



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

***BRACHYCHITON POPULNEUS* (SCHOOT & ENDL.) R. BR.'DA  
(JAPON KAVAĞI) KADMİYUM VE BAKIR STRESİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Seda Ayşe BAKACAK  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Botanik Programı**

**Danışman  
Doç. Dr. Gülriz BAYÇU**

**EKİM, 2010**

**İSTANBUL**

Bu çalışma 01/10/ 2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı botanik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Danışman  
Doç. Dr. Gülriz BAYÇU

İstanbul Üniversitesi



Jüri Üyesi  
Prof.Dr. Muammer ÜNAL

İstanbul Üniversitesi



Jüri Üyesi  
Prof.Dr. Memduh SERİN

Marmara Üniversitesi



Jüri Üyesi  
Y.DoçDr. Serap ÇAĞ

İstanbul Üniversitesi



Jüri Üyesi  
Doç. Dr. Tamer ÖZCAN

İstanbul Üniversitesi



Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 4150 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## **ÖNSÖZ**

Lisans ve Yüksek Lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı değerli hocam Doç. Dr. Gülriz BAYÇU'ya en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tezim süresince bilimsel bilgi birikimini bizlerle paylaşan, değerli fikirleriyle yol gösteren ve laboratuvar çalışmalarımızda kişisel desteğini esirgemeyen Oslo Üniversitesi Moleküler Biyolojik Bilimler Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sven Erik ROGNES'e teşekkürü bir borç bilirim.

İ.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyelerinden Y. Doç. Dr. Ergül Çetin'e yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca, Yüksek Lisans arkadaşım Selda YAZILAN'a, çalışmamın uygulama kısmını destekleyen İstanbul Üniversitesi BAP birimine ve Atomik Absorpsiyon ölçümlerinde yardım eden İ.Ü. Deniz Bilimleri Enstitüsü Öğretim Üyesi Doc. Dr. Nuray Balkıs'a teşekkür ederim.

Gerek tez çalışmalarım ve gerekse tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

**Temmuz, 2010**

**Seda Ayşe BAKACAK**

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİL LİSTESİ .....	vii
TABLO LİSTESİ .....	ix
SEMBOL LİSTESİ .....	x
ÖZET .....	xii
SUMMARY .....	xiii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. KADMİYUM VE BİYOLOJİK ÖNEMİ.....	3
2.2. BAKIR VE BİYOLOJİK ÖNEMİ.....	5
2.3. AĞIR METALLERE MARUZ KALAN BİTKİLERİN GÖSTERDİĞİ STRATEJİLER .....	7
2.3.1. İndikatörler bitkiler .....	8
2.3.2. Ekskluder bitkiler.....	8
2.3.3. Akümülatör bitkiler .....	8
2.3.4. Hiperakümülatör bitkiler.....	8
2.4. BİTKİLERDE AĞIR METAL STRESİ .....	9
2.4.1. Bitkilerde ağır metal alınımı .....	11
2.4.2. Bitkilerde ağır metal taşınımı.....	12
2.4.3. Bitkilerde ağır metal stresinin yol açtığı zararlar .....	15
2.4.3.1. Ağır metallerin kök, gövde ve yapraklara etkisi.....	15
2.4.3.2. Ağır metallerin enzim aktiviteleri üzerine etkisi.....	16
2.4.3.3. Ağır metallerin membranlar üzerine etkisi.....	16
2.4.3.4. Ağır metallerin fotosentez aktivitesi üzerine etkisi.....	16

2.4.3.5. Ağır metallerin serbest radikal oluşumu üzerine etkisi...	17
<b>2.5. BİTKİLERİN AĞIR METAL STRESİNE KARŞI GELİŞTİRDİĞİ KORUNMA MEKANİZMALARI .....</b>	<b>21</b>
2.5.1. Kaçınma .....	21
2.5.2. Tolerans .....	22
<b>2.6. YEŞİL ISLAH (FİTOREMEDİASYON).....</b>	<b>25</b>
2.6.1. Yeşil ıslah çeşitleri .....	26
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM .....</b>	<b>29</b>
3.1. BİTKİ MATERYALİ .....	29
3.2. BİTKİNİN ÇİMLENME VE YETİŞTİRME KOŞULLARI .....	31
3.3. <i>BRACHYCHITON POPULNEUS</i> BİTKİSİNİN YAPRAKLARINDA KLOROFİL TAYİNİ.....	34
3.4. ANTİOKSİDAN ENZİM GLUTATION REDÜKTAZ (GR; EC 1.8.1.7), KATALAZ (CAT; EC 1.11.1.6), GUAİAKOL PEROKSİDAZ (GPOX; EC 1.11.1.7) VE TOTAL PROTEİNLER İÇİN HOMOJENAT HAZIRLANMASI.....	34
3.4.1. Glutasyon Redüktaz (GR) .....	35
3.4.2. Katalaz (CAT) .....	35
3.4.3. Guaiakol peroksidaz (GPOX) .....	36
3.5. PROLİN (PRO) MİKTARINI ÖLÇMEK İÇİN EKSTRE HAZIRLANMASI.....	36
3.5.1. Ninhydrin reagent hazırlanması .....	36
3.6. PROTEİN MİKTARININ BELİRLENMESİ .....	37
3.7. ATOMİK ABSORPSİYON SPEKTROFOTOMETRESİ (AAS) İLE AĞIR METAL ÖLÇÜMLERİ .....	37
3.7.1. AAS ve Çalışma Şekli .....	38
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>39</b>
4.1. <i>BRACHYCHITON POPULNEUS</i> BİTKİSİNİN GELİŞİMİ SÜRESİNDE MEYDANA GELEN MORFOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER.....	39

<b>4.2. Cd VE Cu UYGULANAN <i>BRACHYCHITON POPULNEUS</i> YAPRAKLARINDA GÖZLEMLenen MORFOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER.....</b>	<b>42</b>
4.2.1. 50 µM Cd .....	43
4.2.2. 150 µM Cd .....	46
4.2.3. . 500 µM Cu.....	49
4.2.4. 1500 µM Cu.....	53
<b>4.3. BİTKİNİN VEJETATİF ORGANLARINDA Cd VE Cu BİRİKİMLERİ.....</b>	<b>56</b>
4.3.1. 50 µM Cd birikimi .....	56
4.3.2. 150 µM Cd birikimi .....	57
4.3.3. 500 µM Cu birikimi .....	58
4.3.4. 1500 µM Cu birikimi .....	59
<b>4.4. Cd VE Cu UYGULANAN BİTKİNİN YAPRAKLARINDA KLOOROFİL MİKTARI.....</b>	<b>60</b>
<b>4.5. Cd VE Cu UYGULANAN BİTKİNİN YAPRAKLARINDA VE KÖKLERİDE PROTEİN MİKTARI.....</b>	<b>61</b>
4.5.1. Cd ve Cu Uygulanan bitkinin yapraklarında protein miktarı .....	61
4.5.2. Cd ve Cu Uygulanan bitkinin köklerinde protein miktarı.....	62
<b>4.6. Cd VE Cu UYGULANAN BİTKİNİN VEJETATİF ORGANLARINDA TAZE VE KURU AĞIRLIK.....</b>	<b>63</b>
4.6.1. Cd ve Cu Uygulanan bitkinin vejetatif organlarında taze ağırlık.....	63
4.6.1.1. Yapraklarda taze ağırlık.....	63
4.6.1.2. Gövdelerde taze ağırlık.....	64
4.6.1.3. Köklerde taze ağırlık.....	65

<b>4.6.2. Cd ve Cu Uygulanan bitkinin vejetatif organlarında kuru ağırlık.....</b>	<b>66</b>
4.6.2.1. Yapraklarda kuru ağırlık.....	66
4.6.2.2. Gövdelerde kuru ağırlık.....	67
4.6.2.3. Köklerde kuru ağırlık.....	68
<b>4.7. Cd VE Cu UYGULANAN BİTKİNİN KÖK VE YAPRAKLARINDA PROLİN MİKTARI.....</b>	<b>69</b>
4.7.1. Yapraklarda prolin miktarları.....	69
4.7.2. Köklerde prolin miktarları.....	70
<b>4.8. ANTİOKSİDAN ENZİMLER.....</b>	<b>71</b>
4.8.1. Glutasyon Redüktaz enziminin aktivitesi .....	71
4.8.1.1. Glutasyon Redüktaz'ın yapraktaki aktivitesi.....	71
4.8.1.2. Glutasyon Redüktaz'ın kökteki aktivitesi.....	72
4.8.2. Katalaz enziminin aktivitesi .....	73
4.8.2.1. Katalaz'ın yapraktaki aktivitesi.....	73
4.8.2.2. Katalaz'ın kökteki aktivitesi.....	74
4.8.3. Guaiakol Peroksidaz enziminin aktivitesi.....	75
4.8.3.1. Guaiakol Peroksidaz'ın yapraktaki aktivitesi.....	75
4.8.3.2. Guaiakol Peroksidaz'ın kökteki aktivitesi.....	76
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>77</b>
<b>5.1. YETİŞTİRİLME KOŞULLARI, UYGULANAN Cd VE Cu'IN TOKSİK ETKİLERİNİN BİTKİDE OLUŞTURDUĞU MORFOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER, BİTKİNİN TAZE VE KURU AĞIRLIKLARINDA MEYDANA GELEN FARKLILIKLAR, Cd VE Cu BİRİKİM.....</b>	<b>77</b>
5.1.1. Yetiştirilme koşulları .....	77
5.1.2. Cd ve Cu'nun toksik etkilerinin bitkide oluşturduğu morfolojik değişiklikler.....	78
5.1.3. Bitkinin taze ve kuru ağırlıklarında meydana gelen değişiklikler .....	79
5.1.4. Bitkide Cd ve Cu Birikimleri.....	81

<b>5.2. BİTKİLERDE FİTOTOKSİSİTE SONUCU MEYDANA GELEN FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL DEĞİŞİMLER.....</b>	<b>85</b>
5.2.1. Bitkinin yapraklarında klorofil miktarı.....	85
5.2.2. Bitkinin kök ve yapraklarında protein miktarı .....	86
5.2.3. Bitkinin kök ve yapraklarında prolin miktarı .....	88
5.2.4. Bitkinin kök ve yapraklarında antioksidan enzimlerin aktivitesi .....	89
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>96</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>109</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: Bitkide Cd taşınımı .....	5
Şekil 2.2	: Bitkilere ağır metale maruz kaldığı zaman davrandıkları 4 strateji .....	9
Şekil 2.3	: Besi çözeltilisindeki konsantrasyonlarının bir fonksiyonu olarak bitkilerde eser element alımı .....	10
Şekil 2.4	: Ağır metallerin bitki hücreleri tarafından alınımı .....	13
Şekil 2.5	: Bitkideki ağır metallerin kaynakları ve bitkinin verdiği cevaplar .....	14
Şekil 2.6	: Ağır metallerin neden olduğu ROS oluşumu .....	20
Şekil 2.7	: Katalaz ve Peroksidazların enzim aktivitesi .....	23
Şekil 2.8	: Fitoremediasyon ile metal giderimindeki ana mekanizmalar .....	27
Şekil 2.9	: Farklı fitoremediasyon yöntemlerinin şematik olarak görünümü .....	27
Şekil 4.1	: %50 kum+%50 perlit karışımında yetiştirilen 5 aylık <i>Brachychiton populneus</i> fideleri .....	39
Şekil 4.2	: 4 günlük su kültürü uygulamasının ardından bitki yapraklarında meydana gelen morfolojik değişiklikler .....	40
Şekil 4.3	: Su kültüründeki 1. gün ve kökler .....	41
Şekil 4.4	: Su kültüründeki 2. gün ve kökler .....	41
Şekil 4.5	: Su kültüründeki 4. gün ve kökler .....	42
Şekil 4.6	: 6 gün süreyle 50µM Cd uygulanan bitkiler .....	43
Şekil 4.7	: 8 gün süreyle 50µM Cd uygulanan bitkiler .....	44
Şekil 4.8	: 10 gün süreyle 50µM Cd uygulanan bitkiler .....	44
Şekil 4.9	: 12 gün süreyle 50µM Cd uygulanan bitkiler(1) .....	45
Şekil 4.10	: 12 gün süreyle 50µM Cd uygulanan bitkiler(2) .....	45
Şekil 4.11	: 6 gün süreyle 150µM Cd uygulanan bitkiler .....	46
Şekil 4.12	: 8 gün süreyle 150µM Cd uygulanan bitkiler .....	47
Şekil 4.13	: 10 gün süreyle 150µM Cd uygulanan bitkiler .....	47
Şekil 4.14	: 12 gün süreyle 150µM Cd uygulanan bitkiler(1) .....	48
Şekil 4.15	: 12 gün süreyle 150µM Cd uygulanan bitkiler(2) .....	48
Şekil 4.16	: 6 gün süreyle 500 µM Cu uygulanan bitkiler .....	49
Şekil 4.17	: 8 gün süreyle 500 µM Cu uygulanan bitkiler .....	50
Şekil 4.18	: 10 gün süreyle 500 µM Cu uygulanan bitkiler .....	50
Şekil 4.19	: 12 gün süreyle 500 µM Cu uygulanan bitkiler(1) .....	51
Şekil 4.20	: 12 gün süreyle 500 µM Cu uygulanan bitkiler(2) .....	52
Şekil 4.21	: 6 gün süreyle 1500 µM Cu uygulanan bitkiler .....	53
Şekil 4.22	: 8 gün süreyle 1500 µM Cu uygulanan bitkiler .....	54
Şekil 4.23	: 10 gün süreyle 1500 µM Cu uygulanan bitkiler .....	54

<b>Şekil 4.24</b>	: 12 gün süreyle 1500 µM Cu uygulanan bitkiler .....	55
<b>Şekil 4.25</b>	: 50 µmM Cd uygulanan bitkinin vejetatif organlarında Cd birikimi.....	56
<b>Şekil 4.26</b>	: 150 µmM Cd uygulanan bitkinin vejetatif organlarında Cd birikimi... ..	57
<b>Şekil 4.27</b>	: 500 µM Cu uygulanan bitkinin vejetatif organlarındaCu birikimi.....	58
<b>Şekil 4.28</b>	: 1500 µM Cu uygulanan bitkinin vejetatif organlarında Cu birikimi... ..	59
<b>Şekil 4.29</b>	: Yapraklarda klorofil miktarları.....	60
<b>Şekil 4.30</b>	: Yapraklarda protein miktarları.....	61
<b>Şekil 4.31</b>	: Köklerde protein miktarları .....	62
<b>Şekil 4.32</b>	: Yaprakların taze ağırlığı .....	63
<b>Şekil 4.33</b>	: Gövdelerin taze ağırlığı .....	64
<b>Şekil 4.34</b>	: Köklerin taze ağırlığı.....	65
<b>Şekil 4.35</b>	: Yaprakların kuru ağırlığı .....	66
<b>Şekil 4.36</b>	: Gövdelerin kuru ağırlığı .....	67
<b>Şekil 4.37</b>	: Köklerin kuru ağırlığı.....	68
<b>Şekil 4.38</b>	: Yapraklarda Prolin Miktarı.....	69
<b>Şekil 4.39</b>	: Köklerde Prolin Miktarı .....	70
<b>Şekil 4.40</b>	: Yapraktaki GR Aktivitesi .....	71
<b>Şekil 4.41</b>	: Kökteki GR Aktivitesi.....	72
<b>Şekil 4.42</b>	: Yapraktaki CAT Aktivitesi.....	73
<b>Şekil 4.43</b>	: Kökteki CAT Aktivitesi .....	74
<b>Şekil 4.44</b>	: Yapraktaki GPOX Aktivitesi.....	75
<b>Şekil 4.45</b>	: Kökteki GPOX Aktivitesi.....	76

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2.1</b>	: Bazı metallerin birbirleriyle etkileşimi gösterilmiştir .....	7
<b>Tablo 2.2</b>	: Bitkilerde ROS oluşumu, lokalizasyonu ve uzaklaştırılması .....	18
<b>Tablo 3.1</b>	: Ingestad besi çözeltisi.....	32
<b>Tablo 5.1</b>	: TF ve BAF değerleri .....	83

## SEMBOL LİSTESİ

<b>Cu</b>	: Bakır
<b>Cd</b>	: Kadmiyum
<b>Fe</b>	: Demir
<b>Zn</b>	: Çinko
<b>Pb</b>	: Kurşun
<b>Hg</b>	: Cıva
<b>Co</b>	: Kobalt
<b>Mn</b>	: Mangan
<b>Cr</b>	: Krom
<b>Se</b>	: Selenyum
<b>Ni</b>	: Nikel
<b>Ag</b>	: Gümüş
<b>Au</b>	: Altın
<b>Br</b>	: Brom
<b>UO<sup>2</sup></b>	: Uranyum oksit
<b>Sb</b>	: Antimon
<b>W</b>	: Tungsten
<b>F</b>	: Flor
<b>Te</b>	: Telluriyum
<b>La</b>	: Lantanat
<b>Zr</b>	: Zirkoniyum
<b>Sc</b>	: Skandiyum
<b>Y</b>	: Yttriyum
<b>Cs</b>	: Sesium
<b>Li</b>	: Lityum
<b>Ca</b>	: Kalsiyum
<b>Mg</b>	: Magnezyum
<b>CdS</b>	: Kadmiyum sülfür
<b>CdO</b>	: Kadmiyum oksit
<b>CdSO<sub>4</sub></b>	: Kadmiyum sülfat
<b>CdCl<sub>2</sub></b>	: Kadmiyum klorür
<b>NaOCl</b>	: Sodyum hipoklorid
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	: Hidrojen sülfat
<b>ppm</b>	: 1/1.000.000 kg (Parts per million)
<b>Ros</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>ATPaz</b>	: Adenin tri fosfat
<b>ADPaz</b>	: Adenin di fosfat
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süperoksit radikali
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojenperoksit
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	: Singlet oksijen

<b>OH<sup>•</sup></b>	: Hidroksil radikali
<b>NADP</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>GR</b>	: Glutatyon redüktaz
<b>GPOX</b>	: Guaiakol peroksidaz
<b>APX</b>	: Askorbat peroksidaz
<b>MDHA</b>	: Monodehidroaskorbat
<b>MDHAR</b>	: Monodehidroaskorbat redüktaz
<b>DHAR</b>	: Dehidroaskorbat redüktaz
<b><sup>3</sup>Klo*</b>	: Aktif triplet klorofil molekülü
<b>GSSG</b>	: Okside glutatyon
<b>GSH</b>	: Glutatyon
<b>Glu</b>	: Glutamin
<b>Cys</b>	: Sistein
<b>Gly</b>	: Glisin
<b>Pro</b>	: Prolin
<b>EPA</b>	: Environmental Protection Agency (Çevre Koruma Ajansı)
<b>EDTA</b>	: Etilen diamin tetraasetik asit
<b>DTNB</b>	: 5,5'-dithiobis
<b>TF</b>	: Translokasyon Faktör
<b>BAF</b>	: Biyoakümülatör Faktör
<b>μ</b>	: Mikron
<b>AAS</b>	: Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi
<b>KA</b>	: Kuru ağırlık

## ÖZET

### ***BRACHYCHITON POPULNEUS* (SCHOOT & ENDL.) R. BR.' DA (JAPON KAVAĞI) KADMİYUM VE BAKIR STRESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bu çalışmada *Brachychiton populneus* bitkisindeki ağır metal toksisitesi, birikimi ve toleransının araştırılması amaçlanmıştır. Tohumlar çimlendirilerek küçük fide olana kadar Ingestad besi çözeltisi ile yetiştirilmiştir. Daha sonra, bitkilere 50 ve 150 µM Cd ile 500 ve 1500 µM Cu uygulanmıştır. Ağır metal uygulaması sonucunda bitkilerde meydana gelen morfolojik değişiklikler fotoğraflandırılıp kayıt altına alınmıştır.

Ekofizyolojik ve biyokimyasal parametrelerin incelenebilmesi için, bitkilerin kök ve yapraklarından ekstratlar yapılarak spektrofotometrik yöntemlerle klorofil içeriği, protein miktarı, antioksidan enzim aktivitesi (CAT, GR ve GPOX), prolin aktiviteleri ölçülmüş ve atomik absorpsiyon spektrometresiyle de ağır metal miktarları belirlenmiştir.

Sonuç olarak, ağır metal uygulaması ile bitki yapraklarında, köklerinde ve gövdelerinde aşırı miktarda birikim görülmemiştir. Uygulanan ağır metalin türü ve konsantrasyonuna bağlı olarak yapraklarda kloroz oluşmuştur. Özellikle Cu uygulamalarındaki kloroz belirgin şekilde göze çarparken, Cd uygulanan bitkilerde hafif kloroz ve hafif nekrozlar meydana gelmiştir. Bunun yanı sıra, bitki köklerinde aşırı miktarda musilaj oluşumu dikkat çekmiştir. Klorofil, prolin, taze ve kuru ağırlıklarda azalmalar görülmüştür. Antioksidan enzimlerde ise CAT aktivitesi kontrole göre azalırken, GPOX genelde kontrole göre artmıştır. GR ise kontrole yakın düzeylerde aktivite göstermiştir. Yapılan çalışmalar ışığında, bu bitkinin fitoremediasyon için uygun olamayacağı ancak bozulmuş alanların, kirli, sıcak ve kurak bölgelerin ekorestorasyonunda faydalı olabileceği kanısına varılmıştır.

## SUMMARY

### INVESTIGATION OF CADMIUM AND COPPER STRESS IN *BRACHYCHITON POPULNEUS* (SCHOOT & ENDL.) R. BR. (BOTTLE TREE)

In this study, heavy metal toxicity, accumulation and tolerance in *Brachychiton populneus* has been investigated. Seeds were germinated and watered with Ingested [nutrient](#) solution until they became [seedlings](#). Afterwards plants were treated with 50-150  $\mu\text{M}$  Cd and 500 -1500  $\mu\text{M}$  Cu concentrations and morphological changes were photographed and registered.

Plant roots and leaves were extracted to investigate ecophysiological and biochemical parameters, Chlorophyll and protein amounts, antioxidant enzyme activity (CAT, GR and GPOX) and proline activity were quantified with spectrophotometric methods and heavy metal accumulations were detected with atomic absorption spectrometer.

In conclusion, no excessive heavy metal accumulation was observed either in plant leaves, roots or stems. According to the heavy metal type and concentration, chlorosis was observed in the plant leaves. While chlorosis was evidently available especially in Cu treatments, chlorosis and necrosis in minor degree came in existence in the Cd applied plants. Moreover, excessive mucilage was also observed in the plant roots. Reductions in chlorophyll, proline and *fresh* and dry *weights* occurred. While CAT activity in antioxidant enzymes decreased in comparison with control, GPOX, meanwhile, increased compared to control. GR, on the other hand, was observed to be active in close degree with control. The study reveals that the plant was not appropriate for the fitoremediation practices, but can be usable in the ecorestoration of damaged, polluted, hot and dry areas.

## 1. GİRİŞ

20. yüzyılın başlarından itibaren biyosferdeki ağır metaller belirgin şekilde artmaya başlamış toprak, su ve hava ekosistemlerinde birikerek, bitkiden insana her çeşit organizma için acilen tedbir alınması gereken bir çevre sorunu haline gelmiştir (Sağlam ve Cihangir, 1995).

Yoğunluğu  $5 \text{ g/cm}^3$  ten daha yoğun olan metallere ağır metal denir. 60'tan fazla element ağır metal olarak kabul edilse de bakır (Cu), demir (Fe), çinko (Zn), kurşun (Pb), civa (Hg), kobalt (Co), mangan (Mn), krom (Cr), selenyum (Se), nikel (Ni) ve kadmiyum (Cd) en sık rastlanan ve en çok tanınan ağır metallerdir (Azevedo ve Lea, 2005).

Bazı elementler enzim, vitamin ve hormonların bileşenlerinde bulunur. Emilme, sindirim ve metabolizmada görev alırlar ve belirli vücut yapılarında tamamlayıcı olarak rol oynarlar. Doğada bulunan Cd, Cr, Hg ve Pb gibi ağır metaller canlılar için mutlak gerekli olmayıp eser miktarları bile toksik etki gösterirken, Cu, Cr, Fe, Mn, Mo, Zn ve Ni gibi ağır metaller canlılar için belli bir doza kadar gereklidir, bu elementler "iz" veya "eser" element olarak adlandırılır (Somers, E., 1974).

Endüstriyel faaliyetler, motorlu taşıtların egzoz gazları, maden yatakları ve işletmeleri, volkanik faaliyetler, tarımda gübreleme ve ilaçlama gibi pek çok etmen ağır metallerin

çevredeki miktarlarını artırmakta ve biyolojik sistemlerde birikime neden olmaktadır (Kahvecioğlu,Ö ve diğ., 2001). Bitkilerde Hg, Cd ve Pb'un eser miktarda bile bulunmaları kirlenmeye işarettir. Toksikite, metallerin proteinlerin sülfhidril gruplarına bağlanması sonucu oluşur. Bitkilerin kirleticileri bünyelerinde toplamaları hem bitki yaşamını hem de besin zincirini etkiler. Ağır metallerin bitki dokularında aşırı birikimi bitkilerde strese neden olan önemli faktörlerdendir (Brekken ve Steinnes, 2004).

Tezimizde, tohumları Kıbrıs'tan toplanarak iklim odası koşullarında yetiştirilen *Brachychiton populneus* kullanılmıştır. Bitkide ağır metal toksisitesi, birikimi, tolerans mekanizması, fitoremediasyon ve/veya ekorestorasyon açısından kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda Cd ve Cu birikimi; klorofil, protein ve prolin miktarları ile bazı antioksidan enzimlerin aktivitesi incelenmiştir. Daha önce bu bitkiyle yapılan benzer bir çalışmanın bulunmaması nedeniyle, araştırmamızın literatüre yeni bilgiler sağlayacağı ve ayrıca bitkinin biriktirme açısından ağır metallerle kirlenmiş veya diğer çevresel etkenlerden zarar görmüş topraklarda çevre biyoteknolojisi yönünden katkı sağlayacağı görüşündeyiz.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. KADMIYUM VE BİYOLOJİK ÖNEMİ

Kadmiyum (Cd); atom numarası 48 ve atom ağırlığı 112,411 g/mol, yoğunluğu 8.7 g/cm<sup>3</sup> olan periyodik cetvelin II B grubunda bulunan bir geçiş elementidir. Cd yarılanma ömrü 10–30 yıl arasındadır. Gümüş parlaklığında katı bir metaldir ve doğada tek başına bulunmamaktadır. Cd II B grubu elementlerinden olan Zn ve Hg ile benzerlikler gösterir ve doğada bütün Zn filizlerinde bulunduğu için Zn eldesinde yan ürün olarak Cd da elde edilir. Başlıca Cd tuzları CdS, CdCl<sub>2</sub> ve CdSO<sub>2</sub>'dir. Cd ve bileşikleri oldukça zehirlidir (Kabata pendias ve Mukherjee, 2007) ve havada hızla kadmiyum oksite (CdO) dönüşür. Kadmiyum sülfat, kadmiyum nitrat, kadmiyum klorür gibi inorganik tuzları suda çözünür. Cd kimyasal özellikleri bitki tarafından alınması ve metabolik fonksiyonları bakımından Zn' ya benzemektedir. Ancak ağır metaller grubuna giren Cd elementi önemli bir çevre kirletici olarak bilinmektedir ve Zn'dan farklı olarak bitkiler, hayvanlar ve insanlar için toksik etkiye sahip bir elementtir.

Nükleer santrallerde nötron absorblayıcı olarak kullanılan Cd, stabilizatör olarakta plastik yapımında kullanılır. 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 türevlerinde, fosfatlı gübre ve pestisitlerde kullanılmaktadır. Cd diğer ağır metaller içinde, suda çözünme özelliği en yüksek element olduğu için, doğada yayılma hızı da yüksektir. Cd' un bitkilerdeki konsantrasyonu genellikle 0,1 – 1,0 ppm

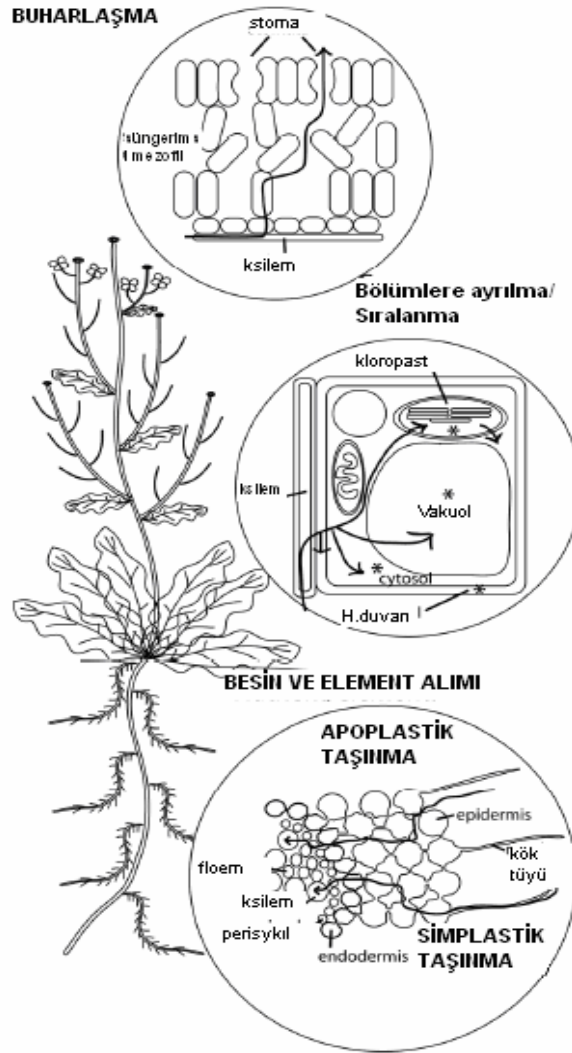
aralığında seyretmektedir. Bitkiler için gerekli olmayan bu elementin zehirli hali daha çok enzim inhibisyonu şeklindedir (Kahvecioğlu ve diğ., 2001).

