 mM dNTP (2 mM dNTP karışımı), 25 pM OPA-08 5'CCACAGCAGT 3' (QIAGEN Operon RAPD® 10 mer Kits) primeri, 20-200 ng genomik DNA, 0.5 ünite

Taq DNA polimeraz ve distile su ile 25 µL'ye tamamlanarak hazırlandı. PCR reaktifleri MBI Fermentasdan temin edildi.

Tüm reaksiyon bileşenlerini içeren tüpler, DNA dışında, her reaksiyon için kontrol olarak alındı. Çoğaltmalar Techne Endurance TC-512 Gradient Thermal Cyclers'da, 95°C'de (genomic DNA'nın başlangıç denatürasyonu) 3 dakika için programlandı, ardından 45 devir 94°C'de (denatürasyon) 1 dakika, 37°C'de (primer bağlanma sıcaklığı) 1 dakika, 72°C'de (uzama) 2 dakika ve 72°C'de (final uzatma basamağı) 5 dakika olarak uygulandı.

4. BULGULAR

4.1. Cd Stresinin *Bryophyllum daigremontianum* Raym.-Hamet & H. Perrier Bitkisi Büyüme Parametreleri Üzerine Etkisi

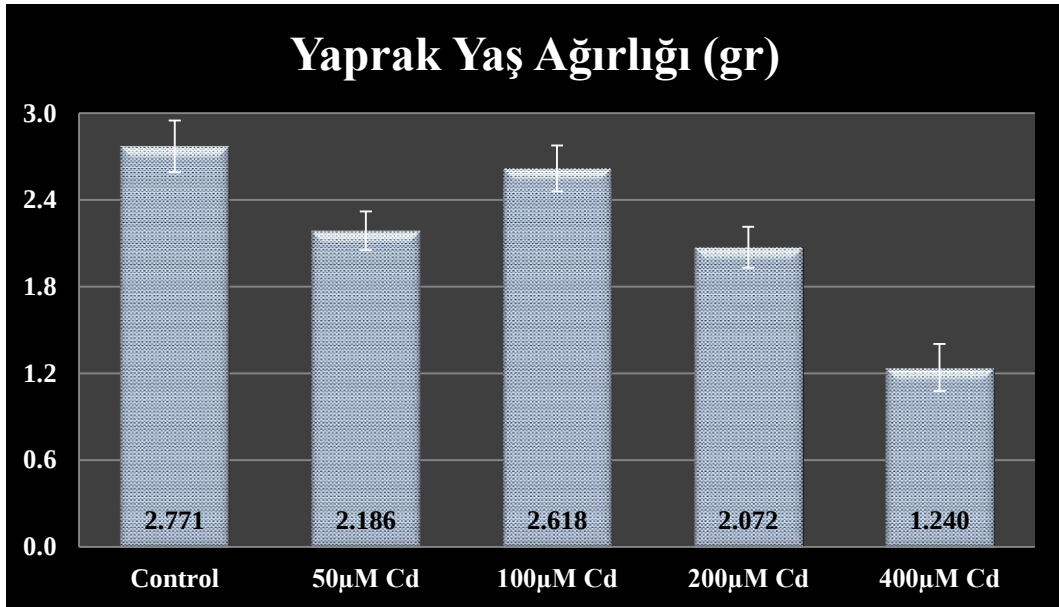
Cd stresinin *B. daigremontianum* bitkisinde büyüme ve gelişme parametreleri üzerinde yaptığı etkilerin belirlenmesinde gövde uzunluğu ve kalınlığı, kök, gövde ve yaprak yaş ve kuru ağırlıkları yanında toplam yaprak alanı ölçümleri alınmıştır. Bitkiye ait büyüme parametreleri Tablo 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda (50, 100, 200 ve 400µM) Cd uygulanmış bitkiler ve Cd uygulanmamış kontrol grubu bitkisi (Resimdeki bireyler deney gruplarındaki ortalama bitkilerden seçilmişlerdir)

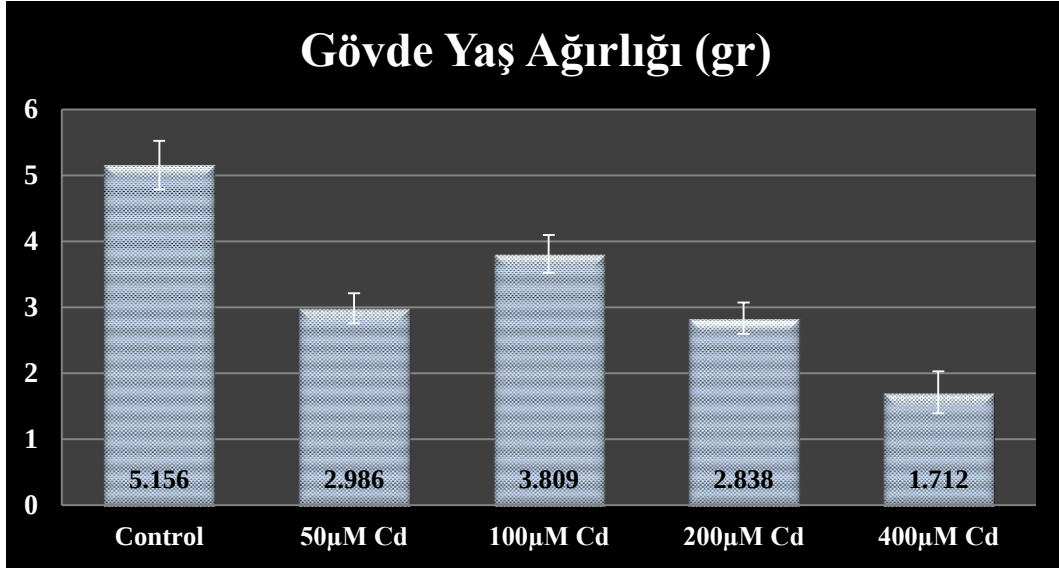
Tablo 4.1. *Bryophyllum daigremontianum* Raym.-Hamet & H. Perrier Bitkisinin Büyüme Parametreleri

Parametreler	Kontrol	50 μ M	100 μ M	200 μ M	400 μ M
Yaprak yaş ağırlığı (gr)	2.771	2.186	2.618	2.072	1.240
Gövde yaş ağırlığı (gr)	5.156	2.986	3.809	2.838	1.712
Kök yaş ağırlık (gr)	0.332	0.253	0.292	0.246	0.161
Yaprak kuru ağırlık (gr)	0.088	0.075	0.078	0.055	0.019
Gövde kuru ağırlık (gr)	0.331	0.199	0.251	0.176	0.106
Kök kuru ağırlık (gr)	0.074	0.056	0.065	0.041	0.031
Gövde kalınlığı (cm)	0.400	0.264	0.326	0.216	0.128
Gövde boy uzunluğu (cm)	18.538	15.138	16.650	14.625	13.025
Yaprak yüzey alanı (cm ²)	30.716	23.421	26.859	16.857	10.728



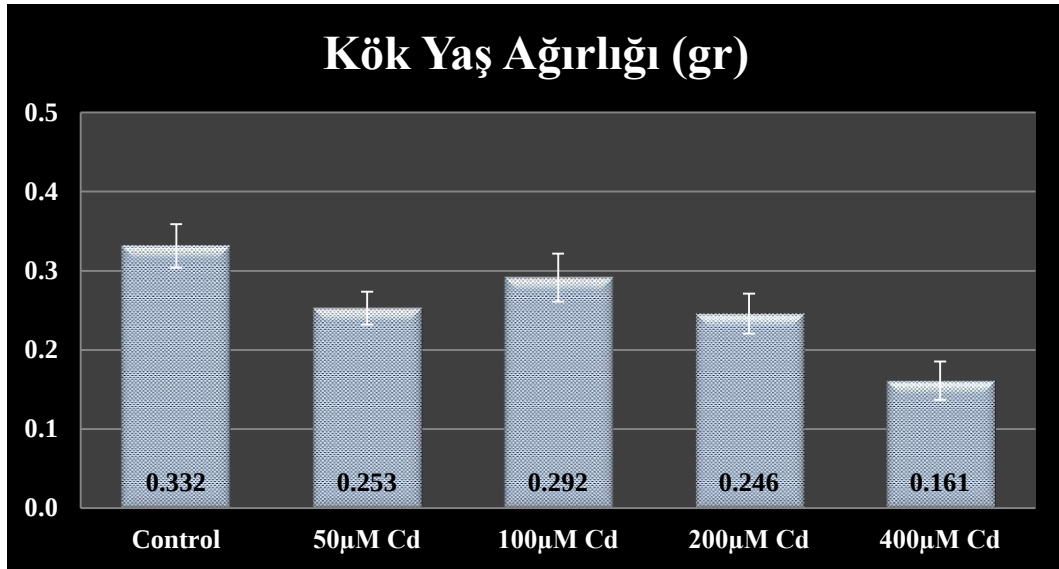
Şekil 4.2. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Yaprak Yaş Ağırlık Değerleri

0, 50, 100, 200, 400 μ M konsantrasyonlarında Cd uygulanan bitkilerin yaprak yaş ağırlıkları (tek yaprak) ölçülmüştür. Yapraklar sırasıyla 2.771, 2.186, 2.618, 2.072 ve 1.240 gr'dır.



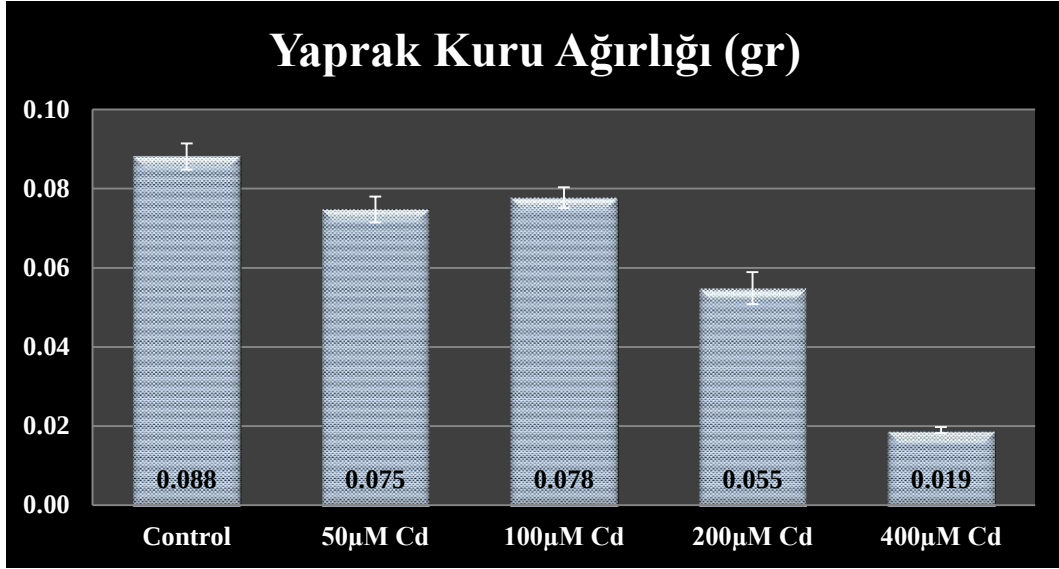
Şekil 4.3. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Gövde Yaş Ağırlık Değerleri

0, 50, 100, 200, 400 μM konsantrasyonlarında Cd uygulanan bitkilerin gövde yaş ağırlıkları ölçülmüştür. Gövde yaş ağırlığı sırasıyla 5.156, 2.986, 3.809, 2.838 ve 1.712 gr'dır.



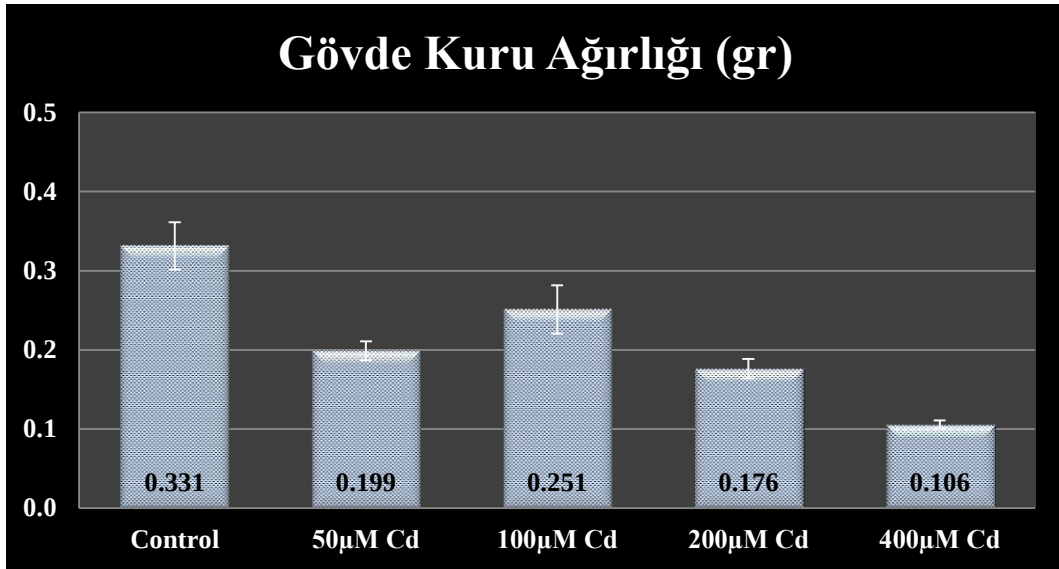
Şekil 4.4. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Kök Yaş Ağırlık Değerleri

0, 50, 100, 200, 400 μM konsantrasyonlarında Cd uygulanan bitkilerin kök yaş ağırlıkları ölçülmüştür. Kök yaş ağırlığı sırasıyla 0.332, 0.253, 0.292, 0.246 ve 0.161 gr'dır.



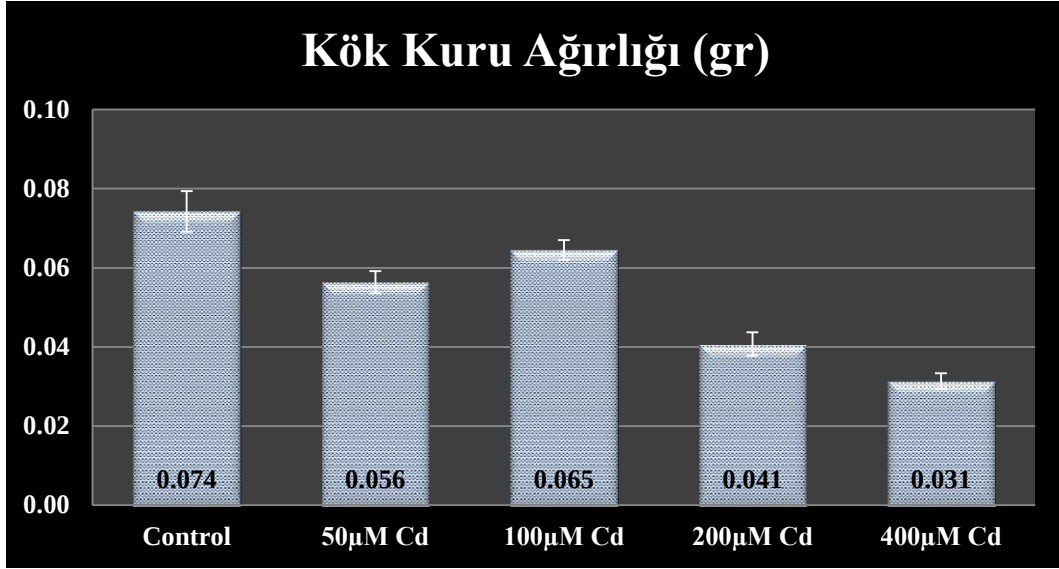
Şekil 4.5. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Yaprak Kuru Ağırlık Değerleri

0, 50, 100, 200, 400 µM konsantrasyonlarında Cd uygulanan bitkilerin yaprak (tek yaprak) kuru ağırlıkları ölçülmüştür. Yaprak kuru ağırlığı sırasıyla 0.088, 0.075, 0.078, 0.055 ve 0.019 gr'dır.



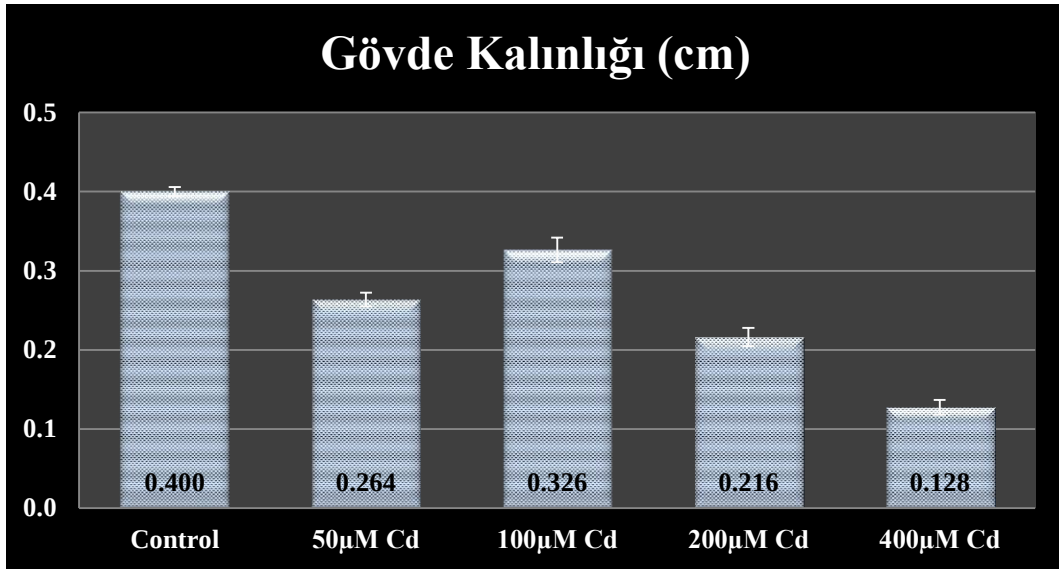
Şekil 4.6. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Gövde Kuru Ağırlık Değerleri

0, 50, 100, 200, 400 µM konsantrasyonlarında Cd uygulanan bitkilerin gövde kuru ağırlıkları ölçülmüştür. Gövde kuru ağırlığı sırasıyla 0.331, 0.199, 0.251, 0.176 ve 0.106 gr'dır.



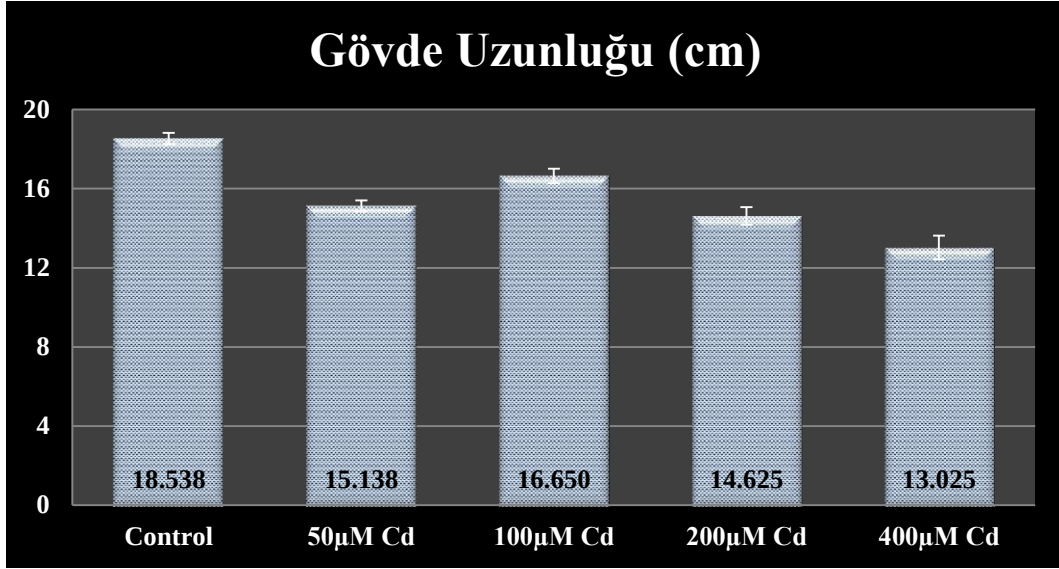
Şekil 4.7. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Kök Kuru Ağırlık Değerleri

0, 50, 100, 200, 400 µM konsantrasyonlarında Cd uygulanan bitkilerin kök kuru ağırlıkları ölçülmüştür. Kök kuru ağırlığı sırasıyla 0.074, 0.056, 0.065, 0.041 ve 0.031 gr'dır.



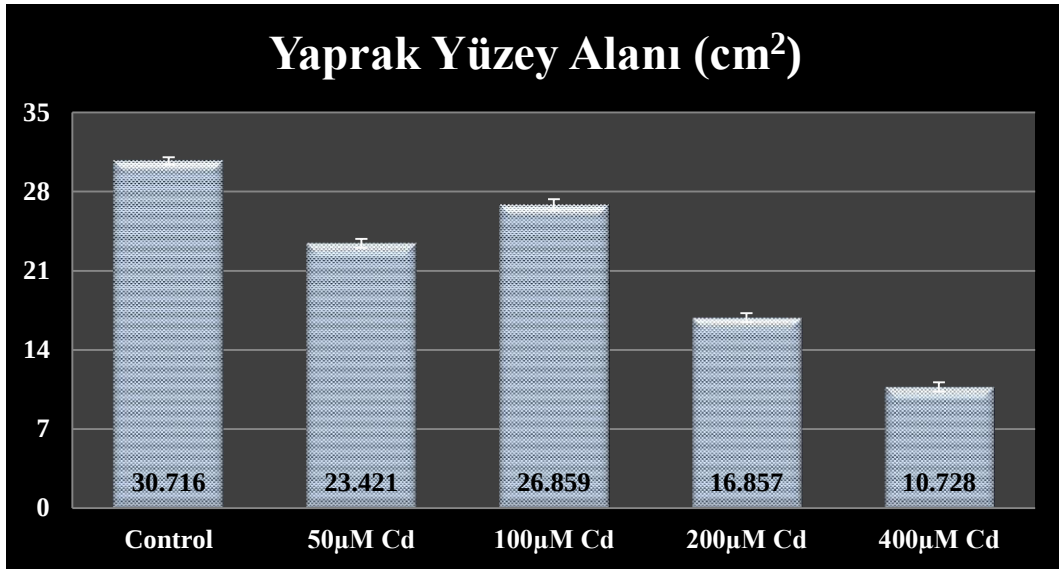
Şekil 4.8. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Gövde Kalınlığı Değerleri

0, 50, 100, 200, 400 µM konsantrasyonlarında Cd uygulanan bitkilerin gövde kalınlıkları ölçülmüştür. Gövde kalınlığı sırasıyla 0.400, 0.264, 0.326, 0.216 ve 0.128 cm'dir.



Şekil 4.9. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Gövde Boy Uzunluk Değerleri

0, 50, 100, 200, 400 µM konsantrasyonlarında Cd uygulanan bitkilerin gövde uzunlukları ölçülmüştür. Gövde uzunlukları sırasıyla 18.538, 15.138, 16.650, 14.625 ve 13.025 cm'dir.

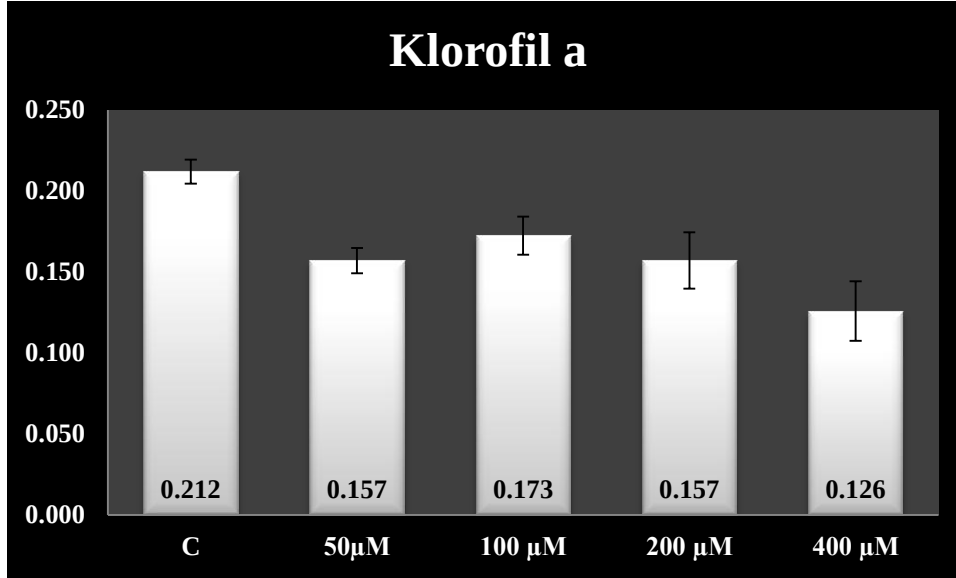


Şekil 4.10. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Yaprak Alanı Değerleri

0, 50, 100, 200, 400 µM konsantrasyonlarında Cd uygulanan bitkilerin yaprak yüzey alanları ölçülmüştür. Yaprak yüzey alanları sırasıyla 30.716, 23.421, 26.859, 16.857 ve 10.728 cm²'dir.

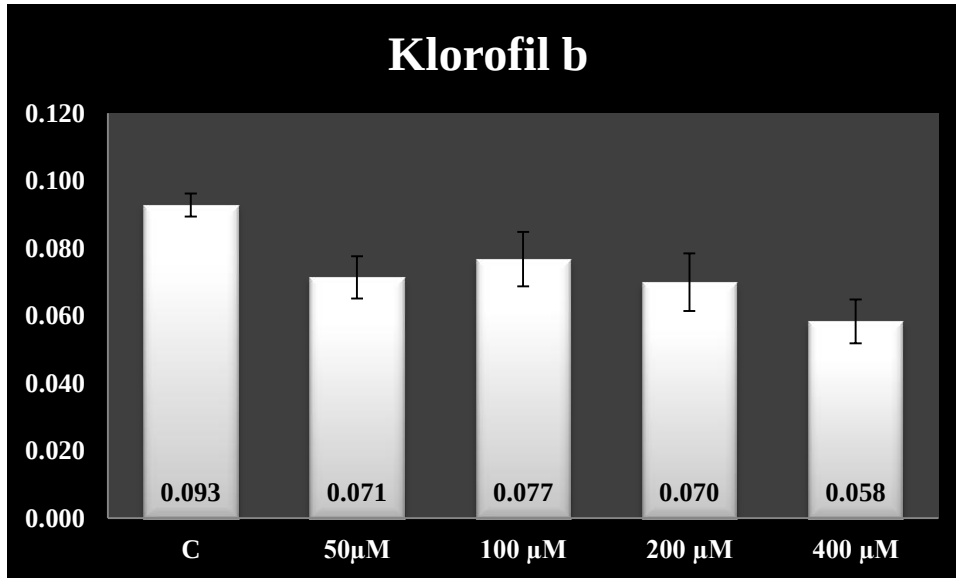
4.2. Klorofil a-b, Toplam Klorofil, a/b ve Karotenoid Miktarları

Yaptığımız çalışmalarda her deney grubuna ait yaprak özütlerinde klorofil a-b, toplam klorofil, a/b ve karotenoid miktarları ölçülmüştür.



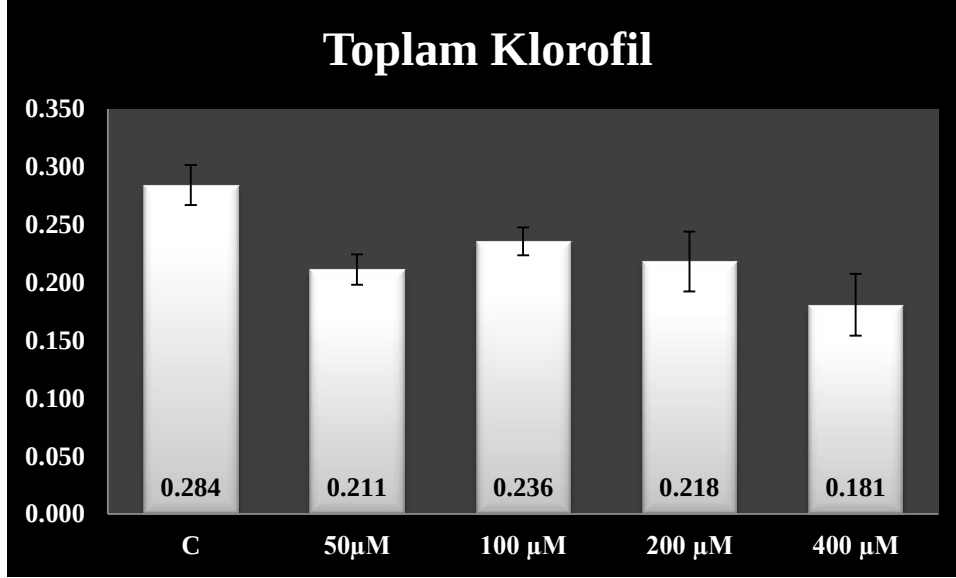
Şekil 4.11. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Kl a Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM konsantrasyonlarında Cd uygulanan bitkilerin özütlerinde spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. Özütlerdeki klorofil a değerleri sırasıyla 0.212, 0.157, 0.173, 0.157 ve 0.126 mg/ml olarak ölçülmüştür.



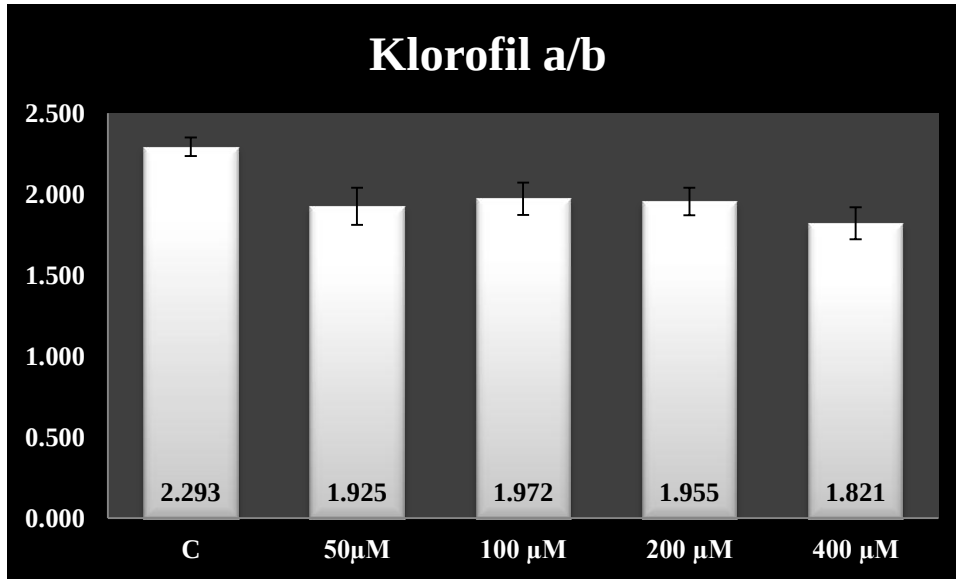
Şekil 4.12. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Kl b Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 μM konsantrasyonlarında Cd uygulanan bitkilerin özütlerinde spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. Özütlerdeki klorofil b değerleri sırasıyla 0.093, 0.071, 0.077, 0.070 ve 0.058 mg/ml olarak ölçülmüştür.



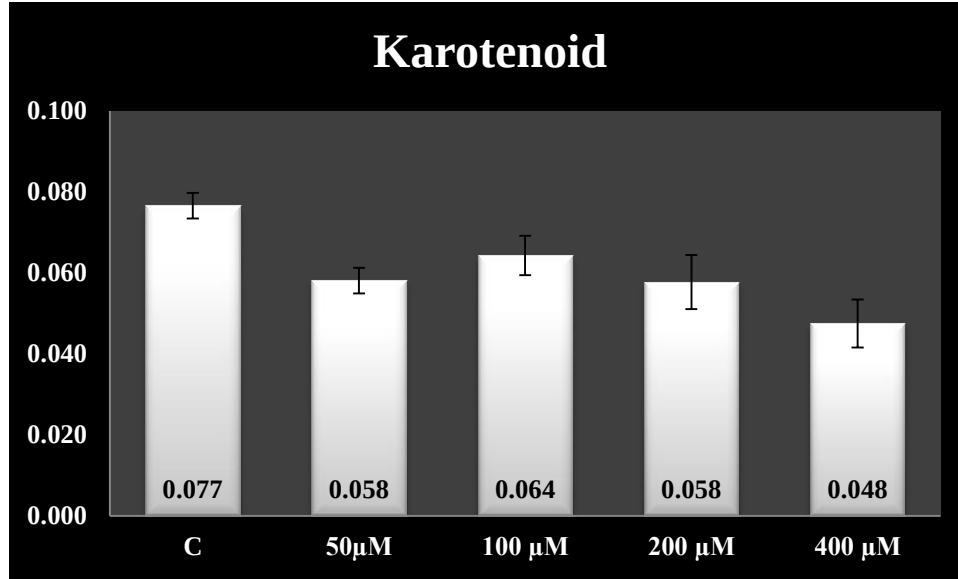
Şekil 4.13. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Toplam Kl Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 μM konsantrasyonlarında Cd uygulanan bitki özütlerindeki toplam klorofil değerleri sırasıyla 0.284, 0.211, 0.236, 0.218 ve 0.181 mg/ml olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.14. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Kl a/b Miktarları

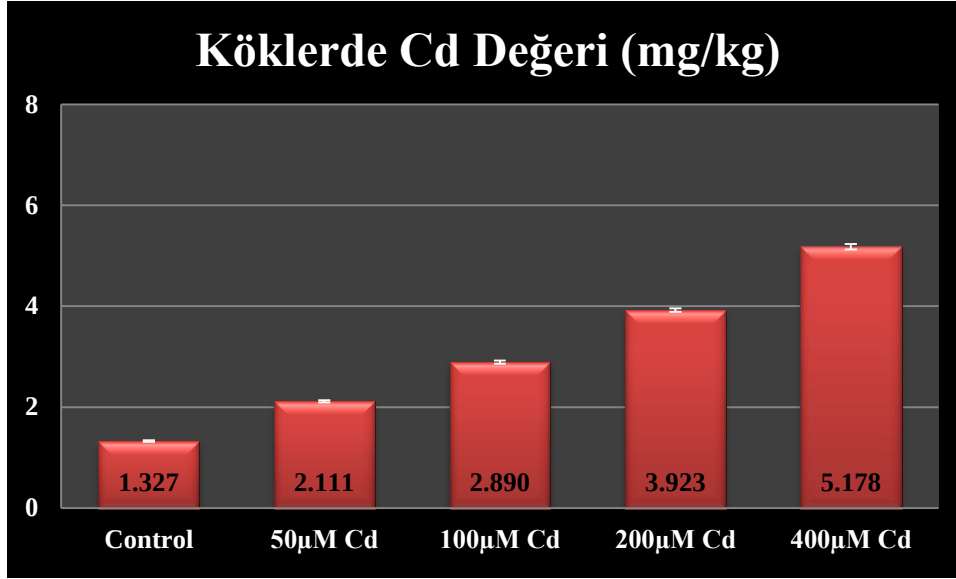
0, 50, 100, 200, 400 μM konsantrasyonlarında Cd uygulanan bitki özütlerindeki klorofil a/b oranları sırasıyla 2.293, 1.925, 1.972, 1.955 ve 1.821 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.15. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerde Karotenoid Miktarları

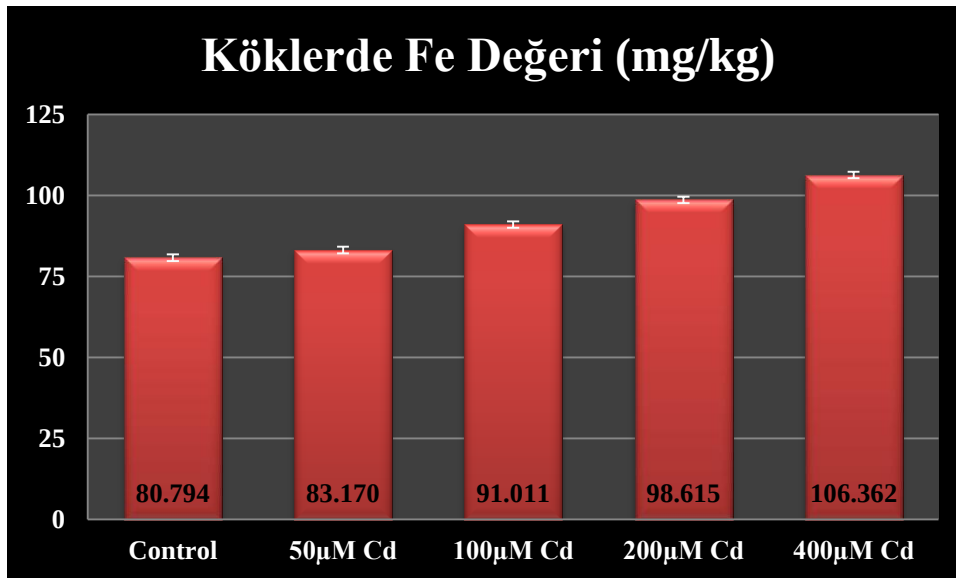
0, 50, 100, 200, 400 μM konsantrasyonlarında Cd uygulanan bitkilerin özütlerinde spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. Özütlerdeki karotenoid değerleri sırasıyla 0.077, 0.058, 0.064, 0.058 ve 0.048 olarak ölçülmüştür.

4.3. Cd Stresi ve Mineral Beslenme Üzerine Etkileri



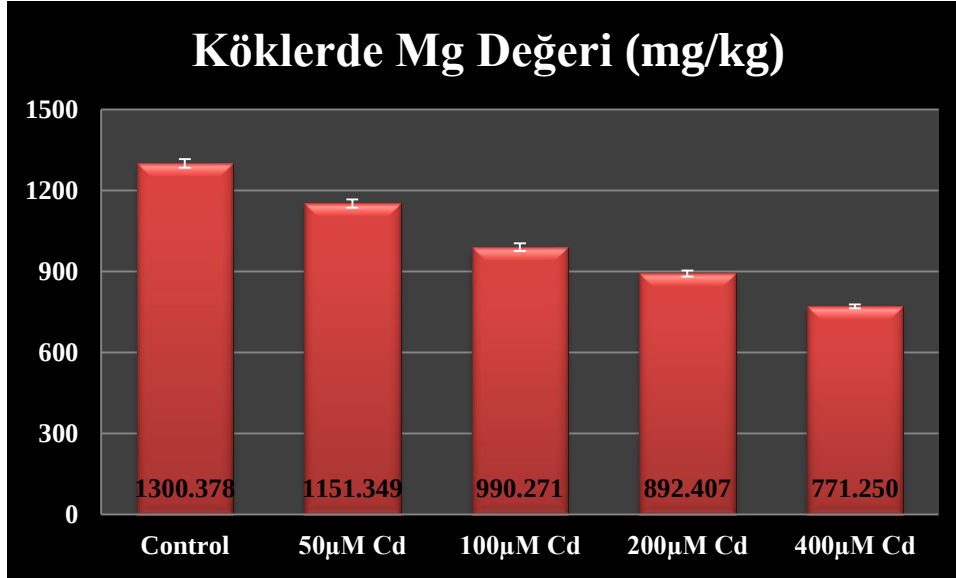
Şekil 4.16. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Cd Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin köklerinden elde edilen Cd değerleri sırasıyla; 1.327, 2.111, 2.890, 3.923 ve 5.178 mg/kg olarak ölçülmüştür.



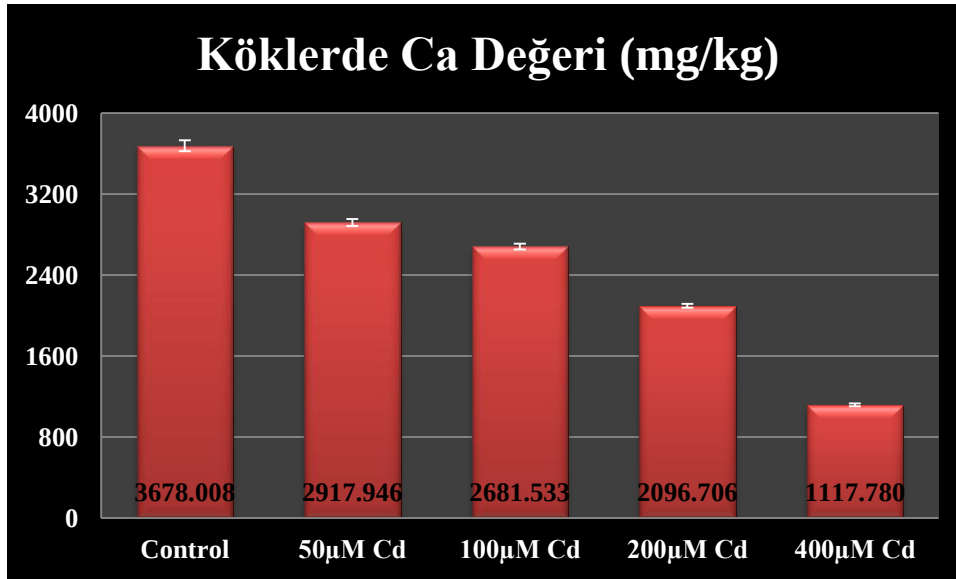
Şekil 4.17. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Fe Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin köklerinden elde edilen Fe değerleri sırasıyla; 80.794, 83.170, 91.011, 98.615 ve 106.362 mg/kg olarak ölçülmüştür.



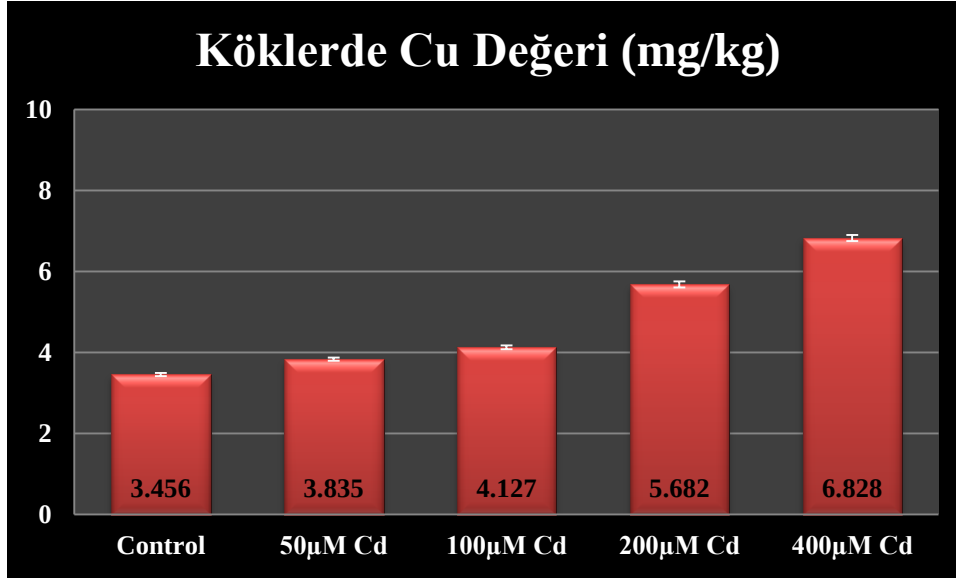
Şekil 4.18. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Mg Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin köklerinden elde edilen Mg değerleri sırasıyla; 1300.378, 1151.349, 990.271, 892.407 ve 771.250 mg/kg olarak ölçülmüştür.