Normalde, Cd iyonları kökte tutunur, çok az miktarı gövdeye geçer. Genellikle, bitkide Cd içeriği kök > gövde > yaprak > meyve > tohum şeklindedir ve bitkinin üst kısımlarına geçmesine rağmen meyvede görülmediği belirlenmiştir (Benavides ve diğ. 2005). Toprakta bitkiye geçiş oranı çok yüksek olan ve toprakta oldukça hareketli olan Cd çok düşük konsantrasyonlarda bile özellikle Zn eksikliğinde bitkiler tarafından kolaylıkla alınması ve bitkinin yenen kısımlarında da birikme olasılığının olması bu metalin çevre açısından büyük tehlike potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (Köleli ve Kantar, 2006).

Cd'nin hücreye alınmasında K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn ve Ni gibi mineral elementlerle olan rekabeti rol oynamaktadır. Cd son derece mobil bir element olduğundan apoplastik yolla (kök endodermis hücrelerinin duvarlarından) taşınabilir. Kök sitoplazmasına kolayca geçebilir. Bundan sonra simplastik taşımayla floeme ve ksileme geçer. Kök epidermal hücrelerinin zarının iç kısmında oluşan -200 mV'luk negatif zar potansiyeli ağır metallerin alımına yardımcı olmaktadır. Bu nedenle birçok ağır metalin köklerdeki konsantrasyonu topraktaki bitki dokularından daha yüksektir. Cd köklere girdikten sonra organik asit ve fitokelatinler gibi bileşiklere bağlanırlar (Benavides ve diğ., 2005),

Köklerde Cd tarafından Fe (III) redüktaz enziminin inhibisyonu ciddi bir Fe<sup>2+</sup> eksikliğine neden olur. Gövdede nitrat redüktaz enzimini inhibe ederek nitrat absorpsiyonunu kısıtlar. Tüm ağır metaller gibi Cd da hücre zarının geçirgenliğini etkileyerek su alımının azalmasına neden olur. Cd hücre zarındaki ADPaz aktivitesini azaltır. Bunun yanı sıra lipit peroksidasyonuna neden olur. Ayrıca Cd fotosentezin karanlık evresinde karbondioksit fiksasyonu aşamasında görevli enzimlerin aktivitesini kısıtlar. Benzer şekilde klorofil biyosentezini de inhibe eder (Benavides ve diğ. , 2005). Cd toksitesi serbest radikal oluşumunu arttırarak ya da enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların oluşumunu azaltarak oksidatif strese neden olurlar. Oksidatif stres sonucu ortaya çıkan en önemli fizyolojik olay senesenstir.

Yapılan bazı çalışmalar gösterir ki, bitkilerde Cd birikimi sonucu klorofil miktarının etkilendiği, peroksidaz aktivitesinde bir artış gözleendiği (Özden ve Bayçu 2004); klorozun meydana geldiği ve yaprakların kuru ağırlıklarında azalmanın olduğu görülmektedir (Bayçu ve Önal 1993).



Şekil 2.1: Bitkide Cd taşınımı (Lombi ve diğ. , 2002).

## 2.2. BAKIR VE BİYOLOJİK ÖNEMİ





Bakır (Cu); atom numarası 29 ve atom ağırlığı 63,546 olan bir I B grubu elementidir. Kırmızımtırak renkli bir metaldir. Metal işletmelerinde, yakıt olarak, elektrik kablosu, ve ev aletleri imalatında kullanılmaktadır. Cu yer kabuğunda ve birçok mineral yatağında bol miktarda bulunan bir elementtir. Trafik yoğunluğu, madencilik faaliyetleri, arıtım teknolojileri sonucunda ekosisteme girer (Kabata Pendias ve Mukherjee, 2007).

Cu bitkilerde en fazla hücre duvarında bulunurken ikinci olarak da kloroplastlarda bulunmaktadır. Kirlenmemiş topraklarda Cu içeriği 2-40 ppm arasında değişirken, kirlenmiş topraklarda 1000 ppm'e kadar çıkabilmektedir. Bitkilerde ise ortalama 10 ppm civarında bulunmaktadır. Cu toprakta organik maddelerce, Mn ve Fe oksitlerce adsorbe edilmiş bir şekilde bulunmaktadır. Bunların dışında silikatlara bağlı olarak, az miktarda da değişebilir ve çözünebilir formda bulunmaktadır (Kukkola E., ve diğ., 2000; Yruela 2005).

Cu bitki beslenmesi için eser miktarlarda gerekirken ve daha yüksek konsantrasyonları, hücrelere toksik etki yapmaktadır. Ayrıca bitkinin kök dokularında daha fazla birikme eğiliminde olan Cu' ın, gövdeye iletimi hareketsiz bir element olduğundan çok daha azdır (Clemens, 2001).

Cu;  $Cu^{2+}$  ve  $Cu^+$  olmak üzere iki formda bulunur. Bu iki form arasındaki redoks döngüsü sonucu aşırı toksik hidroksil radikalleri oluşabilir. Toksik seviyelerde; köklerde büyüme baskılanması, yan kök oluşumunda azalma, koyu renkli benekler oluşması ve kök kütikulasında kalınlaşmalar görülür. Ayrıca kloroz, nekroz, yaprak renginde bozulma gibi zararlara neden olabilir (Yruela 2005). Hücresel düzeyde ise proteinlerin sülfidril gruplarına bağlanarak enzim aktivitesini inhibe eder, fotosentezin inhibisyonuna, N başta olmak üzere mineral elementlerin alınmasının kısıtlanmasına, protein metabolizmasının bozulmasına ve lipid peroksidasyonuna neden olur. Aynı zamanda oksidatif strese karşı bitkinin verdiği cevapta görev alır (Demirevska-Kepova, K., ve diğ., 2004; Yruela 2005).

	Li	Rb	Cu	Zn	Cd	B	Al	Si	Pb	V	As	Se	Cr	Mo	W	Mn	Fe	Co	Ni	
Li																				
Rb																				
Cu																				
Zn																				
Cd																				
B																				
Al																				
Si																				
Pb																				
V																				
As																				
Se																				
Cr																				
Mo																				
W																				
Mn																				
Fe																				
Co																				
Ni																				

	= antagonizma ve/veya sinerjizm		= sinerjizm
	= antagonizma		= antagonizma olabilir

Tablo 2.1: Bazı metallerin birbirleriyle etkileşimi gösterilmiştir  
(Pendias, K. ve Pendias A.K., 1986).

### 2.3. AĞIR METALLERE MARUZ KALAN BİTKİLERİN GÖSTERDİĞİ STRATEJİLER

Bitkiler ağır metale maruz kaldıklarında farklı şekillerde davranırlar. Bunlar;

- İndikatör bitkiler (Indicators)
- Ekskluder bitkiler (Excluder)
- Akümülatör bitkiler (Accumulators)
- Hiperakümülatör bitkiler (Hyperaccumulators)

### 2.3.1. İndikatör bitkiler

Bu bitkiler topraktaki metalleri toprak üstü dokularda biriktirirler. Dokulardaki birikim topraktaki metal miktarını belirtir. Bir ekosistemde, en küçük çevresel değişimlere bile duyarlı olan, çevre koşulları konusunda bilgi sağlayan ve erken uyarılarda bulunan türlere indikatör türler denir.

### 2.3.2. Ekskluder ( metal tutucu ) bitkiler

Geniş bir alandaki toksik metallerin alınımını sınırlayan bitkilere ekskluder bitki denir. Bir çok ekskluder bitki kirlenmiş topraklarda sadece canlı kalmaz ayrıca yüksek ağır metal konsantrasyonu içeren topraklarda çok az bir miktar bünyelerinde bulundurarak canlı kalabilirler (Baker, 1981; Wenzel ve diğ., 2003). Ekskluder bitkiler ağır metallerle kirlenmiş toprakta toksik sınırlarının altında ağır metal bulundurur ya da yüksek konsantrasyondaki ağır metalleri köklerinde tutup toprak üstü kısımlara iletmezler.

Bilinen birkaç ekskluder bitkiler:

- *Silene vulgaris*- Ni- ekskluder (Wenzel ve diğ.,2003)
- *Hyparrhenia hirta* – Cu- ekskluder (Poschenrieder ve diğ. 2001)
- *Armeria maritima* – Co- ekskluder (Brewin ve diğ.2003)

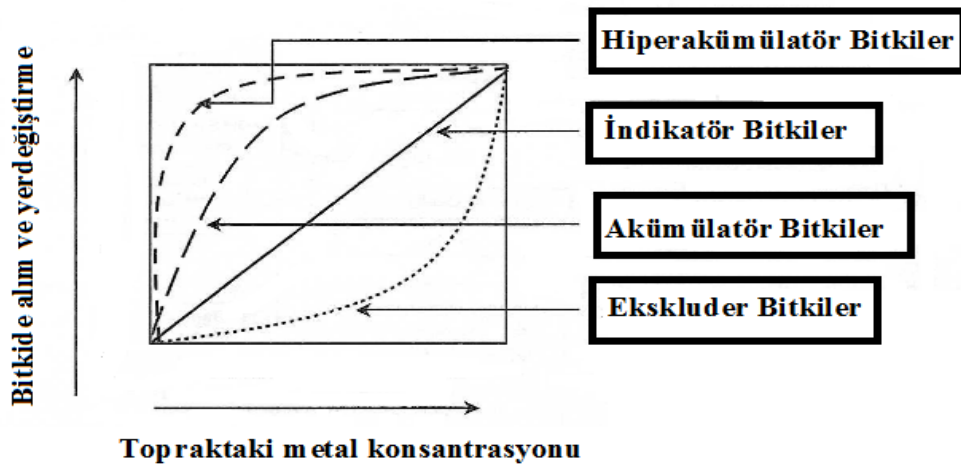
### 2.3.3. Akümülatör bitkiler

Bünyesinde toksik septomları göstermeden topraktaki metal konsantrasyonu yansıtan bitkilere akümülatör bitkiler denir. Topraktaki konsantrasyon bitkidekinden çok daha fazladır.

### 2.3.4. Hiperakümülatör bitkiler

Bu bitki türleri topraktaki metallere veya metal biriktirmeyen bitkilerden çok daha yüksek seviyede metal bulundururlar. Yapraklarında kuru ağırlık olarak % 0.1 Ni, Co,

Cu, Cr, Pb veya % 1 Zn'dan fazla metal içeren bitkiler hiperakümülatör olarak tanımlanır (Baker, 1981). Hiperakümülatör bir bitki 10 ppm' den fazla Hg, 100 ppm' den fazla Cd, 1000 ppm' den fazla Co, Cr, Cu ve Pb ve 10000 ppm' den fazla Ni ve Zn' yu bünyesine alabilmektedir. Şimdiye kadar, en azından 45 bitki familyasında 400 bitki türünün metal sömürücü hiperakümülatör olduğu belirlenmiştir. Bunlardan çoğu Ni' i biyolojik olarak konsantre hale getirebilmekte, yaklaşık 30 tanesi Co, Cu ve/veya Zn' yu absorbe edebilmekte, çok azı Mn ve Cd' u biriktirebilmektedir. Örneğin, çoğu bitkiler yaklaşık 100 ppm'lik bir Zn birikiminde toksisite semptomlarını gösterirken, en yaygın metal hiperakümülatörü olarak bilinen *Thlaspi caerulescens*'in 26000 ppm'in üzerinde bir birikimi sağlayabildiği literatürden bilinmektedir (Lasat, 2000). Metal hiperakümülatasyonu metal içerikli topraklara ekofizyolojik bir adaptasyondur (Maywald ve Weigel, 1997).

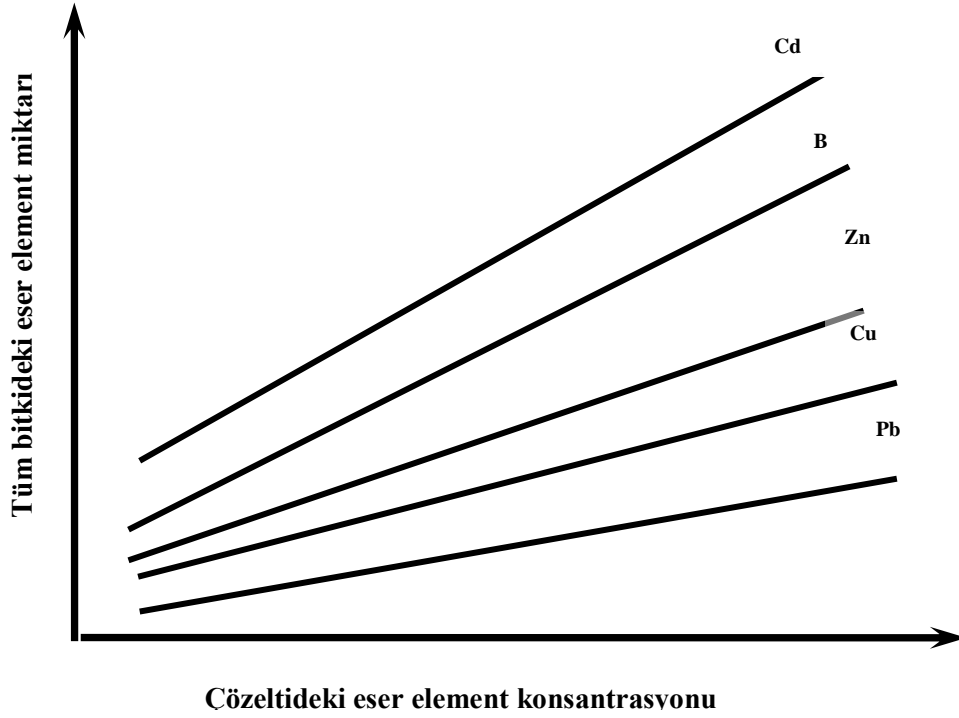


Şekil 2.2: Bitkilerin ağır metale maruz kaldığı zaman gösterdikleri 4 strateji (Prasad M.N.V., 2008)

## 2.4. BİTKİLERDE AĞIR METAL STRESİ

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. Lichtenhaler (1996) ise stres faktörlerini doğal ve insan kaynaklı olmak üzere sınıflandırmaktadır. Yüksek ışımaya, yüksek ve düşük sıcaklıklar, ani donma, su kıtlığı ve mineral eksikliği doğal stres faktörlerini oluştururken; hava kirleticileri, aşırı azot verilmesi, foto oksidantlar, reaktif oksijen türleri ve ağır metaller insan kaynaklı stres faktörlerini oluşturmaktadır (Koç, E. ve Üstün, S.A., 2008).



Şekil 2.3: Besi Çözeltisindeki Konsantrasyonlarının Bir Fonksiyonu Olarak Bitkilerde Eser Element Alımı (Pendias, K. ve Pendias A.K., 1986)

Eser elementlerin bitkide fazla miktarlarda bulunması sonucunda bitkinin yapısında bazı değişiklikler meydana gelebilir. Bunlar:

1. Hücre zarının geçirgenliğini değiştirirler (Ag, Au, Br, Cd, Cu, F, Hg, I, Pb,  $UO^2$ ).
2. Katyonlar ile tiyol grupları reaksiyona girerler (Ag, Hg, Pb).

3. Zorunlu metabolitlerle yer değiştirme rekabeti meydana getirirler (As, Sb, Se, Te, W, F).
4. ATP veya ADP 'nin aktif gruplarının ve fosfat gruplarıyla tepkimeye girme ilgilerini azaltırlar( tüm ağır metaller, Al, Be, Sc, Y, Zr ve La)
5. Esansiyal iyonların değişikliğe uğramasına neden olurlar (özellikle başlıca katyonlarla) (Cs, Li, Rb, Se, Sr)
6. Fosfat ve nitrat gibi esansiyal grupların yerlerini işgal eder görevlerini engellerler (arsenat, bromat, florat, borat, selenat, tellurat ve tungstat) (Prasad, 2008)

Ağır metal iyonlarını toprak çözeltisinden kökleri aracılığı ile alan bitkiler topraktaki kirlenmeden etkilenen ilk canlılardır.

#### **2.4.1. Bitkilerde ağır metal alınımı**

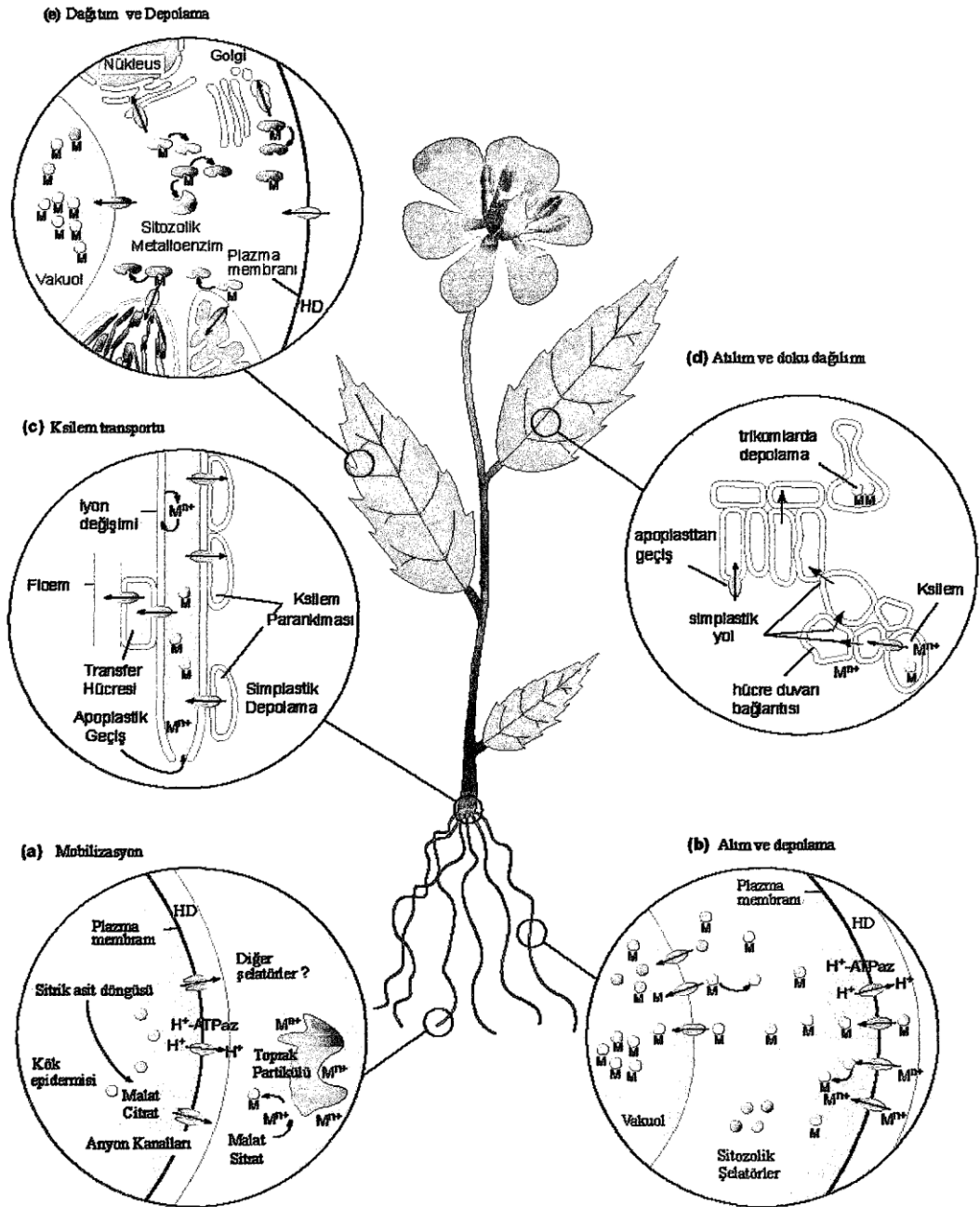
Yapılan araştırmalarda bitkilerin, az miktarda da olsa atmosferde bulunan ağır metalleri yaprakları aracılığı ile alabildikleri gösterilmesine rağmen (Harrison ve Chirgawi, 1989; Lindberg ve diğ. , 1992; Godzik, 1993; Lombi ve diğ. , 2002 ) ağır metal alınımı büyük oranda kökler aracılığı ile olmaktadır. Ağır metaller topraklarda, kolloidlere tutunmuş halde, organik maddelere bağlı halde ve toprak çözeltisi içinde iyon halinde bulunurlar. Bitkiler ancak toprak çözeltisinde iyon halinde bulunan ağır metalleri kökleri aracılığıyla alabilirler. Koşulların değişmesi (pH, sıcaklık, organik madde miktarı, diğer metallerin varlığı, mikroorganizmalar vb.) toprak çözeltisi içindeki ağır metal konsantrasyonunu değiştireceğinden ağır metal alınımını da etkileyecektir. Örneğin pH'ın düşmesi ortamdaki H<sup>+</sup> iyonlarının artmasına neden olmaktadır, artan H<sup>+</sup> katyonları, ağır metal katyonları (molibdenin anyon formu da bulunduğu için istisnadır) ile rekabete girmekte, kolloidlere tutunmasını engellemekte ve böylece ağır metallerin toprak çözeltisindeki konsantrasyonunun artmasına neden olmaktadır (Greger, 1999). Ağır metal alınımı, bitki türüne bağlı olarak da değişiklik göstermektedir. Kök katyon değişim kapasitesi, kök yüzey alanı gibi özellikler ağır metal alınımını etkilemektedir (Davies, 1995). Ayrıca bitkiler rizosfer pH'sını değiştirerek ( Muranyi ve diğ. , 1994), ya da rizosfere malat, sitrat, musilaj gibi maddeler salgılayarak (Jackson ve diğ. , 1990) aldıkları ağır metal miktarını değiştirebilmektedirler.

Bazı durumlarda bir ağır metal diğer bir ağır metalin alımını arttırabilmekte ya da azaltabilmektedir (He ve diğ., 2005; Lombardi, ve diğ., 2005). Pb ve Cd gibi ağır metallerin topraktaki ve bitkideki konsantrasyonunun artmasının, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn gibi besin elementlerinin alınmasını ve kullanılmasını etkilediği birçok araştırmada tespit edilmiştir ( Rivetta et al. ,1997; Sharma and Dubey, 2005).

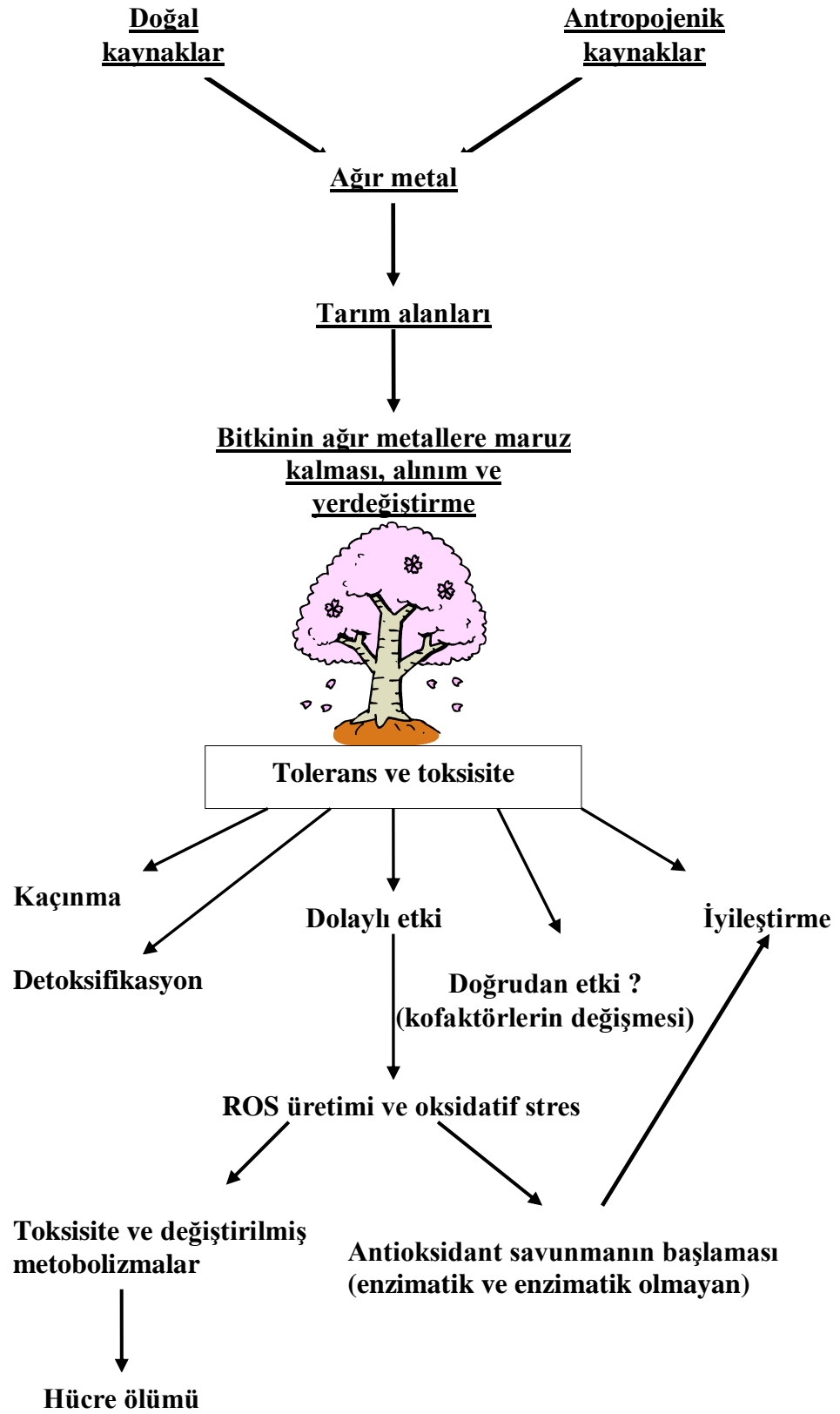
#### **2.4.2. Bitkilerde ağır metal taşınımı**

Köklerden alınan ağır metaller ksilem aracılığı ile gövde ve yapraklara iletilmektedir. Kök içine alınan ağır metaller apoplastik ve/veya simplastik yolla ksileme ulaşırlar. Endodermal hücre tabakası, ksileme apoplastik yoldan ağır metal ulaşımını engelleyen bir bariyer görevi yapmaktadır. Bu nedenle genellikle ağır metaller simplastik yoldan bu tabakayı aşım ksileme ulaşmak zorundadırlar (Tester ve Leigh, 2001). Ksilem ile ağır metal iletimi bitki türüne ve metal çeşidine bağlı olarak farklılıklar göstermektedir.

Bazı metaller ise (örneğin Cd) iyon halinde ksilemde taşınır. (Mench ve diğ., 1988). Bunun yanı sıra organik asitlerin de taşınmada rol oynadığı bildirilmiştir (Greger, 1999). Floem aracılığı ile de ağır metal iletimin olup olmadığının tespitine yönelik araştırmalarda, Cd uygulanmış yapraklarda kısmi bir taşınım söz konusu olsa da (Greger ve diğ., 1993), Cd, Cu ve Zn ile yapılan diğer araştırmalarda, bu ağır metallerin yapraklardan köklere uzanan bir iletiminin olmadığı saptanmıştır. Floemin, muhtemelen ağır metalleri bağlayabilen iyon ve moleküllere sahip protoplazma içermesi ağır metallerin taşınmasını zorlaştırmaktadır (Greger, 1999; Peng ve diğ.. 2006).



Şekil 2.4: Ağır metallerin bitki hücreleri tarafından alınımı (Semboller: HD; hücre duvarı, M; metal, küreler; kelatörler, oval şeklindeki yapılar; taşıyıcılar, fasulye şeklindeki yapılar; metalloşaperonlar) (Lombi ve diğ. , 2002).



Şekil 2.5: Bitkideki ağır metallerin kaynakları ve bitkinin verdiği cevaplar (Prasad M. N.V 2008)

### **2.4.3. Bitkilerde ağır metallerin yol açtığı zararlar**

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.

#### **2.4.3.1. Ağır metallerin kök, gövde ve yapraklara etkisi**

Ağır metal zararının ilk ve en belirgin etkisi köklerde görülür (Tester ve Leigh, 2001; Verma ve Dubey, 2003; Ouzounidou ve diğ., 1995). 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 görülebilmektedir. Bunların dışında köklerde lignifikasyon ile epidermis ve hipodermiste bazı yapısal değişiklikler de saptanmıştır. Ağır metal alınımı devam ettikçe etkisi gövde de gözükmekte ve gövde uzaması da etkilenmektedir. Gerek kök ve gerekse gövdenin taze ve kuru ağırlıklarında azalma meydana gelmekte ve bitki büyümesi yavaşlamaktadır (Köleli ve diğ., 2004; Sharma ve diğ., 2004; Chaoui ve Ferjani, 2005; Lombardi 2005). Maruz kalınan ağır metal çeşidine ve konsantrasyonuna bağlı olarak bitki yapraklarında; şekil değişikliği, alan küçülmesi, sararma (kloroz) ve nekrotik leke oluşumu görülmektedir (Benavides ve diğ., 2005; Köleli ve diğ., 2004; Lombardi, 2005). Benavides ve diğ. (2005)'ne göre, Cd toksisitesinin en kolay biçimde saptanan etkisi, yaprak büyümesinin inhibisyonu, yapraklarda yuvarlanma ve sararmadır. Ayrıca aynı araştırmacılar, yapraklardaki sararmanın, Fe yetersizliği, P yetersizliği ya da Mn taşınımının engellenmesi nedeniyle olabileceğini de bildirmişlerdir.

#### **2.4.3.2. Ağır metallerin enzim aktiviteleri üzerine etkisi**

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).