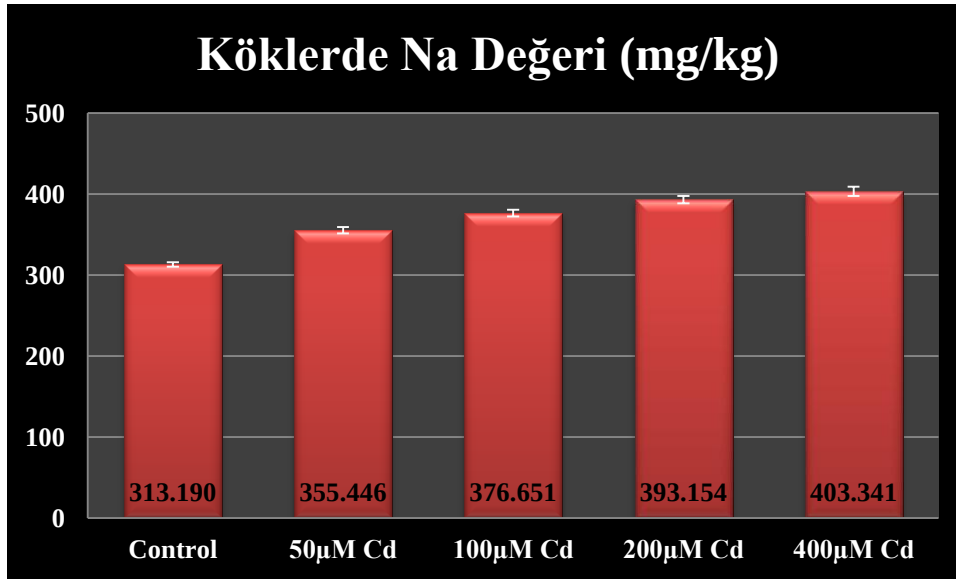
Şekil 4.19. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Ca Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin köklerinden elde edilen Ca değerleri sırasıyla; 3678.008, 2917.946, 2681.533, 2096.706 ve 1117.780 mg/kg olarak ölçülmüştür.



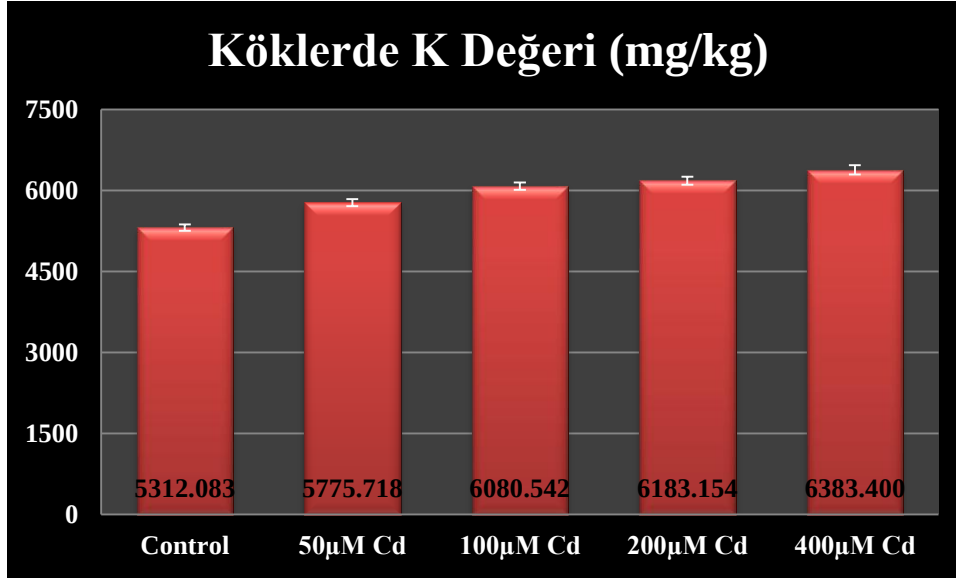
Şekil 4.20. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Cu Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin köklerinden elde edilen Cu değerleri sırasıyla; 3.456, 3.835, 4.127, 5.682 ve 6.828 mg/kg olarak ölçülmüştür.



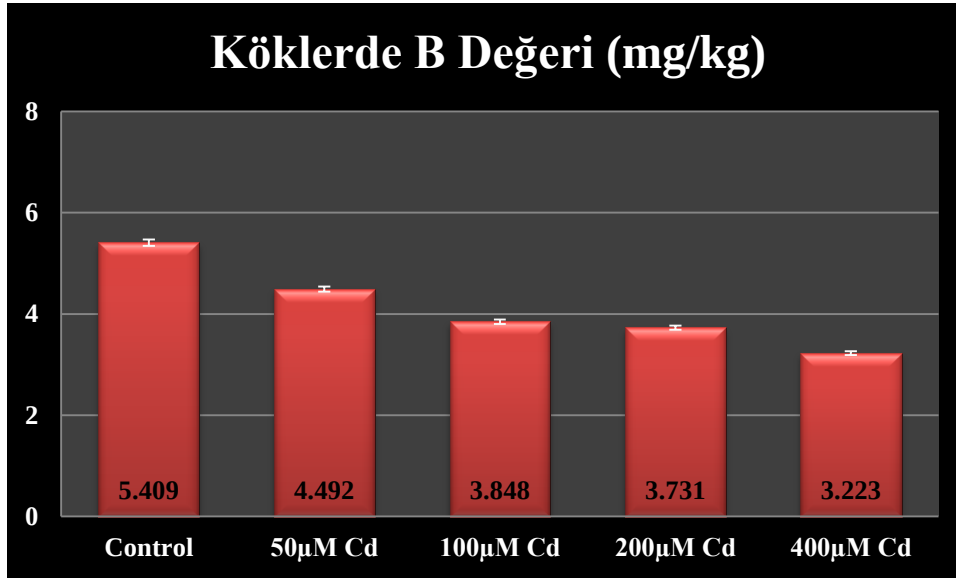
Şekil 4.21. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Na Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin köklerinden elde edilen Na değerleri sırasıyla; 313.190, 355.446, 376.651, 393.154 ve 403.341 mg/kg olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.22. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Köklerinde K Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin köklerinden elde edilen K değerleri sırasıyla; 5312.083, 5775.718, 6080.542, 6183.154 ve 6383.400 mg/kg olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.23. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Köklerinde B Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin köklerinden elde edilen B değerleri sırasıyla; 5.409, 4.492, 3.848, 3.731 ve 3.223 mg/kg olarak ölçülmüştür.

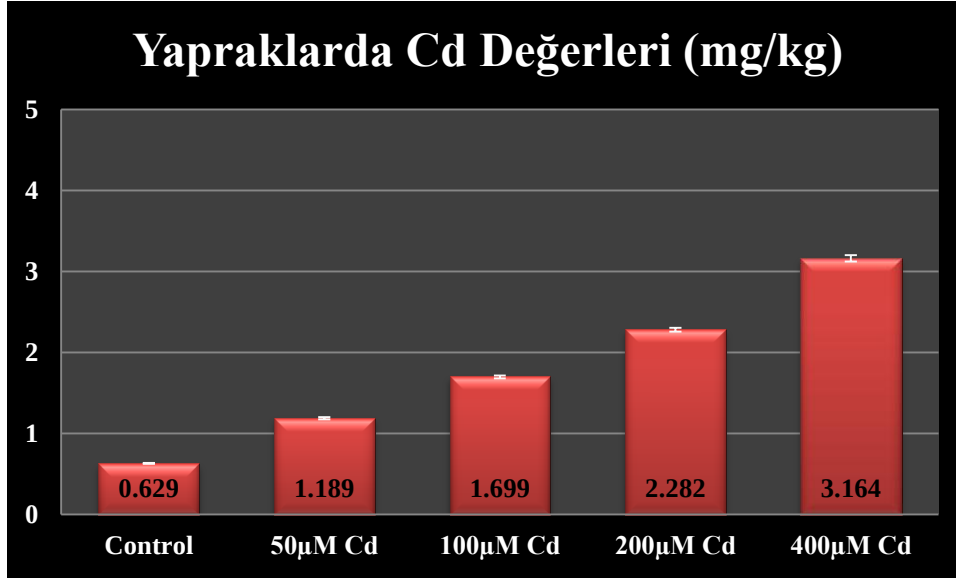
Kök: 0, 50, 100, 200, 400 μ M konsantrasyonlarında Cd uygulanan bitkilerin köklerinde Cd, Fe, Mg, Ca, Cu, Na, K ve B elementlerinin miktar analizleri yapılmıştır. Bu analizler sonucunda kontrol grubunda mineraller sırasıyla; Cd:1.327, Fe:80.794 Mg:1300.378, Ca:3678.008, Cu:3.456, Na:313.190, K:5312.083, B:5.409 mg/kg olarak ölçülmüştür.

50 μ M Cd uygulanan bitki grubunda mineraller sırasıyla; Cd:2.111, Fe:83.170 Mg:1151.349, Ca:2917.946, Cu:3.835, Na:355.446, K:5775.718, B:4.492 mg/kg olarak ölçülmüştür.

100 μ M Cd uygulanan bitki grubunda mineraller sırasıyla; Cd:2.890, Fe:91.011, Mg:990.271, Ca:2681.533, Cu:4.127, Na:376.651, K:6080.542, B:3.848 mg/kg olarak ölçülmüştür.

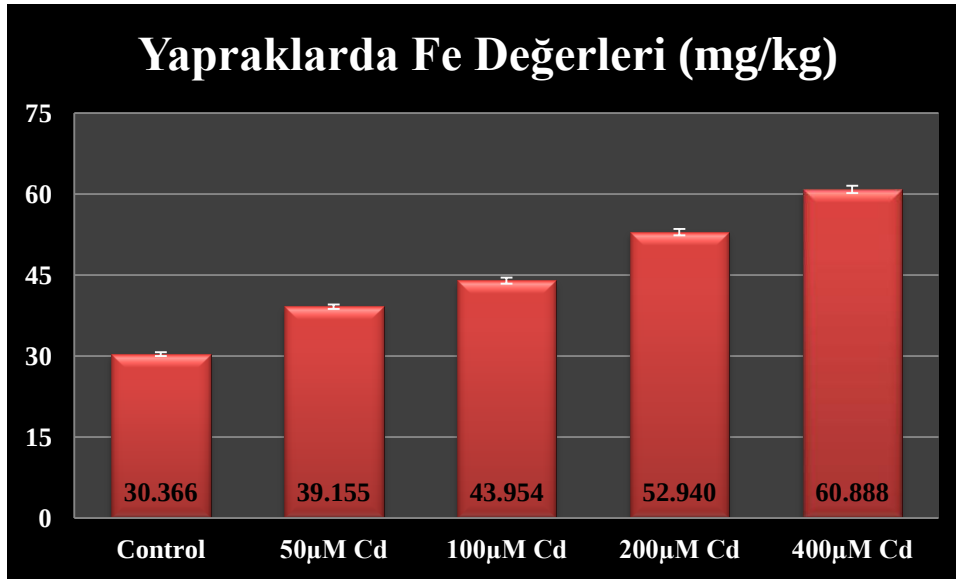
200 μ M Cd uygulanan bitki grubunda mineraller sırasıyla; Cd:3.923, Fe:98.615, Mg:892.407, Ca:2096.706, Cu:5.682, Na:393.154, K:6183.154, B:3.731 mg/kg olarak ölçülmüştür.

400 μ M Cd uygulanan bitki grubunda mineraller sırasıyla; Cd:5.178, Fe:106.362, Mg:771.250, Ca:1117.780, Cu:6.828, Na:403.341, K:6383.400, B:3.223 mg/kg olarak ölçülmüştür.



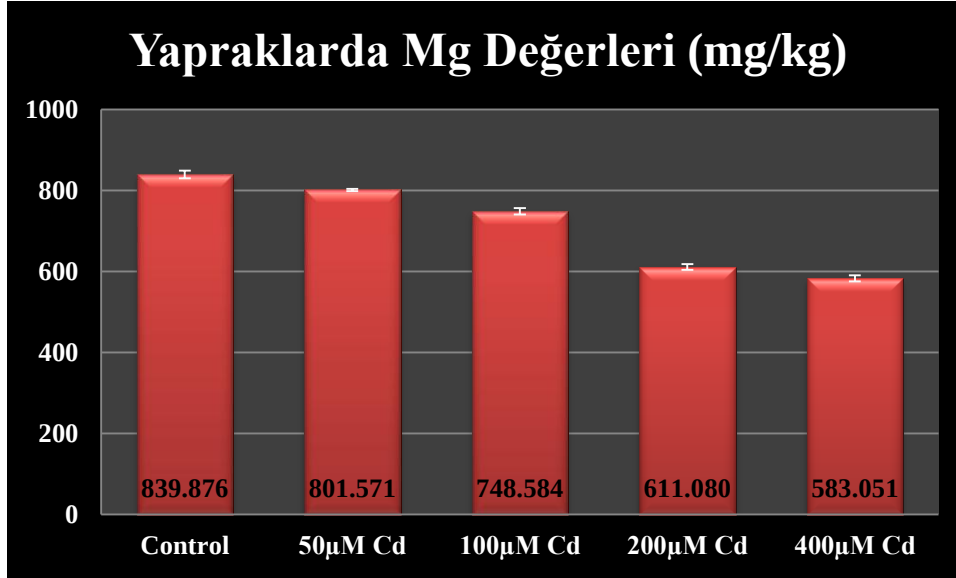
Şekil 4.24. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Cd Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin yapraklarından elde edilen Cd değerleri sırasıyla; 0.629, 1.189, 1.699, 2.282 ve 3.164 mg/kg olarak ölçülmüştür.



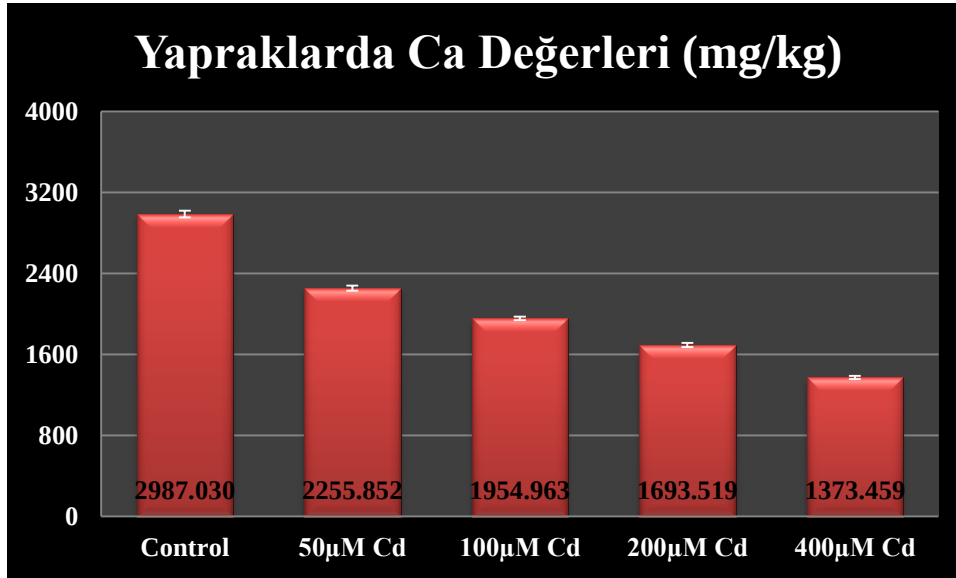
Şekil 4.25. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Fe Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin yapraklarından elde edilen Fe değerleri sırasıyla; 30.366, 39.155, 43.954, 52.940 ve 60.888 mg/kg olarak ölçülmüştür.



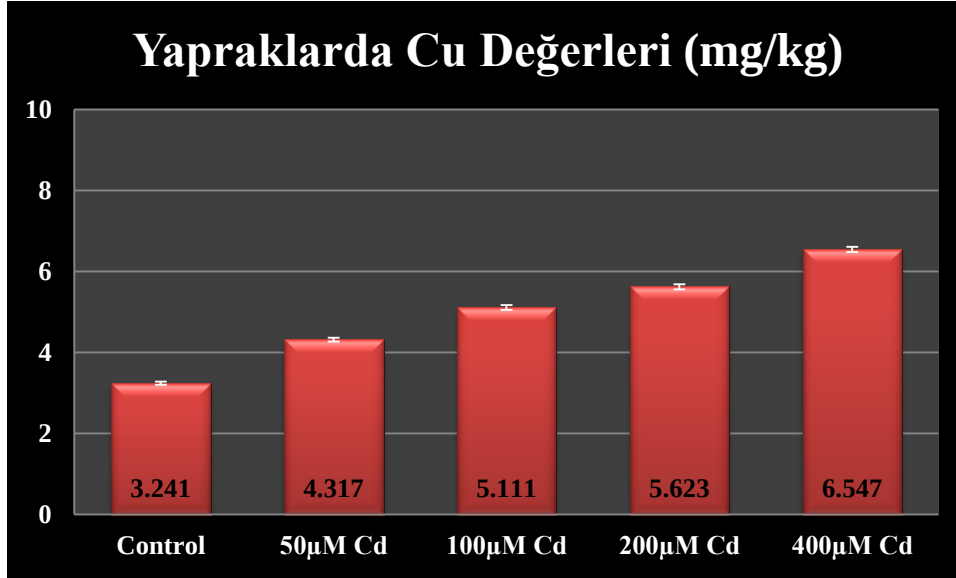
Şekil 4.26. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Mg Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin yapraklarından elde edilen Mg değerleri sırasıyla; 839.876, 801.571, 748.584, 611.080 ve 583.051 mg/kg olarak ölçülmüştür.



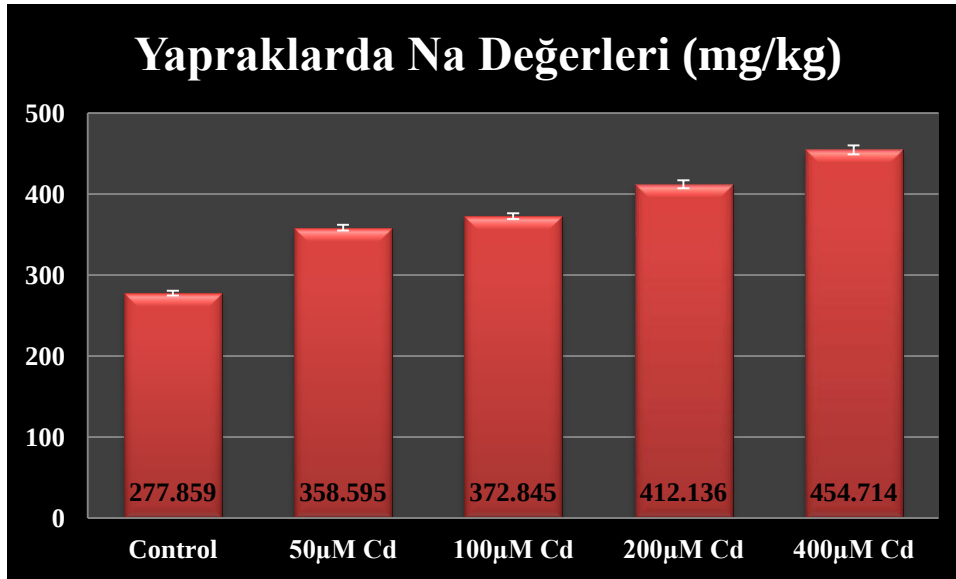
Şekil 4.27. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Ca Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin yapraklarından elde edilen Ca değerleri sırasıyla; 2987.030, 2255.852, 1954.963, 1693.519 ve 1373.459 mg/kg olarak ölçülmüştür.



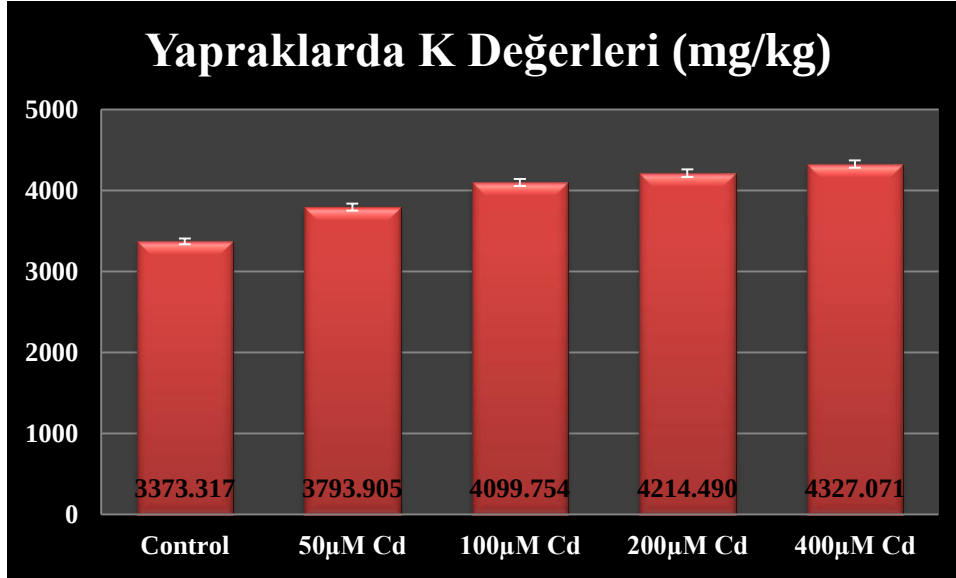
Şekil 4.28. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Cu Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin yapraklarından elde edilen Cu değerleri sırasıyla; 3.241, 4.317, 5.111, 5.623 ve 6.547 mg/kg olarak ölçülmüştür.