#### **2.4.3.3. Ağır metallerin membranlar üzerine etkisi**

Ağır metaller, lipitlere bağlanarak ve/veya reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu arttırıp lipit peroksidasyonuna neden olarak ( Halliwell ve Gutteridge, 1999; Wu ve diğ., 2003) membran (hücre, kloroplast, mitokondri, tilakoid membranları vb.) yapılarının ve işlevlerinin değişmesine sebep olurlar. Zarsı yapıların kompozisyonunda meydana gelen değişiklikler hücre membran akışkanlığının değişmesinin yanında, membrana bağlı enzimlerin yapısının ve aktivitelerinin de değişmesine neden olmaktadır. Cu, Ni, Pb ve Cd'un belirli konsantrasyonlarının, bitkilerin hücre membranlarında bulunan Adenin tri fosfataz (ATPaz) enziminin aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (Smeets ve diğ., 2005).

#### **2.4.3.4. Ağır metallerin fotosentez aktivitesi üzerine etkisi**

Ağır metal stresi; kloroplast yapısının bozulması, klorofil ve karotenoid biyosentezinin inhibe olması, elektron akımının aksaması, Kalvin döngüsü enzimlerinin aktivitelerinin inhibe olması, stoma sayısında ve işlevindeki değişikliklere bağlı CO<sub>2</sub> yetersizliği gibi olumsuz durumlara yol açarak fotokimyasal aktivitenin inhibisyonuna neden olmaktadır ( Macfarlane ve Burchett, 2001; Prasad ve diğ, 2001). Kloroplast yapısındaki olumsuz değişikliklerin yanında pigment miktarlarındaki azalmalar da fotosentetik aktivitenin inhibe olmasının diğer bir nedenidir. Cd ve Pb'un konsantrasyonunun artması, bitkilerin K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn gibi besin elementlerinden yararlanmasını engellemektedir (Sharma ve Dubey, 2005). Bu elementlerden Mg ve Fe klorofil sentezi için gereklidirler ve eksikliği klorofil miktarının azalmasına neden olmaktadır (Ouariti ve diğ., 1997).

#### 2.4.3.5. Ağır metallerin serbest radikal oluşumu üzerine etkisi

Ağır metaller hücre içinde serbest radikal oluşumunu indüklerler ve dolaylı yoldan lipid peroksidasyonuna, nükleik asitlerin zarar görmesine, klorofil parçalanmasına ve fotosentezin inhibisyonuna neden olurlar. Bazı ağır metaller (Fe, Cu vb.) doğrudan serbest radikal oluşumuna neden olurken, Cd, Pb ve Hg gibi redoks kapasitesi olmayan ağır metaller, glutatyon miktarını azaltarak, Ca bağımlı sistemleri aktive ederek ve Fe bağımlı uygulamaları etkileyerek oksidatif oluşuma öncülük ederler ( Pinto ve diğ., 2003). Biyolojik sistemlerde hidroksil-, lipoksi-, tiyol-, fenil-, ve nitroksit- radikalleri gibi oksijen, sülfür, nitrojen ve karbon merkezli serbest radikaller oluşabilir. (Kalyanaram, 1996; Dietz ve diğ., 1999). Serbest radikallerin canlılarda en yaygın bulunan formu reaktif oksijen türleri (ROS)'dir. ROS'ler redoks tepkimeleri sırasında moleküler oksijenden oluşabildiği gibi mitokondride suyun yükseltgenmesi ya da kloroplastlarda elektron aktarımı sırasında da oluşabilirler (Ashraf, 1994; Fridovich, 1995; Singh S. 2006). ROS'nin enzimatik kaynakları hem ekstraselüler hem de intraselülerdir. Büyük ROS kaynakları hücre duvarlarında bulunan peroksidazlar ve aminoksidazlar, plazma membranında bulunan NADP oksidaz, mitokondri, kloroplast, peroksizomlarda bulunan intraselüler oksidaz ve peroksidazlardır (Scandalios, J.G., 2002).

En iyi bilinen reaktif oksijen türleri:

Süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) ve sentezi

Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve sentezi

Hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) ve sentezi

Singlet oksijen ( $^1O_2$ ) ve sentezi

Mekanizma	Lokalizasyon	Başlıca Reaktif oksijen türleri
<b>Oluşum ( ürün )</b>		
Fotosen. ET ve PSI-II	Kloroplast	$O_2^-$
Solunum ET	Mitokondri	$O_2^-$
Glikolat Oksidaz	Peroksizom	$H_2 O_2$
NADPH oksidaz	Plazma Membranı	$O_2^-$
Yag asidi $\beta$ -oksidasyonu	Peroksizom	$H_2 O_2$
Oksalat Oksidaz	Apoplast	$H_2 O_2$
Ksantin Oksidaz	Peroksizom	$O_2^-$
Peroksidaz ,Mn ve NADH	Hücre Duvarı	$H_2 O_2, O_2^-$
Amino oksidaz	Apoplast	$H_2 O_2$
<b>Parçalama</b>		
Süperoksit dismutaz	Kloroplast, Sitozol, mitokondri, Apoplast	$O_2^-$
Askorbat peroksidaz	Kloroplast, Sitozol, mitokondri, Apoplast	$H_2 O_2$
Katalaz	Peroksizom	$H_2 O_2$
Glutatyon Peroksidaz	Sitozol	$H_2 O_2, ROOH$
Peroksidaz	Hücre duvarı, Sitozol, Vakuol	$H_2 O_2$
Askorbik Asit	Kloroplast, Sitozol, mitokondri, Apoplast	$H_2 O_2, O_2^-$
Glutatyon	Kloroplast, Sitozol, mitokondri, Apoplast	$H_2 O_2$
$\alpha$ -Tokoferol	Membranlar	$ROOH, O_2^-$
Karetenoidler	Kloroplast	$O_2$

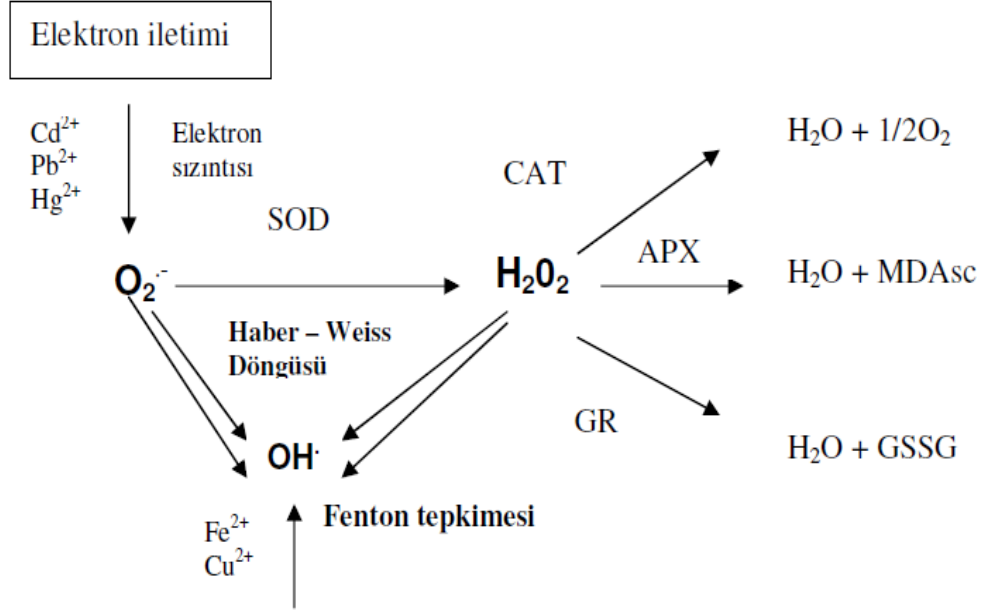
Tablo 2. 2: Bitkilerde ROS oluşumu, lokalizasyonu ve uzaklaştırılması

(Koç E. ve Üstün S.A., 2008).

Yüksek metal konsantrasyonu ve yüksek ışık gibi uygun olmayan stres koşulları, mitokondri ve kloroplastların elektron taşıma sisteminde elektron iletimini engeller ve

elektron sızıntısına neden olurlar. Elektron, ortamda bulunan oksijen tarafından alınır ve sonuçta oksijen indirgenmesinin ilk ürünü olan süperoksit ( $O_2^-$ ) radikali oluşur. Bu tepkime ilk kez Mehler adlı araştırmacı tarafından tanımlandığı için Mehler tepkimesi olarak adlandırılmaktadır. Süperoksitin hem indirgeyici hem de yükseltgeyici özelliği vardır. İki molekül süperoksit radikali pH'a bağlı olarak kendiliğinden veya süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile katalizlenerek hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve  $O_2$ ' ye dönüşür. Mehler reaksiyonu sonucu oluşan  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  gibi hem indirgeyici hem de yükseltgeyici olarak davranır. Eğer ortamda metal katalizörler veya enzimler yoksa organik moleküllere doğru düşük bir ilgi gösterirler. Optimal durumlarda bile hücrede çok yüksek seviyede sentezlenen  $H_2O_2$ 'in hücre zarlarından geçebilme özelliği vardır. Bitki hücrelerindeki  $H_2O_2$ 'in büyük bölümü  $O_2$  radikalinin SOD enzimi ile katalizlenmesi yoluyla oluşmaktadır. Katalaz (CAT), Askorbat peroksidaz (APX) ve bazı genel peroksidazlar,  $H_2O_2$ 'in parçalanmasını katalizlemektedir.

Askorbat ve  $H_2O_2$ 'in APX katalizörlüğündeki reaksiyonu sonucunda monodehidroaskorbat (MDHA) ve su oluşmaktadır (Şekil 2). Bu reaksiyonun tamamında Monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), glutatyon redüktaz (GR) önemli yer tutmaktadır ve ortak çalışmayla hidrojen peroksidin zararlı etkisi ortadan kaldırılmaktadır (Asada, 1999; Bray ve diğ. 2000; Garratt ve diğ., 2002). Tüm bu reaksiyonlar olurken ortamda hem  $O_2^-$  hem de  $H_2O_2$  radikalleri bulunmaktadır. Bu radikaller birbirleriyle tepkimeye girerek çok daha tehlikeli bir radikal olan hidroksil radikalini ( $OH^-$ ) meydana getirirler (Haber-Weiss tepkimesi). Normal şartlarda bu reaksiyon çok yavaş yürüdüğünden hücreye fazla zararı olmamaktadır. Ancak Fe, Cu gibi ağır metallerin yüksek konsantrasyonlarında bu reaksiyonun hızlandığı (Fenton tepkimesi) saptanmıştır (Nikookar ve diğ., 2005).



Şekil 2.6: Ağır metallerin neden olduğu ROS oluşumu.

Diğer bir reaktif oksijen türü ise singlet oksijen ( $^1O_2$ )'dir. Klorofil tarafından ışık enerjisinin absorbe edilmesiyle 'aktif triplet klorofil molekülü' ( $^3Klo^*$ ) oluşmaktadır. Aktive olmuş klorofil molekülünün, absorbe ettiği enerjiyi moleküler oksijene aktarması sonucunda üretilen  $^1O_2$  oksijenin fizyolojik olarak elektron aktarılmamış ve enerjilenmemiş formudur. Oldukça aktif olan bu molekül iki elektronun transfer edildiği tepkimelere katılabilir. Bununla birlikte, ışık altındaki kloroplastlarda singlet oksijene doğrudan rastlanılmamıştır. Asada ve Takahashi (1987), singlet oksijenin üretilse bile sulu ortamlarda çok kısa ömrünün olduğunu, çevresindeki moleküllerle yüksek oranda tepkimeye girdiğini ve üretildiği yerde tilakoid membranlarındaki karotenoidler tarafından yok edildiğini bildirmişlerdir.

## 2.5. BİTKİLERİN AĞIR METAL STRESİNE KARŞI GELİŞTİRDİĞİ KORUNMA MEKANİZMALARI

Bitkilerin strese yanıtı, kaçınma (sakinma) ve tolerans (dayanma- savunma) olmak üzere iki şekilde olur (Lewitt, 1980; Bray ve diğ., 2000).

### 2.5.1. Kaçınma:

Kaçınma, stres faktörlerinin bitkiye girişinin önlenmesi veya azaltılması olup, bitki morfolojisinde ve metabolizmasında değişiklikler meydana getirir. Bu mekanizma aşağıdaki yollarla gerçekleştirilir.

1. Bitkinin çevre ile temas halinde olduğu yüzeylerinin morfolojik ve kimyasal bütünlüğündeki değişiklikler: yaprak ayasının alanı ve kalınlığı, stoma büyüklüğü ve yoğunluğu, kutikulanın kalınlığı ve kimyasal yapısı, yaprak ve kök salgılarında toksik ve engelleyici bileşenlerin oluşumudur.
2. Ontogenetik değişmeler (stres faktörlerinden mevsimsel olarak kaçınma): stres olayında önce dormant ontogenetik faza (tohum, yumru oluşumu) geçiş sağlanarak, bitki üretkenliği garantili hale getirilir.

### *Ağır metal alınımından sakınma*

Bazı bitkiler rizosferdeki pH'sını artırarak, ağır metal alınımını azaltacak yöntemler geliştirmişlerdir. pH artınca metallerin hareketliliği (mobilitesi) azalmaktadır (Jackson ve diğ., 1990). Bazı organik asitlerin rizosfere verilmesi ve burada ağır metallere bağlanması (kelatlaşma), metal alınımının azalmasına neden olabilmektedir. Cd'un kelat (metal+elektron verici moleküller) formunda kökler tarafından alınmadığı gösterilmiştir. Çeşitli karbonhidratları içeren ve köklerin apikal bölgesinden salgılanan musilaj da ağır metallerle yüksek oranda bağlanma kapasitesine sahiptir (Puthota ve diğ., 1991). Musilaj ve kalloz gibi karbonhidratların salınımının, Cd stresini engellemeye yönelik bir savunma olduğu bildirilmiştir (Verkleij ve Schat, 1990; Wagner, 1993).

### 2.5.2. Tolerans:

Stres faktörlerinin etkisini ortadan kaldırma, azaltma ya da onarma mekanizmalarıdır. Bu tepki tipi doku seviyesinde değişiklikler (yara periderminin oluşumu gibi) , subselüler seviyedeki değişiklikler (hücre duvarı ilavesi, membran, kloroplast ve hücre duvarı modifikasyonlarının oluşumu gibi) ve antioksidan enzimlerin oluşumu, stres proteinlerinin oluşumu, fenol polimerlerin (sekonder metabolitlerin) seviyelerindeki değişiklikleri içerir.

#### *Antioksidan savunma sistemi*

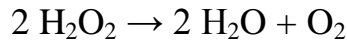
Ağır metaller doğrudan etkileri yanında, serbest radikal oluşumunu teşvik ederek dolaylı yoldan da birçok zarara (oksidatif stres) neden olurlar. Serbest radikaller içinde özellikle aktif oksijen türleri olan  $\text{OH}^-$ ,  $\text{O}_2^-$ , ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  radikalleri ağır metal stresine maruz kalan bitkilerde bitkiye zarar verecek düzeylere çıkabilmektedir (Shah ve diğ., 2001). Bitkiler serbest radikallerin zararlarından korunmak için kompleks bir antioksidan savunma sistemine sahiptir (Halliwell ve Gutteridge, 1999). Antioksidan terimi, aktif oksijen türlerini, kendisi bir yıkıcı radikale dönüşmeden, baskılayan bir molekül olarak tanımlanabilir. Antioksidan savunma sistemi, enzimleri ve bazı indirgen molekülleri içeren bir sistemdir.

Bu sistemin esas bileşenlerini süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, peroksidazlar ve glutatyon-askorbat döngüsünün enzimleri olan askorbat peroksidaz, dehidroaskorbat redüktaz, monodehidroaskorbat redüktaz ve glutatyon redüktaz, guaiakol peroksidaz gibi enzimatik antioksidanlar ile askorbat, glutatyon,  $\alpha$ -tokoferol, fenolik bileşikler ve karotenoidler gibi enzimatik olmayan antioksidanları içerdiği bilinmektedir (Foyer ve diğ., 1994; Hodges ve Forney, 2000).

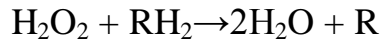
Süperoksit dismutaz (SOD, E.C 1.15.1.1), süperoksidin ( $\text{O}_2^-$ ) nin en önemli gidericisidir ve enzim aktivitesi sonucunda hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oluşur. SOD aktivitesinin bu toksik ürünü, askorbat peroksidaz (AP, E.C 1.11.1.1), Guaiakol

peroksidaz (GPOX E.C.1.11.1.7) ve glutatyon redüktaz (GR, E.C 1.8.1.7) tarafından ortadan kaldırılır. Glutatyon redüktaz redoks döngüsünde önemli bir enzim olup, glutatyon redüktaz, okside glutatyonun (GSSG) glutatyon (GSH) indirgenmesini katalizleyen bir enzimdir ve böylece indirgenmiş hücre sel GSH'ın hücrede yeterli seviyede kalmasını sağlar. Bu enzim flavoprotein disülfid oksidoredüktaz enzim ailesinin bir üyesidir (Mishra S. ve diğ., 2006).

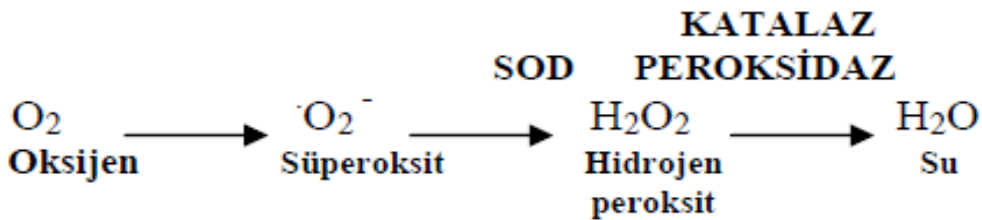
Katalaz (CAT, E.C 1.11.1. 6) enzimi ise oluşan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )'i suya ( $H_2O$ ) ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) çevirir. Hidroperoksidaz olarak da isimlendirilen katalaz bir sitokrom sistemine sahip tüm aerobik canlılarda bulunan ve  $H_2O_2$ 'in su ve oksijene parçalanmasını katalizleyen özel bir proteindir.



Hidrojen peroksitin ( $H_2O_2$ ) bu şekilde uzaklaştırılması sayesinde daha reaktif olan hidroksil radikallerinin oluşumu önlenmiş olur. Bu reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılması aerobik ortamda yaşamayı kolaylaştırır.



$H_2O_2$ 'nin detoksifikasyonu, en çok peroksidazlarda yerleşmiş olan katalaz tarafından sağlanır. Hidrojen peroksiti ortadan kaldıran diğer bir enzim grubu da peroksidazlardır. Katalaz ve peroksidaz enzimlerinin her ikisi de  $H_2O_2$ 'i parçalar. Ancak katalaz hem elektron alıcısı hem de elektron vericisi olarak  $H_2O_2$  kullanırken, peroksidazlar ise  $H_2O_2$ 'i indirgemek için organik bir substrata ( $RH_2$ ) gereksinim duyarlar.



Şekil 2.7: Katalaz ve Peroksidazların enzim aktivitesi.

Bitkilerde stres etmenin oluşturduğu sinyalin algılanması bitkinin savunma mekanizmasını aktif hale getirmektedir. Bitki savunmasında aktif oksijen olarak adlandırılan ürünler bitki hücresi tarafından üretilmeye başlanır. Oksidatif hasara karşı antioksidan enzimler ve bazı metabolitlerin mevcut stres dönemlerinde bitkilerin yaşaması için adaptasyon rol oynadığı bilinir. ROS türleri hücrel hasarlara neden olmalarına karşın bitkilerde sinyal molekülü olarak da görev yapmaktadırlar. Düşük konsantrasyonlarda savunma ile ilgili genlerin uyarılmasında, savunma cevaplarının oluşmasında görev yapmasına karşın yüksek konsantrasyonlarda hücre hasarlarına, hücre ölümlerine neden olmaktadır.

### *Fitokelatinler*

Fitokelatinler peptid familyasındandır. İlk olarak mayalarda tanımlanmışlardır. Fitokelatinlerin sentezi Cd, Ni, Cu, Zn, Ag, Hg ve Pb gibi ağır metallere, anyonlara (arsenat ve selenit gibi) maruz kalan hücrelerde hızlıca indüklenir (Yang ve diğ. 2001). Fitokelatinler sadece üç amino asit içerir ki bunlar; Glutamin (Glu), Sistein (Cys) ve Glisin (Gly)'dir. Fitokelatinlerin sentezi tripeptit olan glutatyonla ilişkilidir ve ondan enzimatik olarak sentezlenirler. Fitokelatinler genel olarak –Glu-Cys dipeptit tekrarını izleyen terminal Gly bağlanması şeklindedir. Yani Gly-(-Glu-Cys)<sub>n</sub>-Gly şeklindedir. Burada “n” genelde 2-5 arasında iken, en fazla 11 olabilir (Cobbet, 2000; Bayçu, G., 2002 ).

### *Prolin*

Prolin (Pro, P) proteinleri oluşturan 20 aminoasitten biridir. Diğer tüm aminoasitler birincil amin grubu taşımalarına rağmen, prolin, yan zincirindeki üç karbon atomu bir halka oluşturarak tekrar peptid bağındaki nitrojen atomuna bağlandığı için, birincil amin grubundan yoksundur (-NH<sub>2</sub>). Prolindeki nitrojen (azot) aslında ikincil amin olarak nitelendirilebilir. Prolin bazen iminoasit olarak da adlandırılmaktadır (Anonim 3).

Pro bitki ve mikroorganizmalarda meydana gelen streslere karşı bir cevap mekanizmasıdır (Siripornadulsil, S., ve diğ., 2002). Stres durumlarında bitkiler

membranlarında ve proteinlerinde meydana gelen hasarı indirmek için prolin biriktirmeye başlar (Shah ve Dubey, 1998; Verma, 2003). Ayrıca prolin sentezi sitoplazmanın asidozisesini azaltır, metabolizma ile NADP/NADPH oranlarının uyumlu olmasını sağlar. Serbest prolin, bir osmotik koruyucu (Taylor, 1996), protein stabilizatörü (Shah and Dubey, 1998), lipid peroksidasyon inhibitörü, hidroksil radikalleri temizleyici ve singlet oksijen temizleyicisi gibi davranır (Farago and Mullen, 1979).

## **2.6. YEŞİL ISLAH ( FİTOREMEDİASYON)**

Fitoremediasyon terimini kelime anlamı olarak incelediğimizde, bitki anlamındaki “fito” ile ıslah anlamındaki “remediasyon” kelimelerinden türetilmiş olup, 1991’de terminolojiye girmiştir. Bu terim ingilizcede “phytoremediation, bioremediation, botanical remediation ve green remediation” olarak da anılmaktadır (EPA, 2000).

Türkçe’de “Yeşil Islah” olarak kullanılan fitoremediasyon, bitki temel alınarak çevreyi temizleme teknolojisidir. Bu teknoloji ile organik ve inorganik maddeler ki özellikle son yıllarda gelişen sanayileşmeden dolayı çevreye verilen ağır metallerin neden olduğu kirlilik bitkiler tarafından alandan bertaraf edilebilmektedir (Henry, 2000).

Bitkiler tarafından alınan bir kısım metaller, bitki bünyesindeki enzimler aracılığıyla bozunmakta ve kimyasal formları değişikliğe uğramaktadır. Çoğu metaller ise herhangi bir bozunmaya uğramadan bitkinin yaprak ve sapslarında birikerek, bitkinin hasadıyla ortamdaki uzaklaşmaktadır (Vanlı ve Yazgan 2001).

Fitoremediasyonun fizikokimyasal teknolojilerden çok daha kolay uygulanabilmesi ve birçok organik ve inorganik kirlenmede etkili olması, bu sistemlerin kuruluşu ve ıslah maliyetinin diğer teknolojilere göre çok (4- 1000 kat) daha ucuz olması önemli olumlu yönleridir (Sadovskiy, 1999). Sistem doğal ve yapay ortamlarda kullanılabilir. Yani kirlilik etmeni, bulunduğu yerde veya başka bir ortama taşınarak bertaraf edilebilir.

Bu teknolojinin en önemli olumsuz yönü ise ağır düzeylerde kirlenmiş alanlarda bitkilerin kısa sürede etkinliğini gösterememesidir. Bu nedenle ancak düşük düzeylerde kirlenmiş alanlarda kullanılır. Sistemin etkinliği kök derinlikleri ve iklim koşulları ile sınırlıdır. Doğal olmayan bitkilerin bu amaçla kullanılması biyolojik çeşitliliği olumsuz yönde etkileyebilir (EPA, 2000; Henry, 2000).

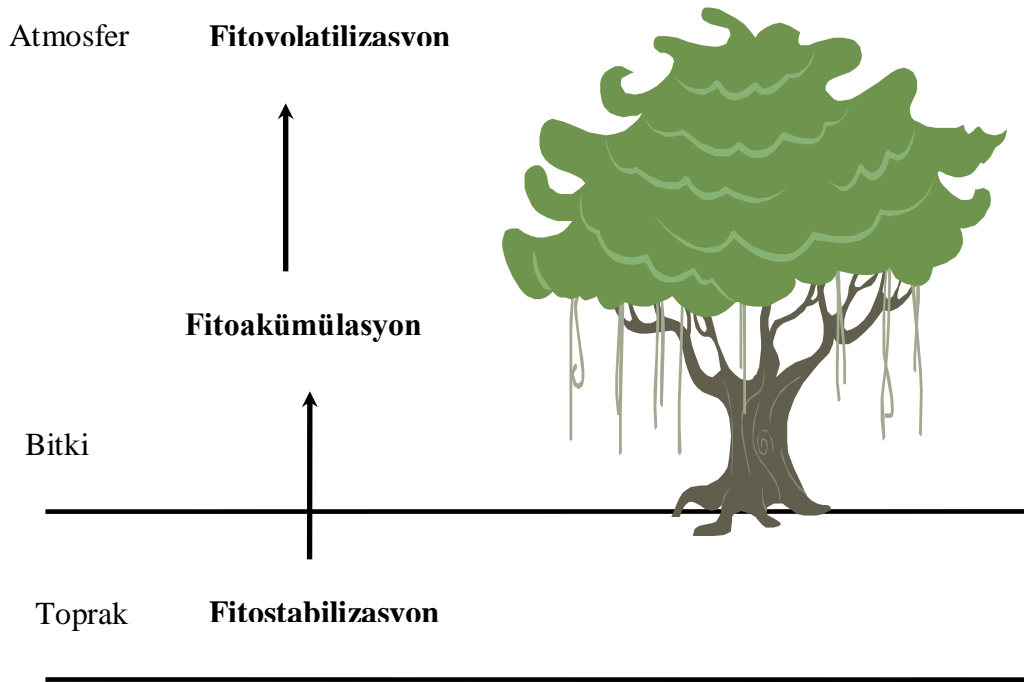
Fitoremediasyonla yapılacak çalışmalarda kullanılacak en uygun bitkiler, ortamdaki yüksek ağır metal konsantrasyonlarında yaşayabilen, güçlü ve zengin bir kök sistemine sahip olan, hasat edilebilen kısımlarında yüksek düzeyde metal toplayabilen, hızlı bir büyüme yeteneği ve arazide çok miktarda biyokütle üretebilme potansiyeline sahip olan bitkilerdir (Reeves ve Baker, 2000; Bayçu, G, 2003).

### **2.6.1. Yeşil Islah çeşitleri**

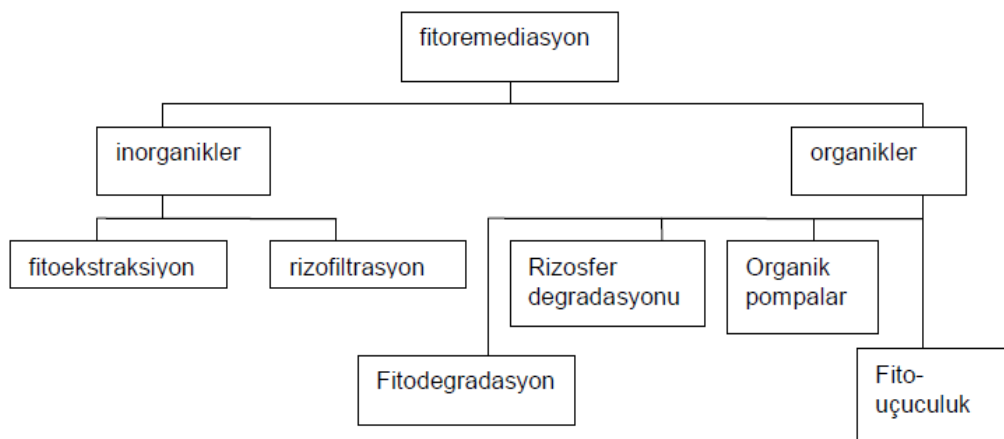
Fitoremediasyon teknolojilerini fitoekstraksiyon (fitoakümülyasyon), fitostabilizasyon ve rizofiltrasyon olmak üzere üç sınıfta incelemek mümkündür. Ayrıca organik kirleticiler için şu sınıflama yapılmıştır; fitodegradasyon, rizodegradasyon ve fitovolatilizasyon.

Fitoekstraksiyon teknolojilerinde, topraktaki metalleri köklerine ve hasat edilebilen kısımlara nakledebilen hiperakümülatör bitkiler kullanılmaktadır. Fitostabilizasyon ise topraktaki metallerin mobiliteelerini ve yararışlılıklarını sınırlayan bitkilerin kullanımını kapsamaktadır. Fitostabilizasyon bitkileri, yüksek metal seviyelerini tolere edebilen ve metalleri absorpsiyon, çöktürme, kompleksleşme veya metal valanslarının indirgenmesiyle toprakta immobilize edebilen bitkilerdir. Aynı zamanda gövdelerinde düşük seviyede bir birikim gösterdikleri için, hasattan sonra kalıntıların tehlikeli atık haline gelmesi elimine edilmiş olmaktadır. Toprakta bulunan metalleri stabilize eder. Fitoremediasyonun diğer bir çeşidi olan rizofiltrasyon ise metalleri sorpsiyon yoluyla uzaklaştıran bitkilerin kullanımını içermektedir. Fitoremediasyon toprağın biyolojik özelliklerini ve fiziksel yapısını korumaktadır. Fitodegradasyon da bitkiler organik kirleticilerin yapısını bozma ve ayrıştırma yeteneğine sahiptirler. Bu oluşum esas olarak enzimatik reaksiyonlar vasıtasıyla gerçekleşir. Yani bazı kirleticiler bitkiler tarafından adsorbe edilebilir ve bitki enzimleri vasıtasıyla daha sonra bozunuma uğratılabilirler.