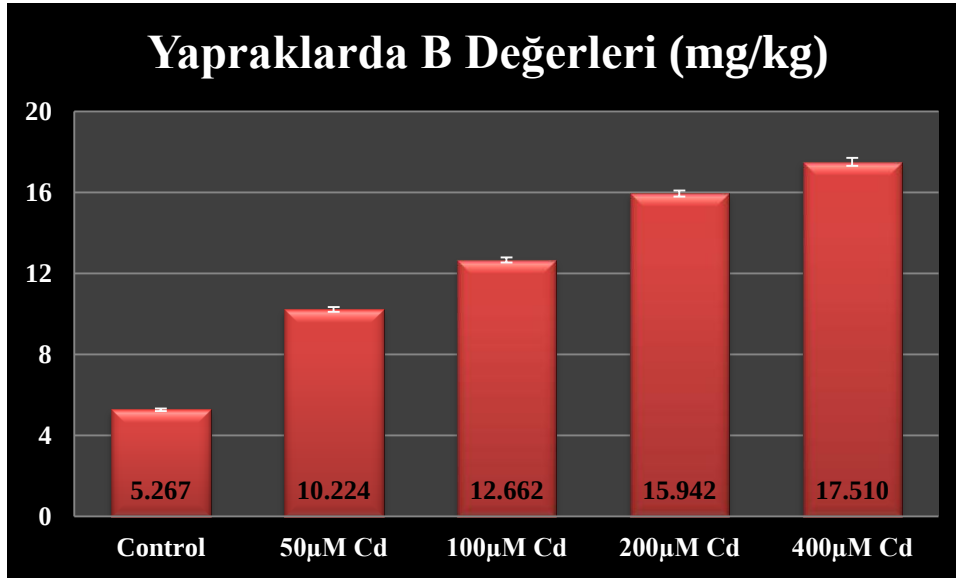
Şekil 4.29. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Na Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin yapraklarından elde edilen Na değerleri sırasıyla; 277.859, 358.595, 372.845, 412.136 ve 454.714 mg/kg olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.30. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında K Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin yapraklarından elde edilen K değerleri sırasıyla; 3373.317, 3793.905, 4099.754, 4214.490 ve 4327.071 mg/kg olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.31. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında B Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin yapraklarından elde edilen B değerleri sırasıyla; 5.267, 10.224, 12.662, 15.942 ve 17.510 mg/kg olarak ölçülmüştür.

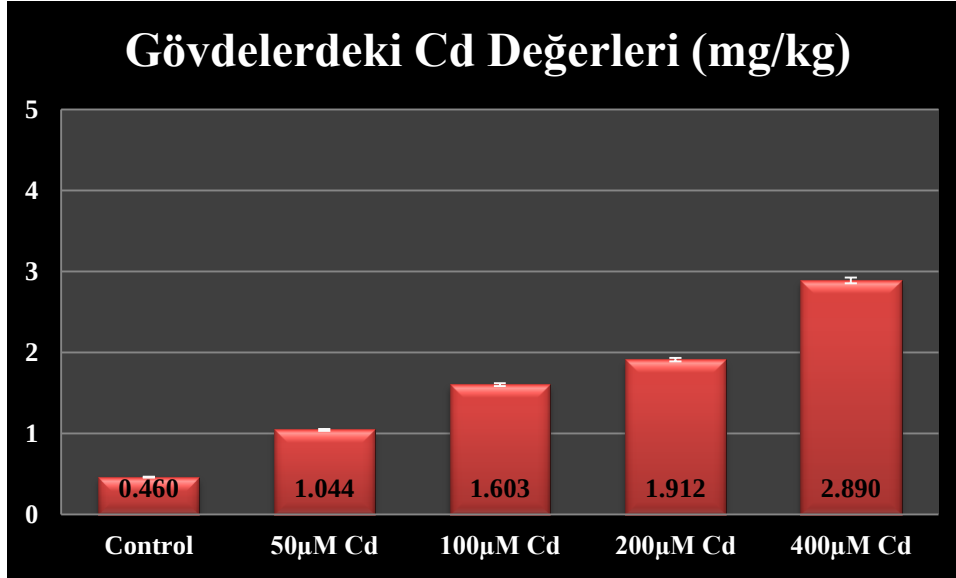
Yaprak: 0, 50, 100, 200, 400 μM konsantrasyonlarında Cd uygulanan bitkilerin yapraklarında Cd, Fe, Mg, Ca, Cu, Na, K ve B elementlerinin miktar analizleri yapılmıştır. Bu analizler sonucunda kontrol grubunda mineraller sırasıyla; Cd:0.629, Fe:30.366, Mg:839.876, Ca:2987.030, Cu:3.241, Na:277.859, K:3373.317, B:5.267 mg/kg olarak ölçülmüştür.

50 μM Cd uygulanan bitki grubunda mineraller sırasıyla; Cd:1.189, Fe:39.155, Mg:801.571, Ca:2255.852, Cu:4.317, Na:358.595, K:3793.905, B:10.224 mg/kg olarak ölçülmüştür.

100 μM Cd uygulanan bitki grubunda mineraller sırasıyla; Cd:1.699, Fe:43.954, Mg:748.584, Ca:1954.963, Cu:5.111, Na:372.845, K:4099.754, B:12.662 mg/kg olarak ölçülmüştür.

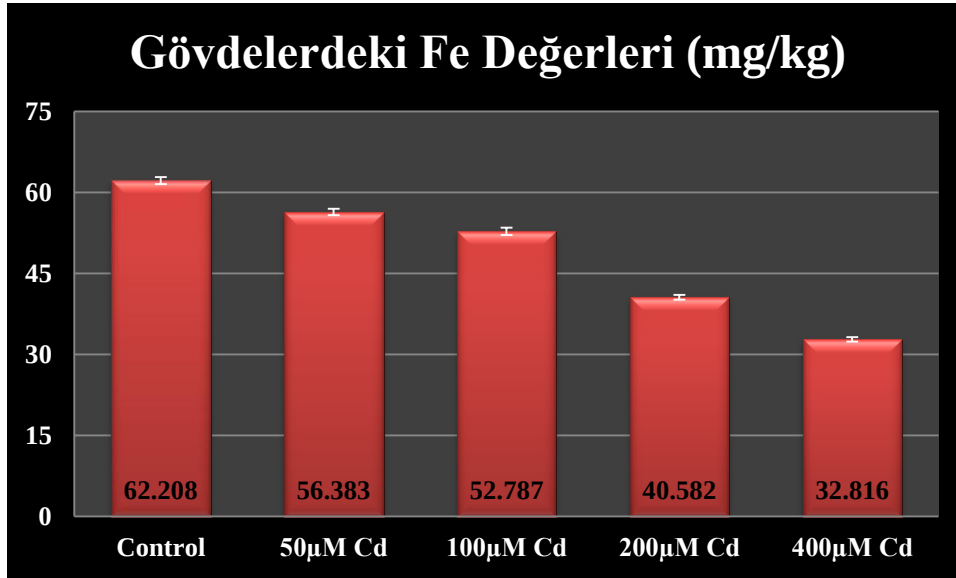
200 μM Cd uygulanan bitki grubunda mineraller sırasıyla; Cd:2.282, Fe:52.940, Mg:611.080, Ca:1693.519, Cu:5.623, Na:412.136, K:4214.490, B:15.942 mg/kg olarak ölçülmüştür.

400 μM Cd uygulanan bitki grubunda mineraller sırasıyla; Cd:3.164, Fe:60.888, Mg:583.051, Ca:1373.459, Cu:6.547, Na:454.714, K:4327.071, B:17.510 mg/kg olarak ölçülmüştür.



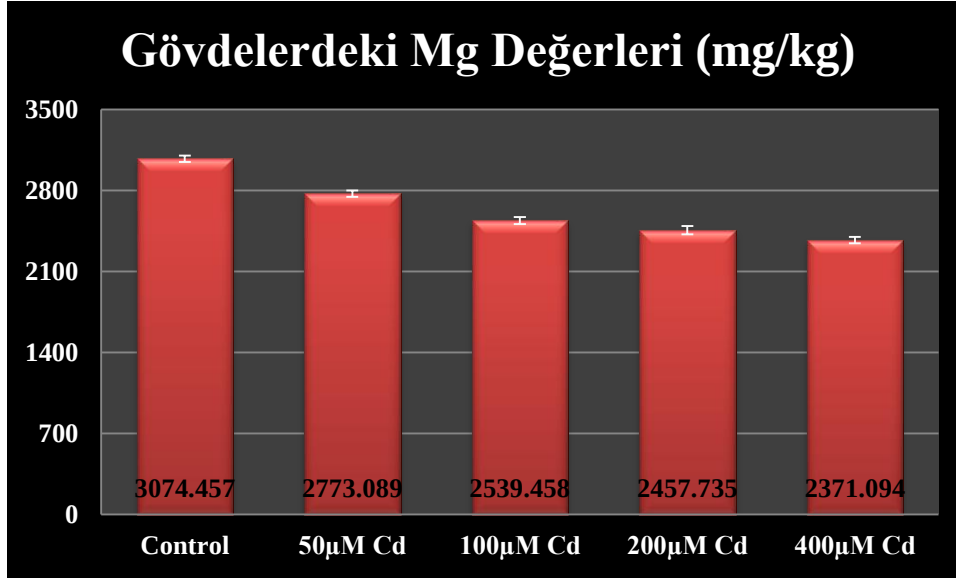
Şekil 4.32. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Gövdelerinde Cd Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin gövdelerinden elde edilen Cd değerleri sırasıyla; 0.460, 1.044, 1.603, 1.912 ve 2.890 mg/kg olarak ölçülmüştür.



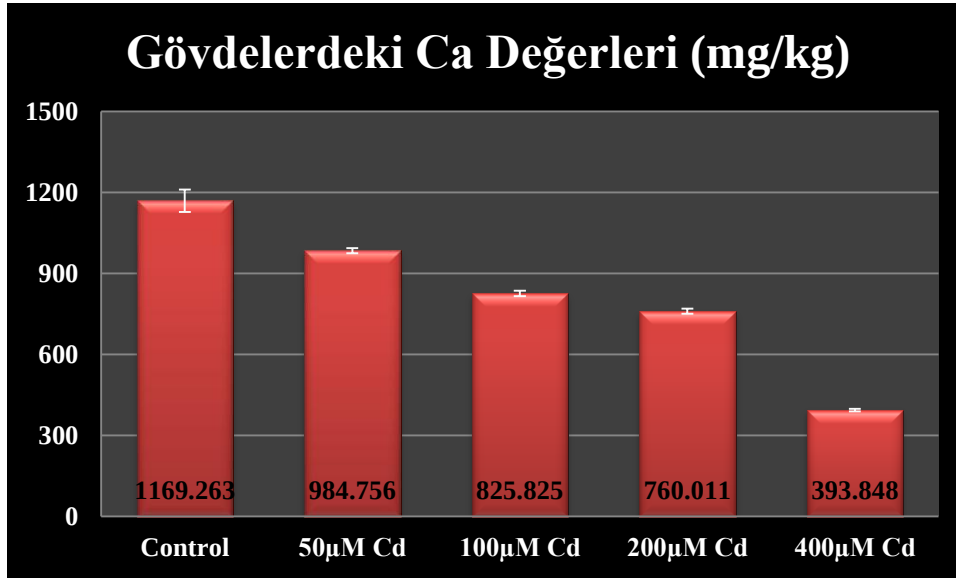
Şekil 4.33. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Gövdelerinde Fe Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin gövdelerinden elde edilen Fe değerleri sırasıyla; 62.208, 56.383, 52.787, 40.582 ve 32.816 mg/kg olarak ölçülmüştür.



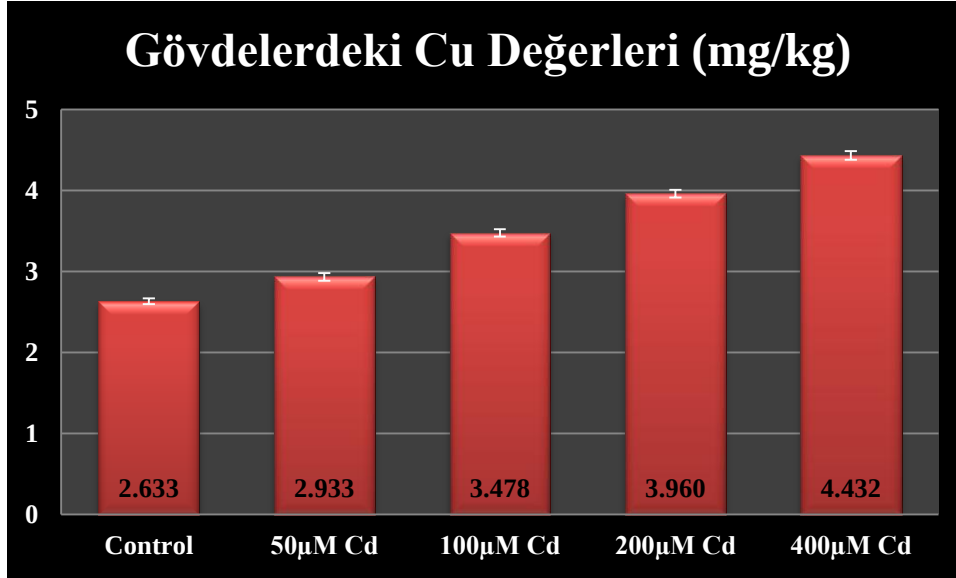
Şekil 4.34. Farklı Konantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Gövdelerinde Mg Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin gövdelerinden elde edilen Mg değerleri sırasıyla; 3074.457, 2773.089, 2539.458, 2457.735 ve 2371.094 mg/kg olarak ölçölmüştür.



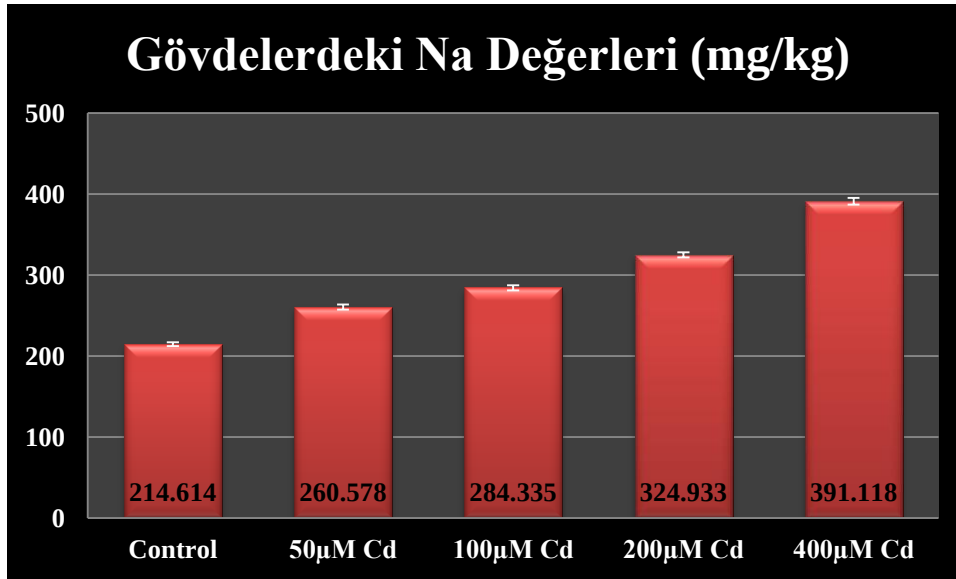
Şekil 4.35. Farklı Konantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Gövdelerinde Ca Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin gövdelerinden elde edilen Ca değerleri sırasıyla; 1169.263, 984.756, 825.825, 760.011 ve 393.848 mg/kg olarak ölçölmüştür.



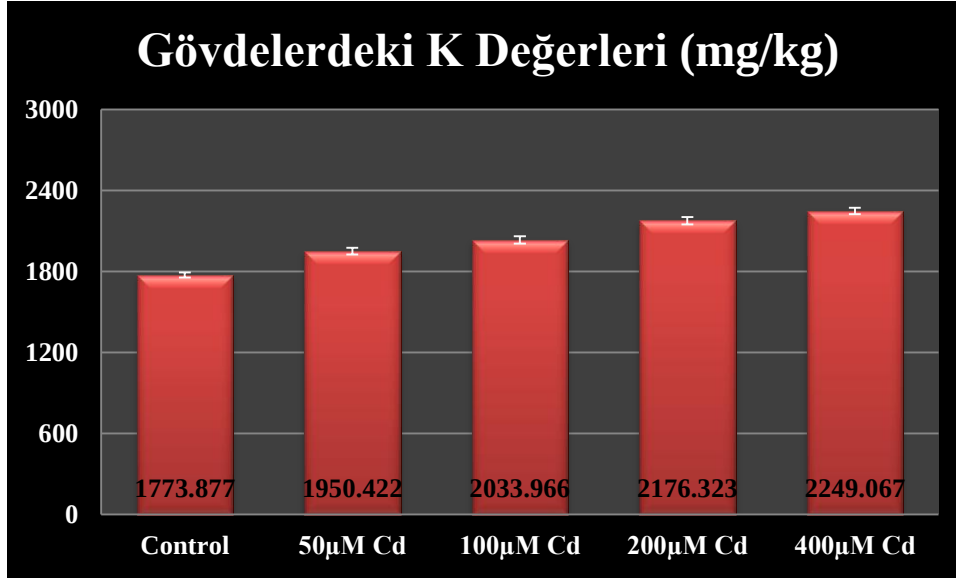
Şekil 4.36. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Gövdelerinde Cu Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin gövdelerinden elde edilen Cu değerleri sırasıyla; 2.633, 2.933, 3.478, 3.960 ve 4.432 mg/kg olarak ölçülmüştür.



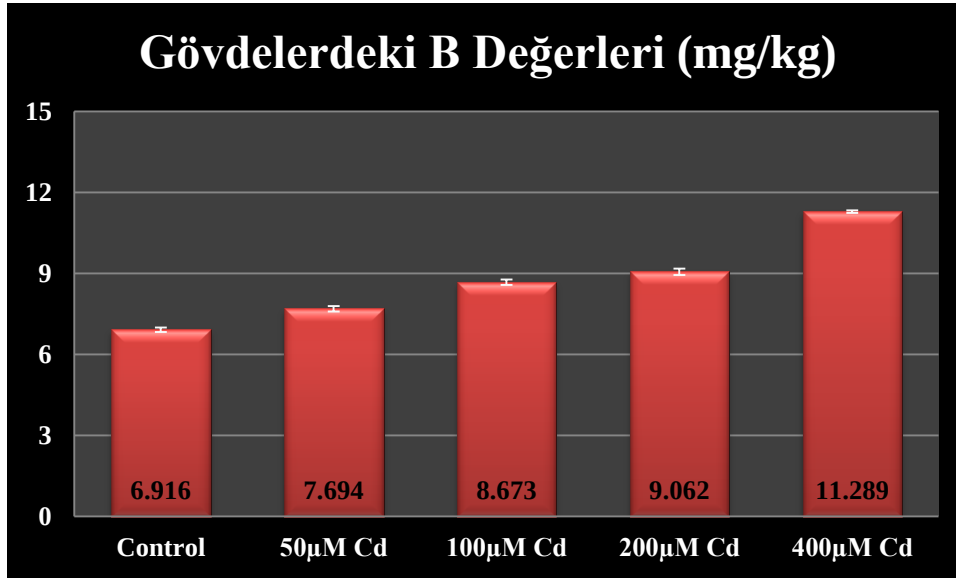
Şekil 4.37. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Gövdelerinde Na Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin gövdelerinden elde edilen Na değerleri sırasıyla; 214.614, 260.578, 284.335, 324.933 ve 391.118 mg/kg olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.38. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Gövdelerinde K Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin gövdelerinden elde edilen K değerleri sırasıyla; 1773.877, 1950.422, 2033.966, 2176.323 ve 2249.067 mg/kg olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.39. Farklı Konsantrasyonlarda Cd Uygulanan Bitkilerin Gövdelerinde B Mineralinin Miktarları

0, 50, 100, 200, 400 µM Cd uygulanan bitkilerin gövdelerinden elde edilen B değerleri sırasıyla; 6.916, 7.694, 8.673, 9.062 ve 11.289 mg/kg olarak ölçülmüştür.

Gövde: 0, 50, 100, 200, 400 μ M konsantrasyonlarında Cd uygulanan bitkilerin gövdelerinde Cd, Fe, Mg, Ca, Cu, Na, K ve B elementlerinin miktar analizleri yapılmıştır. Bu analizler sonucunda kontrol grubunda mineraller sırasıyla; Cd:0.460, Fe:62.208, Mg:3074.457, Ca:1169.263, Cu:2.633, Na:214.614, K:1773.877, B: 6.916 mg/kg olarak ölçülmüştür.

50 μ M Cd uygulanan bitki grubunda mineraller sırasıyla; Cd:1.044, Fe:56.383, Mg:2773.089, Ca:984.756, Cu:2.933, Na:260.578, K:1950.422, B: 7.694 mg/kg olarak ölçülmüştür.

100 μ M Cd uygulanan bitki grubunda mineraller sırasıyla; Cd:1.603, Fe:52.787, Mg:2539.458, Ca:825.825, Cu:3.478, Na:284.335, K:2033.966, B: 8.673 mg/kg olarak ölçülmüştür.