Rizodegradasyonda organik kirleticileri etkisiz hale getirmek için toprak mikroorganizmaları ile birlikte çalışırlar. Ve son olarak fitovolatilizasyonda organik kirleticileri içeren suyun büyük bir miktarını alan ağaçlarda meydana gelir. Kirleticiler terleme yoluyla bitki sisteminden ayrılabilir ya da buharlaşabilir.



Şekil 2.8: Fitoremediasyon ile metal giderimindeki ana mekanizmalar  
(Değiştirilmiş, Mirsal 2004)



Şekil 2.9: Farklı fitoremediasyon yöntemlerinin şematik olarak görünümü (Mirsal, 2004)

Bu tez çalışmasında, daha önce ağır metal alımı, stresi ve tolerans mekanizmaları ile hiçbir çalışma yapılmamış olan *Brachychiton populneus*, yani Japon kavağı bitki materyali olarak kullanılmıştır. Amacımız bitkinin çimlenme koşullarından başlayarak çeşitli yetiştirme ortamlarında incelenmesi, bitkiye verilen Cd'un Cu elementiyle antagonistik veya sinerjik ilişkisi, Cd ve Cu'nun toksik miktarlarına karşı bitkinin dayanıklılığı, bu ağır metalleri bünyesinde ne derecede biriktirebildiği, toleranslı olup olmadığı, bitkilerin stres durumlarında hangi mekanizmalarla ağır metallerle karşı cevap verdiği, biyokimyasal yönden hangi antioksidan enzimlerin işlev gördüğü, fitokelatin varlığı ve fitoremediasyon çalışmaları için uygunluğunu araştırmaktır (Buist ve diğ., 2000).

Avustralya orijinli ve Kıbrıs'ın sıcak ve kurak iklim şartlarına uyum sağlamış dayanıklı bir tür olarak gözlemlenen bu bitkinin, ağır metal stresine karşı geliştireceği cevaplar, kaçınma, tolerans gibi mekanizmalarının incelenerek, yine aynı bölgedeki Cu metali atığı çevresinde yetiştirilmesinin fitoremediasyon açısından bir önemi olup olmayacağı değerlendirilecektir.

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1 BİTKİ MATERYALİ

Deney materyali olarak tercih edilen *Brachychiton populneus* bitkisi ile ilgili bilgiler:

Alem: Plantae - Bitkiler

Bölüm: Magnoliophyta - Kapalı tohumlular

Sınıf: Magnoliopsida - İki çenekliler

Takım: Malvales

Familiya: Sterculiaceae – Kakaogiller

Cins: *Brachychiton* Schott & Endl.

Tür: *Brachychiton populneus* (Schott et Endl.) R. Br.

*Sterculiaceae* (Kakaogiller),

Tropik ağaçları bulunduran, sistematikdeki yeri tartışmalı bir familyadır. 1500 türü ve 70 cinsi bilinmektedir. Bu familyadaki bitkiler ağaç, çalı, ve otsu formlarda olabilirler. Bitkilerin yaprakları çoğunlukla almaşık, çiçekleri salkım ya da talkım (ana sapın bir çiçekle sonuçlandığı, büyümeyi yan sapların sürdürdüğü bir tür uzama biçimi) halinde topludur. Çiçeklerde çanaklar bitişik çanak yapraklı ve az ya da çok derin dilimlidir; taç yaprağın beşi de ayrıdır ya da erkek organlar borusunun dibine yapışmıştır; erkek organlar çok sayıdadır; meyve genellikle 5 bölmeli ve çok çekirdeklidir. Kakao (*Theobroma cacao*), kola (*Cola nitida*) vb. gibi ekonomik değeri yüksek türler bu familyada yer alır (Anonim 2, 2010).

*Brachychiton populneus* (Schott et Endl.) R. Br.

Kurrajong veya şişe ağacı adıyla da bilinen *Brachychiton populneus* (Schott et Endl.) R. Br bitkisi Avustralya kökenlidir. Kurak durumlara toleranslı olan, çok çabuk çoğalabilen bir bitkidir. Victoria'nın kuzey doğusundan Townsville'ye kadar doğal yayılıma sahiptir. Herdem yeşil yapraklara sahiptir. Kıyı kesimden yarı kurak olan iç kesimlere doğru yayılım gösterir. Bazık, asidik ve nötr toprakları tercih eder. Gölge alanlarda büyüyemez kuru veya nemli alana ihtiyaç duyar. Bitki büyümesi yavaştır. Bitki tohumdan ya da vejetatif olarak çoğalır. Sıcak ve kurak iklimlerde canlı kalmak için gövdeleri kaktüs gibi su biriktirir (Buist ve diğ., 2000).

*Brachychiton populneus'un* olgun yaprakları ise daha çok kavak ağaçlarının yapraklarına benzer ve yan lobları indirgenmiş durumdadır. Çiçekleri çan şeklinde kırmızı, beyazımsı ve pembe renklidir. Tohumları odunsu bir yapının içindedir, yüz ve göz tahrişine neden olan ince tüylere sahiptir. Meyveleri ise tekne şeklinde 1-7 cm uzunluğundadır. Çekici loblu parlak yeşil yaprakları ve tuberli kökleriyle kuraklığa toleranslı olan bu bitkiler göze hitap eder. Kökleri drenajın iyi olmadığı durumlarda çok çabuk zarar görür (Buist ve diğ., 2000).

Kurrajong'un birçok kullanım alanı vardır. Tohumlar Aborijin halkı tarafından kavrulur sonra yenir. Yaprakları da kurak zamanlarda hayvanlar için yem olarak kullanılır. Avustralya ve denizaşırı ülkelerde sokaklarda yaygın olarak kullanılır. Tohumları ise ekmek ve kahve yapımında kullanılır. Yapraklar hem besleyici hemde tercih edilen bir hayvan yemidir. Ancak meyvelerin yenmesi hastalığa sebep olabilir. Havuç şeklindeki ana kökler besleyici tatlı bir sebze olarak yenilebilir. Derin köklenen ağaçlar tarıma bir zarar vermez, hatta çiçekleri nedeniyle bal üretimine destek olduğu bildirilmiştir. Ağaç gövdesinden alınan lifler sicim ve file yapımında kullanılır. Ayrıca bu ağaç güneybatı Avustralya, Güney Afrika, Louisiana, California, Arizona ve Güney İspanya da bir süs ağacı olarak kullanılır. Tohumu kolay çimlendirmek için 12 saat sıcak suda bekletildiği bildirilmiştir (Anonim 3, 2010).

Daha önce de belirtildiği gibi, doğal olarak güney Avustralya'da yetişen bitkinin genç fidelerinin tuber şeklindeki köklerinde önemli miktarlarda nişasta ve su depolanır. Bu özellik, bitkilerin sıcak ve kurak dönemleri kolayca atlatabilmesini sağlar (Buist ve diğ., 2000).

Deneyde kullanılan *Brachchiton populneus* tohumları tipik Akdeniz iklimine sahip olan Kıbrıs'ın Lefkoşa bölgesinden toplandı (35°10' Kuzey, 33°21' Doğu; Bayçu G, ve diğ., 2008).

### 3.2. BİTKİNİN ÇİMLENME VE YETİŞTİRİLME KOŞULLARI

Tohumlar %10 'luk Sodyum hipoklorid (NaOCl) çözeltisinde 30 dakika tutuldu. Sterilizasyon sonrası tohumlar distile su ile yıkandı. Testanın aşırı sert ve kalın olması nedeniyle %95'lik konsantre (derişik) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck) çözeltisinde yaklaşık 40 dakika tutuldu ve bol distile su ile yıkanarak nemli filtre kağıtlarının bulunduğu petrilerde karanlıkta ve 27 °C'de çimlenmeye bırakıldı.

Tohumlar gün aşırı filtre kağıdı nemli tutulmak kaydıyla kontrol edildi.

Radikula ve kotiledon oluşumu görüldükten sonra 40 adet çimlenen tohum %50 perlit-%50 yıkanmış kum karışımının bulunduğu 200 x 800 x 160 = 17 lt ebatlarındaki 2 adet balkon tipi uzun saksıya nakledildi ve 2 hafta boyunca her bir saksı 250'şer ml distile su ile sulandı.

Daha sonra, fideler gün aşırı olmak üzere 2 hafta süresince %50 sulandırılmış 250 ml Ingestad besi çözeltisiyle, deneyin yürütüldüğü ve hasada kadarki zaman olan 26 hafta boyunca ise tam Ingestad (250 ml) ile sulandı (Tablo III.1).

Makro ve mikro element tuzları	Stok çözeltideki miktar (g/l)	Besi çözeltisindeki stok çözelti miktarı (ml/l)
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	32.930	2.00
$\text{K}_2\text{SO}_4$	29.070	2.00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30.420	4.00
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	11.000	4.00
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	56.000	5.00
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1.443	1.00
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.018	1.00
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.018	1.00
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.08	1.00
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1.440	1.00
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	7.000	
+	+ —————	1.00
Titriplex III EDTA	9.300	

Tablo 3.1: Ingestad besi çözeltisi (değiştirilmiş, Bayçu G 2002)

Bitkilerin bulunduğu iklim odası şartları:

Işık şiddeti: Her biri TLD 18W/54 şiddetinde 16 sarı + 10 beyaz lamba (Philips preheat daylight)

Sıcaklık:  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$

Işık periyodu: 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık

Nem: %50

Fideler 7 ay boyunca bu koşullarda yetiştirildi ve daha sonra 4'er adet bitki köpüklere yerleştirilerek tam Ingestad besi çözeltisi içeren 10 lt'lik koyu renk kovalarda su kültürüne alındı. Kültürdeki oksijen içeriği akvaryum hava motoru ile sağlandı.

Ancak su kültürü uygulaması bu bitkide başarılı olamadığından her saksıda tek bitki olacak şekilde %50 kum + %50 perlit içeren (19x17= 3.5 lt) saksılara alındı ve 2 hafta süresince günde 100 ml Ingestad besi çözeltisiyle yetiştirildi.

2 haftanın sonunda bitkilerden bir kısmı kontrol olarak ayrıldı, Ağır metal uygulanacak bitkiler ise belirlenerek etiketlendi.

Farklı konsantrasyonlarda Cd ve Cu çözeltileri hazırlandı ve 2 hafta süresince uygulandı.

### **Cd ve Cu çözeltilerinin hazırlanması ve uygulanması:**

Cd çözeltisi hazırlanmasında  $\text{CdSO}_4 \cdot 8/3\text{H}_2\text{O}$  (SIGMA) ve Cu çözeltisi hazırlanmasında  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (MERCK) kullanıldı. İki farklı stok çözeltisi hazırlandı ve bunlardan belli miktarlarda alınarak istenen Cd ve Cu konsantrasyonunu verecek şekilde Ingestad besi çözeltisine aktarıldı.

12 gün süresince her gün uyguladığımız konsantrasyonlar:

50  $\mu\text{M}$  Cd

150 $\mu\text{M}$  Cd

500  $\mu\text{M}$  Cu

1500 $\mu\text{M}$  Cu

Gelişen fidelerde her gün düzenli olarak morfolojik gözlemler yapıldı ve bitkilerde meydana gelen değişiklikler izlendi. Ağır metal uygulaması boyunca ve hasat günü bitkilerin fotoğrafı çekildi.

Kum+perlit kültüründen dikkatlice çıkarılan bitkilerin yaprak ve gövdelerinin taze ağırlıkları alındı. Kökler distile su ile yıkanıp filtre kağıdı ile kurutuldu ve taze ağırlıkları ölçüldü. Tüm bitki materyali ayrı ayrı etiketlenerek kilitli plastik torbalara konuldu ve -20°C'de dondurucuda (Bosch) analiz aşamasına kadar muhafaza edildi.

### **3.3. BRACHYCHITON POPULNEUS BİTKİSİNİN YAPRAKLARINDA KLOROFİL TAYİNİ**

Klorofil tayini Arnon D. (1949) tarafından saptanan metodla yapıldı.

Kontrol ve farklı Cd ve Cu konsantrasyonlarında yetiştirilen *B. populneus*'un taze yapraklarından 500 mg tartıldı. Soğuk porselen havanda 6 ml'lik %80 aseton (Merck) ile ekstre edildi. Elde edilen ekstre santrifüj tüpüne konularak 5°C ve 3500 rpm'de 25 dakika homojenize edildi (Heraeus Labofuge 400R). Elde edilen süpernatantların hacimleri ölçüldü ve 645 ve 663 nm dalga boyundaki spektrofotometrede (Shimadzu UV – Visible Spectrophotometer UV - 1601) klorofil ölçümlerine hazırlandı. Sonuçlar aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\text{Total Klorofil} = 20.2 \times D_{645} + 8.02 \times D_{663}$$

### **3.4. ANTIOKSİDAN ENZİM GLUTATİON REDÜKTAZ (GR; EC 1.8.1.7), KATALAZ (CAT; EC 1.11.1.6), GUAİAKOL PEROKSİDAZ (GPOX; EC 1.11.1.7) VE TOTAL PROTEİNLER İÇİN HOMOJENAT HAZIRLANMASI:**

450 mg donmuş bitki materyali (kök ve yaprak) 0,1M K-Na buffer (pH:7) ve 0,05M EDTA(Merck) ve distile su içeren 8 ml'lik ekstraksiyon tampon ve ekstre edilirken enzimler sıcaklıktan denatüre olmasın diye sıvı azot kullanılarak porselen havanlarda homojenize edildi.

Daha sonra homojenatlar 20 ml'lik tüplere konup 4500 rpm'de 3<sup>0</sup>C'de 20 dakika santrifüj (Heraeus Labofuge 400R) yapıldı. Son olarak Eppendorf tüplere aktarılarak 10.000 rpm'de 2<sup>0</sup>C de 10 dakika santrifüj (Eppendorf centrifuge 5417R) edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar dondurucuda saklandı.

### **3.4.1. Glutatyon Redüktaz (GR)**

Bitkide ki GR aktivitesi Smith ve diğ.,'nin 1988 yılında saptadığı yöntem deneye uyarlanarak ölçüldü.

Bitkide GR aktivitesini ölçmek için GR solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyon 20 mM GSSG (Merck), 1mM DTNB (Merck), 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O ve son olarak eklenen 2 µM NADPH (Merck) içeren Gr solüsyonu hazırlandı. Hazırladığımız solüsyon 40 ml'lik olduğu için 5±6 mg NADPH kullandık.

Daha sonra spektrofotometrede (UV 1601 Shimadzu ) ön kuvete 25µl bitki ekstresi + 1ml tampon, arka kuvete ise 25µl bitki ekstresi + 1 ml H<sub>2</sub>O koyup 412 nm'de her 30 saniyede bir ölçüm yapıldı.

### **3.4.2. Katalaz (CAT)**

Katalaz aktivitesini ölçmek için Aebi H.'nin 1984 yılında saptadığı metod kullanıldı. Katalazda 100 mM lık fosfat tampounu (pH 5,5±6,0) ve 3ml'lik kuvetler kullanıldı. Spektrofotometrenin (UV 1601 Shimadzu ) ön kuvetine 3 ml buffer + 25µl bitki ekstresi, arka kuvete ise 3 ml distile su + 25µl bitki ekstresi eklenip sıfırlandı. Daha sonra her iki kuvete 15 µl lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koyulup iyice karışmasını sağladıktan sonra 240 nm'de her 30 saniyede bir ölçüm yapıldı.

### 3.4.3. Guaiakol peroksidaz (GPOX)

GPOX'da 100mM fosfat tamponu (pH 5.5±6.0) ve 3 ml kuvetler kullanıldı. Spektrofotometrenin (UV 1601 Shimadzu ) arka kuvetine 2,975 ml fosfat buffer + 25µl bitki ekstresi; ön kuvetine 2,800 ml fosfat buffer + 25µl bitki ekstresi koyup 450 nm'de sıfırlanıp daha sonra ön kuvete 170µl %0,5 guaiakol (Merck) ve 5µl %87,5 'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenip her 60 saniyede bir 450 nm'de ölçüm yapıldı (Brecka ve diğ.,1973).

## 3.5. PROLİN (PRO) MİKTARINI ÖLÇMEK İÇİN EKSTRE HAZIRLANMASI:

### 3.5.1. Ninhydrin reagent hazırlanması:

- 1) 0,75 gr Ninhydrin (Merck)
- 2) 18 ml CH<sub>3</sub>COOH (Sigma)
- 3) 7,2 ml H<sub>2</sub>O
- 4) 4,8 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(85%,1,71 g/ml) (Merck)

Bitki materyalinin ekstresi için %66'lık C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, 0,12M HCl ve distile su içeren 500 ml'lik prolin solüsyonu hazırlandı.

Donmuş bitki materyali yaklaşık 300 mg tartılarak 6 ml prolin tampon çözeltisi ile sıvı azot kullanılarak ekstre edildi. Ekstreler 4500 rpm ve 15<sup>0</sup>C'de 15 dakika süreyle santrifüj yapıldı (Heraeus Labofuge 400R). Elde edilen süpernatantlar heri biri 0,5 ml ve 3 paralel olmak üzere kapaklı cam tüplere (Kjeldahl) aktarıldı. Ayrılan tüplere 0,5 ml asetik asit ve 0,5 ml Ninhydrin reagent eklenerek 1 saat süre ile 100<sup>0</sup>C'de kaynatıldı.

Kaynama işleminden sonra tüplere son olarak 300 ml'lik ksilen (Merck) ekleyip 520 nm absorbansta spektrofotometre (UV 1601 Shimadzu) ile ölçüm yapıldı (Bates ve diğ., 1973).

### 3.6. PROTEİN MİKTARININ BELİRLENMESİ

Yapraklardaki protein miktarı Bradford (1976) yöntemine göre belirlenmiştir. Bu yöntemde kullanılan boya (Coomassie brilliant blue G-250) negatif yüklüdür ve protein üzerindeki pozitif yüklere bağlanır. Bu boyanın kırmızı ( $A_{\max}=465$  nm) ve mavi ( $A_{\max}=595$  nm) formları mevcuttur. Boya ile proteinin bağlanması kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar.

Bu yöntem çok geniş bir kullanım alanına sahiptir. Reaksiyon çok defa tekrarlanabilir ve hızlı bir şekilde cereyan eder. Meydana gelen renk, stabilitesini bir saat kadar koruyabilir.

Protein miktarının belirlenmesi için enzim aktivitelerin ölçümü için hazırlanan süpernatantlar kullanıldı. Süpernatantlardan 1.5 ml ekstrapat 10.000 rpm 3 °C 5 dakika santrifüj yapıldı. Ölçüm için köklerden 0,5 ml, yaprak için 0,25 ml + 0,25 ml H<sub>2</sub>O süpernatant kullanıldı. Süpernatantlar %10'luk TCA (Merck) de çözöldü. Daha sonra tekrar 14,000 rpm de 15°C 10 dakika santrifüj yapıldı. Ve dibe çöken pellet kısmına 1 ml' lik Bradford ekleyerek (yaprak da 3 ml'lik Bradford ekledik) tekrardan 14,000 rpm de 15°C de 5 dakika santrifüj yapıldı ve 595 nm'de 3 ml'lik kuvvetlerde ölçüm yapıldı.

### 3.7. ATOMİK ABSORPSİYON SPEKTROFOTOMETRESİ (AAS) İLE AĞIR METAL ÖLÇÜMLERİ

Bitki örnekleri 85-90°C'de 7 gün de kurutulduktan ve agat havanda öğütöldükten sonra kapalı çözönrleştirme sisteminde (mikrodalga fırın) HNO<sub>3</sub>: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1: 1) asit karışımı ile 180°C de çözönrleştirildi (Loring ve Rantala, 1992). Daha sonra 1 M HCl ile seyreltilerek çözeltiye alınmış ve SHIMADZU 6701F Atomik Absorbsiyon Spektrometresinde (AAS), Cu ve Cd elementleri hava-asetilen aleviyle analiz edildi (İÜ Deniz Bilimleri ve İşletmeciliği Enstitüsü, Kimyasal Oşinografi Laboratuvarı).

Bitkilerin ölçüm yapıldığı dalga boyları:

Cd: 228,8 nm dalga boyu

Cu: 324,7 nm dalga boyu

### 3.7.1. AAS ve Çalışma Şekli

Atomik absorpsiyon spektrofotometre cihazında atomların kendine özgü ışığın absorplaması prensibine dayanır. Bir numunenin gaz halindeki atomlara veya temel iyonlara dönüştürülmesine atomlaşma denir. Temel halde bulunan atomlar dışarıdan uyarılarak yüksek enerji seviyesine geçerler. Bu halde uzun süre kalmayan atomlar tekrar temel düzeye dönerken kendine özgü dalga boylarında ışımaya yaparlar. Atomik absorpsiyon cihazlarında kullanılan lambalar her element için oyuk katot lamba kullanılır. Örneklerin atomlaşmasını sağlamak için gerekli sistemler alevli ve alevsiz olmak üzere ikiye ayrılır. Alevli sistemlerde örnek sisteme verildikten sonra hava ve yakıtla karışarak aerosol halinde alevle gönderilerek örnek atomlaştırılır. Daha sonra oyuk katot lambanın gelen ışığında absorplanarak ölçüm yapılır (İÜ Deniz Bilimleri ve İşletmeciliği Enstitüsü, Kimyasal Oşinografi Laboratuvarı).

## 4. BULGULAR

### 4.1. *BRACHYCHITON POPULNEUS* BİTKİSİNİN GELİŞİMİ SÜRESİNDE MEYDANA GELEN MORFOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER

7 ay boyunca Ingestad çözeltilisi verilerek kum kültürlerinde ve iklim odası şartlarında yetiştirilen 40 adet *Brachychiton populneus* fidesi bu süre sonunda morfolojik anlamda gayet iyi bir gelişim gösterdi.



Şekil 4.1: %50 kum+%50 perlit karışımında yetiştirilen 5 aylık *Brachychiton* fideleri

7. ayın bitiminde ağır metal uygulaması için su kültürüne alınan bitkilerde suya bağlı olarak ani stres meydana geldi. Bu süre zarfında yaprakların ana damar çevresinde ve kenarlarında yaygın kloroz ve petiyole yakın bölgelerde noktasal olarak nekroz başlangıçları saptanmıştır.



Şekil 4.2: 4 günlük su kültürü uygulamasının ardından bitki yapraklarında meydana gelen morfolojik değişiklikler

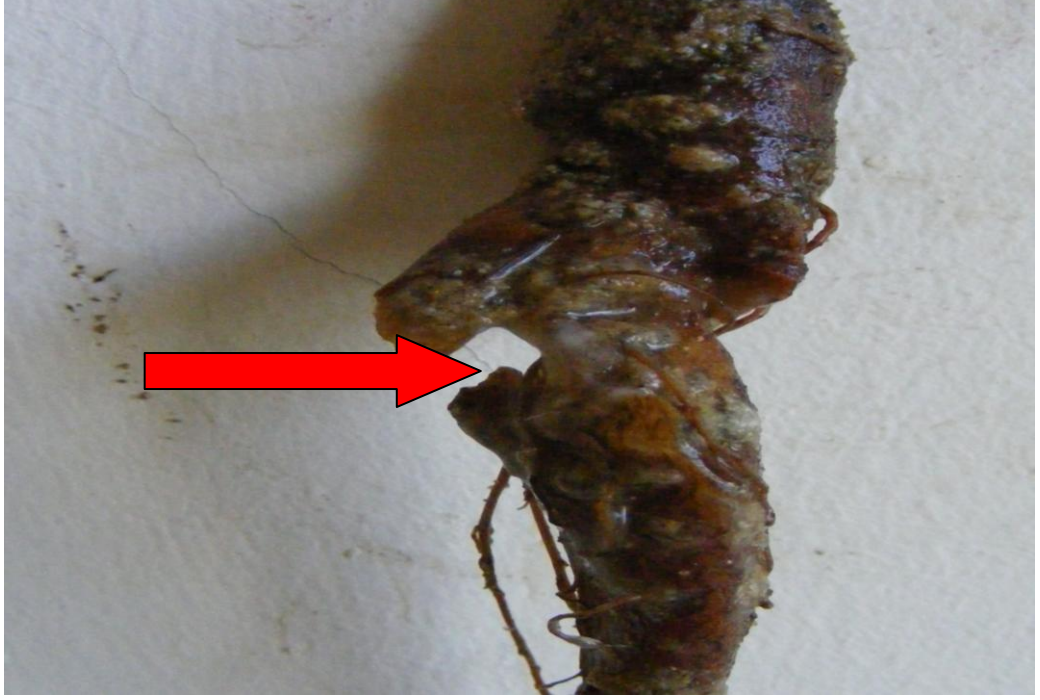
Kökler 2. günden itibaren bozulmaya, yumuşamaya ve köpüklenmeye başlamış, özellikle yumrulu kısımlarından müsilaajlı bir madde olduğu tahmin edilen yapının kök dışına çıktığı ve kökün içinin boşaldığı gözlenmiştir. 4 günlük su kültürü sonunda bitkilerin % 40'lık bir kısmı ölmüştür.



Şekil 4.3: Su kültüründeki 1. gün ve kökler



Şekil 4.4: Su kültüründeki 2.gün ve kökler



Şekil 4.5: Su kültüründeki 4.gün ve kökler

#### **4.2. Cd VE Cu UYGULANAN *BRACHYCHITON POPULNEUS* BİTKİSİ YAPRAKLARINDA GÖZLEMLenen MORFOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER**

12 gün süresince farklı ağır metal konsantrasyonlarına maruz bırakılan bitki yapraklarında genel olarak kloroz ve nekrozlar saptandı, ve bu durum ağır metalin türü, konsantrasyonu ve uygulama zamanına bağlı olarak değişiklik gösterdi.

#### 4.2.1. 50 $\mu$ M Cd Uygulaması:

50  $\mu$ M Cd uygulaması ile yapraklarda hafif kloroz saptanırken, köklerde morfolojik anlamda herhangi bir olumsuz etki gözlenmedi (Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10).



Şekil 4.6: 6 gün süreyle 50 $\mu$ M Cd uygulanan bitkiler



Şekil 4.7: 8 gün süreyle 50 $\mu$ M Cd uygulanan bitkiler



Şekil 4.8: 10 gün süreyle 50 $\mu$ M Cd uygulanan bitkiler



Şekil 4.9: 12 gün süreyle 50 $\mu$ M Cd uygulanan bitkiler (1)



Şekil 4.10: 12 gün süreyle 50 $\mu$ M Cd uygulanan bitkiler (2)

#### 4.2.2. 150 $\mu$ M Cd Uygulaması:

150  $\mu$ M Cd uygulaması ile yapraklarda yaygın kloroz ve bölgesel nekroz saptanırken, köklerde morfolojik anlamda herhangi bir olumsuz etki gözlenmedi (Şekil 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15).



Şekil 4.11: 6 gün süreyle 150 $\mu$ M Cd uygulanan bitkiler



Şekil 4.12: 8 gün süreyle 150  $\mu$ M Cd uygulanan bitkiler



Şekil 4.13: 10 gün süreyle 150  $\mu$ M Cd uygulanan bitkiler



Şekil 4.14: 12 gün süreyle 150  $\mu$ M Cd uygulanan bitkiler (1)



Şekil 4.15: 12 gün süreyle 150 $\mu$ M Cd uygulanan bitkiler (2)

#### 4.2.3. 500 $\mu$ M Cu Uygulaması:

500  $\mu$ M Cu uygulaması ile yapraklarda nokta halinde kloroz saptanırken, köklerde morfolojik anlamda herhangi bir olumsuz etki gözlenmedi (Şekil 4.16, 4.17, 4.18, 4.19, 4.20).



Şekil 4.16: 6 gün süreyle 500  $\mu$ M Cu uygulanan bitkiler



Şekil 4.17: 8 gün süreyle 500  $\mu$ M Cu uygulanan bitkiler



Şekil 4.18: 10 gün süreyle 500  $\mu$ M Cu uygulanan bitkiler



Şekil 4.19: 12 gün süreyle 500  $\mu$ M Cu uygulanan bitkiler (1)



Şekil 4.20: 12 gün süreyle 500  $\mu$ M Cu uygulanan bitkiler (2)

#### 4.2.4. 1500 $\mu$ M Cu Uygulaması:

1500  $\mu$ M Cu uygulamasında yapraklarda hafif kloroz saptanırken, köklerde morfolojik anlamda herhangi bir olumsuz etki gözlenmedi (Şekil 4.21, 4.22, 4.23, 4.24).



Şekil 4.21: 6 gün süreyle 1500  $\mu$ M Cu uygulanan bitkiler



Şekil 4.22: 8 gün süreyle 1500 µM Cu uygulanan bitkiler



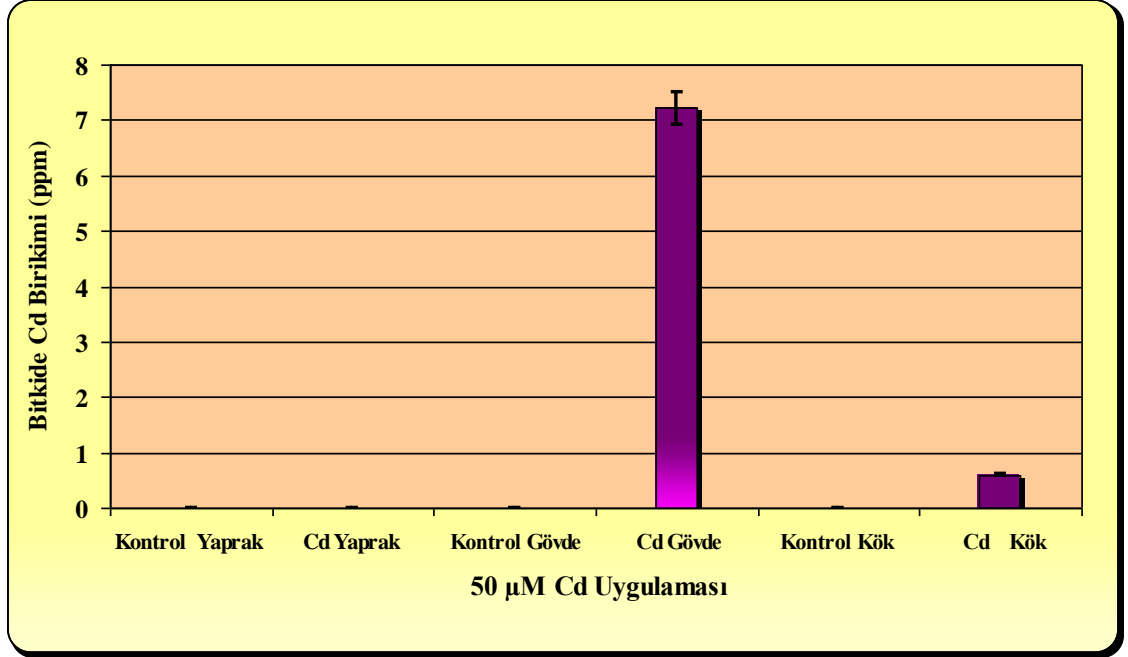
Şekil 4.23: 10 gün süreyle 1500 µM Cu uygulanan bitkiler



Şekil 4.24: 12 gün süreyle 1500  $\mu\text{M}$  Cu uygulanan bitkiler

### 4.3. BİTKİ VEJETATİF ORGANLARINDA CD VE CU BİRİKİMLERİ ( $\mu\text{g/gKA}$ )

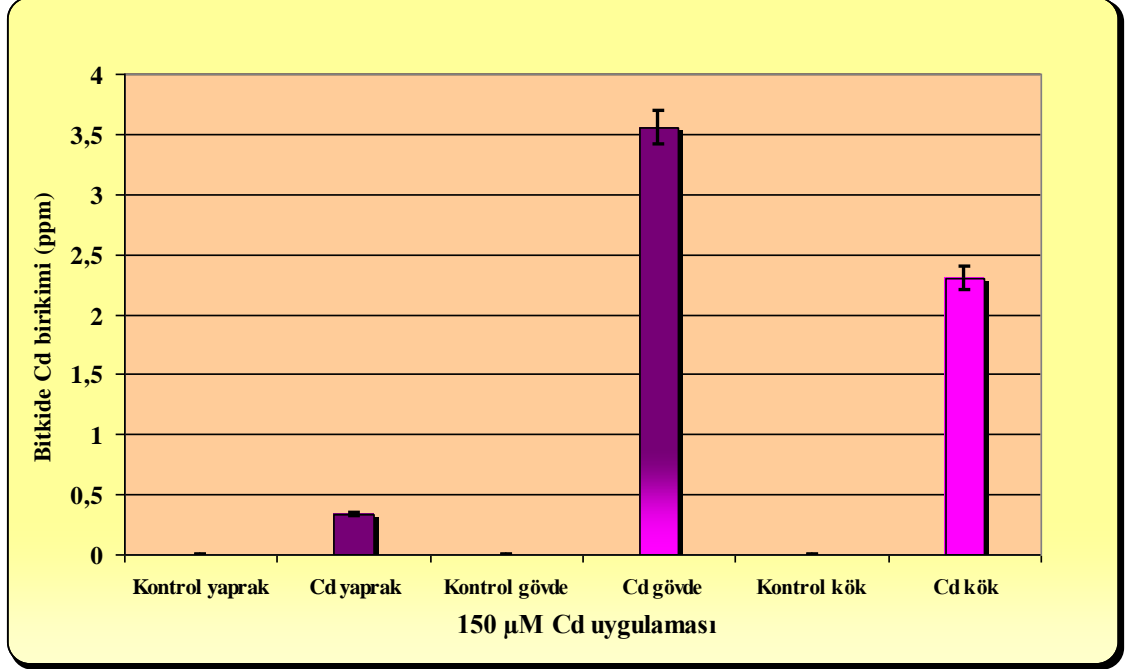
#### 4.3.1. 50 $\mu\text{M}$ Cd Uygulaması:



Şekil 4.25: 50  $\mu\text{M}$  Cd uygulanan bitkinin vejetatif organlarında Cd birikimi ( $\mu\text{g/gKA}$ )

Şekil 4.25’de 12 günlük 50  $\mu\text{M}$  Cd uygulamasının ardından bitkinin yapraklarında herhangi bir Cd birikimine rastlanmadı. Köklerdeki konsantrasyon ise 0,6 ppm seviyelerinde belirlenirken gövdede ise 7,2 ppm Cd birikimi gözlemlendi. Buna göre 50  $\mu\text{M}$  Cd uygulanan bitkinin gövdesinde önemli miktarda Cd birikimi olduğu saptandı

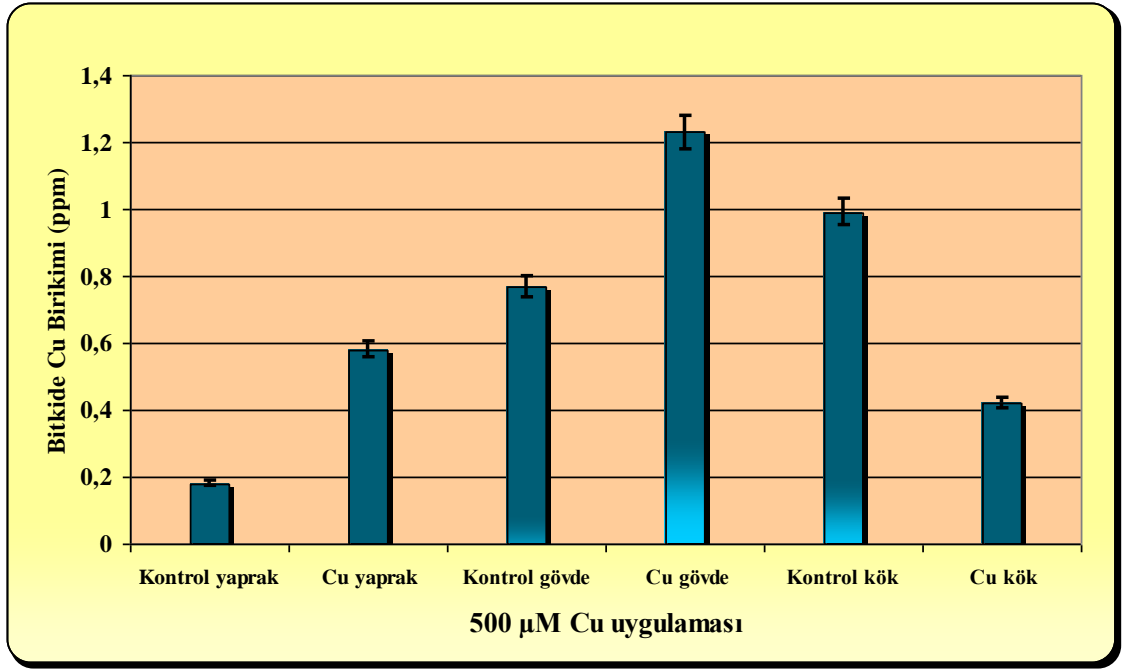
#### 4.3.2. 150 $\mu$ M Cd Uygulaması:



Şekil 4.26: 150  $\mu$ M Cd uygulanan bitkinin vejetatif organlarında Cd birikimi ( $\mu$ g/gKA)

Şekil 4.26'da 12 günlük 150  $\mu$ M Cd uygulaması sonrası bitkinin yapraklarında 0,34 ppm köklerinde 2,3ppm ve gövdede ise 3,55 ppm kadar bir birikime rastlanıldı. Kökte ve özellikle gövdede fazla miktarda Cd birikimi saptandı

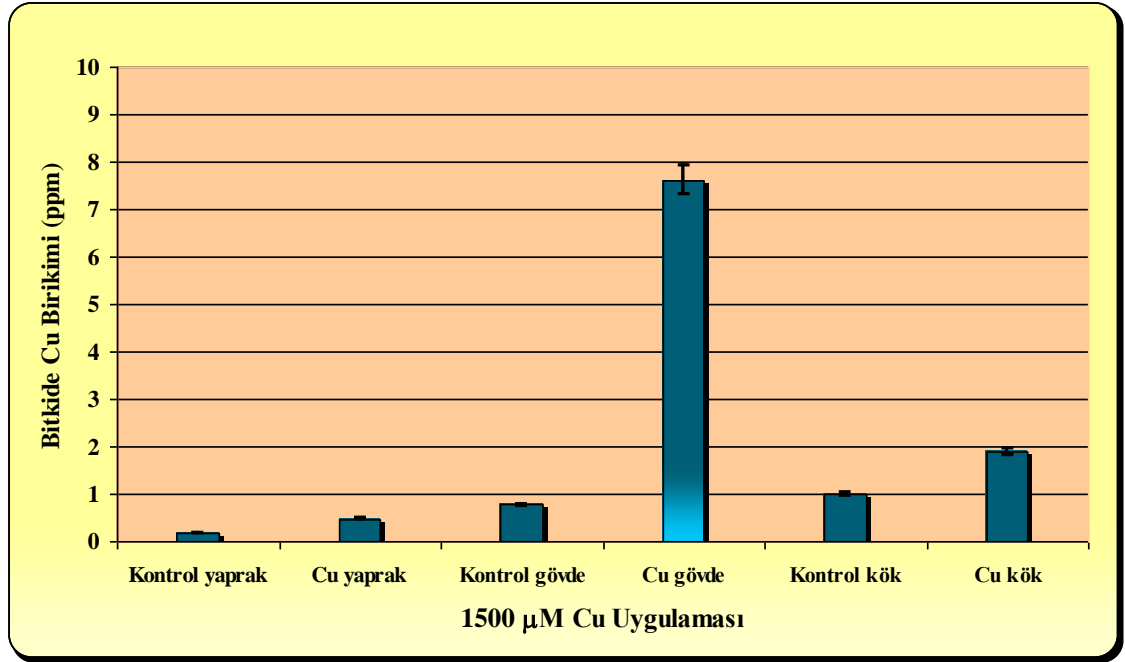
### 4.3.3. 500 $\mu\text{M}$ Cu Uygulaması:



Şekil 4.27: 500  $\mu\text{M}$  Cu uygulanan bitkinin vejetatif organlarında Cu birikimi ( $\mu\text{g/gKA}$ )

Şekil 4.27’de 12 günlük 500  $\mu\text{M}$  Cu uygulaması ardından bitkinin yapraklarında 0,58 ppm köklerinde 0,42 ppm ve gövdesinde 1,23ppm kadar bir birikime rastlanıldı. Ağır metal uygulaması esnasında bitkinin besin eksikliğini gidermek için bitkiye verilen Ingestad’taki bakır konsantrasyonunda göz önüne alınarak bitkilere Cu konsantrasyonu uygulandı.

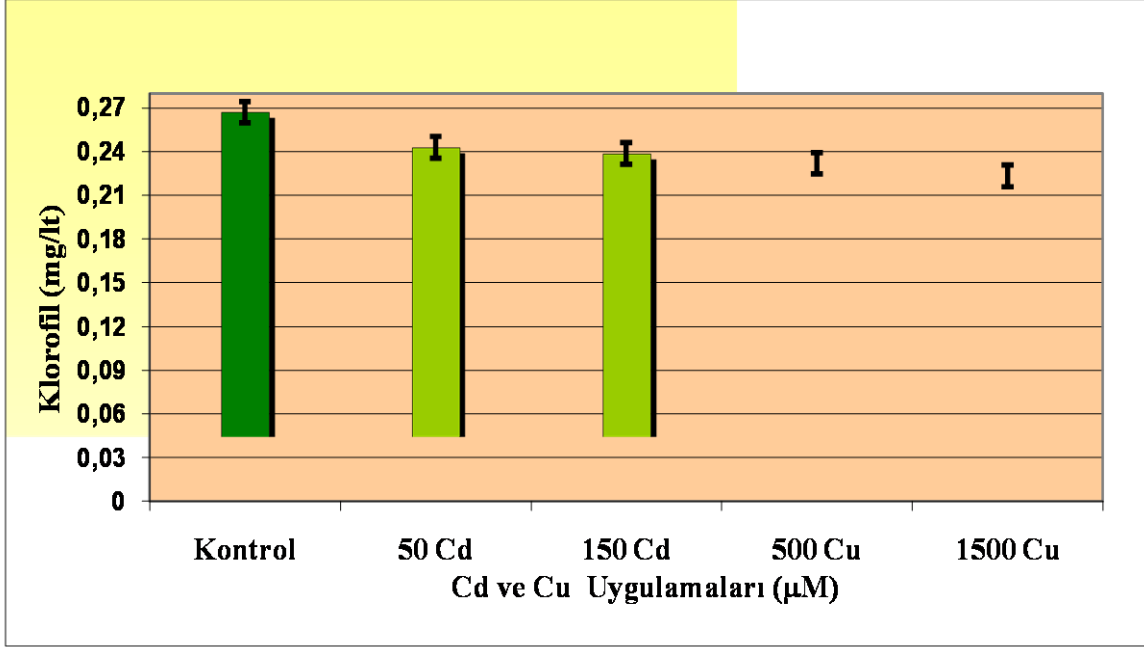
#### 4.3.4. 1500 $\mu$ M Cu Uygulaması:



Şekil 4.28: 1500  $\mu$ M Cu uygulanan bitkinin vejetatif organlarında Cu birikimi ( $\mu$ g/gKA)

Şekil 4.28’de görüldüğü gibi 12 günlük 1500  $\mu$ M Cu uygulaması ardından bitkinin yapraklarında 0,48 ppm, köklerinde 1,89 ppm ve gövdelerinde ise 7,61 ppm kadar bir birikimle karşılaşıldı. Kontrollerde Cu uygulamasının bulunması Ingestad besi çözeltilisinden kaynaklanmaktadır.

#### 4.4. Cd VE Cu UYGULANAN BİTKİNİN YAPRAKLARINDA KLOROFİL MİKTARI:

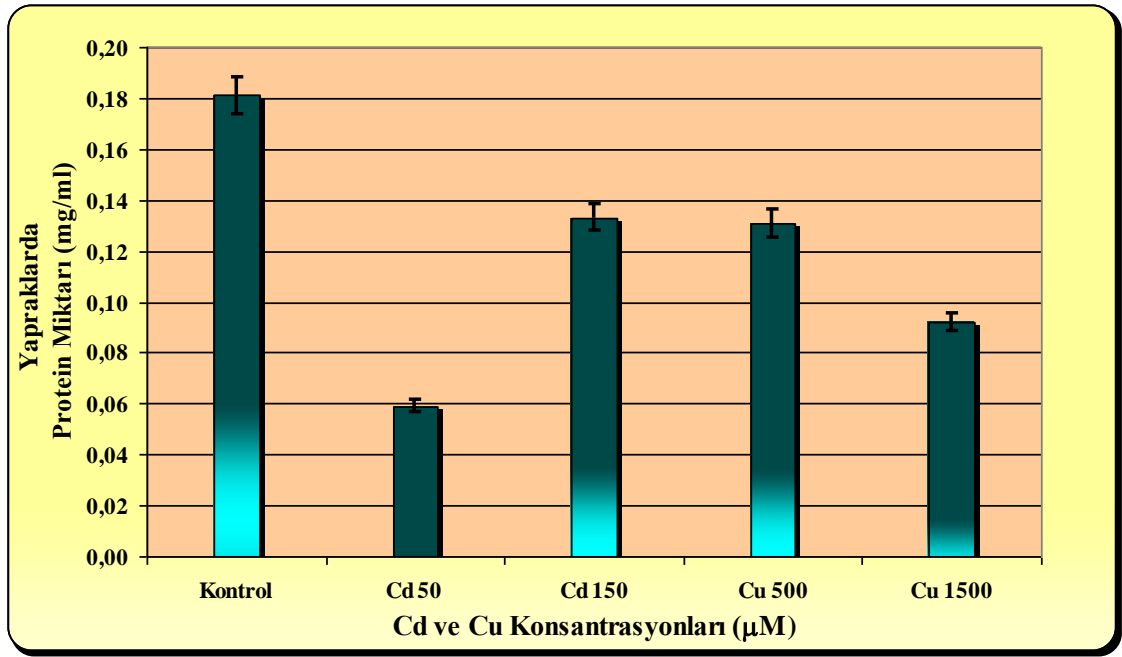


Şekil 4.29: Yapraklarda klorofil miktarları (mg/lt)

Şekil 4.29’da da görüldüğü gibi kontrole göre ağır metal uygulanan bitkilerin yapraklarındaki klorofil miktarlarında birbirine paralel bir azalma görülmektedir. Kontrol bitkisine göre klorofil miktarları 50 µM Cd ‘da 0,243 mg/lt, 150 µM Cd ‘da 0,238 mg/lt, 500 µM Cu’da 0,231 mg/lt ve 1500 µM Cu ‘da ise 0,223 mg/lt kadardır. Kontrolde bu miktar 0,276 mg/lt’dir.

#### 4.5. Cd VE Cu UYGULANAN BİTKİNİN YAPRAKLARINDA VE KÖKLERİDE PROTEİN MİKTARI:

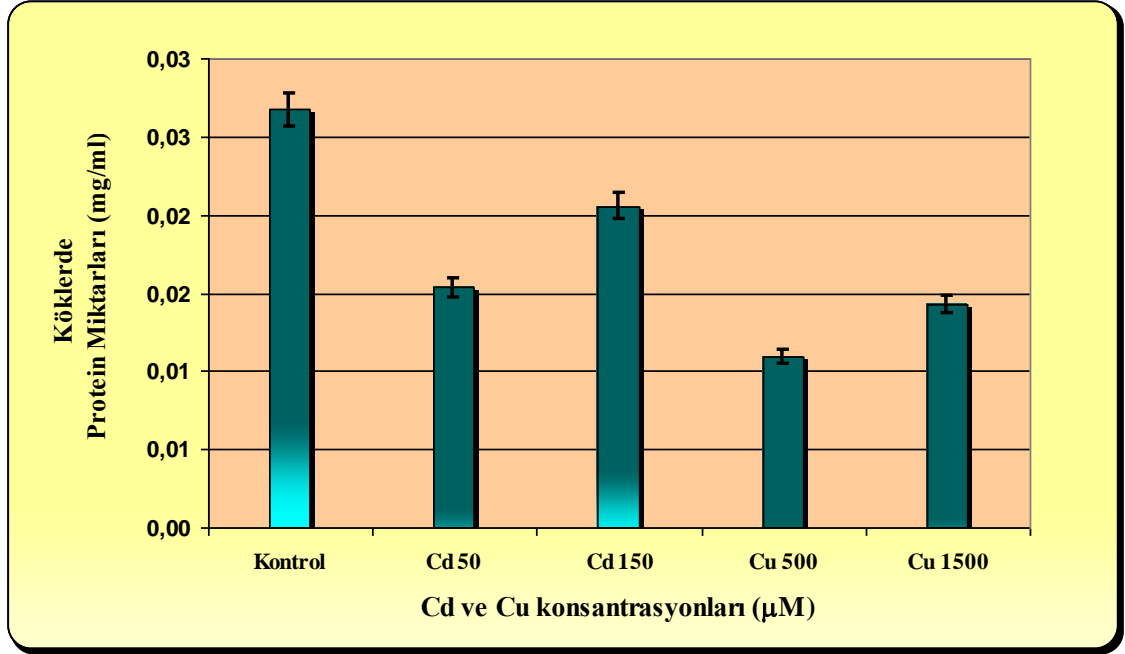
##### 4.5.1. Cd ve Cu Uygulanan bitkinin yapraklarında protein miktarı:



Şekil 4.30: Yapraklarda protein miktarları (mg/ml)

Şekil 4.30'dan da izlenebileceği gibi 150  $\mu\text{M}$  Cd, 500  $\mu\text{M}$  Cu ve 1500  $\mu\text{M}$  Cu konsantrasyonlarında bitkinin yapraklarındaki protein miktarlarında kontrole göre bir düşüş görülürken, 50  $\mu\text{M}$  Cd konsantrasyondaki bitkinin yapraklarda protein miktarları kontrole göre ciddi bir oranda azalma görülmektedir. 50  $\mu\text{M}$  Cd'da 0,059 mg/ml, 150  $\mu\text{M}$  Cd'da 0,133 mg/ml, 500 $\mu\text{M}$  Cu'da 0,131 mg/ml ve 1500 $\mu\text{M}$  Cu'da ise bu değer 0,092 mg/ml'dir. Kontrolde ise 0,181 mg/ml'dir.

#### 4.5.2. Cd ve Cu Uygulanan Bitkinin Köklerinde Protein Miktarı:



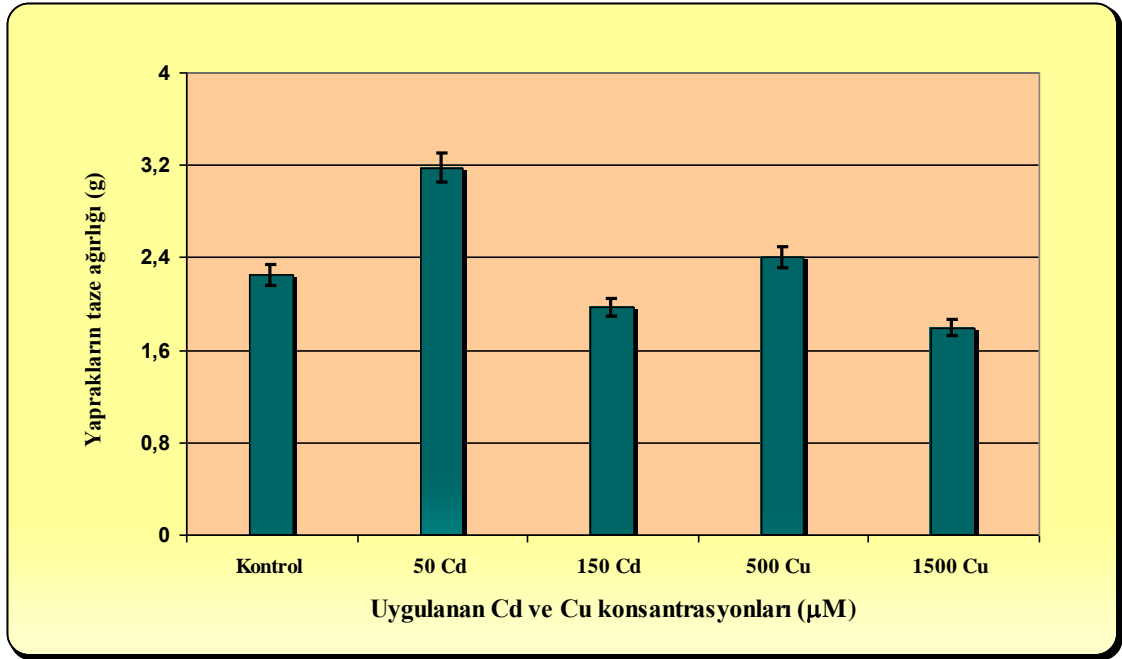
Şekil 4.31: Köklerde protein miktarları (mg/ml)

Şekil 4.31’de ise bitkinin köklerinde 50 µM Cd’da 0,015g/mlt, 150 µM Cd’da 0,021, 500µM Cu’da 0,011 ve 1500 µM Cu’da ise 0,014 mg/mlt kadar protein bulunmaktadır. Kontrol bitkilerinde ise 0,027 mg/mlt protein bulunmaktadır. anlaşıldığı gibi bitkinin köklerinde protein değerleri sıfıra yakındır.

#### 4.6. Cd ve Cu UYGULANAN BİTKİNİN VEJATATİF ORGANLARINDA TAZE VE KURU AĞIRLIK

##### 4.6.1. Cd ve Cu Uygulanan bitkinin vejetatif organlarında taze ağırlık:

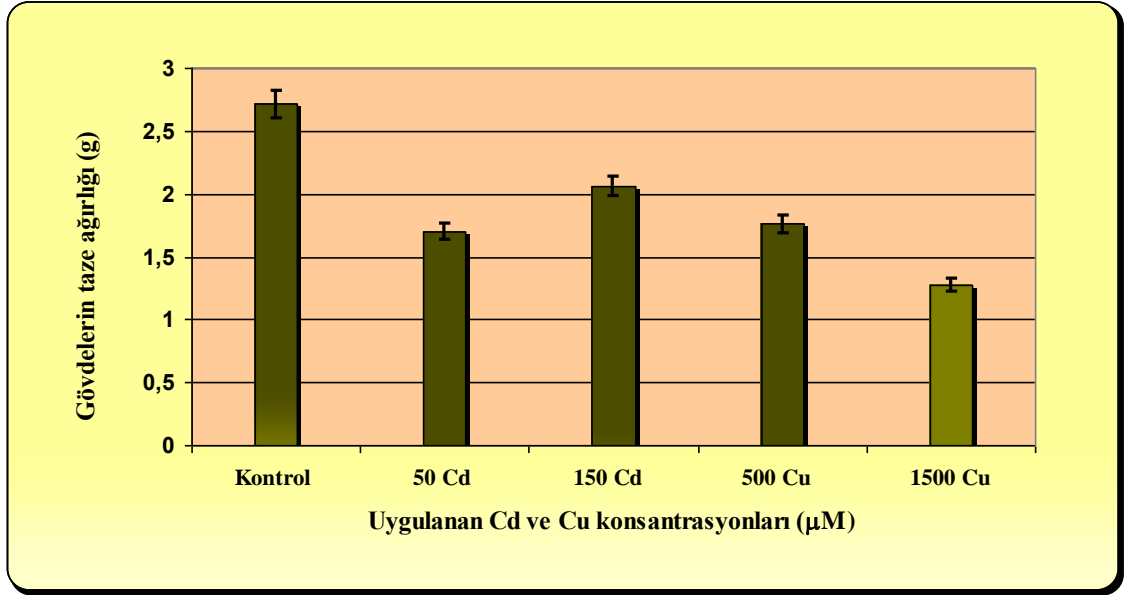
###### 4.6.1.1. Yapraklarda taze ağırlık



Şekil 4.32: Yaprakların taze ağırlığı (g)

Şekil 4.32’de izlendiği gibi ağır metal uygulanan bitkinin yapraklarında yaş ağırlık miktarı, 50 µM Cd, 500 µM Cu ve 1500 µM Cu ve kontrol bitkilerinin yaş ağırlık miktarlarından daha fazla olduğu görülmektedir. Kontrolde yaş ağırlık miktarı 2,249 gr, 50 µM Cd’da 3,175 gr, 150 µM Cd’da 1,97 gr, 500 µM Cu’da 2,4gr ve 1500 µM Cu’da ise 1,795 gr’dır.

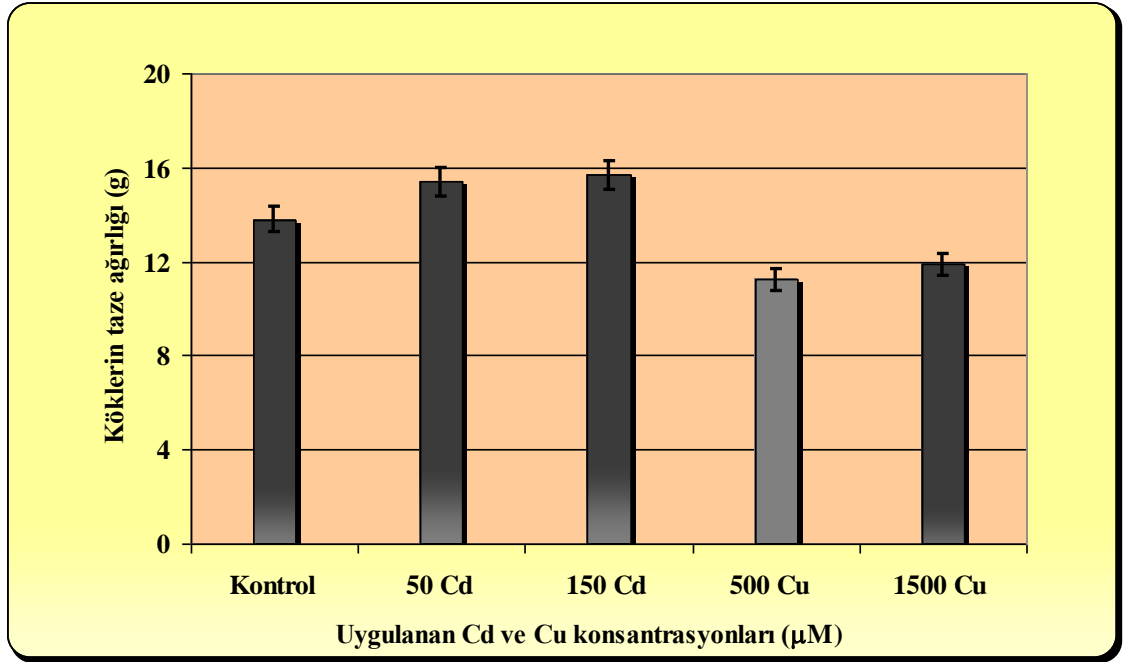
4.6.1.2. Gövdelerde taze ağırlık:



Şekil 4.33: Gövdelerin taze ağırlığı (g)

Şekil 4.33’de ise ağır metal uygulanan bitkilerin gövdelerinde ki yaş ağırlık miktarları kontrole göre alt seviyelerdedir. Kontrolde bu miktar 2,713 gr, 50 µM Cd’da 1,700 gr, 1500 µM Cd’da 2,059, 500 µM Cu’da 1,759 gr ve 1500 µM Cu’da ise 1.270 gr’dır.