200 μ M Cd uygulanan bitki grubunda mineraller sırasıyla; Cd:1.912, Fe:40.582, Mg:2457.735, Ca:760.011, Cu:3.960, Na:324.933, K:2176.323, B:9.062 mg/kg olarak ölçülmüştür.

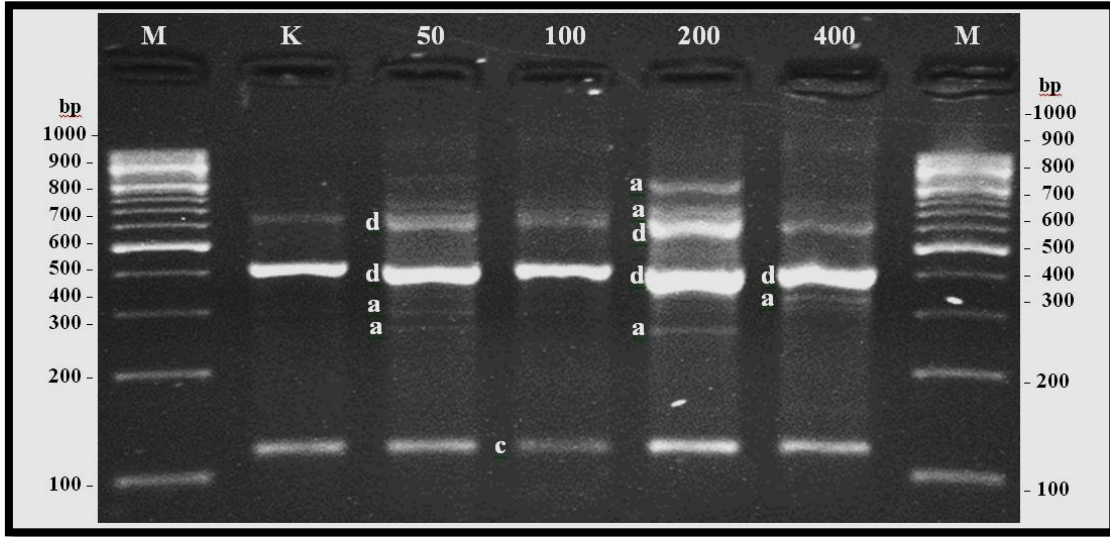
400 μ M Cd uygulanan bitki grubunda mineraller sırasıyla; Cd:2.890, Fe:32.816, Mg:2371.094, Ca:393.848, Cu:4.432, Na:391.118, K:2249.067, B:11.289 mg/kg olarak ölçülmüştür.

4.4. *Bryophyllum daigremontianum* Bitkisinde Genotoksik Bulgular

Sonuç

Farklı Cd konsantrasyonları uygulanan bitkilerin yaprak hücrelerinde DNA analizleri RAPD-PCR moleküler markör tekniğiyle analiz edildi. Biri kontrol grubu olmak üzere 5 farklı deney grubu 50, 100, 200 ve 400 μM CdCl_2 içeren Hoagland solüsyonu ile gūnaşırı 2 ay boyunca sulandılar. İki aylık Cd uygulaması sonucunda bitkiler hasat edilip analiz yapıldı. RAPD analizlerinde DNA çoğaltımı için OPA08 (GTGACGTAGG, QIAGEN Operon RAPD® 10 mer Kits) primeri kullanılmıştır. Primer ile çoğaltılan DNA bantları Jel-Doc 2000 cihazı sisteminin 4.4.1 sürümü kullanılarak işaretleici GeneRulerTM 100 bp (MTÖ-Fermentas) ile ölçüldü.

Çalışma sonucunda RAPD profil sonuçlarımıza göre yeni bantların ortaya çıkışı ve bant yoğunluğundaki artışlar 50, 200 ve 400 μM konsantrasyonlarında Cd uygulanan bitkilerde ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda bant yoğunluğunda bir düşüş 100 μM 'lik Cd'a maruz bırakma uygulamasında görülmüştür. Kaybolan banda rastlanmamıştır. Artan ve azalan bantlarla uygulanan Cd konsantrasyonları arasında yüksek bir korelasyon olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.40. Farklı konsantrasyonlarda Cd (K: kontrol, 50: 50 μM , 100: 100 μM , 200: 200 μM , 400: 400 μM) uygulanan *B. daigremontianum* yapraklarından alınan DNA'nın RAPD sonuçları a: yeni bant oluşumları, b: kaybolan bantlar, c: bant yoğunluklarında azalma, d: bant yoğunluklarında artış.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada *Bryophyllum daigremontianum* bitkisinin farklı derecelerdeki Cd stresinden nasıl etkilendiği ve bu stresin bitkiye olan fizyolojik, genotoksik ve mineral beslenme üzerine etkileri araştırılmıştır.

Çevre kirliliği günümüzde, zararları gün geçtikçe artmakta olan, insanoğlunun karşılaştığı en ciddi sorunlardan biridir ve özellikle toprak ve havadaki ağır metal kirliliği canlıları tehdit etmektedir (Das ve ark., 1997; Çağlarırnak ve Hepçimen, 2010; Öngen ve Gür, 2012; Saint-Laurent ve ark., 2013). Çevre kirliliğinin oluşmasında insan kaynaklı etkiyle oluşan kirlilik, bu tehdidin büyük bir bölümünü oluşturmaktadır. Her yıl milyonlarca toksik kirletici madde çevreye bırakılmaktadır ve bunun sonucu olarak bu toksik kirleticiler çevredeki canlılara zarar vermektedir (Beckett ve ark., 1998; Akın ve Akın, 2007; Sujetoviene ve Sliumpaite, 2013).

Ağır metaller grubuna giren Cd elementi önemli bir çevre kirletici; bitkiler, hayvanlar ve insanlar için toksik etkiye sahip bir element olarak bilinmektedir (Akgüç ve ark., 2008; Alak ve ark., 2013; Özçetin ve ark., 2013). Tarım topraklarında bulunması, ana materyal kaynaklı olabileceği gibi endüstriyel faaliyetler sonucunda da Cd oluşabilmektedir (Assche ve Clijsters 1990). Kadmiyum emisyonuna neden olan faktörler; Cd işleyen fabrikalar (nükleer santrallerde nötron absorblayıcı, stabilizatör olarak ta plastik yapımında, Ni-Cd pillerinde, düşük erime noktalı alaşımlarda, yarı iletken olarak televizyon tüplerinde, stabilizatör olarak PVC'lerde, korozyona dayanıklı olduğu için gemi sanayinin çelik kaplamasında, boya sanayinde, deterjanlarda, rafine petrol türevlerinin üretiminde Cd kullanılır), mazot ile çalışan iş makineleri ve araçlar, oto lastiklerinin cilalanması, yağ ve kömür yakan tesisler, tarım alanlarına ve bahçelere uzun süre arıtma çamuru ve çöp gübresi uygulanması, biyosferde artan ölçülerdeki Cd miktarı, fosfat gübreleri ve pestisitlerdir (Bergmann 1993; Liu ve ark., 2007; WHO, 2010).

Bitkiler normal gelişimlerini optimum koşullarda gerçekleştirirler. Bir çevrede devamlı olarak ya da arada sırada meydana gelen çok sayıdaki olumsuz fakat hemen öldürücü olmayan koşullar stres olarak bilinmektedir. Bir başka yaklaşımsa bitkide metabolizmayı, büyüme ve gelişmeyi etkileyen ya da engelleyen, uygun olmayan

herhangi bir durum ya da madde stres olarak kabul edilir (Lichtenhaler, 1998). Lewitt'e (1980), göre stres faktörleri, biyotik ve abiyotik olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Lichtenthaler (1996), ise stres faktörlerini doğal ve insan kaynaklı olmak üzere sınıflandırmaktadır. Yüksek ışıma, yüksek ve düşük sıcaklıklar, ani donma, su kıtlığı ve mineral eksikliği doğal stres faktörlerini oluştururken; hava kirleticileri, aşırı azot verilmesi, foto oksidantlar ve ağır metaller insan kaynaklı stres faktörlerini oluşturmaktadır (Koç ve Üstün, 2008).

Havadaki ve tarım topraklarındaki ağır metal kirliliği, en önemli küresel ölçekteki ekolojik problemlerin başında gelmektedir (Kabata-Pendias ve Pendias, 1999; WHO, 2007). Aşırı (toksik konsantrasyonlar) ağır metale maruz kalma, bitkilerde birçok değişikliklere neden olmaktadır. Bu değişikliklerin yol açtığı zararların bir kısmı gözle görülebilir ve ölçülebilir (morfolojik değişiklikler) düzeyde iken, birçoğunun saptanabilmesi ise karmaşık biyokimyasal analizleri gerektirmektedir. Ağır metal zararının ilk ve en belirgin etkisi köklerde görülür (Ouzounidou ve ark., 1995, Tester ve Leigh, 2001; Verma ve Dubey, 2003). Yüksek metal konsantrasyonuna maruz kalmış bitkilerde kökler, normal bitki köklerine göre oldukça kısa kalmakta ve saçak kök sayısında azalma, yan köklerde artma ya da azalma, köklerde lignifikasyon ile epidermis ve hipodermiste bazı yapısal değişiklikler görülmektedir. Enzimlerin aktif bölgelerinde bulunan sülfidril grupları, enzim aktivitesinde önemli rol oynar. Pozitif yüklü ağır metaller, bu bölgelere bağlanarak enzim aktivitelerinde inhibisyona neden olurlar. Ağır metallerin bazıları enzimlerin çalışabilmesi için gerekli kofaktörlerdir. Ancak yüksek konsantrasyonlardaki başka metaller, kofaktör metallerin yerlerine geçebilir ve enzim aktivitesinde azalmaya neden olabilir. Bazı durumlarda ise, ağır metaller enzimlerin aktivitelerini arttırabilmektedir (Ralph ve Burchett, 1998, Sytar ve ark., 2013). Ağır metal stresi; kloroplast yapısının bozulması, klorofil ve karotenoid biyosentezinin inhibe olması, elektron akımının aksamaması, Calvin döngüsü enzimlerinin aktivitelerinin inhibe olması, stoma sayısında ve işlevindeki değişikliklere bağlı CO₂ yetersizliği gibi olumsuz durumlara yol açarak fotokimyasal aktivitenin inhibisyonuna neden olmaktadır (Macfarlane ve Burchett, 2001; Prasad ve diğ., 2001).

Ağır metaller içinde Cd, suda çözünme özelliği yüksek olduğu için, doğada yayılma hızı da yüksektir. Bitkilerdeki Cd'un konsantrasyonu genellikle 0.1-1.0 ppm aralığındadır (Das ve ark.,1997). Bitkiler belirli bir miktara kadar Cd'u zarar görmeden alabilirler.

Ancak aşırı alımı bitkileri etkileyebilir. Topraktaki kireç miktarı, toprak pH'ı, yüksek kil oranı ve fazla humuslu topraklar, bitkinin Cd alımını yavaşlatan faktörlerdir (Günay 1992). Bitkilerde aşırı Cd'a maruz kalma fotosentezde azalma (Chugh ve Sawhney, 1999), su dengesinin kaybolması (Pasquale ve ark.,1995), gaz alışverişinin, solunumun (Costave Morel, 1994) ve hücre artışının (Bertin ve Averbek, 2006) inhibe edilmesi, karbonhidrat metabolizmasının (Sandalio ve ark., 2001) ve mineral beslenme alımının plazma zarının geçirgenliğinin etkilenmesi yolu ile bozulması, DNA ve RNA sentezlerinin ve transkripsiyon işlemlerinin aksaması, DNA-DNA ile DNA-protein çapraz bağlarını değiştirmesinden dolayı genomda değişimleri ortaya çıkarması (Bertin ve Averbek, 2006) gibi birçok stress semptomlarının oluşması ile klorozis, nekrozis, kök lekesi, normal gelişimin durması ve toplam biyokütledeki artışın düşmesinden büyümenin inhibasyonu ve hatta ölüme kadar giden görünür durumların meydana gelmesine sebep olur (Bartha ve Fodorpataki, 2007; Liu ve ark., 2009).

Yapılan bir çalışmada 50 µM Cd uygulanan domates bitkisinin yaprak ve köklerinin nitrat içeriğinin kontrol bitkilerine göre %24 ve %62 oranında daha düşük olduğu belirlenmiştir (Chaffei ve ark., 2004). Bir başka çalışmada ise buğday fidelerinin yetiştirildiği ortama 0.04 mM Cd uygulamasının bitkilerin kontrole göre nitrat alımını %60, potasyum alımını ise %56 azalttığı saptanmıştır (Veselov ve ark., 2003). Kadmiyum bitki bünyesinde azot ve karbonhidrat metabolizmalarını değiştirmesi nedeniyle birçok fizyolojik değişikliğe neden olmaktadır. Bayçu, *Picea abies*'te yaptığı çalışmada kontrol grup hariç bütün köklerde kadmiyum konsantrasyonlarındaki artışlara bağlı olarak giderek artan bir kahverengileşmeye tanık olmuş ve uygulama süresi uzadıkça köklerin zamanla siyaha dönüştüğünü belirlemiştir (Bayçu ve ark., 1997). Pasquale ve arkadaşları (1995), ise *Coriandrum sativum*'da artan kadmiyum konsantrasyonlarına bağlı olarak yapraklarda bir sararma gözlemlendiğini belirtmektedirler.

Cd toksisitesi bitkiler için büyümeyi etkileyen önemli bir faktördür. Bitkiler için gerekli olmayan bu element enzim inhibasyonu gibi birçok fizyolojik hücresel prosesi etkiler (Kahvecioğlu ve ark., 2001). Kadmiyum toksitesinin çeltik bitkisinin büyüme oranı ve antioksidant enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada Cd miktarı arttıkça süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz enzimlerinin aktivitesinin azaldığı, melondialdehit içeriğinin arttığı saptanmıştır (Hassan ve ark., 2005). Domates ve fasulye bitkilerinde yapılan bir çalışmada 0-50 mM CdCl₂ (kadmiyum klorür) içeren

besin çözeltilerinin uygulanması sonucunda Cd'un bitki köklerindeki nitrat redüktaz aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (Quariti ve ark., 1997).

Potansiyel olarak Cd toksisitesi apoplastik, plazma zarı ve simplastik hedefler ile bağlantılı olarak kompleks ilişkiler sonucu ortaya çıkar. Cd iyonları bitkilerin kök sistemleri aracılığı ile bitkilere alınır ve başlıca epidermis ve dış cortex içerisinde birikirler. Muhtemelen endodermis bir bariyer gibi davranarak Cd'un gövde ve yapraklara taşınımının büyük bir kısmını engeller. Buna rağmen Cd son derece mobil bir element olduğundan apoplastik yolla (kök endodermis hücrelerinin duvarlarından) taşınarak kök sitoplazmasına geçer. Bundan sonra simplastik taşımayla floeme ve ksileme geçer (Lux ve ark., 2011). Kök epidermal hücrelerinin zarının iç kısmında oluşan -200 mV'luk negatif zar potansiyeli ağır metallerin alımına yardımcı olmaktadır (Bertin ve Auerbach, 2006). Bu nedenle birçok ağır metalin köklerdeki konsantrasyonu topraktaki bitki dokularından daha yüksektir (European Environmental Agency, 1995). Cd köklere girdikten sonra organik asit ve fitokelatinler gibi bileşiklere bağlanırlar (Benavides ve ark., 2005). Bitkide Cd içeriği kök > gövde > yaprak > meyve > tohum şeklinde bulunmaktadır. (Benavides ve ark., 2005). Topraktan bitkiye geçiş oranı çok yüksek olan ve toprakta oldukça hareketli olan Cd çok düşük konsantrasyonlarda bile özellikle Zn eksikliğinde bitkiler tarafından alınabilir olması ve bitkinin yenilen kısımlarında da birikme olasılığının bulunması bu metalin çevre açısından büyük tehlike potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (Köleli ve Kantar, 2006). Domates ve fasulye bitkilerinde kadmiyum toksisitesini araştıran bir başka çalışmada besin çözeltilerindeki kadmiyum konsantrasyonu ile domates ve fasulye bitkilerinin kök ve sürgünlerindeki kadmiyum konsantrasyonları arasında hemen hemen lineer bir ilişki olduğu, domates köklerinin sürgünlerden yaklaşık 15 kat, fasulye köklerinin ise yaklaşık 4 kat daha fazla kadmiyum akümüle ettiği bildirilmektedir (Xue ve ark., 1995). Keza domates ve fasulye bitkilerinde yapılan benzer bir çalışmada da köklerde kadmiyum birikiminin sürgünlerde belirlenen değerlerden önemli ölçüde yüksek olduğu görülmüştür (Quariti ve ark., 1997). Zhou ve arkadaşları (1992), tarafından domates bitkisinde yapılan bir başka çalışmada ise kadmiyum birikiminin köklerde ve gövdelerde meyvelerden daha yüksek olduğu görülmüştür. *Picea abies* üzerinde yapılan çalışmada köklerde kadmiyum birikimi yetiştirme ortamındaki kadmiyum konsantrasyonu arttıkça doğru orantılı olarak artış göstermiştir (Bayçu ve ark., 1997). Quariti ve

arkadaşları, 0,5 ya da 50 μ M kadmiyum veya bakır içeren besin çözeltilerinde geliştirilen 17 gün yaşlı domates fideciklerinde uygulanan metal konsantrasyonlarındaki artışlara bağlı olarak fideciklerinde kadmiyum ve bakır içeriklerinin arttığını bildirmektedirler.

Bu durum bizim sonuçlarımızla uyumludur. Veriler Cd iyonlarının çoğunun kök sistemi tarafından tutulduğunu ve sadece Cd'un bir kısmının kökten bitkinin üst kısımlarına (gövde ve yaprak) doğru geçiş yapabildiğini göstermektedir. İlk olarak Cd'a maruz bırakılma ana kök ve yan köklerin oluşumunun durmasına yol açar. Etkilenen kökler kısa ve kalındır ve hücre bölünmesi ve hücre uzamasının inhibisyonu (Yagdi ve ark., 2000), kalsiyum ve potasyum kullanımının bozulması (Alcantara ve ark., 1994; Kaya ve ark., 2002), kök solunumunun düşmesi, plazmodezmata ve hücre zarında kalloz birikimi (De Filippis, 1979; Ouzonidou ve ark., 1997) ve pektin, selüloz ve hemisellüloz sentezinin artışı ile birlikte hücre duvarında polisakkaritlerin depolanmasından dolayı su ve mineral besinlerin emiliminde yetersiz kalmaktadır (Bertin ve Averbeck, 2006). Bu karbohidratlar belkide Cd'un apoplast içerisinde tutulmasına yardımcı olabilir ve ileriki aşamalarda hücre uzamasının durmasına sebep olabilir (Lux ve ark., 2011). Tüm ağır metaller gibi Cd da hücre zarının geçirgenliğini etkileyerek su alımının azalmasına neden olur. Zarar görmüş kök sistemi toprak içerisinde fazla gelişemez ve su ve mineral besinlerin emilmesini sağlamakta yetersiz kalacaktır (Liu ve ark., 2009). Su eksikliği stomaların kapanmasına sebep olur (Barcelo ve Poschenrieder, 1990), ki buda birçok bitkide fotosentez ve transpirasyonun düşmesini tetikler (Alcantara ve ark., 1994; Chugh ve Sawhney, 1999). Cd'un bezelye bitkisinin fizyolojik parametreleri ve antioksidatif enzimler üzerine etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada 50 μ M Cd'un yapraklardaki terleme, fotosentez oranı ve klorofil sentezini azalttığı bildirilmektedir (Sandalio ve ark., 2001).