#### 4.6.1.3. Köklerde taze ağırlık

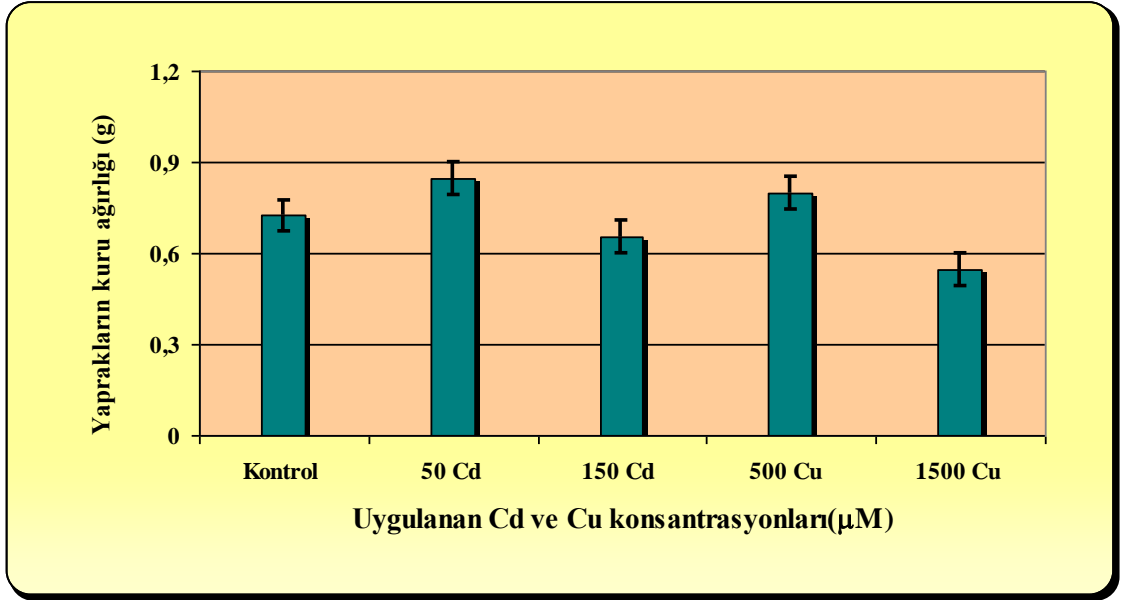


Şekil 4.34: Köklerin taze ağırlığı (g)

Şekil 4.34'de ise köklerdeki yaş ağırlık miktarları özellikle 50 µM ve 150 µM Cd bitkilerin köklerinde kontrole göre üst seviyede iken; 500 µM ve 1500 µM Cu bitkilerin köklerinde ise yaş ağırlık miktarları kontrole göre alt seviyededirler. Kontrolde bu miktar 13,784 gr, 50 µM Cd'da 15,405 gr, 150 µM Cd'da 15,671, 500µM Cu'da 11,230 ve 1500 µM Cu'da ise 11,869 gr'dır.

#### 4.6.2. Cd ve Cu Uygulanan Bitkinin Vejetatif Organlarında Kuru Ağırlık:

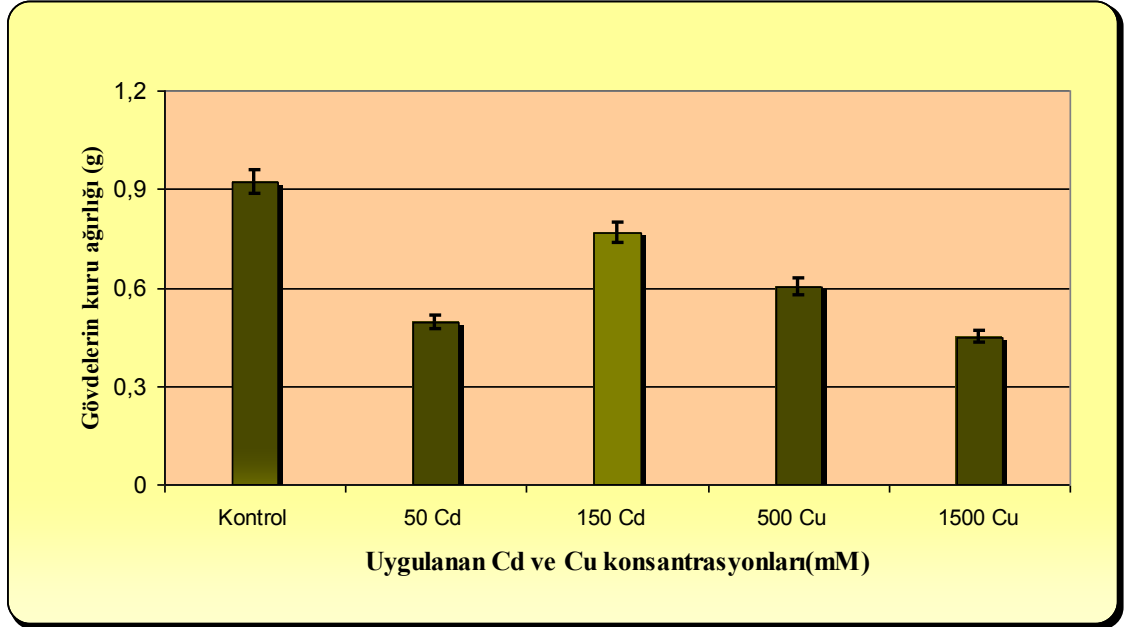
##### 4.6.2.1. Yapraklarda kuru ağırlık



Şekil 4.35: Yaprakların kuru ağırlığı (g)

Şekil 4.35’de görüldüğü gibi 50  $\mu\text{M}$  Cd ve 500  $\mu\text{M}$  Cu bitkilerin yapraklarında kuru ağırlık miktarları kontrole göre üst seviyede iken; 150  $\mu\text{M}$  Cd ve 1500  $\mu\text{M}$  Cu bitkilerin yapraklarında alt seviyedirler. Kontrolde bu miktar 0,723 gr, 50  $\mu\text{M}$  Cd 0,844gr, 150  $\mu\text{M}$  Cd 0,652 gr, 500  $\mu\text{M}$  Cu 0,797 gr ve 1500  $\mu\text{M}$  Cu’da ise 0,546 gr’dır.

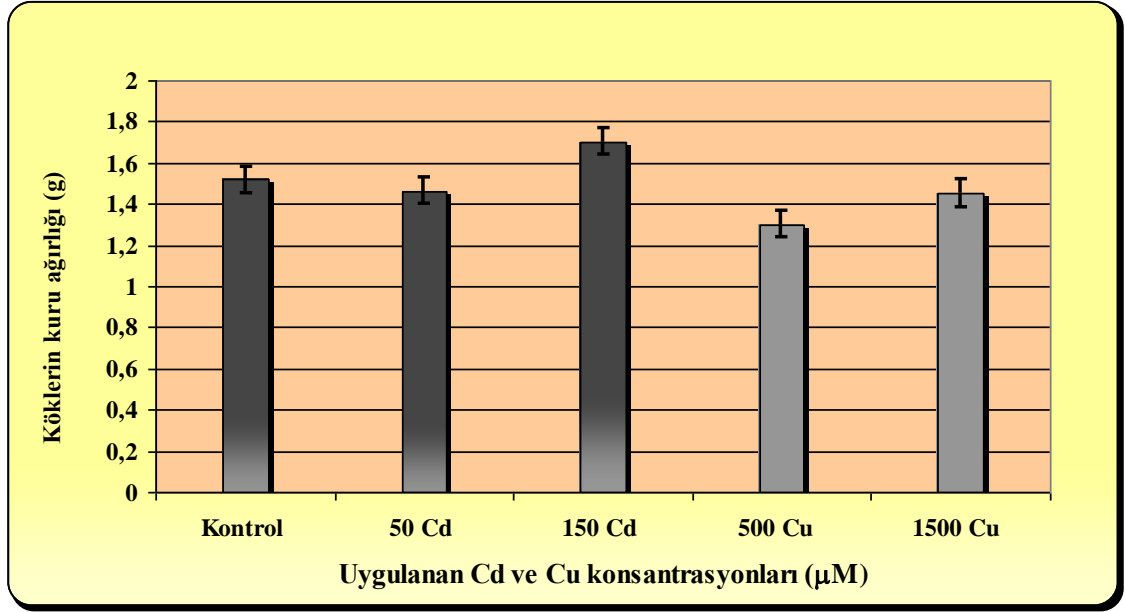
#### 4.6.2.2. Gövdede kuru ağırlık



**Şekil 4.36:** Gövdelerin kuru ağırlığı (g)

Şekil 4.36’da görüldüğü gibi ağır metal uygulanan bitkilerin gövdelerindeki kuru ağırlık miktarları kontrole göre alt seviyededirler. Kontrolde bu miktar 0,920 gr, 50  $\mu\text{M}$  Cd 0,493 gr, 150  $\mu\text{M}$  Cd 0,768 gr, 500  $\mu\text{M}$  Cu 0,603 gr ve 1500  $\mu\text{M}$  Cu ise 0,449 gr’dır.

#### 4.6.2.3. Köklerde kuru ağırlık

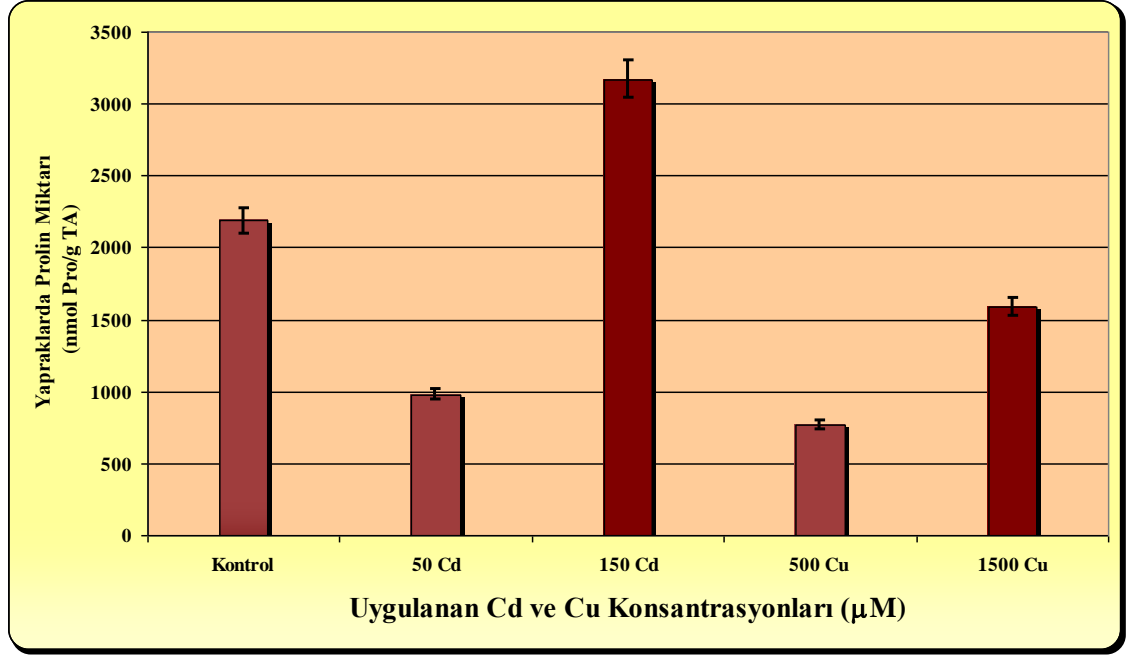


Şekil 4.37: Köklerin kuru ağırlığı (g)

Şekil 4.37’de görüldüğü gibi 150 µM Cd bitkisinin köklerindeki kuru ağırlık miktarları kontrole göre üst seviyede iken; diğer ağır metal uygulanan bitkilerin köklerinde ise kontrole göre kuru ağırlık miktarları alt seviyededirler. Kontrolde bu miktar 1,517 gr, 50 µM Cd 1,463 gr, 150 µM Cd 1,702 gr, 500 µM Cu 1,300 gr ve 1500 µM Cu ise 1,453 gramdır.

#### 4.7. Cd VE Cu UYGULANAN BİTKİNİN KÖK VE YAPRAKLARINDA PROLİN MİKTARI:

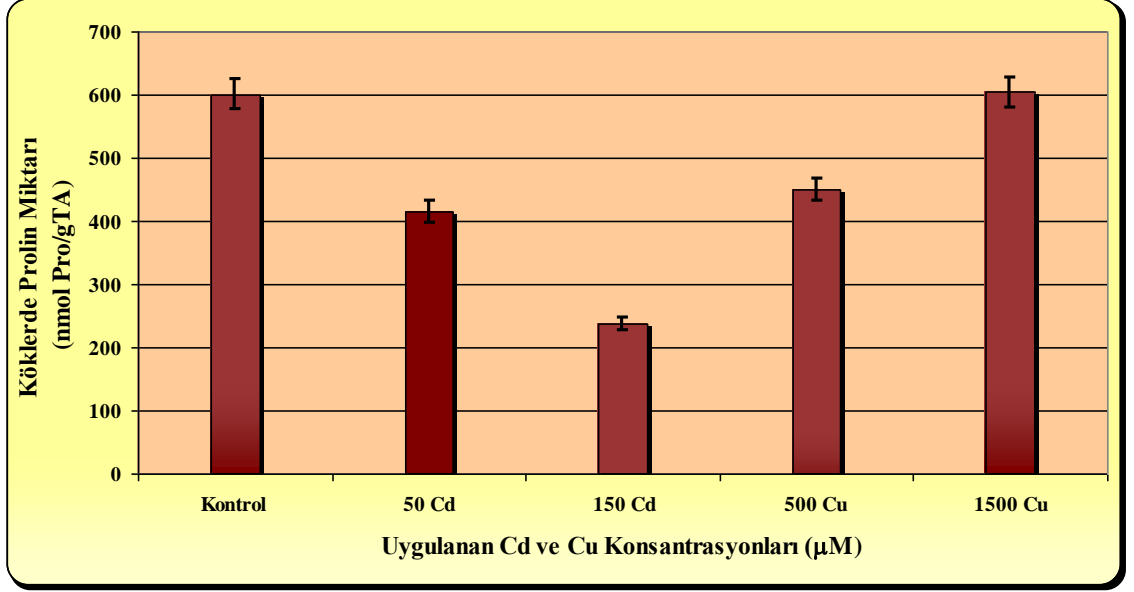
##### 4.7.1. Yapraklarda prolin miktarları



Şekil 4.38: Yapraklarda Prolin Miktarı (nmol/g TA)

Şekil 4.38'de de görüldüğü gibi yapraklardaki prolin miktarı kontrole göre ve kendi aralarında uygulanana konsantrasyona göre azalma ve artış göstermiştir. 50  $\mu\text{M}$  Cd uygulanan bitkinin yapraklarındaki prolin miktarı 150  $\mu\text{M}$  Cd'a göre azaldığı görülmektedir. Bakır konsantrasyonlarında ise kadmiyum konsantrasyonları uygulanan bitkilerdeki duruma paralellik vardır. 500  $\mu\text{M}$  Cu 'daki yaprakların prolin miktarları da 1500  $\mu\text{M}$  Cu 'a göre daha az olduğu görülmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi burada 150  $\mu\text{M}$  Cd uygulanan bitkinin yapraklarındaki prolin miktarı kontrol bitkisinden de yüksektir. Bu miktarlar kontrolde 2187, 50  $\mu\text{M}$  Cd'da 980, 150  $\mu\text{M}$  Cd'da 3171, 500  $\mu\text{M}$  Cu'da 772 ve 1500  $\mu\text{M}$  Cu'da ise 1588 nmol Pro/ g TA'dır.

#### 4.7.2. Köklerde prolin miktarları



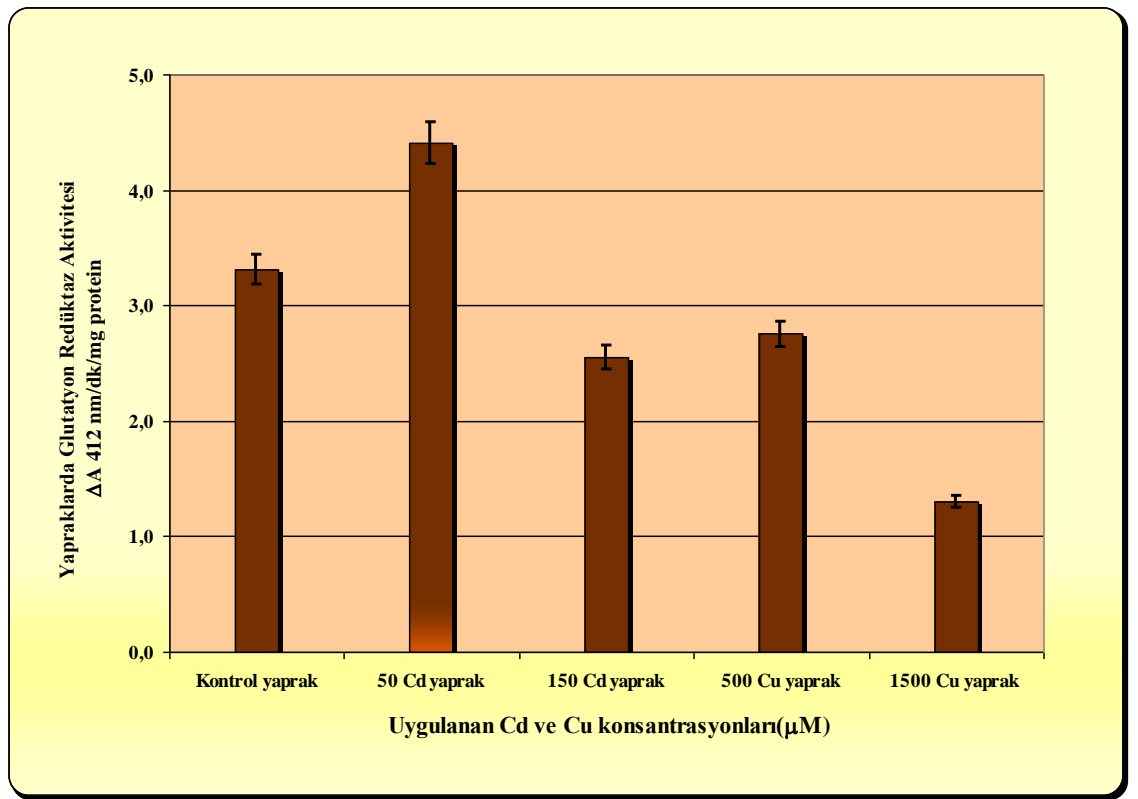
Şekil 4.39:Köklerde prolin miktarı (nmol/g TA)

Şekil 4.39'da da görüldüğü gibi kökledeki prolin miktarı kontrole göre ve kendi aralarında uygulanana konsantrasyona göre azalma ve artış göstermiştir. 50  $\mu\text{M}$  Cd uygulanan kökteki prolin miktarı 150  $\mu\text{M}$  Cd uygulanan kökteki prolin miktarından daha fazla olduğu görülmektedir. Bakır konsantrasyonlarında ise tam tersi bir durum söz konusudur. 500  $\mu\text{M}$  Cu uygulanan bitkinin köklerindeki prolin miktarı 1500  $\mu\text{M}$  Cu uygulanan bitkinin köklerindeki prolin miktarına göre azalmıştır. Bu miktarlar kontrolde 600, 50  $\mu\text{M}$  Cd'da 415, 150  $\mu\text{M}$  Cd'da 238, 500  $\mu\text{M}$  Cu'da 449 ve 1500  $\mu\text{M}$  Cu'da ise 603 nmol Pro/ g TA'dır.

## 4.8. ANTİOKSİDAN ENZİMLER

### 4.8.1. Glutasyon Redüktaz enziminin aktivitesi

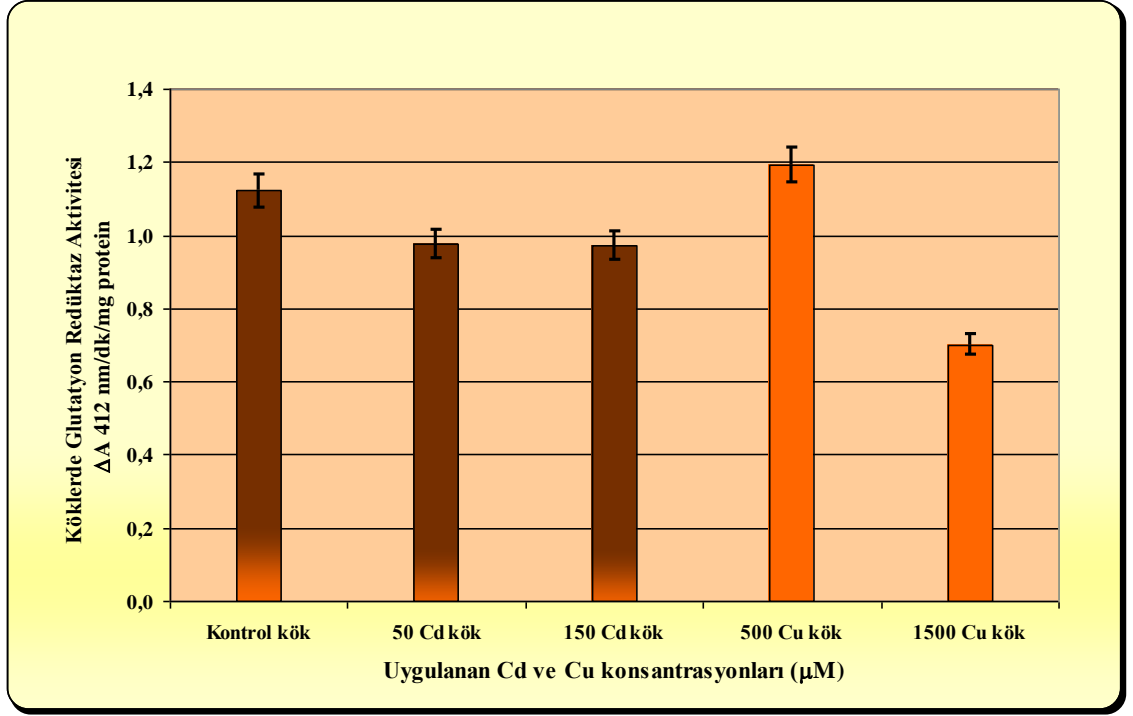
#### 4.8.1.1. Glutasyon Redüktaz'ın yapraktaki aktivitesi



Şekil 4.40: Yaprakta GR aktivitesi ( $\Delta A$  412 nm/dk/mg protein)

Şekil 4.40'da izlendiği gibi GR metabolizmasında düşük konsantrasyonlardaki Cd uygulanan bitkinin yapraklarında enzim aktivitesi yüksek oranda görülürken, yüksek konsantrasyon uygulanan bitkinin yapraklarında herhangi bir enzim aktivitesi görülmemiştir. Cu konsantrasyonları için de herhangi bir aktivite yoktur.

#### 4.8.1.2. Glutasyon Redüktaz'ın kökteki aktivitesi

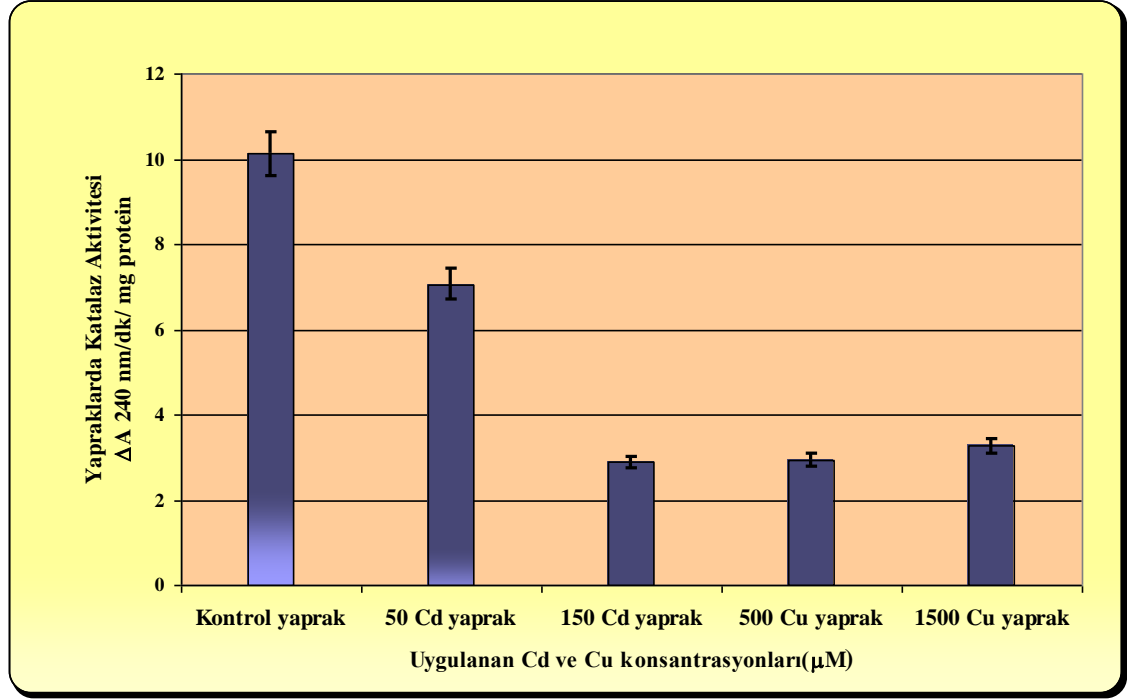


Şekil 4.41: Kökte GR aktivitesi ( $\Delta\text{A } 412 \text{ nm/dk/mg protein}$ )

Şekil 4.41'de izlendiği gibi 500  $\mu\text{M}$  Cu uygulanan kökte kontrol seviyesinin biraz üstünde bir aktiviteye görülürken; 50 $\mu\text{M}$  Cd, 150  $\mu\text{M}$  Cd ve 1500  $\mu\text{M}$  Cu uygulanan kökte herhangi bir aktiviteye rastlanılmamıştır.

## 4.8.2. Katalaz enziminin aktivitesi

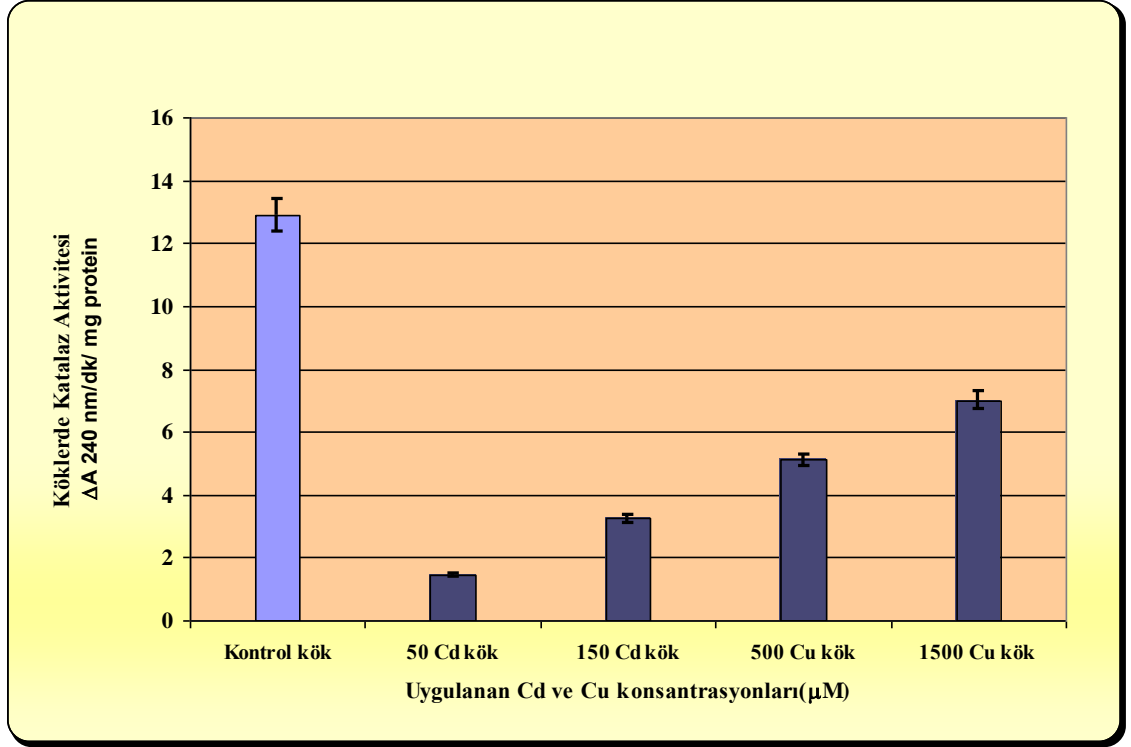
### 4.8.2.1. Katalaz'ın yapraktaki aktivitesi



Şekil 4.42: Yaprakta CAT aktivitesi ( $\Delta A_{240}$  nm/dk/mg protein)

Şekil 4.42'de görüldüğü gibi, uygulanan Cd ve Cu konsantrasyonlarıyla yapraklardaki CAT enzim aktivitesi baskılanmıştır.

#### 4.8.2.2. Katalaz'ın kökteki aktivitesi

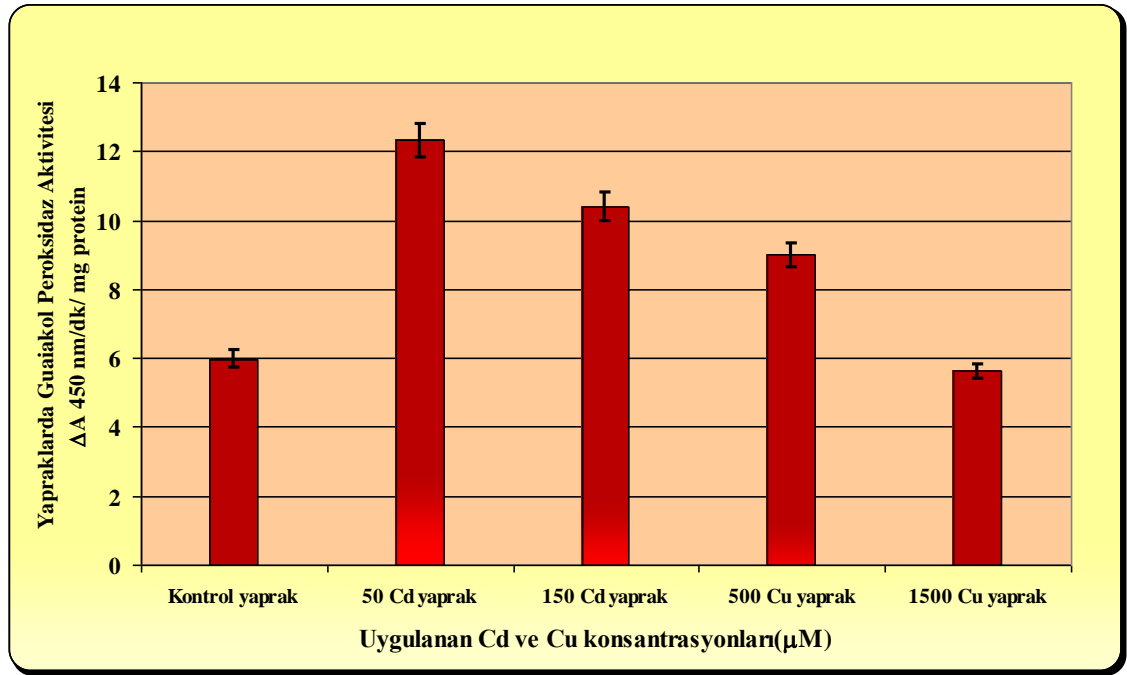


Şekil 4.43: Kökte CAT aktivitesi ( $\Delta A$  240 nm/dk/mg protein)

Şekil 4.43'de ise, Cd ve Cu uygulamalarıyla köklerde ki CAT aktivitesinin de azaldığı görülmüştür.

### 4.8.3. Guaiakol Peroksidaz enziminin aktivitesi

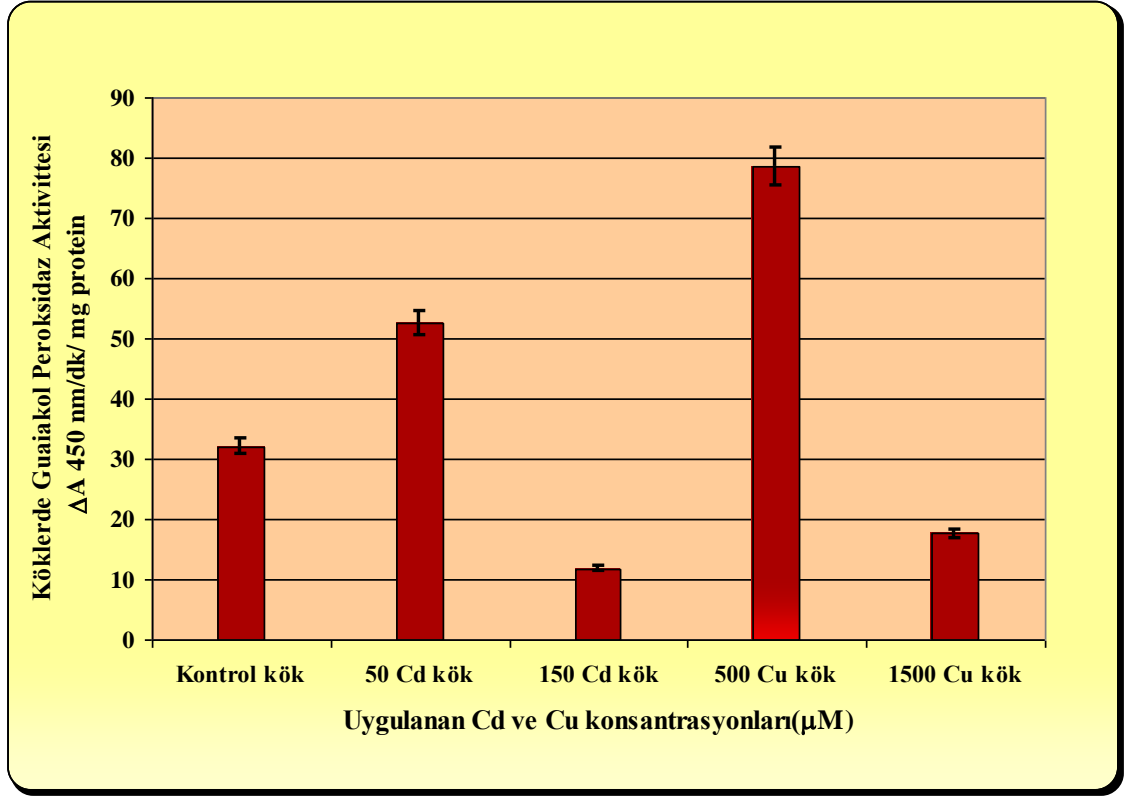
#### 4.8.3.1. Guaiakol Peroksidaz 'ın yapraktaki aktivitesi



Şekil 4.44: Yaprakta GPOX ( $\Delta A$  450 nm/dk/mg protein)

Şekil 4.44'de izlenebileceği gibi, uygulanan 50 ve 150  $\mu\text{M}$  Cd konsantrasyonları ile 500  $\mu\text{M}$  Cu konsantrasyonunda yaprakların peroksidaz aktivitesi (GPOX ) artış göstermiştir. 1500  $\mu\text{M}$  Cu uygulamasında ise kontrole göre önemli bir farklılık gözlenmemiştir.

4.8.3.2. *Guaiakol Peroksidaz*'ın kökteki aktivitesi



Şekil 4.45: Kökte GPOX aktivitesi (ΔA 450 nm/dk/mg protein)

Şekil 4.45'de ise, uygulanan 50 μM Cd ve 500 μM Cu uygulamalarında GPOX aktivitesi artış gösterirken, 150 μM Cd ve 1500 μM Cu konsantrasyonlarında kontrole göre indirgenmelerin olduğu saptanmıştır.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkilerin yetiştiği ortamdaki olumsuz iklim şartları (kuraklık, sıcaklık, soğuk), toprak içeriği (tuzluluk, ağır metal, pH) ve diğer faktörler (ultraviyole ışınlar, radyasyon, ozon) bitkilerin büyüme ve gelişmesini etkiler (Scandalios, 1994; Allen, 1995). Bitkiler bu tür çevresel streslere karşı bazı savunma mekanizmaları geliştirerek yaşam mücadelesi verir.

Fitotoksitesi yüksek olan ağır metallere kadmiyum (Cd) ve bakır (Cu)'ın toksik etkileri, yetiştirme ortamındaki farklı konsantrasyonlara ve bitkinin özelliklerine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Bununla ilgili olarak bitkilerde Cd ve Cu tolerans sınırları ve olası tolerans mekanizmaları da farklı boyutlarda gelişmektedir.

Araştırmamızın ilk bölümünde *B. populneus*'un yetiştirilme koşulları, farklı Cd ve Cu konsantrasyonlarının bitkide oluşturduğu toksik etkiler morfolojik anlamda incelenmiş, Cd ve Cu birikimleri belirlenmiştir.

İkinci bölümde ise, fitotoksite sonucu bitkilerde meydana gelen fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerdeki farklılıklar araştırılmış ve bu ağır metallere karşı bitkide gelişen cevaplar irdelenmiştir.

### 5.1. BİTKİNİN YETİŞTİRİLME KOŞULLARI, UYGULANAN Cd VE Cu' IN TOKSİK ETKİLERİNİN BİTKİDE OLUŞTURDUĞU MORFOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER, BİTKİNİN TAZE VE KURU AĞIRLIKLARINDA MEYDANA GELEN FARKLILIKLAR, Cd VE Cu BİRİKİMLERİ

#### 5.1.1. Yetiştirilme koşulları

Su kültüründe yetiştirilmeye çalışılan bitkilerde % 50 oranında kayıplar yaşanmıştır. Bitki özellikle yaşamının ilk evrelerinde suya fazla ihtiyaç duymamaktadır. Su ve nişastadan oluşan tüber şeklindeki köklerin drenajı iyi olmayan ortamlarda çabuk bozulduğu bildirilmiştir (BUİST, M. ve diğ., 2000). Avustralya kökenli ve kurak

ortamlara uyum sağlayan bir bitki olan *B. populneus*'un sahip olduğu tüber şeklindeki kök yapısı ve kök mekanizmasının bunda etkili olduğu düşünölmektedir.

### **5.1.2. Cd ve Cu'm Toksik Etkilerinin Bitkide Oluşturduğu Morfolojik Değişiklikler**

Bitkilere 12 gün boyunca uygulanan Cd konsantrasyonlarına bağlı olarak iki konsantrasyonda da yapraklarda noktasal kloroz ve ayrıca 150 µM Cd uygulanan bitkinin yapraklarında hafif nekroz saptanmıştır. Köklerde ise herhangi bir morfolojik değişim gözlenmemiştir.

Genel olarak Cd' un bitkiler tarafından hem aktif hem de pasif olarak alınabildiği ileri sürölmektedir. Büyük çoğunluğu köklerle alınan Cd' un bitki içinde çok hareketli olduğu ve ksilem ile kolayca taşınabildiği öne sürölmüştür. Bitkilerde Cd toksisitesinin en belirgin özelliği büyümenin yavaşlaması ve klorozdur. Yüksek Cd birikiminden kaynaklanan klorozun, Fe etkileşimi nedeniyle de ortaya çıkabileceği belirtilmiştir. Cd ve Fe arasında antagonistik bir ilişki vardır. Bitki tarafından aşırı Cd alınımı, Fe' in metabolik işlevini etkiler; bundan dolayı bitkide Fe alınımı yavaşlar ve Fe eksikliğinden doğan kloroz oluşur (Benavides MP ve diğ., 2005).

12 gün boyunca bitkilere uygulanan Cu konsantrasyonları yapraklarda hafif kloroza neden olurken, köklerde herhangi bir morfolojik değişim olmamıştır. Cu klorofil oluşumu için gerekli bir elementtir. Kloroz; metallerin birbirleriyle olan antagonistlik ya da sinerjik etkileşiminden doğan metal eksikliğinden ya da kloroplast ve mezofil yapısının bozulmasından ileri gelir. Cu'm bitki bünyesinde hareket kabiliyeti iyi değildir. Bu nedenle eksiklik belirtileri özellikle genç yapraklarda meydana gelir.

*Origanum vulgare* bitkisiyle yapılan bir çalışmada Cu'm yapraklar üzerine toksisitesi araştırılmış ve bitkinin yüksek Cu konsantrasyonu içeren topraklarda tipik semptom olarak kloroz gösterdiği belirlenmiştir (Panou-Filotho, H. ve diğ., 2001).

*Brassica olearacea* L var. *Botrytis* cv. *maghi* bitkisine Cu, Cr ve Co uygulanmış ve uygulama sonrası Cu toksisitesine bağlı olarak yapraklarda kloroz görülmüştür. (Chatterjee, J. ve Chatterjee, C., 2000). *Tulbaghia violace* bitkisiyle yapılan deneyde ise 2 ve 4  $\mu\text{M}$  Cd konsantrasyonlarına bağlı olarak meydana gelen ilk toksisite kloroz olarak belirlenmiştir (Street R.A. ve diğ., 2010).

Kloroz genel olarak bitkiye uygulanan yüksek ağır metal konsantrasyonlarından kaynaklanır. Ağır metaller bitkide Fe, Zn ve Mn gibi klorofil oluşumunda görev alan iyonlarla yer değiştirerek, bitkinin bu metalleri yeterli düzeyde alamamasına sebep olur böylece yapraklarda kloroz meydana gelir (Kukkola, E. ve diğ., 2000; Lombardi, L., 2005).

Cd uygulamasıyla yetiştirilen *Sesivum* ve *Mesembryanthemum*'un genç yapraklarında ilk iki hafta hafif kloroz oluşurken, iki hafta sonra daha yoğun kloroz ve diğer toksik septomlar görülmeye başlamıştır. 200 ve 300  $\mu\text{M}$  Cd uygulamasında *Sesivum* petiyollerinde nekrozlar oluşmuş ve yaprakların döküldüğü görülmüştür. Düşük (50  $\mu\text{M}$ ) Cd uygulamasında ise *Mesembryanthemum*'un genç yapraklarında nekrozların oluştuğu gözlemlenmiştir. Metal eksikliğinde protein sentezinin inhibe olması sonucu klorofil biyosentezinin baskılanmasından kloroz meydana gelir. Tekrar klorofil sentezi olmadığı için yapraklarda meydana gelen sarı renk tekrar yeşile dönüşemez. Ayrıca mezofil tabakasında kloroplast sayısının ve hacminin azalması klorozla ilişkilidir (Ghnaya ve diğ., 2005). Yukarıda incelediğimiz bu çalışmalar genel anlamda bizimkiyle paralellik gösterir.

### **5.1.3. Bitkinin taze ve kuru ağırlıklarında meydana gelen değişiklikler**

*Brachychiton populneus* yapraklarında taze ağırlıklar 50  $\mu\text{M}$  Cd'da %41, 500  $\mu\text{M}$  Cu'da %6 oranında kontrole göre artarken, 150  $\mu\text{M}$  Cd'da %12, 1500  $\mu\text{M}$  Cu'da %20 oranında azalmıştır. Kuru ağırlıklar ise 50  $\mu\text{M}$  Cd'da %17 ve 500  $\mu\text{M}$  Cu'da %10 oranında artarken, 150  $\mu\text{M}$  Cd'da %10 ve 1500  $\mu\text{M}$  Cu'da ise %24 oranında kontrole göre azalmıştır. Görülüyor ki uygulanan yüksek ağır metal konsantrasyonları bitkinin yapraklarında biyosentez olaylarını inhibe etmiş ve biyokütleyi azaltmıştır.

*Brassica pekinensis* Rupr. bitkisi ile yapılan çalışmada belli konsantrasyonlarda uygulanan Cu' in bitkinin tüm vejetatif organlarının biyokütlesini düşürdüğü, kök uzunluğunu azalttığı ve yaprak sayısını indirgediği gözlenmiştir. Yaprak sayısının azlığı fotosentezi etkiler ve bitkinin biyokütlesi düşer, ayrıca N metabolizmaları inhibe olur ve bundan dolayı da biyokütle azalır (Xiong, Z.-T, 2006).

Gövdelerdeki taze ağırlıklar kontrole göre; 50  $\mu\text{M}$  'da %37, 150  $\mu\text{M}$ 'da %24, 500 $\mu\text{M}$  Cu'da %37 ve 1500  $\mu\text{M}$  Cu'da ise %53 oranında azalmıştır. Kuru ağırlıkları ise 50  $\mu\text{M}$  Cd'da %47, 150  $\mu\text{M}$  Cd'da %17, 500  $\mu\text{M}$  Cu'da %35 ve 1500  $\mu\text{M}$  Cu'da ise %51 oranında azalmıştır. Gövdede tüm uygulamalar da biyokütlenin azalması ağır metal parametreleri incelendiğinde birikimin gövdede olmasıyla ilişkilendirilebilir.

2010 yılında Zhang, S., ve diğ.'leri tarafından Çin'deki Kangding ve Yajiang maden bölgelerinden toplanan *Malva sinensis* Cavan tohumlarıyla yapılan bir deneyde yetiştirilen bitkiye 50, 75, 100, 150 ve 200  $\mu\text{M}$  Cd uygulaması yapılmış ve uygulama sonunda bölgelere göre bitkinin boyunda ve biyokütlelerin arasında farklılık gözlenmiştir. Gövde biyokütleleri iki bölge içinde çok farklılık gösterirken yaprak ve kök için bu durum söz konusu değildir. *Malva sinensis* Cavan bitkisi yüksek derecede Cd'la kirlenmiş topraklara toleranslıdır ve sonuç olarak Yajiang'daki bitkiler Kangding bölgesindeki bitkilere göre Cd'a karşı daha güçlü toleransa sahiptir. Ayrıca bitkinin 100  $\mu\text{M}$  Cd'dan sonra biyokütlesinde bir azalma görülmüştür.

Köklerin taze ağırlıkları 50  $\mu\text{M}$  Cd'da %11 ve 150  $\mu\text{M}$  Cd'da %13 oranında artarken, 500  $\mu\text{M}$  Cu 'da %18 ve 1500  $\mu\text{M}$  Cu'da ise %6 oranında kontrole göre azalmıştır. Köklerdeki kuru ağırlıklar ise 50  $\mu\text{M}$  Cd'da %4, 500  $\mu\text{M}$  Cu'da %12 ve 1500  $\mu\text{M}$  Cu'da ise %4 oranında azalırken, 150  $\mu\text{M}$  Cd'da %12 oranında artmıştır.

Cu ksilem borularının su geçirgenliğini etkileyen ve su geçişini kontrol eden bir elementtir (Kabata-Pendias, A., 1986). Bizim deneylerimizde, Cu uygulanan bitkilerin taze ağırlıklarında saptanan düşme, ksilem borularının geçirgenliğinin artması ve su metabolizmasının bozulmuş olmasına bağlanabilir.

*Withinia somnifera* bitkisinde belli konsantrasyonlarda Cu uygulaması sonucu bitkideki biyokütle miktarına bakılmış ve 30 gün boyunca uygulanan Cu konsantrasyonu arttıkça biyokütle miktarı azalmıştır (Khatuna, S. ve diğ. 2008).

Bayçu (1999) tarafından yapılan bir çalışmada, *Picea abies*'e uygulanan Cd konsantrasyonlarındaki artışlara göre iğne yapraklarda gelişimin yavaşladığı, yüksek konsantrasyonlarda ise tamamen durduğu, kök ve gövde uzunlukları ile köklerin taze ve kuru ağırlıklarının indirgendiği, 50 µM Cd konsantrasyonundan sonra da yan kök oluşumu ve uzamasının azaldığı gözlenmiştir.

Leon ve arkadaşları (2002) 5 farklı biber (*Capsicum annuum* L.) kültürünü 0- 5 mM CdCl<sub>2</sub> ile muamele edip, Cd' un bitkilerdeki gelişme ve fizyolojik parametreleri nasıl etkilediğini araştırmışlardır. Cd, konsantrasyona bağlı olarak taze ve kuru ağırlıkta azalmaya neden olmuştur. Yaprak büyüklükleri de Cd konsantrasyonundan etkilenmiştir. Ağır metaller fotosentetik pigment miktarının azalmasına dolayısıyla fotosentez hızının olumsuz etkilenmesine neden olmuştur. Ayrıca madde yapımında inhibe olması bitkilerin biyokütlelerinde azalmaya sebep olmaktadır.

Cd ve Cu' ın toksik etkileri genellikle büyümenin indirgenmesi ve biyokütlenin azalması ile kendini gösterir. Kökler metale ve toksisiteye maruz kalan ilk kısımlardır ve bu nedenle kök biyokütlesi diğer kısımlara göre daha fazla etkilenir. Biyokütlenin azalması bitki hücrelerinin bölünme ve uzamasının ağır metaller tarafından inhibe olmasıyla açıklanmaktadır (Arduini ve diğ., 1994; Mishra, S., ve diğ., 2006). Ağır metaller ribozomal RNA' nın öncü biyosentezini değiştirerek meristematik hücre yapısını etkiler ve böylece bitki gelişimi etkilenir (Ouzounidou ve ark. 1992). Büyümenin indirgenmesi yüksek yapılı bitkilerde ağır metal toksisitesine karşı görülen genel bir etkidir (Ouariti O. ve diğ. 1997).

#### **5.1.4. Bitkide Cd ve Cu Birikimleri**

Bitkilerde Cd miktarının normal sınırları 0,2 - 0,8 µgg<sup>-1</sup> K.A olduğu kabul edilmektedir, toksik değerler ise 5 - 30 µgg<sup>-1</sup> K.A olarak belirtilmiştir (Kabata – Pendias, A., 1986).

50  $\mu\text{M}$  Cd uyguladığımız bitkinin yapraklarında herhangi birikim gözlenmezken, gövdede yaklaşık 7,2 ppm ve kökte ise 0,6 ppm bir birikim görülmüştür. Kabata-Pendias'ın verilerine göre gövdede toksik limitlerde bir birikim göze çarpmaktadır. 150  $\mu\text{M}$  Cd'da da yaprakta 0,3, kökte 2,3 ve gövdede 3,5 ppm birikim olmuştur. 150  $\mu\text{M}$  Cd' da bitki normal sınırlarda bir birikim yapmıştır.

Bitkinin Cu miktarının normal sınırları 4 - 15  $\mu\text{gg}^{-1}$  K.A. olduğu belirtilmektedir, toksik değerler ise 20 - 100  $\mu\text{gg}^{-1}$  K.A. olarak belirtilmiştir (Kabata – Pendias, A., 1986).

500  $\mu\text{M}$  Cu uygulanan bitkinin yapraklarında 0,58, gövdelerinde 1,23 ve köklerinde 0,42 ppm'lik bir birikim vardır ve bu verilere göre bitkide fazla Cu birikim olmamıştır. 1500  $\mu\text{M}$  Cu'm yapraklarında 0,48, gövdesinde 7,61 ve köklerinde 1,89 ppm birikim olmuştur ve buna göre Cu normal seviyede sadece gövdede birikmiştir.

Mishra, S. ve diğerlerinin 2006 yılında yaptığı bir deneyde bitki tarafından biriktirilen Cd miktarı yaklaşık 11,46  $\text{mg g}^{-1}$  KA olarak bulunmuş ve bunun yaklaşık %80,6'sının kök dokusunda biriktiği bildirilmiştir. Cd'un hücre çeperi ve hücreler arası karbonhidratlarla hareketsizleştirildiği düşünülmekte ve bunun bitkiler tarafından kazanılan önemli bir savunma stratejisi olabileceği belirtilmektedir.

Kanalizasyon atıklarının bulunduğu toprakta yapılan bir deneyde ise *Beta vulgaris* bitkisinde Zn, Cu, Mn, Cd, Pb ve Ni miktarlarına bakılmış ve köklerinde Cu, Zn ve Ni; gövdelerinde ise Mn, Cd ve Pb'u biriktirdiği belirlenmiştir. Ağır metalleri yaşadığı topraktaki konsantrasyonlardan çok daha fazla biriktirmesi bitkinin akümülatör özellikle olduğunu düşündürmüştür (Singh, R.P. ve Agrawal, M., 2007).

Çalışmamızdan elde edilen verilere göre, gerek Cd ve gerekse Cu birikimlerinin çok düşük düzeyde olması ve sadece gövdelerde az bir farklılık göstermesi bitkinin bir metal akümülatörü ya da indikatörü olamayacağını göstermektedir.

Bununla birlikte, çok yüksek ağır metal konsantrasyonuna sahip topraklarda bile hayatlarını sürdürebilen (Wei, S.H., ve diğ., 2005) ve yüksek konsantrasyonlara maruz bırakıldıklarında toksik metalin bitkiye alınımının sınırlandırılması ya da engellenmesi şeklinde bir mekanizmaya sahip olan ekskluder (Prasad M.N.V., 2008) grubunda bir bitki olabileceği düşünülmektedir.

Baker (1981)'e göre bitkilerin ağır metal toleransına karşı üç temel tipinin olduğu öne sürülmüştür: biriktirme, kaçınma ve belirteç. Biriktirme ve kaçınma bitkilerin yüksek ağır metal konsantrasyonlarına karşı cevap olarak verdiği iki temel stratejidir (Vogel-Mikus ve diğ. 2005). Bitkilerin bünyelerinde ne kadar birikim yaptığını bulmak için ve bitkinin ağır metal toleransına karşı hangi grupta olduğunu belirlemek için bitkilerin translokasyon faktörlerine bakmak gerekmektedir. Translokasyon faktörü (TF) bitkilerin gövde ve köklerindeki birikimler hakkında bilgi veren bir formüldür. TF gövdedeki ağır metal konsantrasyonunun kökteki ağır metal konsantrasyonuna oranıyla bulunur. Eğer  $TF > 1$  ise bitki metali kökten gövdeye iletmıştır (Baker ve Brooks, 1989).

$$TF: [Gövde](mg\ g^{-1})/[Kök](mg\ g^{-1})$$

Biyo-akümülatör faktör (BAF) ise bitkilerin hiperakümülatör, akümülatör veya ekskluder olmaları hakkında bilgi verir. Ve BAF toprak üstü kısımların konsantrasyonlarının ( $mg\ g^{-1}$ ), toprak konsantrasyonuna bölünmesiyle bulunur. Eğer  $BAF > 10\ mg/g^{-1}$  ise bitki hiperakümülatör bir bitkidir,  $BAF > 1$  ise akümülatör bitkidir ve  $BAF < 1$  ise ekskluder bitkidir (Ma ve diğ., 2001 Baker 1981). Biyoakümülatör faktörleri (BAF) regülatör amaçlar için oldukça yararlı olmaktadır.

$$BAF=[Toprak\ üstü\ kısım]\ (mg\ g^{-1})/[Toprak]\ (mg\ g^{-1})$$

Uygulama ( $\mu\text{M}$ )	Translokasyon faktör (TF)	Biyoakümülatör faktör(BAF)
50 $\mu\text{M}$ Cd	0	1,44
150 $\mu\text{M}$ Cd	0,147	0,259
500 $\mu\text{M}$ Cu	1,23	0,034
1500 $\mu\text{M}$ Cu	0,25	0,053

Tablo 5.1: TF ve BAF değerleri

TF değerlerine baktığımızda yalnızca 500  $\mu\text{M}$  Cu' da kökten gövdeye ağır metal taşınımı vardır. BAF değerlerine baktığımızda ise 50  $\mu\text{M}$  Cd'da azda olsa bir birikim varken diğerlerinde herhangi bir birikim görülmemektedir. BAF değerleri, *Brachychiton populneus'* un potansiyel ekskluder bir bitki olabileceğini düşündürmekle birlikte daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

*Malva sinensis* Cavan ile yapılan bir deneyde bitkinin BAF ve TF değerlerine bakılmış ve bitkinin bu değerleri 1'den çok büyük çıktığı için bu bitkinin Cd hiperakümülatörü olduğu ileri sürülmüştür (Zhang, S., ve diğ., 2010).

Shenyang ekolojik yaşam alanından toplanılan *Bidens pilosa* L. bitkisiyle yapılan bir deneyde belli konsantrasyonlarda Arsenik (As) verilen bitkide BAF ve TF değerlerine bakılmıştır. Sonuç olarak BAF ve TF değerleri < 1 çıkmıştır. Buna göre bu bitki potansiyel bir As- ekskluderidir ( Sun Y.-b. ve diğ., 2009). Ekskluder bitkilerde köklerin ağır metalleri üst bölümlere taşınmasına karşı bir bariyer görevi üstlendiği düşünülür ve bunun köklerdeki potansiyel bir tolerans mekanizmasıyla gerçekleştirilebileceği açıklanmıştır (Ernst ve diğ. , 1992).

Sebzelerin ve tarım ürünlerinin seçiminde bitkinin yenilebilir kısımlarındaki metal birikimleri çok önemlidir. Metal kirlilik düzeyinin yüksek olduğu tarım alanlarında bitkinin yenilebilir bölgelerindeki metal birikimlerine belli bir limite kadar azda olsa izin verilebilir (Wang S. ve diğ., 2009; Barman ve diğ., 2000; EPA, 2000 ). Bu anlamda ekskluder bitkilerin bariyer, dışlama gibi mekanizmalara sahip olması ekonomik ve ekolojik anlamda yarar sağlar.

## **5.2. BİTKİLERDE FİTOTOKSİSİTE SONUCU MEYDANA GELEN FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL DEĞİŞİMLER**

### **5.2.1. Bitkinin yapraklarında klorofil miktarı**

Yüksek yapılı bitkilerde, siyanobakterlerde ve yeşil alglerde; fotosentezin diğer metabolik proseslere oranla ağır metal toksisitesine daha duyarlı olduğu belirtilmektedir (Lu ve ark, 2000).

Deney sonuçlarına göre, klorofil miktarı uygulanan konsantrasyon miktarı arttıkça giderek seviyesi düşmüştür. 50  $\mu\text{M}$  Cd'da klorofil içeriği kontrole göre %9, 150  $\mu\text{M}$  Cd'da % 10, 500  $\mu\text{M}$  Cu 'da % 13 ve 1500  $\mu\text{M}$  Cu'da ise %16 oranında azalmıştır.

Cu ve Cd gibi ağır metaller bitki yapraklarında klorofil pigment birikimini inhibe eder ve fitosistemlerdeki klorofil bütünlüğünü bozar (Caspı ve diğ.,1999). Bunun yanında Cu kloroplast zarlarının peroksidasyonuna neden olur (Halliwell, B. ve diğ., 1984; M.N.V. Prasad ve diğ., 2001). Klorofil pigmentlerinin yıkımıyla fotosentetik verimin düşmesi bitki büyümesini olumsuz yönde etkiler. Fotosentezin inhibasyonu ve klorofilin yıkımı bitkinin maruz kaldığı metale spesifik bir yanıtı olarak kabul edilebilir (Upadhyay, R.K. ve diğ., 2009).

Çevresel stres faktörlerinin bitkiler üzerindeki etkilerini anlamak amacıyla sıkça başvurulan yollardan biri organizmadaki klorofil içeriğini belirlemektir. Çeşitli araştırmacılar tarafından metal kirliliğine bağlı olarak değişik bitki türlerinde klorofil miktarının azaldığı rapor edilmiştir. Örneğin, metal kirliliği (Ni-Cu) olan topraklarda

yetişen *E. nigrum*'un klorofil içeriğinde % 15-30 oranında azalma tespit edilmiştir (Monni S. ve diğ 2001). Cu, Cd, Pb ve Zn uygulanan *Halophila ovalis* bitkisinde klorofil a, klorofil b miktarının (Ralph ve Burchett 1998), *Brassica pekinensis* bitkisinde Cu'a bağlı olarak klorofil miktarlarının (Xiong, Z.-T. Ve diğ., 2006) düştüğü belirlenmiştir.