Aynı zamanda Cd diğer birçok metabolik yolu, mineral alımını, zar yapısını, stomanın yapısal değişikliklerini ve iletim ile CO₂ alımını etkiler (Ouzonidou ve ark., 1997). Cd hücre zarındaki ADPaz aktivitesini azaltır. Bunun yanı sıra lipid peroksidasyonuna neden olur. Ayrıca Cd fotosentezin karanlık evresinde karbondioksit fiksasyonu aşamasında görevli enzimlerin aktivitesini kısıtlar (Chugh ve Sawhney, 1999). Genel olarak bitkilerde kök ve topraküstü yapıların Cd'a verdiği tepki toprakaltı (kök) ve topraküstü (gövde ve yaprak) biyokütlesinde artan Cd miktarı ile orantılı olarak görülen

düşüştür (Liu ve ark., 2009). Moral ve arkadaşları, (1990) domates bitkilerinin kültür çözeltilerine 10 ya da 30 mg/l CdCl_2 ilave ettiklerinde bitki büyümesinin kadmiyum yoluyla inhibe edildiğini, kültür çözeltilisine ilave edilen kadmiyum konsantrasyonundaki artış ile birlikte kök ve gövde uzaması ile taze ağırlık oranlarında azalmalar gözlemlendiğini belirtmektedirler. Clarke ve arkadaşları (1989), ise tütün bitkisinin 16 kültür varyetesini kullanarak yaptıkları çalışmalarında kadmiyum fitotoksitesinin bitki genotipi ve uygulanan kadmiyum seviyeleri ile çeşitlilik gösterdiğini ve 0.25 ppm'lik bir kadmiyum konsantrasyonunun sürgün ağırlığını, internod uzunluğunu ve yaprak sayısını stimüle ettiğini, buna karşın toplam kuru ağırlık ve kuru ağırlık yüzdelerini inhibe ettiğini ve kadmiyum uygulanan bitki türlerinin hiçbirinde diğer bitki türlerinde yaygın olarak gözlenen yaprak semptomlarının gözle teşhis edilemediğini saptamışlardır. Tütün bitkisinde kadmiyumun etkisini araştıran bir çalışmada 0.25 ppm kadmiyum konsantrasyonunun sürgün ağırlığını stimüle ettiği belirlenirken, toplam kuru ağırlık ve kuru ağırlık yüzdelerinde ise aynı konsantrasyonda kadmiyumun inhibe edici etkilerinden bahsedilmektedir (Clarke ve ark., 1989). Quariti ve arkadaşları (1997), domates ve fasulye bitkilerine 0-50 mM CdCl_2 içeren besin çözeltilerini 7 gün süreyle uyguladıklarında kadmiyumun sürgün ve kök kuru ağırlık oranları üzerinde fasulye bitkilerinde domates bitkilerinden daha fazla baskılayıcı etkileri olduğunu saptamışlardır. Bu bizim çalışmamızda da gözlenmiştir. İki ay boyunca gün aşırı Cd'a maruz bırakılma (0, 50, 100, 200 ve 400 μM) sonucunda gövde boy uzunluğu ve kalınlığı ile kök, gövde, yaprak yaş ağırlık kütleleri ve yaprak yüzey alanı kontrol ile karşılaştırıldıklarında düşmüştür (Tablo 4.1). Yalnız kontrol ile karşılaştırıldığında biyokütlenin düşmesine rağmen 100 μM Cd uygulamasında 50, 200 ve 400 μM 'lık Cd uygulamalarının aksine (kontrolden daha düşük olmasına karşın) bir artış görülmektedir. Burada bitki düşük konsantrasyonda (50 μM) Cd'a maruz kaldığı zaman Cd'un toksik etkisini kompanse edebilmek için çeşitli organik asitlerin salınımı ya da stress ile alakalı enzimlerin oluşturulması gibi çeşitli aktiviteler oluşturuyor (Sandalio ve ark., 2001). Fakat artan Cd konsantrasyonu ile birlikte bitki belli bir eşik değerinden sonra Cd toksisitesine karşı koyamayacak duruma geliyor. Bitki hücreleri stress faktörlerine karşı bulundukları dokunun tipine bağlı olarak farklı yönlerde cevap oluştururlar (Büyük ve ark., 2012). Düşük klorofil miktarları Cd toksisitesinin bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Moya ve ark.,1993). Cd klorofil içeriğini ve

elektron akımını düşürerek fotosentezi etkilemektedir. Bunun yanında bezelye, fasulye gibi birçok bitkide Cd stresi ile alakalı olarak klorofil kaybı rapor edilmiştir (Sandalio ve ark., 200; Zengin, 2007). Cd toksitesi serbest radikal oluşumunu artırarak ya da enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların oluşumunu azaltarak oksidatif strese neden olurlar. Oksidatif stres sonucu ortaya çıkan en önemli fizyolojik olay senesestir (Özden ve Bayçu, 2004). Toksik düzeyde Cd klorofil biyosentezinde görev yapan protoklorofil reduktaz ile aminolevulinik asit sentezini engelleyerek klorofil sentezinin azalmasına neden olmaktadır (Zengin ve Munzuroğlu, 2005). Cd proteinlerin -SH gruplarındaki enzimleri inaktive etmekte, stomaların kapanmasına, transpirasyon ile su kaybının azalmasına ve klorofil biyosentezinin bozulmasına neden olmaktadır (Sheoran ve ark., 1990). Bizim çalışmamızda da bütün Cd konsantrasyon uygulamalarında 50, 200 ve 400 μM 'lık Cd uygulamalarına bakıldığında 100 μM 'lık Cd uygulamasında hafif bir artış görülse de kontrol ile kıyaslandığında klorofil a, b ve a/b, total klorofil ve karotenoid miktarlarında düşüş gözlenmiştir.

Sonuçlar bize açık bir şekilde göstermiştir ki bitkide kökte ve topraküstü yapılarda makro ve mikro besin kompozisyonu Cd'a maruz bırakılma neticesinde değişmiştir. *B. daigremontianum* bitki dokularındaki makro ve mikro besin konsantrasyonları Tablo 2.1. de gösterilmiştir. Cd stresi altında *B. daigremontianum*'un kök, gövde ve yapraklarındaki makro ve mikro besinlerin akümülyasyonunda farklılıklar ortaya çıkmıştır. *B. daigremontianum* bitkisinin kök, gövde ve yapraklarında Cu (Şekil 4.20/28/36), Na (Şekil 4.21/29/37) ve K (Şekil 4.22/30/38) konsantrasyonları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artan Cd konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak artmıştır ve en çok artış en yüksek seviyedeki Cd'a maruz bırakılan grupta görülmüştür. Kökte, gövdede ve yaprakta Mg (Şekil 4.18/26/34) ve Ca (Şekil 4.19/27/35) içeriği artan Cd konsantrasyonuna maruz kalma neticesinde doğru orantılı olarak düşmüştür. Kontrol ile yapılan karşılaştırmada ise Fe konsantrasyonun kök ve yaprakta artarken gövdede düştüğü gözlenmiştir. Keza benzer şekilde B için de kontrol grubu ile yapılan karşılaştırma neticesinde B konsantrasyonunun yaprak ve gövdede arttığı ama kökte düştüğü tespit edilmiştir (Şekil IV.23/31/39). Artan Cd konsantrasyonuna bağlı olarak Fe ve B artış ve düşüşlerinde linear olarak artış veya düşüşler görüldüğü saptanmıştır.

Bizim çalışmamızda bütün seviyelerde görülen Ca ve Mg konsantrasyonlarındaki düşüşlerin sebebi Cd'un voltaja bağlı Ca kanallarını engellemesi ve klorofil

metabolizmasının bozulması olabilir (Hattab ve ark., 2009). Klorofil metabolizması klorofil biyosentezinin inhibasyonu ve CO₂ fiksasyonunu ile alakası olan enzimlerin aktivasyonlarının azaltılması ile ortaya çıkar (Somashekaraiah ve ark., 1992; Siddhu ve Khan, 2012). Cd iyonlarının alımı görünüşe göre Ca ile zar üzerinde bulunan aynı taşıyıcı için yarış halindedir. Kök epidermal hücrelerinin zarının iç kısmında oluşan -200 mV'u geçen negatif zar potansiyeli katyonların ikincil taşıyıcılar yolu ile alımı için itici güç olanağı sağlamaktadır ki bu katyonların başında K, Na ve Cu gelmektedir. Zarın iki yanındaki H⁺ değişim derecesi ikincil iyon taşınma prosesleri için uygun gücü oluşturmaktadır. H⁺-ATPaz bu proton gradientinin formasyonu ve devamlılığından sorumludur. Cd'un H⁺-ATPaz aktivitesinin inhibasyonuna sebep olduğu yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. K, Na ve Cu konsantrasyonlarının artışı yaptığımız çalışmada *B. daigremontianum* kök, gövde ve yaprak kısımlarında bütün uygulanan Cd seviyelerinde gözlenmiştir. Yukarıda verilen bilgi bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir. Cd'un su dengesinide plazma zarının geçirgenliğinin değişmesinden dolayı etkilediği göz önüne alınırsa belki bitki hemostatik dengeyi koruyabilmek adına hücre içerisine K alımını arttırdığı varsayımını da ileri sürebiliriz. Fe konsantrasyonun *B. Daigremontianum*'da kök ve yaprakta artarken gövdede düştüğü gözlenmiştir. Keza benzer şekilde B için de bu mineralin konsantrasyonunun *B. Daigremontianum*'da yaprak ve gövde de arttığı ama kökte düştüğü tespit edilmiştir. Çeşitli metaller içerisinde antagonistik bir etkileşim vardır (Başar ve Özgümüş, 1999; Küçükymuk, 2011). Mesela Fe ve Zn için böyle bir ilişkiden bahsedebiliriz. Görünüşe göre belli iyonlar arasında (bitkiler için temel ve temel olmayanlar dâhil) kompleks ilişkiler mevcuttur. B toksisitesinin önlenmesi bitkilerde daha yüksek değerlerde Ca'un hücre içerisine alınması ile sağlanmaktadır (Lopez ve ark., 2002; Soylu ve ark., 2004; Türkan, 2006). *B. daigremontianum*'da borun gövde ve yaprakta artışı Ca'un hücre içerisine alınmasının engellenmesi sonucu ortaya çıkmış olabilir.

Genotoksisite; mutajenik veya karsinojenik maddelerin (kimyasal bileşikler, radyasyon vb.) organizmaların genomlarında meydana getirdiği değişikliklerdir. Bitkiler, çevresel kirliliğe ve mutajenik kimyasallara yer değiştiremedikleri için daha fazla maruz kalmakta ve vücutlarındaki bu maddelerin birikimi artmaktadır. Zararlı kimyasalların bitki genomlarındaki genotoksik etkileri mutasyon oluşturmaktadır. Genotoksik zararların çeşitleri arasında mikro çekirdek oluşumu (MN), fenotipik mutasyonlar, DNA

tek zincir kırılmaları, DNA çift zincir kırılmaları, kromozom ayrılmamaları, kararsızlığı gen duplikasyonları, nükleotid kayıpları veya eklenmeleri, DNA onarım mekanizmasında bozulmalar, çerçeve kayma mutasyonları, örnek verilebilmektedir (Waisberg ve ark., 2003). Ağır metallerin toksik miktarda artışına bağlı olarak hücre zarında, protein veya DNA gibi hücre bileşenlerinin yapısında zararlar oluşabilmektedir. Bu zararlar bitkilerden izole edilen ve agaroz jel üzerinde yürütülen DNA'ların bant yoğunluklarında değişimler, bant kaybolmaları veya yeni bant oluşumları şeklinde PCR tabanlı metodlar ile belirlenebilmektedir.

DNA'daki değişimler tespit edilirken moleküler markör (belirteç) tekniklerinden olan RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) kullanılmıştır. RAPD tekniği ilk defa 1990 yılında ortaya çıkmıştır. Bu teknik, rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nu (Polymerase Chain Reaction) temel almaktadır. (Williams ve ark., 1990; Welsh ve ark., 1990). RAPD yönteminde temel prensip, ilgili türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 9–10 bp (baz çifti) oligonükleotidin (primer), düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfî olarak bağlanarak Polimer Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltma yapmasıdır. Elde edilen çoğaltma ürünü radyoaktif olmayan standart jel elektroforezinde yürütülmekte ve çoğaltma ürünleri bantlar halinde görülmektedir. RAPD tekniğinin güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini etkileyen etmenlerden en önemlisi hedef DNA'dır. Diğer faktörler; primer konsantrasyonu, primer bağlanması, MgCl₂ konsantrasyonu, Taq DNA polimeraz konsantrasyonu, dNTP konsantrasyonudur (Aydın, 2004). RAPD tekniğinin avantajı çok az miktarda DNA'ya yeterli olması, tek primer kullanılması, çok gelişmiş cihaz gerektirmemesi ve pahalı bir teknik olmamasıdır. DNA zararlarının ve değişimlerinin tespitinde, karsinojenik instabilite analizlerinde RAPD çalışmaları yaygın olarak kullanılmaktadır (Atienzar ve Jha, 2006).

Türkiye Karabük bölgesinde demir-çelik fabrikalarının kirleticilerinden hava yoluyla etkilenen liken türünde (*Evernia prunastri* L.) kirlenmenin genotoksik etkisi araştırılmış ve biri kontrol olmak üzere toplam 11 bölgeden toplanan likenlerde ağır metal ve DNA analizleri RAPD markör tekniği ile analiz edilmiştir. DNA analizleri sonucunda 21 RAPD primerinden 13 tanesinde temiz DNA bantı ve 104 adet yeni DNA bant oluşumu tespit edilmiştir. Demir-çelik fabrikasına yakın bölgelerde Genomik kalıp stabilitesi

(GTS) değerlerine bakıldığında ise, değerlerinin yüksek olduğu bulunmuştur (Cansaran-Duman ve ark., 2011).

Aküçgül (*Trifolium repens* L.) bitkisinde hava kirliliğinin DNA değişimlerine genotoksik etkisinin incelenmesi amacıyla AFLP markör sistemi kullanılmıştır. Kuzey İtalya’da dağılım gösteren bu bitkiden 19 bölgeden örnekler toplanarak büyüme indeksleri (Growth Index=GI) hesaplanmış, klorofil a miktarı ölçülmüş ve genotoksik etkilerin, AFLP analizleri sonucunda toplam 355 DNA bandı elde edilmiş ve bu bantların %1.6’sının polimorfik olduğu görülmüştür (Piraino ve ark., 2006).

Bir tütün varyetesi ile (*Nicotiana tabacum* L. var. *xanthi*) kurşunun mutajenik etkilerini belirlemek için Comet analizi (DNA zararlarının değerlendirilmesine yönelik) ve bitki yaprak-kök yapılarında ağır metal analizi yapılmıştır. Kurşunun yüksek miktarlardaki uygulamalarında bitki kök ve yapraklarında kurşun birikiminde ve Comet analizleri sonucunda DNA zararlarında artma tespit edilmiştir (Gichner ve ark., 2008).

Genotoksisite çalışmalarında ağır metallerin DNA üzerindeki etkisi araştırılırken, yeni DNA bandı kazanma veya DNA band kaybı, çekirdek morfolojisi, mikro çekirdek oluşumu, Comet analizleri, ve mitotik aktivite hızı gibi çok farklı parametreler incelenebilmektedir.

Başka bir çalışmada fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisine çimlenme aşamasındayken, 150ppm ve 350ppm dozajları kullanılarak, civa (Hg), bor (B), krom (Cr) ve çinko (Zn) [(HgCl₂, H₃BO₃, K₂Cr₂O₇, ZnSO₄)] toksik elementleri verilmiştir. Büyütme süreci yedi gün sürmüştür. Hg, B, Cr ve Zn konsantrasyonları artırıldıkça kök ve yan köklerin büyümesinde azalma olduğu görülmüştür. Fasulye kök ve yapraklarında RAPD tekniğinde guanin-sitozin (GC) oranı %60–70 olan 12 primer kullanılmış ve özel DNA bantları elde edilmiştir. Polimorfizm oranları kökte %50.4, yapraklarda %28 olduğu tespit edilmiş, toplam bant sayısı 120 bulunmuş ve DNA bantlarının büyüklüğü 263–3125 baz çifti arasında değiştiği bulunmuştur. Hg, B, Cr ve Zn uygulamaları sonucunda elde edilen polimorfizm oranları sırasıyla %26.7, %45.8, %30 ve %25.3 bulunmuştur. Ağır metal uygulamaları sonucunda genetik ağaçta 3 ana kolun olduğu tespit edilmiş, 350 ppm Hg, B, Cr ve Zn uygulanan bitkilerin beraber gruplaştığı, 150 ppm B uygulanan bitkinin yalnız kaldığı saptanmıştır. En yüksek genetik benzerlik değerinin yapraklarda 150 ppm Hg uygulamasında olduğu görülmüştür. Sonuç olarak

bitkilerde ağıt metallerin genotoksik etkilerinin tespitinde RAPD analizlerinin faydalı bir yöntem olduğu tespit edilmiştir (Cenkci ve ark., 2009).

Yaygın çevresel kirleticilerden olan paranitrofenol kullanılarak fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisinin bu toksik bileşiğin 4, 18, 36, 72, 144, 288, 360, 720 nM konsantrasyonlarına nasıl tepki verdiği, DNA parmak izi tekniğiyle, polimer zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak araştırılmıştır. Bitkiler 14 gün boyunca PNP'ye maruz bırakılarak büyütülmüş ve analiz aşamasında toplam 46 primer kullanılmış, PCR ürünleri %1.8'lik agaroz jelde yürütülerek değerlendirmeler yapılmıştır. 46 RAPD primerinden 8 tanesinde polimorfik DNA bantları elde edilmiş, toplam bant sayısı 488 ve bu bantlarında %39'unun polimorfik olduğu görülmüştür. Düşük PNP konsantrasyon uygulamalarında 5 yeni bant (%9) elde edilirken, 11 bant kaybı (%20), yüksek PNP konsantrasyon uygulamalarında 11 yeni bant (%22.9) ve 22 bant kaybı (%45.8) sonuçları gözlenmiştir. Paranitrofenole maruz kalan bitkiler ile kontrol arasında genetik mesafe temelli bir dendrogram (soyağacı) çizilmiştir. Sonuçta düşük konsantrasyona maruz kalan bitkilerin kendi arasında, yüksek konsantrasyona maruz kalan bitkilerin kendi arasında gruplandığı görülmüş ve genetik benzerlik indeksi 0.241 ve 0.562 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Enan, 2007).

Yine fasulye bitkisinde yapılan başka bir çalışmada B elementinin 5ppm (%19) ve 10 ppm (%13) olan uygulamalarında bitkilerin kök ve gövde uzunlukları ölçülmüş ve kök büyümesini engelleyici önemli sonuçlar elde edilmiştir. RAPD analizlerinde OPA-08 primeri kullanılmış ve B uygulamalarının hepsinde toplam 14 yeni bandın oluştuğu, 7 DNA bandının da kaybolduğu görülmüştür. Kök gelişiminin 10 ppm B uygulaması sonucunda %7 azaldığı tespit edilmiştir (Kekec ve ark., 2010).

Yapılan başka bir çalışmada atık su kirliliğinin genotoksik etkisinin incelenmesi amacıyla yulaf (*Avena sativa*) bitkisi kullanılmıştır. RAPD analizleri sonucunda arıtılmış ve ham atık suların her ikisinin de genotoksik etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Analizlerde 15 primer kullanılmış, 186 DNA bandı elde edilmiş ve primer başına düşen bant sayısı 12.4 olarak tespit edilmiştir. Ham atık sularla sulanan bitkilerin 51 yeni DNA bandı, 19 tane de kaybolan DNA bandı, arıtılmış atık sularla sulanan bitkilerde 16 tane yeni DNA bandı, 17 tane kaybolan DNA bandı görülmüştür. Sonuçta, arıtılmış atık suyun ham atık suya oranla genotoksik etkisinin daha az olduğu tespit

edilmiştir. Öklidyen genetik mesafe matriks sonuçlarına göre soyağacında iki ana küme oluşmuş, birinci kümede kontrol grubu bitkileri ile arıtılmış atık suya maruz kalan bitkiler, ikinci kümede ise ham atık suya maruz kalan bitkiler bir araya toplanmıştır (Swaileh ve ark., 2008).

Yapılan başka bir çalışmada turp bitkisinin (*Brassica napus* L.) tohumları 0.5mM–5mM kurşun nitrata ($Pb(NO_3)_2$) maruz bırakılmıştır. Sonuçlar, aminolevulinik asit (ALA), aminolevulinik asit dehidrataz (ALAD), fotosentetik pigment içeriği (klorofil a, klorofil b ve karotenoid) ve RAPD analizleriyle incelenmiştir. Analizler neticesinde, kontrole oranla ağır metale maruz kalan bitkilerin yapraklarında 410 kat fazla kurşun (Pb) tespit edilmiş, kökte kurşun oranının yapraklara oranla 1.7 kat fazla olduğu gözlenmiştir. ALA ve ALAD analizleri sonucunda miktarlarının arttığı ve ters bir şekilde 5 mM Pb dozajı uygulamasında ALAD miktarının azaldığı anlaşılmıştır. RAPD tekniği uygulaması sonucunda, 11 RAPD primerinden toplam 90 DNA bandı elde edilmiş, band büyüklüklerinin 189–2928 baz çifti arasında değiştiği, Pb uygulanan bitkilerde ekstra 35 DNA bandının oluştuğu ve yeni oluşan bantların %77'sinin 1 kb'den küçük olduğu tespit edilmiştir. Farklı kurşun konsantrasyonlarıyla klorofil a ve klorofil b içerikleri arasında, zayıf bir ilişki olduğu, en yüksek dozaj olan 5 mM Pb uygulaması sonucunda klorofil a içeriğinde %57.4 ve klorofil b içeriğinde %68.5, karotenoid içeriğinde %38.1 azalma tespit edilmiştir. Sonuçta, RAPD analizlerinin klorofil içeriğiyle birlikte ağır metal kirliliğinde ekotoksikolojik olarak güçlü bir enstrüman olduğu anlaşılmıştır (Cenkci ve ark., 2010).

Cd tüm organizmalarda sitogenetik yapıyı etkileyen ve çevresel kirliliğe neden olan en önemli toksik ağır metallere biridir.

Bakla (*Vicia faba*) bitkisinde yapılan genotoksisite çalışmalarında, baklada Cd genotoksisitesine karşı selenyumun etkisi araştırılmıştır. Bitkilere Cd ($CdCl_2$) 183.316, 18.3316, 1.83316 ppm, selenyum (Se^{4+}) ise 0.08, 8, 800 ppm olarak 7 gün uygulanmış, ve DNA zararlarının tespitinde RAPD tekniği kullanılmıştır. DNA analizleri sonucunda 8 RAPD primerinden toplam 100 DNA bandı elde edilmiş ve bant büyüklüklerinin 300–400 baz çifti arasında değiştiği tespit edilmiştir. Cd bitkide bütün uygulama dozlarında genetik polimorfizme neden olmuş ve genomik kararsızlığı artırmıştır. Cd genotoksisitesine karşı 0.08ppm, 8ppm ve 800ppm Se eklendiğinde Cd'un neden

olduğu polimorfizmin azaldığı ve genomik kararlılığın arttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak Se ile Cd'un birbirine karşı antogonistik bir etki yaptığı görülmüştür (Taspınar ve ark., 2009).

İki farklı bitki türü olan sarımsak (*Allium sativum*) ve baklada (*Vicia faba*), 1–10–100–200 µM dozlarda kadmiyumnitrat (CdNO_3) uygulanarak, kök uçlarındaki sitogenetik zararlar, mikro çekirdek (MN) tekniği ve mitotik indeks (MI) metoduyla test edilmiş ve lipid peroksidasyonu analizleri yapılmıştır. Cd'un her iki türde de mikro çekirdek oluşumunu uygulanan dozdan bağımsız olarak artırdığı, yüksek Cd miktarının lipid peroksidasyonunu artırdığı, mitotik indeks ve profaz basamağını dikkat çekici şekilde azalttığı saptanmıştır. En düşük mitotik indeks 200 µM Cd konsantrasyonunda tespit edilmiş ve sadece profaz evresi gözlemlenmiş, bu konsantrasyonunda bakla bitkisinin hücre sayısında artış ve anormal morfoloji tespit edilmiştir (Ünyayar ve ark., 2006).

Roka (*Eruca sativa*) bitkisiyle yapılan bir çalışmada, çinko (Zn), Pb ve Cd ağır metallerinin 50mg/l - 100 mg/l - 150 mg/l uygulamalarının koleoptil ve radikula uzunluklarına etkisi araştırılmış, analizler sonucunda en fazla etkilenen yapının radikula olduğu görülmüştür. Cd ve Pb 150 mg/l'de genotoksik etki göstermiş, yüksek dozdaki Cd miktarının Zn ve Pb'un oranla radikula ve koleoptil büyümesini daha da azalttığı görülmüştür. Bitkinin genotoksisite incelemesinde, RAPD tekniğinde 20 çeşit primer kullanılmış ve bunlardan 4 tanesinden DNA bandı elde edilmemiştir. Üç RAPD primerinden tek bant, 13 primerden 5'ten fazla DNA bandı elde edilmiş ve primer başına ortalama bant sayısının 4 olduğu anlaşılmıştır. Spesifik DNA bantları yüksek doz Cd uygulamalarında elde edilmiş ancak yüksek dozdaki Zn uygulamasında elde edilmemiştir. Genetik çeşitlilik değeri %47.83 ile 95.83 arasında bulunmuştur. Soyağacı (dendrogram) benzerlik matrisi oluşturularak çizilmiştir (Qurainy ve ark., 2010).

Marul (*Lactuca sativa*) bitkisinde Cd genotoksisitesinin araştırılmıştır. Bitkilere 14 gün boyunca 100 µM $\text{Cd(NO}_3)_2$ uygulanmış sonra hasat edilerek, 9 çeşit SSR primeri kullanımıyla analiz edilmiştir. Genotoksisite çalışmaları neticesinde, Cd uygulanan bitkilerdeki 9 SSR markörünün kontrol grubu bitkileriyle aynı büyüklükte bantlar oluşturduğu ve mikrosatellit instabilitesi (MSI) oluşmadığı tespit edilmiştir (Monteiro ve ark., 2007).

Arpa (*Hordeum vulgare*) bitkisinde yapılan bir çalışmada, tohumlar 0, 10, 20, ve 40 mg/L⁻¹ dozlarda Cd uygulanarak çimlendirilmiştir. Fidelerdeki kök büyüme oranları, çözünür protein miktarları ve genotoksisite RAPD tekniği kullanılarak incelenmiştir. Analizler sonucunda kök büyüme oranlarında 10–20–40 mg Cd uygulamalarında sırasıyla %15.2, %29.5 ve %38.1 azalma olduğu, kök uçlarında total çözünür protein oranlarında sırasıyla %8.6, %22.5 ve %37.7 artış olduğu tespit edilmiştir. RAPD sonuçlarında 17 primerden 9 primerin spesifik sonuçlar verdiği görülmüş ve büyüklükleri 144–2639 baz çifti arasında değişen toplam 129 DNA bandı görülmüştür. Cd'un 10, 20 ve 40 mg L⁻¹ miktarlarda uygulanması sonucunda gözlenen polimorfizm oranları (P) sırasıyla %37.9, %52.7 ve %53.4'tür. Her dozdaki Cd sonucunda bitkilerin DNA'sında 4 yeni bandın oluştuğu ve 16 bandın da kaybolduğu saptanmıştır (Liu ve ark., 2009).

Yine arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkisinde Cd kirliliğinin DNA üzerindeki genotoksik etkilerini göstermek için yapılan diğer bir çalışmada 0, 30, 60, 120 mg/L⁻¹ konsantrasyonda Cd stresine maruz bırakılan arpa fidelerinde RAPD tekniğiyle DNA analizleri, kök gelişim oranları ve kök uçlarındaki çözünür protein miktarları incelenmiştir. Kök büyümesinin 120 mg Cd uygulamasının, kontrol bitkilerine göre %44.9, 60 mg Cd uygulamasının %32.6, 30 mg Cd uygulamasının ise %22.5 daha az büyüdüğü gözlenmiştir. Kök uçlarındaki çözünür protein analizleri sonucunda, Cd konsantrasyonu ile çözünür protein arasında negatif bir korelasyon olduğu bulunmuştur. RAPD analizlerinde, 12 primer çeşidinden uzunlukları 180 ile 2344 baz çifti arasında değişen toplamda 110 DNA bandı bulunmuştur. 30, 60 ve 120mg Cd uygulamalarında polimorfizm oranı sırasıyla %34.5, %40.9 ve % 44.5'tir. RAPD analizleri neticesinde DNA'da polimorfizmler tespit edilmiştir. Çevresel toksikoloji çalışmalarında, Cd'un genotoksik etkisinin incelenmesinde RAPD tekniğinin iyi bir araç olduğu gözlenmiştir (Liu ve ark., 2005).

İnsanların beslenmesi açısından en önemli gıdalardan olan pirinç (*Oryza sativa* L.) bitkisiyle yapılan çalışmada, bitkiye çimlenme döneminde 15, 30, 60 mg/L⁻¹ konsantrasyonlarda Cd verilmiştir. RAPD incelemeleri için 12 primer kullanılmış, kontrol bitkilerinde nükleotid sayısı 179–3056 arasında değişen 180 DNA bandı gözlenmiştir. Cd'un 15 mg, 30 mg ve 60 mg dozlarındaki uygulamalarında polimorfizm değeri (P) sırasıyla %32.8, %44.4 ve %66.7 olarak tespit edilmiştir. RAPD neticesinde

kontrol grubu bitkilerle Cd uygulanmış bitkiler kıyaslandığında, toplam 108 yeni DNA bandı oluşumu, 164 DNA bandının da kaybolduğu gözlenmiştir. Genomik kalıp stabilite değerlerine (GTS) bakıldığında, 15 mg Cd uygulamasında %67.1, 30 mg Cd uygulamasında %52.7, 60 mg Cd uygulamasında %32.3 olduğu bulunmuştur (Liu ve ark., 2007).

Yaptığımız çalışmada RAPD profil sonuçlarımıza göre yeni bantların ortaya çıkışı ve bant yoğunluğundaki artışlar 50, 200 ve 400 μ M Cd'a maruz bırakma uygulamalarında ortaya çıkmıştır. Yeni bantların ortaya çıkışı ve bant yoğunluklarındaki artışlar belki DNA da oluşan hasarın seviyesi ile alakalı olarak genomik kalıbın dengesizliğinden dolayı meydana gelmiştir. Aynı zamanda bant yoğunluğunda bir düşüş 100 μ M'lik Cd maruz bırakma uygulamasında görülmüştür. Bundan dolayı bu çalışma ile birlikte çevresel faktörlerin organizmaların karakterlerini etkilediği gösterilmiştir. Cd tek ve çift iplikçikteki kırılmalar, modifiye edilmiş bazlar, nükleotidlerin kaybolduğu bölgeler, DNA-protein çapraz bağları, okside olmuş bazlar gibi durumların oluşmasını başlatabilir (Bisova ve ark., 2003; Hsiao ve Stapleton, 2004). Bu tür farklı DNA lezyonları ve mutasyonlarının varlığından dolayı önemli yapısal değişikliklerin indüksiyonu PCR olaylarının kinetiğini büyük oranlarda etkileyebilir (Bowditch ve ark., 1993). Yeni PCR ürünlerinin ortaya çıkışı yapısal bir değişiklikten yada ortaya çıkan büyük nükleotid eksilmelerinden veya homolog rekombinasyon gibi mutasyonların sonucu olarak oligonükleotid işleme noktalarında meydana gelir (Atienzar ve ark., 1999). En son yapılan çalışmalar göstermiştir ki DNA parmakizi toksik maddelerin etkilerinin tespiti için biyoindikatörlerden biridir. Kırletici madde ile oluşturulan RAPD profil değişiklikleri genomik DNA kalıp istikrarı ve diğer parametrelerle birlikte genotoksik etkilerin değişikliklerinin karşılaştırmalı olarak ortaya konmasında kullanılmıştır (Liu ve ark., 2005; Atienzar ve ark., 2000). Bu çalışmada *B. daigremontianum* yapraklarında fotosentetik pigment seviyelerinin (klorofil a, b, a/b, total klorofil ve karotenoidler) tespiti ile Cd'a karşı oluşturulan cevaplar potansiyel bir biyomarkör olarak kullanılabilir mi diye değerlendirilmiştir. Veriler göstermiştir ki Cd bitkinin bütün bölümlerinde akümüle olmuştur ve akümülyasyon dışarıdan verilen Cd artışına paralel olarak artmıştır. *B. daigremontianum* fidanlardan alınan yapraklardaki fotosentetik pigment içeriğindeki değişiklikler Cd konsantrasyonu ile ters bir ilişki sergilemiştir. *B. daigremontianum* fidanlarındaki fotosentetik pigment seviyelerindeki

düşüş RAPD profillerinde değişikler ile bir korelasyon göstermiştir (Şekil IV.11-15. ve Şekil IV.40.). Bu bulgular göstermektedir ki DNA’da ortaya çıkan zararların uzantıları *B. daigremontianum* fidanlarının yapraklarındaki hücrelerin çoğunda ciddi problemler oluşturmuştur. Aynı zamanda *B. daigremontianum*’un bazı büyüme parametrelerinin (yaprak, gövde ve kök yaş ağırlıkları, gövde uzunlukları ve gövde kalınlığı) Cd’a maruz kalmasından dolayı oldukça değiştii gözlenmiştir. Keza yine birkaç makro ve mikro besinin alımının, taşımının ve kullamının Cd tarafından değişikliğe uğratıldığı gözlenmiştir. Cd’un fazlalılığı belli elementlerin alımını düşürmüş ve bazılarını arttırmıştır. Bu artış ve düşüşler bitkinin hangi kısmının olaya dâhil olması ile de alakalıdır.

Sonuçta, RAPD-PCR metodu Cd tarafından oluşturulan genomik düzeydeki değişiklikler için bir araştırma aracı olarak kullanılabilir. Daha da ilerisi için RAPD-PCR parmakizi diğer fizyolojik parametrelerle birlikte düşünöldüğünde Cd toksisitesinin tayininde güçlü bir strateji olarak kullanımını destekler sonuçları ortaya çıkarmıştır.

KAYNAKLAR

1. Aissa, L., Kéloufi, B. (2012) Determining the heavy metal pollution in Mascara (Algeria) by using *Casuarina equisetifolia*. *Ecologia Balkanica*, 4 (1), 1-7.
2. Akat, H. ve Özzambak, M. E. (2013) Örtü altı tuzlu koşullarda yetiştirilen *Limonium sinuatum* bitkisinde kalsiyum uygulamalarının stres parametreleri üzerine etkileri. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 10 (1).
3. Akgüç, N., Özyiğit, İ.İ., Yarcı, C. (2008) *Pyracantha coccinea* Roem. (Rosaceae) as a biomonitor for Cd, Pb and Zn in Muğla Province (Turkey). *Pakistan Journal of Botany*, 40 (4), 1767-1776.
4. Akın, M., Akın, G. (2007) Suyun önemi, Türkiye’de su potansiyeli, su havzaları ve su kirliliği. *Ankara Üniversitesi Dil ve Tarih-Coğrafya Fakültesi Dergisi* 47 (2), 105-118.
5. Alak, G., Tamanalp M., Topal, A., Arslan, H., Oruç, E., Altun, S. (2013) Histopathological and biochemical effects of humic acid against cadmium toxicity in brown trout gills and muscles. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13, 315-320.
6. Alcantara E., Romera F.J., Canete M., De LaGuardia M.D. (1994) Effects of heavy metals on both induction and function of roots Fe(III) reductase in Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. *Journal of Experimental Botany* 45, 1893-1898.
7. Al-Qurainy, F. (2010) Application of inter simple sequence repeat (ISSR marker) to detect genotoxic effect of heavy metals on *Eruca sativa* (L.). *African Journal of Biotechnology*, 9 (4).
8. Anonim 1, <http://marketpublishers.com/lists/13419/news.html>
9. Arnon, D.I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoxidase in *beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24, 1-15.
10. Atienzar, F. A., Jha A. N. (2006) The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A Critical Review, *Mutation Research*, 613, 76–102.
11. Aybak, H.Ç. (2005) Bitkisel Üretim, Hasat Yayınevi, İstanbul 52- 57.

12. Aydın, S. Ö. (2004) RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) belirleyicileri ve bitki sistematiği. Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 6, 113-129.
13. Azevedo, R.A., Lea, P. J. (2005) Toxic metals in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology, 17-1.
14. Baranowska, I., Srogi, K., Wlochowicz, A., Szczepanik, K. (2002) Determination of heavy metal contents in samples of medicinal herbs. Polish Journal of Environmental Studies, 11, 467-471.
15. Barcelo, J., Poschenrieder, C. (1990) Plant water relations as affected by heavy metal stress: A Review. Journal of Plant Nutrition, 13, 1-37.
16. Bartha, L., Fodorpataki, L. (2007) Physiological reactions of the succulent CAM plant *Bryophyllum daigremontianum* to increased salinity. Contribuții Botanice 42, 47-56.
17. Baryla, A., Carrier, P., Franck, F., Coulomb, C., Sahut, C., Havaux, M. (2001) Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. Planta 212, 696-709.
18. Başar, H., Özgümüş, A. (1999) Değişik demirli gübre ve dozlarının şeftali ağaçlarının bazı mikro besin elementi içerikleri üzerine etkisi. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 23, 273-281.
19. Beckett, KP, Freer-Smith, PH, Taylor, G. (1998) Urban woodlands: Their role in reducing the effects of particulate pollution. Environmental Pollution, 99, 347-360.
20. Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M.L. (2005) Cadmium toxicity in plants. Brazilian Journal of Plant Physiology, 17 (1), 21- 34.
21. Bertin, G. and Averbeck, D. (2006) Cadmium: Cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences. Biochimie, 88, 1549-1559.
22. Bonnet, M., Camares, O., Veisseire, P. (2000) Effects of Zinc and influence of *Acremonium lolii* on growth parameters, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activities of ryegrass (*Lolium perenne* L.cv Apollo). Journal of Experimental Botany, 51 (346), 945-953.

23. Bray, E.A, Bailey-Serres J, Weretilnyk, E. (2000) Responses to abiotic stresses. In W Gruissem, B Buchannan, R Jones, eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, 1158–1249.
24. Brekken, A., Steinnes, E. (2004) Seasonal concentrations of cadmium and zinc in native pasture plants: Consequences for grazing animals. *Science of the Total Environment*, 326, 181–195.
25. Cansaran-Duman, D. (2011) Study on accumulation ability of two lichen species (*Hypogymnia physodes* (L.) Nyl and *Usnea hirta* (L.) Weber ex F.H. Wigg) at Iron-steel factory site, Turkey. *Journal of Environmental Biology*, 32 in press.
26. Carfagna, S., Lanza, N., Salbitani, G., Basile, A., Sorbo, S., Vona, V. (2013) Physiological and morphological responses of lead or cadmium exposed *Chlorella sorokiniana* 211-8K (Chlorophyceae). *Springer Plus*, 2, 147.
27. Cenkci, S., Ciğerci, İ.H., Yıldız, M., Özay, C., Bozdağ, A., Terzi, H. (2010) Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa* L. *Environmental and Experimental Botany*, 67, 467–473.
28. Cenkci, S., Yıldız, M., Ciğerci, İ.H., Konuk, M., Bozdağ, A. (2009) Toxic chemicals-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Chemosphere*, 76, 900–906.
29. Chaffei, C., Pageau, K., Suzuki, A., Gouia, H., Ghorbel, M.H., Masclaux-Daubresse, C. (2004) Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. *Plant Cell Physiology*, 45 (11), 1681-1693.
30. Chaoui, A., Ferjani, E. (2005) Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Comptes Rendus Biologies*, 328, 23-31.
31. Chugh, L.K., Sawhney, S.K. (1999) Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37, 297-303.
32. Clemens, S. (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212, 475–486.
33. Clemens, S. (2006) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88, 1707-1719.
34. Corsolini, S. (2009) Industrial contaminants in Antarctic Biota. *Journal of Chromatography A*, 1216, 598-612.

35. Costa, G., Morel, J.L. (1994) Water relations, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce. *Plant Physiology Biochemistry*, 32, 561-570.
36. Cramer, G. R. (2002) Calcium-sodium interactions under salinity stress. In: *Salinity. Environment-Plants-Molecules*. Eds. A. Läuchli and U. Lüttge. Kluwer Academic Publishers, Invited Review, 205-227 (in press).
37. Curie, C., Briat, J. F. (2003) Iron transport and signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 183–206.
38. Çağlarırnak, N., Hepçimen, A. Z. (2010) Ağır metal toprak kirliliğinin gıda zinciri ve insan sağlığına etkisi. *Akademik Gıda*, 8 (2), 31-35.
39. Çulha, Ş., Çakırlar H. (2011) Tuzluluğun bitkiler üzerine etkileri ve tuz tolerans mekanizmaları. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 11, 11-34.
40. Dalcorso, G., Farinati, S., Maistri, S., Furini, A. (2008) How plants cope with cadmium: Staking all on metabolism and gene expression. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50, 1268- 1280.
41. Dankov, K., Busheva, M., Stefanov, D., Apostolova, E.L. (2009) Relationship between the degree of carotenoid depletion and function of the photosynthetic apparatus. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96, 49–56.
42. Das, P., Samantaray, S., Rout, G.R. (1997) Studies on cadmium toxicity in plants: A review. *Environmental Pollution*, 98, 29-36.
43. De Filippis, L.F. (1979) The effect of heavy metal compounds on the permeability of chlorella cells. *Zeitschrift fur Pflanzen Physiologie*, 92, 39-49.
44. Demirezen, D., Aksoy, A. (2004) Accumulation of heavy metals in *Typha Angustifolia* (L.) and *Potamogeton Pectinatus* (L.) living in Sultan Marsh (Kayseri, Turkey). *Chemosphere*, 56, 685-696.
45. Demirezen, D., Aksoy, A. (2006) Heavy metal levels in vegetables in turkey is within safe limits for Cu, Zn, Ni and exceeded for Cd and Pb. *Journal of Food Quality*, 29 (3), 252-265.
46. Deng, H., Ye, Z.H., Wong, M.H. (2004) Accumulation of lead, zinc, copper and cadmium by 12 wetland plant species thriving in metal-contaminated sites in China. *Environmental Pollution*, 132, 29-40
47. Elik, A., Akçay, M. (2000) Sivas Kenti'nde ağır metal kirliliğinin yerel ve zamansal değişimi. *Turkey Journal Engineering Environment Science*, 24, 15-24.

48. Elmlund, H., Lundqvist, J., Al-Karadaghi, S., Hansson, M., Hebert, H., Lindahl, M. (2008) A new cryo-EM single-particle ab initio reconstruction method visualizes secondary elements in an ATP-fueled AAA+ motor. *Journal of Molecular Biology*, 375, 934–947.
49. Elson, M., Hass, M.D. (2001) Toxic minerals and heavy metals. The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, 776 Geneva.
50. Enan, M.R. (2007) Assessment of genotoxic activity of para-nitrophenol in higher plant using arbitrarily primed-polymerase chain reaction (AP-PCR). *American Journal Biotechnology and Biochemistry*, 3, 103–109.
51. Epstein, E. (1972) *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives*. Wiley, New York.
52. Epstein, E. (1999) Silicon. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50, 641-664.
53. European Environmental Agency (1995) *Soil Pollution by Heavy Metals. Europe's Environment The Dobris Assessment*. Luxembourg: Office des Publications, 676.
54. Everitt, J.H., Lonard, R.L., Little, C.R. (2007) *Weeds in South Texas and Northern Mexico*. Lubbock: Texas Tech University Press, 569-575.
55. Farooq, M., Anwar, F., Rashid, U. (2008) Appraisal of heavy metal contents in different vegetables grown in the vicinity of an industrial area. *Pakistan Journal Botany*, 40 (5), 2099-2106.
56. Fırat, B. (1998) *Bitki Nasıl Beslenir, Atlas Kitabevi*, Konya.
57. Garbisu, C., Alkorta, I. (2001) Phytoextraction: A cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology*, 77, 229-236.
58. Giannakoula, A., Moustakas, M., Syros, T., Yupsanis, T. (2010) Aluminum stress induces up-regulation of an efficient antioxidant system in the Al-tolerant maize line but not in the Al-sensitive line. *Environmental and Experimental Botany*, 67, 487–494.
59. Gichner, T., Znidar, I., Száková, J. (2008) Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 652 (2), 186–190

60. Gouia, H., Gorbil, M.H., Meyer, C. (2000) Effects of cadmium on activity of nitrate reductase and on other enzymes of the nitrate assimilation pathway in bean. *Plant Physiology Biochemistry*, 38, 629-638.
61. Greger, M. (1999) Metal availability and bioconcentration in plants. In: *Heavy Metal Stress in Plants from molecules to ecosystem*, Prasad, M.N.V., and Hagemeyer, J., (eds.), Springer-Verlag, Berlin, 1- 27.
62. Gupta, V.K., Jain, C.K., İmran, A., Sharma, M., Saini, V.K. (2003) Removal of cadmium and nickel from wastewater using bagasse fly ash—a sugar industry waste. *Water Research*, 37, 4038–4044.
63. Güler, Ç., Çobanoğlu, Z. (2001) Gürültü. *Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi*, 19.
64. Gür, N., Topdemir, A., Munzuroğlu, Ö., Çobanoğlu, D. (2004) Ağır metal iyonlarının (Cu^{+2} , Pb^{+2} , Hg^{+2} , Cd^{+2}) *Clivia sp.* bitkisi polenlerinin çimlenmesi ve tüp büyümesi üzerine etkileri. *Fırat Üniversitesi Fen ve Matematik Bilimleri Dergisi*, 16 (2), 177-182.
65. Haehnel, W. (1984) Photosynthetic electron transport in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 35, 659-693.
66. Hall, J. L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53 (366) 1-11.
67. Harite, Ü. (2008) Pamukta Bor Toksisitesine Dayanıklılık. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye.
68. Hassan, M.J., Shao, G., Zhang, G. (2005) Influence of cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activity in rice cultivars with different grain cadmium accumulation. *Journal of Plant Nutrition*, 28 (7), 1259-1270.
69. He, Z., Li, J., Zhang, H., Ma, M. (2005) Different effects of calcium and lanthanum on the expression of phytochelatin synthase gene and cadmium absorption in *Lactuca sativa*. *Plant Science*, 168, 309-318.
70. Hepler, P.K. (2005) Calcium: A central regulator of plant growth and development. *American Society of Plant Biologists The Plant Cell*, 17 (8), 2142-2155.
71. Hosier, S., Bradley, L. (1999) Guide to symptoms of plant nutrient deficiencies. The University of Arizona Cooperative Extension, 5.

72. Hou, X., Jones, B.T. (2000) Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry. In Encyclopedia of Analytical Chemistry, R.A. Meyers (Ed.), 9468–9485.
73. Kabata-Pendias, A., Mukherjee, A.B. (2007) Trace Elements From Soil To Human. Springer Berlin Heidelberg, New York, 1-519.
74. Kacar, B., Katkat, A.V. (1998) Bitki Besleme. Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayın No: 127. Vipaş Yayınları, 3, Bursa.
75. Kacar, B., Katkat, V. (2010) Bitki Besleme (Plant Nutrition), 5. Baskı. Nobel Yayın Dağıtım Yayın No:849.
76. Kaçar, B. (2006) Potasyumun bitkilerde işlevleri ve kalite üzerine etkileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü, 20- 29.
77. Kaçar, B., Katkat, V. (2007) Bitki Besleme, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 10-24.
78. Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven A., Timur, S. (2001) Metallerin Çevresel Etkileri-I. İTÜ, Metalurji ve Malzeme Müh. Bölümü, Metalurji Dergisi 136, İstanbul, 47-53.
79. Karaömerlioğlu, B. (2011) *Medicago sativa* L. ve *Vicia sativa* L. Bitkileri Kullanılarak Toprakta Bor Gideriminin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye.
80. Kartal, G., Güven, A., Kahvecioğlu, Ö., Timur, S. (2004) Metallerin Çevresel Etkileri –II, İTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü Ders Notu, 137, İstanbul.
81. Kaya, C., Higgs, D., İkinci, A. (2002) An experiment to investigate ameliorative effects of potassium sulphate on salt and alkalinity stressed vegetable crops. Journal of Plant Nutrition, 25 (11), 2545-2558.
82. Kaya, S., Akar, F. (2002) Metaller, diğer inorganik ve radyoaktif maddeler. Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji, Ed: Kaya, S., Pirinçci, D., Bilgili, A., 2. Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, 212-233.
83. Kayhan, F.E. (2006) Su ürünlerinde Cd'un biyobirikimi ve toksisitesi. E.U. Su Ürünleri Dergisi, 23, 215-220.
84. Kekec, G., Sakcali, M. S., Uzonur, I. (2010) Assessment of genotoxic effects of boron on wheat (*Triticum aestivum* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using RAPD analysis. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 84 (6), 759-764.

85. Kıbağ, F., Munzuroğlu, Ö. (2003) Fasulye fidelerinin (*Phaseolus Vulgaris* L.) kök, gövde ve yaprak büyümesi üzerinde kadminyum (Cd⁺⁺) ve civa (Hg⁺⁺)'nın etkileri. C.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi, 24, 64,75.
86. Kirkham, M.B. (2006) Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments. *Geoderma*, 137 (1-2), 19-32.
87. Kotrba, P., Najmanova, J., Macek, T., Ruml, T., Mackova, M. (2009) Genetically modified plants in phytoremediation of heavy metal and metalloids soil and sediment pollution. *Biotechnology Advances*, 27, 799–810.
88. Köleli, N., Eker, S., Cakmak, I. (2004) Effect of zinc fertilization on cadmium toxicity in durum and bread wheat grown in zinc-deficient soil. *Environmental Pollution*, 131 (3), 453-459.
89. Köleli, N., Kantar, Ç. (2006) Fosforlu gübrede ağır metal tehlikesi. *Ekoloji Magazin Dergisi*, 9.
90. Küçükyumuk, Z. (2011) Farklı Çinko Uygulamalarının Değişik Anaçlara Aşılı Elma Çeşitlerinde Çinko ve Diğer Besin Elementi İçerikleri ile Verim Üzerine Etkileri, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, Türkiye.
91. Liu, W., Yang, Y.S., Zhou, Q.X., Xie, L., Li, P.J., Sun, T. (2007) Impact assessment of cadmium contamination on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings at molecular and population levels using multiple biomarkers. *Chemosphere* 67 (6), 1155–1163.
92. Liu, W., Yang, Y.S., Li, P.J., Zhou, Q.X., Han, Y.P. (2009) Risk assessment of cadmium contaminated soil on plant DNA damage using RAPD and physiological indices. *Journal of Hazardous Materials*, 161, 878-883.
93. Liu, W., Li, P.J., Qi, X.M., Zhou, Q.X., Zheng, L., Sun, T.H., & Yang, Y.S. (2005) DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. *Chemosphere*, 6 (2), 158-167.
94. Lombardi, L. (2005) Copper Toxicity in *Prunus cerasifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. *Plant Science*, 168, 797–802.
95. Lopez- Lefebre, L.R., Rivero, R.M., Garcia, P.C., Sanches, E., Ruiz, J.M., Romero, L. (2002) Boron effect on mineral nutrients of tobacco. *Journal Plant Nutrition*, 25 (3), 509-522.

96. Lux, A., Martinka, M., Vaculík, M., White, P.J. (2011) Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review *Journal of Experimental Botany*, 62 (1), 21-37
97. Macfarlane, G.R., Burchett, M.D. (2001) Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Marine Pollution Bulletin*, 42, 233-240.
98. Majer, J.B.J., Tscherko, D., Paschke, A. (2002) Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and microbial enzyme activities: a comparative investigation. *Mutation Research*, 515, 111-124.
99. Marschner, H. (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*, Academic Press, London.
100. Marschner, H. (2008) *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Digital Print. Academic Press, 889.
101. Matschi, S., Werner, S., Schulze, W.X., Legen, J., Hilger, H.H., Romeis, T. (2013) Function of calcium-dependent protein kinase CPK28 of *Arabidopsis thaliana* in plant stem elongation and vascular development. *The Plant Journal* 73 (6), 883–896.
102. Méndez-Armenta, M., Ríos, C. (2007) Cadmium neurotoxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23 (3), 350-358.
103. Meravi, N., Prajapati S.K. (2013) Effects of heavy metals/metalloids contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia pallida*. *Environmental Skeptics and Critics*, 2 (2), 58-62.
104. Mercier, L., Pinnauala, T. J. (1997) Access in mesoporous materials: advantages of a uniform pore structure in the design of a heavy metal ion adsorbent for environmental remediation. *Advanced Materials*, 9 (6), 500-503.
105. Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Breusegem, F.V., (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9 (10), 490-498.
106. Monteiro, M., Santos, C., Mann, R.M., Soares, A.M., Lopes, T. (2007) Evaluation of cadmium genotoxicity in *Lactuca sativa* L. using nuclear microsatellites. *Environmental and Experimental Botany*, 60 (3), 421-427.
107. Moya, J.L., Ros, R., Picazo, I. (1993) Influence of cadmium and nickel on growth, net photosynthesis and carbohydrate distribution in rice plants. *Photosynthesis Research*, 36, 75-80.

108. Murugavel, P., Pari, L., Sitasawad, S.L., Kumar, S., Kumar, S. (2007) Cadmium induced mitochondrial injury and apoptosis in vero cells: protective effect of diallyl tetrasulfide from garlic. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39 (1), 161-170.
109. Müller, H.A., Hansson, M. (2009) The barley magnesium chelatase 150-kD subunit is not an abscisic acid receptor1[OA]. Plant Physiology, 150, 157–166.
110. Navarro, M. J., Martinez, V., Carvajal, M. (2000) Amonium, bicarbonate and calcium effects on tomato plants grown under saline conditions. Plant Science, 157, 89-96.
111. Ouzonidou, G., Moustakas, M., Eleftheriou, E.P. (1997) Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 32, 154-160.
112. Ozaki, I., Watanabe, I., Kuno, K. (2004) As, Sb and Hg distribution and pollution sources in the roadside soil and dust around Kamikochi, Chubu Sangaku National Park, Japan. Geochemical Journal, 38, 473-484.
113. Öktüren, A.F., Sönmez, S. (2006) Ağır metal toksisitesinin bitki metabolizması üzerine etkileri. Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Toprak Bölümü, Antalya.
114. Öktüren, F., Sönmez, S. (2005) Bitki besin maddeleri ile bazı büyüme düzenleyicileri (hormonları) arasındaki ilişkiler. Derim, 22 (2), 20-32.
115. Ölgen, M.K., Gür, F. (2012) Yatağan termik santrali çevresinden toplanan likenlerde (*Xanthoria parietina*) saptanan ağır metal kirliliğinin coğrafi dağılışı. Türk Coğrafya Dergisi, 57, 43-54.
116. Özçetin, M., Yılmaz, R., Mendil, D., Koçyiğit R., Gedik, K.D. (2013) Anne sütünde toksik ağır metal varlığı. Journal of Clinical and Analytical Medicine, 4 (2), 89-92.
117. Özdemir, Ö., Demir, E., (2010) Fındıkpınarı-Erdemli/Mersin bölgesinde nikel akümülatörü bir bitki türü *Alyssum murale* Waldst.&Kit. Jeoloji Mühendisliği Dergisi, 34 (1).
118. Özdemir, Z. (2009) Bitkilerle maden bulunabilir mi? Biyojeokimyasal (Bitki jeokimyası) prospeksiyon nedir? Madencilik ve Yer Bilimleri Dergisi, 1 (3), 14-19.

119. Özden, H., Bayçu, G. (2004) Cadmium exposure and changes in some physiological parameters of *Quercus robur* ssp. Robur L. (Common Oak) and *Acer negundo* L. (Box Elder) seedlings. Fresenius Environmental Bulletin, 13 (3), 268-273.
120. Özyiğit, İ.İ., Akıncı, Ş., (2009) Effects of some stress factors (aluminum, cadmium and drought) on stomata of Roman Nettle (*Urtica pilulifera* L.). Not Bot Horti Agrobo, 37 (1), 108-115.
121. Palmer, C.M., Guerinot, M.L. (2009) Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. Nature Chemical Biology, 5, 333–340.
122. Parida, A.K., Das, B.A. (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants. Science Direct, 60, 324-349.
123. Pasquale, R., Rapisarda, A., Germano, M.P., Ragusa, S., Kirjavainen, S., Galati, E.M. (1995) Effects of cadmium on growth and pharmacologically active constituents of the medicinal plant *Coriandrum sativum* L. Water, Air and Soil Pollution, 84 (1-2), 147-157.
124. Paustenbach, D.J., Finley, B.L., Mowat, F.S. (2003) Human health risk and exposure assessment of chromium (VI) in tap water. Journal of Toxicology and Environmental Health Part A, 66, 1295-1339.
125. Peng, K.J., Li, X.D., Luo, C.L., Shen, Z.G. (2006) Vegetation composition and heavy metal uptake by wild plants at three contaminated sites in Xiangxi Area, China. Journal of Environmental Science and Health, 41, 65- 76.
126. Petrova, S. (2011) Biomonitoring study of air pollution with *Betula pendula* Roth. Plovdiv, Bulgaria. Ecologia Balkanica, 3 (1), 1-10.
127. Piraino, F., Aina, R., Palin, L., Prato, N., Sgorbati, S., Santagostino, A., Citterio, S. (2006) Air quality biomonitoring: Assessment of air pollution genotoxicity in the Province of Novara (North Italy) by using *Trifolium repens* L. and molecular markers. Science of the Total Environment, 372, 350-359.
128. Pohl, C., Croot, P.L., Hennings, U., Daberkow, T., Budeus, G., Loeff, M.R. (2011) Synoptic transects on the distribution of trace elements (Hg, Pb, Cd, Cu, Ni, Zn, Co, Mn, Fe, and Al) in surface waters of the Northern- and Southern East Atlantic. Journal of Marine Systems, 84, 28-41.
129. Prajapati, S.K. (2012) Biomonitoring and speciation of road dust for heavy metals using *Calotropis procera* and *Delbergia sissoo*. Environmental Skeptics and Critics, 1 (4), 61-64.

130. Prasad, M.N.V., Malec, P., Waloszek, A., Bojko, M., Strzalka, K. (2001) Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation. *Plant Science*, 161, 881–889.
131. Prozialeck, W.C., Edwards, J.R., Woods, J.M. (2006) The vascular endothelium as a target of cadmium toxicity. *Life Sciences* 79 (16), 1493-1506.
132. Rivero-Huguet, M., Huertas, R., Francini, L., Vila, L., Darre, E. (2006) Concentrations of As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, and Zn in Uruguayan rice determined by atomic absorption spectrometry. *Atomic spectroscopy*, 27 (2), 48-55.
133. Robinson, B.H., Mills, T.M., Petit, D., Fung, L.E., Green, S.R., Clothier, B.E. (2000) Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: implications for phytoremediation. *Plant and Soil*, 227, 301–306.
134. Sabiha-Javied, Mehmood, T., Chaudhry, M.M., Tufail, M., Irfan, N. (2009) Heavy metal pollution from phosphate rock used for the production of fertilizer in Pakistan. *Microchemical Journal*, 91, 94–99.
135. Saint-Laurent, D., Gervais-Beaulac, V., Baril, F., Matteau, C., Berthelot, J.-S. (2013) Spatial variability of heavy metal contamination in alluvial soils in relation to flood risk zones in outhern Québec, Canada. *Air, Soil and Water Research*, 6, 1-13.
136. Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gomez, M., Romero-Puertas, M.C., del Rio, L.A. (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*, 52 (364), 2115-2126.
137. Sayadi, M.H., Sayyed, M.R.G. (2011) Variations in the heavy metal accumulations within the surface soils from the Chitgar industrial area of Tehran. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 1 (1), 36-46.
138. Schenkeveld, W.D.C., Dijcker, R., Reichwein, A.M., Temminghoff, E.J.M., Riemsdijk, W. H. (2007) The effectiveness of soil-applied FeEDDHA treatments in preventing iron chlorosis in soybean as a function of the o,o-FeEDDHA content. *Plant Soil*, 303, 161-176.
139. Sekeroğlu, N., Özkutlu, F., Kara, S. M., Özgüven, M. (2008) Determination of cadmium and selected micronutrients in commonly used and traded medicinal plants in Turkey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 86-90.

140. Shah, K., Kumar, R.G., Verma, S., Dubey, R.S. (2001) Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science*, 161, 1135- 1144.
141. Sharma, P., Dubey, R.S. (2005) Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17 (1), 35-52.
142. Sharma, S.S., Kaul, S., Metwally, A., Goyal, K.C., Finkkemeier, I., Dietz, K.J. (2004) Cadmium toxicity to barley (*Hordeum vulgare*) as affected by varying Fe nutritional status. *Plant Science*, 166, 1287-1295.
143. Siatka, T., Kašparová, M., Spilková, J. (2012) Effects of zinc and cadmium ions on cell growth and production of coumarins in cell suspension cultures of *Angelica archangelica* L. *Ceska a Slovenska Farmacie* 61, 261-266.
144. Smirnoff, N. (2005) Ascorbate, Tocopherol and Carotenoids: Metabolism, Pathway Engineering and Functions, Antioksidants and Reactive Oxygenspecies In Plants. Publishing by Blacwell, ISBN 978-1-4051-2529-1, Oxford, 302.
145. Soylu, S., Topal, A., Sade, B., Akgün, N., Gezgin, S., Babaoğlu, M. (2004) Yield and yield attributes of durum Wheat (*Triticum durum* Desf.) genotypes as affected by boron application in boron deficient-calcareous soils: An evaluation of major Turkish genotypes for B efficiency. *Journal of Plant Nutrition*, 27 (6), 1077-1106.
146. Sujetoviene, G., Sliumpaite, I. (2013) Response of *Evernia prunastri* transplanted to an urban area in central Lithuania. *Atmospheric Pollution Research* 4, 222–228.
147. Suzuki K., Yabuki, T., Ono, Y. (2009) Roadside leaves as bioindicators of heavy metal pollution in traffic areas of Okayama, Japan. *Environmental Monitoring and Assessment*, 149, 133-141.
148. Swaileh, K.M., Hussein, R., Ezzughayyar, A. (2008) Evaluating wastewater-induced plant genotoxicity using randomly amplified polymorphic DNA. *Environmental toxicology*, 23 (1), 117-122.
149. Taspinar, M.S., Agar, G., Yildirim, N., Sunar, S., Aksakal, O., Bozari, S. (2009) Evaluation of selenium effect on cadmium genotoxicity in *Vicia faba* using RAPD. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 7 (3&4), 857-860.
150. Long, T.A., Tsukagoshi, H., Busch, W., Lahner, B., Salt, A.E., Benfey, P.N. (2010) The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in arabidopsis roots. *The Plant Cell*, 22, 2219–2236.
151. Tester, M., Leġgh, R.A. (2001) Partitioning of Nutrient Transport Processes in Roots. *Journal Experiment of Botanical*, 52, 445-457.

152. Tucker, M. R. (1999) Essential plant nutrients: Their presence in North Carolina soils and role in plant nutrition. North Carolina Department of Agriculture & Consumer Services, Miscellaneous Publication, 2- 9.
153. Tuna, L.A., Kaya, C., Altunlu, H., Yokas, İ., Yagmur, B. (2007) The effects of calcium sulphate on growth, membrane stability and nutrient uptake of tomato plants grown under salt stres. Science Direct, 59, 173-178.
154. Türkmen, O., Şensoy, S., Erdal, İ., Kabay, T., (2002) Kalsiyum uygulamalarının tuzlu fide yetiştirme ortamlarında domateste çıkış ve fide gelişimi üzerine etkileri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 12 (2), 53-57.
155. Türkan, Y. (2006) Buğdayda Bor Toksisitesi ile Fosfor Arasındaki Etkileşimin Büyüme ve Çözünür Karbonhidratlar ile İlişkisinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
156. Uçgun, K., Gezin, S. (2008) Makro Bitki Besin Elementlerinin Hastalıklarla İlişkisi. 4. Ulusal Bitki Besleme ve Gübreleme Kongresi Bildiriler Kitabı, Konya, 696-705.
157. Ünyayar, S., Çelik, A., Çekiç, F.Ö., Gözel, A. (2006) Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. Mutagenesis, 2 (1), 77-81.
158. Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., Beyersmann, D. (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. Toxicology, 192, 95–117.
159. Walker, E.L., Connolly, E.L. (2008) Time to pump iron: Iron deficiency signaling mechanisms of higher plants. Current Opinion in Plant Biology, 11, 530–535.
160. Welsh, J., McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research, 18, 7213–7218.
161. Wenzel, W.W., Bunkowski, M., Puschenrerter, M., Horak, O. (2003) Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. Environmental Pollution, 123 (1), 131– 8.
162. White, P.J., Broadley, M.R. (2003) Calcium in plants. Annals of Botany, 92 (4), 487-511.
163. World Health Organization (2007). Health Risks of Heavy Metals From Long-Range Transboundary Air Pollution. Copenhagen, World Health Organization Regional Office for Europe <http://www.euro.who.int/document/E91044.pdf>. (09/06/2013)

164. Williams, J., Kubelik, A.R., Livak, K.J. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531–6535.
165. World Health Organization (2010) Exposure to Cadmium: A Major Public Health Concern <http://www.euro.who.int/document/E91044.pdf>. (09/06/2013)
166. Yagdi, K., Kacar, O., Azkan, N. (2000) Heavy metal contamination in soils and it's effects in agriculture. *Journal of the Faculty of Agriculture*, 15, 109-115.
167. Yang, L.T., Yang, G.H., You, X., Zhou, C.P., Lu, Y.B., Chen, L.S. (2013) Magnesium deficiency-induced changes in organic acid metabolism of *Citrus sinensis* roots and leaves. *Biologia Plantarum*, 57 (3), 481-486.
168. Yavuz, C.I., Tanık, F.A. (2012) Türk Tabipleri Birliği Dilovası Raporu, İkinci Baskı, Ocak, Ankara Türk Tabipleri Birliği Yayınları.
169. Yıldız, A., Genç, Ö. (1993) Enstrümental Analiz, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, A-64.
170. Yılmaz, C. (2004) Bitkisel Üretimde Besin Elementleri, Hasad Yayıncılık, Kayseri, 16-17.
171. Zengin, F.K., Munzuroğlu, O. (2005) Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta Biologica Cracoviensia*, 47 (2), 157-164.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Seçil Yılmaz
Doğum Yeri ve Tarihi : Antalya/ 14.10.1979
E-Posta : secilbaba07@windowlive.com
Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Eğitim FakültesiBiyoloji Öğretmenliği	Marmara Üniversitesi	2001
Yüksek Lisans	Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji ABD	Marmara Üniversitesi	2013