*Potamogeton crispus* L. bitkisiyle yapılan bir deneyde gümüşün(Ag) klorofil içeriğini azalttığı görülmüştür. Klorofil biyosentezini Ag'ün de diğer metaller gibi inhibe etmesi veya bozması, Ag'ün miktarının 5µM'dan 20 µM'a çıkmasının yapraktaki pigment miktarını azaltması ve Fe, Mg ile Zn eksikliğinin klorofil oluşumunu engellemesinden dolayı klorofil içeriği yaprakta azalmıştır (Xu,Q.S. ve diğ.,2010).

Baycu ve diğ., 2006 yılında yaptıkları araştırmada İstanbul'un belirli yerlerinden toplanılan ağaçlarda klorofil miktarının kontrol bitkilerinkine göre azaldığı saptanmıştır. Yapılan araştırma klorofil miktarının azalmasında ağaç türleri, mevsimsel faktörler, yerin durumu ve ağır metal stresinin neden olduğu belirtilmiştir.

*Bacopa monnieri* L. bitkisinin Cd uygulaması sonrası klorofil miktarını azalmıştır. *Withania somnifera* bitkisinde de Cu uygulaması sonrası klorofil miktarında azalma olmuştur. Bu azalmalar klorofil biyosentez enzimlerin –SH gruplarının Cd ve Cu ile bağlanması ve yanı sıra lipid peroksidazın bozulmasıyla meydana gelir (Nyitrai ve diğ. , 2003; Singh S. ve diğ., 2006).

### **5.2.2. Bitkinin kök ve yapraklarında protein miktarı**

Yapraklarda protein miktarlarına baktığımızda kontrole göre 50 µM Cd'da % 67, 150 µM Cd'da %26, 500 µM Cu'da %27 ve 1500 µM Cu'da %49 oranında azalma görülmektedir. Kökte ise kontrole göre 50 µM Cd'da %42, 150 µM Cd'da %23, 500 µM Cu'da %59 ve 1500 µM Cu'da ise %46 oranında azalma görülmektedir. Genel olarak kökte uygulanan düşük konsantrasyonlarda protein miktarı, yüksek konsantrasyon uygulanan bitkilere göre daha çok azalmıştır. Bitki aşırı yüksek

konsantrasyondaki ağır metalleri bünyesine alamaz. Ağır metaller bitkilerdeki protein miktarının azalmasına sebep olur.

Ağır metal stresinde bitkilerdeki protein miktarlarının azalması genelde protein sentezinin inhibisyonundan ya da oksidatif stresle üretilen ROS'ların tetiklediği proteolizden kaynaklanır (Parida ve diğ., 2004).

*Vigna unguiculata* L. var. Pusa Falguni tohumları Cd ve Hg' ya maruz bırakılmış, protein ve amino asit içeriklerinde azalma, prolinde ise artma tespit edilmiştir (Nagoor, S., 1997). *H. verticillata* (L.f.) Royle su bitkisiyle yapılan çalışmada 0, 1, 4, 7 gün süreyle uygulanan Cu (0,1–25 µM) sonrası protein miktarındaki değişimler incelenmiş ve protein miktarlarının 5µM'a kadar düzenli bir artış gösterdiği fakat 7 gün 5 µM Cu uygulanan bitkide ise protein içeriğinin azaldığı belirtilmiştir. 25 µM Cu uygulama ile bitkilerin hepsinde protein miktarı düzenli olarak azalma göstermiştir ( Srivastava S. ve diğ., 2006).

Cd uygulamasıyla ilgili bir deneyde kullanılan *Bacopa monnieri* L. bitkisine 48, 96 ve 144 saat 10, 50, 100 ve 200 µM Cd'a maruz bırakılmıştır. Deney sonunda bitkideki protein miktarı zamana ve uygulanan konsantrasyon artışına göre azalmıştır. Proteinleri yıkan veya aktive eden proteaz ya da diğer katabolik enzimlerin aktifliğinin artması çözülebilir proteinleri bozmuş ve *Bacopa monnieri* bitkisinde Cd' a maruz kalan kısımların protein içeriğinin azalmasına neden olmuştur (Shraddha Singh ve diğ., 2006; Davies, 1987).

*Pistia stratiotes* L. bitkisiyle yapılan çalışmada ağır metal uygulaması sonunda protein içeriklerindeki değişimlere bakılmıştır. Deneyin sonucunda toplam protein miktarının yüksek konsantrasyonda azaldığı görülmüştür. Kök ve yapraklarda başlangıçta maksimum bir artış görülürken bununla birlikte 18 saat sonra kontrole göre protein miktarı yavaş yavaş azalmıştır. Ve deney sonunda protein seviyelerinde bir inhibisyon görünür. *Pistia* bitkisinde proteinin inhibe olması bitki hücrelerinde ki akut oksidatif strese neden olur (Upadhyay R.K. ve diğ. 2009).

Diğer bazı araştırmalarda ise, düşük Cu konsantrasyonlarının bitkinin protein miktarları ile biyokütlelerinde artışa neden olduğu ve bu durumun düşük moleköl ağırlıklı stres proteinlerinin indüksiyonundan kaynaklandığı öne sürülmüştür (Prasad ve diğ 2001; Cuypers ve diğ 2006; S.D.L. Toppi ve diğ., 1999).

Ağır metal stresinin bitkide oluşturduğu önemli etkilerden biri protein sentezini etkileyerek bitkideki protein içeriğini azaltmaktır. Protein miktarı bir organizmada geriye dönüşümlü veya dönüşümsüz değişimlerin önemli bir göstergesidir ve bu değişimlerin doğal ve ksenobiyotik tüm streslere karşı bir cevap olduğu bilinir (Liu, S. ve diğ. 2005; Hou, W. ve diğ. 2007).

### **5.2.3. Bitkinin kök ve yapraklarında prolin miktarı**

Bitkideki prolin miktarlarına bakarsak; kontrole göre, 50  $\mu\text{M}$  Cd %55, 500  $\mu\text{M}$  Cu % 64 ve 1500  $\mu\text{M}$  Cu %27 azalırken, 150  $\mu\text{M}$  Cd %45 oranında artmıştır. Kökler ise kontrole göre 50  $\mu\text{M}$  Cd %30, 150  $\mu\text{M}$  Cd %60 ve 500  $\mu\text{M}$  Cu % 25 oranında azalırken, 1500  $\mu\text{M}$  Cu kontrolle yaklaşık aynı değerdedir. Görüldüğu gibi kökler ve yapraklar birbirine paralellik göstermemektedir. Bu sonuçlara göre bitkinin genelinde prolin miktarlarında bir artış olmamıştır.

Çeşitli araştırmacılar tarafından prolinin su kıtlığı, sıcaklık, ağır metal gibi çevresel streslere cevap olarak bitkide biriktiği belirtilmektedir (Shah, ve Dubey, 1998; Mehta ve Gaur, ve diğ., 1999, Bayçu ve diğ., 2008). Bu konuyla ilgili bazı çalışmalarda prolinin bir stres septomu olduğu belirtilmiştir (Lutts ve diğ., 1996; ClaussenW., 2005).

Bir aminoasit olan prolin, stres altındaki bitkilerde hücre ve dokuların zarar görmesini önlemek amacıyla bitki tarafından içsel olarak üretilen bir organik bileşiktir. Stres koşulları sona erdiğinde kendiliğinden ve geriye bir hasar bırakmaksızın normal değerlere dönmektedir (Chen ve diğ., 2004).

Prolin antioksidan enzimlerin aktivitesini ve glutasyon içeriğini artırır, ağır metallerin şelatlanarak detoksifikasyonunu sağlar, strese maruz kalan bitkinin osmotik dengesini korur, oksidatif strese karşı hidroksil radikalleri ortadan kaldırır ve protein stabilitesini

koruyarak bitkinin zararını en aza indirir (Farago and Mullen 1979; Shah ve Dubey, 1997; Jin Xu ve diğ., 2009).

Bazı stres durumlarında prolin birikiminin bitkide azalması, prolin biyosentezindeki enzimlerin aktivasyonu veya indüksiyonunun azalması, glutamatın okside olması veya protein sentezinde prolin kullanımının azalması nedenine bağlı olabilir (Delauney ve diğ., 1993; Claussen, W., 2005). Prolin, patates gibi bitkilerde osmotik düzenleyici olarak görev yapar ve stres türlerine göre bitkide artar ya da azalır (Büssis ve Heineke, 1998). *Arachis hypogaea* ile yapılan bir araştırmada tohumlarına 25- 50 ve 100  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  uygulanmış ve 10 gün uygulama sonunda prolin miktarlarına bakıldığında Cd konsantrasyonuna bağlı olarak artış görülmüştür (Dinakar, N. Ve diğ., 2008).

*Silene vulgaris*'in metale toleranslı olan ve olmayan ekotipleriyle yapılan araştırmada, bitkilere Cu, Cd ve Zn uygulanmış ve yapraklarda prolin miktarının oldukça arttığı özellikle de metale toleranslı olan ekotiplerde toleranslı olmayan ekotiplere göre prolin miktarının 5-6 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Schat ve diğ., 1997). Farklı konsantrasyonlarda Pb ve Cd' a maruz bırakılan iki buğday varyetesiyle (*Triticum aestivum* L. cv. Gerek-79 ve Bolal-2973) yapılan çalışmada ise değişik stres koşullarında prolin miktarının arttığı rapor edilmiştir (Öncel I. ve diğ., 2000). Yapılan başka bir çalışmada *Solanum nigrum* L.'nin yapraklarında ve köklerinde hücre içi serbest prolin miktarının Cd uygulamalarıyla arttığı bildirilmiştir (Costa and Morel, 1994; Sun ve diğ., 2009).

Chen ve diğerleri, 2004 yılında pirinç bitkisiyle yaptıkları bir deneyde, dışarıdan uygulanan prolinin köklerde Cu alınımını azalttığı ve Cu'a karşı bir bariyer görevi üstlendiğini belirtmişlerdir.

#### **5.2.4. Bitkinin kök ve yapraklarında antioksidan enzimlerin aktivitesi**

ROS oluşumu hem abiyotik hemde biyotik streslerin ortak bir sonucudur. Bitkiler ROS'ları temizlemek amacıyla antioksidan enzimleri üretirler. Bitkide oluşan oksidatif strese karşı antioksidan enzimlerin biri yada bir kaçını aynı anda aktif olabilir (Xu, Q.S. ve diğ., 2010).

GR, CAT ve GPOX hücre içerisinde farklı yerlerde görev alırlar. Bu enzimler hücrelerde moleküler oksijeni ve suyu azaltarak bunların hidrojen perokside dönüşmesini engeller. GPOX hücre duvarına bağlı veya sitoplazmada, CAT peroksizomlarda, mitokondrilerde ve kısmen sitoplazma bulunur. GR ise hücrelerin sitoplazmasında lokalize olmuştur.

Katalaz, glutatyon redüktaz ve guaiakol peroksidazların aktivitelerinin araştırıldığı çalışmamızda yapraklardaki glutatyon redüktaz (GR) enziminin aktivitesi 50  $\mu\text{M}$  Cd'da %33 artarken, 150  $\mu\text{M}$  Cd'da % 22, 500  $\mu\text{M}$  Cu'da % 16 ve 1500  $\mu\text{M}$  Cu'da % 60 azalmıştır. Yapraklarda yüksek konsantrasyonda Cd'un GR metabolizmasını baskıladığı görülmektedir. Cu uygulamalarında GR aktivitesinin düşmesi Cd ve Cu'nun GR'ı farklı şekilde etkilediği sonucuna varmamıza neden olmuştur.

Köklerdeki durum ise 50  $\mu\text{M}$  Cd'da %12, 150  $\mu\text{M}$  Cd %13 ve 1500 $\mu\text{M}$  Cu'da % 37 oranında GR aktivitesi azalırken, 500  $\mu\text{M}$  Cu'da %6 artmıştır. Uygulanan Cd konsantrasyonları kökteki GR aktivitesini çok az etkilemiştir. Bitkide GR aktivitesinin özellikle Cu'a bağlı olarak azalması, enzimin inhibisyona uğraması şeklinde yorumlanabilir.

GR aktivitesi bitkinin türüne, ağır metal çeşidine ve konsantrasyonuna bağlı olarak artar ya da azalır. Yapılan bir çalışmada *Withinia somnifera* bitkisine 0-10-25-50-100 ve 200  $\mu\text{M}$  Cu uygulanmış ve sonrasında GR enziminin aktivitesine bakıldığında azalma görülmüştür (Khatun, S., ve diğ., 2008). *Arabidopsis thaliana* bitkisiyle yapılan bir çalışmada ise ilk olarak Cd'a dayanıklı bir alt tür ve ikinci olarak da Cd'a duyarlı yabani bir alt tür arasında karşılaştırmalı deney yapılmıştır. Araştırmada bitkilere 500  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub> verilmiş ve Cd toksisitesi ile oksidatif stres arasındaki ilişki incelenmiştir. 21 gün süreyle uygulanan Cd sonucunda, GR aktivitesi özellikle dirençli türde daha çok azalmıştır (Cho Un-H. ve diğ. 2005).

Ağır metal uygulamalarında GR aktivitesindeki azalma okside glutatyon (GSSG)'a bağlı NADP(H)'ın parçalanmasından kaynaklanır. GSSG'nin indirgenmesi çok aşamalı bir reaksiyondur. Başlangıç olarak enzim NAHPH tarafından indirgenir. İndirgenmiş

glutasyon redüktaz GSSG molekülü ile reaksiyona girer ve bu reaksiyon bir disülfit değişimi ile sonuçlanır. Sonuçta GSH molekülü ve GR<sub>red</sub> – SG kompleksi ortaya çıkar. GR<sub>red</sub> – SG kompleksinde ikinci bir disülfit değişimi ile sonuçlanan bir elektron düzenlemesi gerçekleşir. İkinci GSH molekülünün enzimden ayrılması ile enzim tekrar okside forma dönüşür (Hou, W. C., ve diğ., 2004; Khatun,s., ve diğ., 2008).

Bazı durumlarda ise Cd'a maruz kalan bazı bitkilerde GR aktivitesi artmıştır (Chaoui ve diğ., 1997; Stroinski ve diğ., 1999; Schickler ve Caspi, 1999). Bezelye köklerinde yürütülen Cd uygulamaları (Vivek,d., ve diğ., 2001) ve farklı biber türleri üzerinde yürütülen çalışmalarda da (León, A. M., ve diğ., 2002) GR aktivitesinin arttığı bildirilmiştir.

GR aktivitelerindeki artış oksidatif strese karşı bir cevap olarak görülmekte (Stroinski A., ve diğ., 1999) ve GR'ın da askorbat-glutasyon döngüsünde ROS'lara bağlı Cd'un detoksifikasyonunda görev aldığı düşünülmektedir ( Stevens ve diğ., 1997).

Araştırmamızdaki diğer bir enzim olan katalaz (CAT)'ın aktivitesi yapraklarda 50 µM Cd'da %30, 150 µM Cd'da %72, 500µM Cu'da %71 ve 1500µM Cu'da %67 oranında azalmıştır. Köklerde ise 50µM Cd'da %88, 150 µM Cd'da %74, 500µM Cu'da %60 ve 1500µM Cu'da %45 oranında azalmıştır. Ağır metale maruz kalan *Brachychiton populneus*' da CAT'in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i parçaladığı ve bunu da aktivitesini düşürerek gösterdiği saptanmıştır.

CAT bitki hücrelerinde aktif oksijen türlerini ortadan kaldırır, hidrojen peroksidin seviyesini kontrol eder ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin toksisitesine karşı savunmada görev alır (Upadhyay R. K ve diğ. , 2009 ).

Soya fasulyesi hücreleriyle yürütülen bir çalışmada Cd uygulamasının CAT aktivitesini azalttığı belirtilmiştir (Sobkowiak R. ve diğ., 2004). Cd'a duyarlılıkları farklı olan biber türleri üzerinde yürütülen çalışmalarda CAT aktivitesinin Cd uygulamasında az da olsa düştüğü bildirilmiştir (León Ana M. ve diğ., 2002). Tiryakioğlu (2002) iki farklı arpa çeşidi (Tokak ve Hamidiye) üzerinde kadmiyuma karşı dayanıklılık çalışmaları yapmış

ve 0- 60  $\mu\text{M}$  Cd uygulamıştır. CAT aktivitesi uygulama gruplarında ilk önce azalmış ve Cd daha yüksek konsantrasyonlara ulaştığında ise tekrar artmıştır.

*Phaseolus vulgaris* bitkisiyle yapılan bir çalışmada, bitkiye 96 saat süreyle 5 $\mu\text{M}$  Cd uygulanmış ve uygulama sonunda CAT aktivitesi kökte ve yaprakta düşmüştür (Chaoui, A. 1997). Diğer bir deneyde ise *Phaseolus vulgaris* bitkisine Cu uygulanmış ve benzer sonuçlar görülmüştür (Weckx ve Clijsters, 1996).

Bazı farklı çalışmalarda ise CAT aktivitesi artış göstermiştir. Soya fasulyeleriyle yapılan bir araştırmada  $\text{CdCl}_2$  uygulaması yapılan bitkide CAT aktivitesi artmıştır. Bu sonuçlar, CAT tarafından  $\text{H}_2\text{O}_2$  konsantrasyonunun düzenlendiğini ve  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin üretiminin kontrol edildiğini göstermektedir (Fornazier, R. F. ve diğ., 2002).

*Ulva lactuca* ile yapılan bir deneyde 100  $\mu\text{M}$  'a kadar Cu uygulanmış 24 saat sonra bitkide Cu birikimi artmıştır, buna bağlı olarak süperoksit radikalleri ve hidrojen peroksit üretiminde artmıştır ve CAT'in aktivitesinde 12 saat Cu uygulamasında artış görülürken 18 saat sonra düşmeye başlamıştır (Upadhyay R. K ve diğ., 2009). *Raphanus sativus* L. bitkisiyle yapılan araştırmada ise su kültüründe 72 saat boyunca 0,25-1 $\mu\text{M}$  arası  $\text{CdCl}_2$  uygulanmış ve yaprak ve köklerde CAT ve GR analizi yapılmış ve sonuç olarak köklerde CAT ve GR aktivitesi artmıştır (Vittória ve diğ., 2002).

CAT peroksizomlarda bulunan peroksitleri serbest bırakır ve böylece zararlı olan  $\text{H}_2\text{O}_2$  katalizlenir. Sonuç olarak CAT, ROS'ları peroksizomlarda inhibe eder ve toksik etkilerini azaltır (Vittória ve diğ., 2002).

Son olarak araştırılan guaiakol peroksidaz (GPOX) enziminin aktivitesi yapraklarda 50  $\mu\text{M}$  Cd'da %106, 150  $\mu\text{M}$  Cd'da %73, 500 $\mu\text{M}$  Cu'da %50 oranında artarken 1500  $\mu\text{M}$  Cu 'da %6 oranında kontrole göre azalır. Köklerde ise 50  $\mu\text{M}$  Cd'da %63, 500  $\mu\text{M}$  Cu'da %144 oranında artış varken, 150  $\mu\text{M}$  Cd'da %63 ve 1500  $\mu\text{M}$  Cu'da %44 oranında kontrole göre bir azalma mevcuttur. Bulgularımıza baktığımızda uygulanan Cd konsantrasyonlarında ve düşük Cu konsantrasyonunda yaprakta GPOX aktivitesi artarken yüksek Cu konsantrasyonlarında GPOX aktivitesi bastırılmıştır.

GPOX stres belirleyici bir enzimdir ve ağır metaller tarafından meydana gelen stresi belirtmek amacıyla birçok araştırmacı tarafından bir stres işaretçisi olarak kullanılmakta ve aktivitenin metal birikimiyle bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Pek çok bitki türüyle yapılan çalışmalarda, bitkinin ağır metali almasına bağlı olarak peroksidaz aktivitesinin hızlı bir şekilde artışa geçtiği vurgulanmıştır (Chaoui ve diğ., 2004; (Bayçu ve diğ., 2006).

Pb akümülatörü olan *Sesbania drummondii* bitkisiyle yapılan bir deneyde GPOX aktivitesinde artış gözlenmiştir (Ruley, A.T., ve diğ., 2004). Cd'a maruz bırakılan *Phaseolus vulgaris* bitkisinde fitotoksitesisi ve oksidatif stres arasındaki ilişki araştırılmış ve GPOX enziminin aktivitesine bakılmıştır. GPOX aktivitesi Cd uygulaması sonunda özellikle gövdede artmıştır. Bu bitkinin strese girdiğini göstermektedir. Ancak, peroksidaz aktiviteleri yalnızca ağır metal stresiyle artmaz, diğer çevresel streslerde de artabilir.

GPOX'un bitkinin hücre duvarlarını sınırlamada bir rol oynadığı ve böylece bitkinin gövde büyümesini engelleyerek strese cevap verdiği söylenebilir (Chaoui A ve diğ., 1997). *Triticum aestivum* L. bitkisine 0- 33  $\mu$ M Cd uygulanmıştır ve bu uygulamalar sonunda kontrole göre bitkinin yapraklarındaki antioksidan enzimlerin aktivitelerinde uygulanan düşük konsantrasyondaki Cd'lar kontrole göre fazla değişmemiştir. 10  $\mu$ M Cd'da CAT ve GPOX enzim aktiviteleri en yüksektir. GR' da ise durum biraz farklıdır ve uygulanan konsantrasyon arttıkça enzim aktivitesi artmakla birlikte 10  $\mu$ M Cd konsantrasyonundan sonra düşmeye başlamıştır. Bu bulgulara göre bitkinin 10  $\mu$ M Cd'a kadar bünyesinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biriktirmediği, birikimin 10  $\mu$ M Cd'dan sonra olduğu ve CAT ile GPOX aktivitelerinde artış görüldüğü ifade edilmiştir (Lin R. ve diğ. 2007).

*Bacopa monnieri* L. bitkisiyle yapılan araştırmada *B.monnieri* bitkisine 1, 2, 4 ve 7 gün boyunca 100  $\mu$ M Cd uygulanmış ve antioksidan enzim aktiviteleri incelenmiştir. Çalışmada, düşük konsantrasyonlarda (1-5  $\mu$ M) yapraktaki GR aktivitesi fazla bir değişikliğe uğramazken, yüksek konsantrasyonlarda ve uygulama süresi arttıkça aktivite düşmüştür. Bu durum kök için de geçerlidir. Çalışmadaki CAT aktivitesine bakıldığında uygulama süresi arttıkça enzim aktivitesi yaprak ve kökte de artmıştır. GPOX aktivitesi ise yapraklarda uygulama süresi arttıkça 50  $\mu$ M Cd'a kadar artmış 100

$\mu\text{M}$  Cd'dan itibaren düşmüştür. Kökte ise GPOX aktivitesi 10  $\mu\text{M}$  Cd'a kadar artmış 25, 50 ve 100  $\mu\text{M}$  Cd'da azalmıştır. *Bacopa monnieri L.* bitkisinde antioksidan enzimler kök ve yaprakta farklı aktiviteler göstermiştir (Mishra S. ve diğ., 2006). Yapılan çalışmanın sonuçları bizim araştırmamızla paralellik göstermektedir.

Akuatik makrofit olan *Hydrilla verticillata* (L.f) Royle' de 1-7 günlük periyodlarla 0.1–25  $\mu\text{M}$  Cu uygulaması yapılmış ve sonrasında GPOX ile CAT aktivitesi araştırılmıştır. 1  $\mu\text{M}$  Cu uygulanan bitkilerde gerek GPOX ve gerekse CAT enzimlerinin her ikisinde de 7 gün boyunca artış görülmüştür. 25  $\mu\text{M}$  Cu uygulamasında GPOX, 5 ve 25  $\mu\text{M}$  Cu uygulamalarında ise CAT aktivitesine azalmalar olmuştur. GR aktivitelerinde ise, 1  $\mu\text{M}$  Cu uygulamasında artış saptanırken, 5 ve 25  $\mu\text{M}$  Cu uygulamalarında azalmalar kaydedilmiştir (Srivastava, S. ve diğ., 2005).

Cd uygulanan *Phragmites australis* bitkisinde yapılan çalışmada, SOD, APX, CAT ve GR antioksidan enzimleri artmıştır. Bitki metabolizması ile ilgili işlevler ve glutatyon miktarı bitkinin kök, gövde ve yapraklarında azalmalar görülmüştür. Askorbik asit ve GPOX aktivitesi ise sadece yapraklarda düşmüştür. Bu sonuçlara göre kök ve gövdenin aynı konsantrasyondaki Cd'a cevabı yapraklara göre daha güçlüdür ( Iannelli M. A. ve diğ., 2002).

Guaiakol peroksidaz, bitki çeşitli streslere maruz kaldığında bu streslere cevap olarak sentezlenir. Fizyolojik ve biyokimyasal olarak büyümede, etilen biyosentezinde, meyve gelişiminde ve hücre oluşumunda yavaşlamaya neden olur.

Sonuç olarak, Cu madeni atığında daha önceden saptanmış olan (Bayçu, G., 2007) Cd ve Cu konsantrasyonlarında 12 gün süreyle yetiştirilen bitkilerin kök, gövde ve

yapraklarında aşırı bir ağır metal birikimi gözlenmemiştir. Ağır metal alımı ile ilgili kaçınma mekanizmalarında, musilaj ve kalloz gibi maddeleri içeren ve köklerin apikal bölgesinden salgılanan karbonhidratların ağır metallerle yüksek oranda bağlanabildiği ve ağır metal stresini engellemeye yönelik bir savunma stratejisi geliştirdiği bilinmektedir. Uygulanan yüksek konsantrasyonlara rağmen ağır metal birikiminin az olması, köklerde morfolojik olarak gözlemediğimiz musilajla ilişkili olabilir.

Alınan az miktardaki Cu ve Cd konsantrasyonlarının özellikle gövdede lokalize olması bitkinin kök ve yapraklarında gelişen fitotoksosite derecesini düşürmekle birlikte, klorofil, taze ve kuru ağırlıklar ile protein parametrelerinde belli ölçülerde azalmalar görülmüştür. Stres sonucu oluşan ROS'ların giderilmesinde yer alan enzimatik aktiviteler ile stres belirteci olan prolin miktarlarının, kök ve yapraklara, ağır metal türüne ve konsantrasyonlarına bağlı olarak değişiklikler gösterdiği kaydedilmiştir.

Birikimin az olması nedeniyle, *Brachychiton populneus*' un akümülatör, hiperakümülatör ya da indikatör bitki olamayacağı, ancak potansiyel bir ekskluder bitki olabileceği düşünülmektedir

Bulgularımızın ışığında, yeterince ağır metal birikimi göstermeyen *Brachychiton populneus* ağaç türüyle fitoremediasyon çalışmalarının yürütülemeyeceği ve ayrıca su kültürlerinde yetiştirilmeye uygun olmadığı sonucuna varılmış olmakla birlikte kuraklık ile ilgili araştırmalarda başarıyla kullanılabilirliği söylenebilir.

Daha önce bu bitkiyle yapılan ve ağır metal stresinin ekofizyolojik, biyokimyasal, moleküler biyolojik ve çevre biyoteknolojisi yönünden değerlendirildiği benzer bir çalışmanın bulunmaması nedeniyle daha detaylı araştırmalara gereksinim duyulmaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

- AEBİ, H., 1984, Catalase in vitro. In: methods enzymology. Packer L. (Editor) Academic Pres, New York, 105- 121-6
- ALLEN, R.D., 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiology*, Vol.107-1049–1054.
- Anonim 1, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Kakaogiller> (04.06.2010)
- Anonim2, [www.anbg.gov.au/gnp/brachyichitonpopulneus.html](http://www.anbg.gov.au/gnp/brachyichitonpopulneus.html) (03.06.2010).
- Anonim 3, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Prolin> (06.06.2010)
- ARDUİNİ, I. , GODBOLD, DL. ve ONNİS, A. , 1994. Cadmium and copper change root growth and morphology of *Pinus pinea* and *Pinus pineaster* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 92- 675-680.
- ARNON, D., 1949, Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiology*, 24-1.
- ASADA, K., ve TAKAHASHI, M., 1987, Production and scavenging of active oxygen radicals in photosynthesis. Photoinhibition. Kyle D.J., et al. (eds.), *Elsevier*, 227-297.
- ASADA, K., 1999, The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons, *Annual Review of Plant Physiology And Plant Moleculer. Biology*, 85- 235-241.
- ASHRAF, M., 1994, Breeding for salinity tolerance in plants, *Plant Science*, 13 (1)-17-42.
- AZEVEDO, R.A. ve LEA, P. J. , 2005, Toxic metals in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 17-1.
- BAYÇU, G. ve ÖNAL, M., 1993, ‘An Investigation of the Levels of Cadmium and Lead in the soils and in the Leaves of selcted specimens of *Alianthus altissima* Found growing beside A Freeway in istanbul’, *İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Dergisi*, 56-21-34.
- BAYÇU, G., ERUZ, E., CANER, H., GÖNENÇGİL, B., 1999. Heavy Metal Stres and Peroxidases: I. Peroxidase Activity and Chlorophyll Content in Response to Cadmium and Lead in *Pinus pinea* L. *Plant Peroxidase Newsletter*, 12,13-21.

- BAYÇU, G. 2002, Phytochelatin biosynthesis and cadmium detoxification. *Journal Cell Moleculer. Biology*, 1-45-55.
- BAYÇU, G, 2003, Çevre Kirliliğinin Bitkilerle Giderilmesi: Fitoremediasyon, 21. Yüzyılın Bilimi Biyolojide Son Gelişmeler V (Sistemik ve Çevre Biyolojisi), Yaz Eğitimi, i. Ü. Fen Fak. Biyoloji bölümü, 114-124.
- BAYÇU, G., TOLUNAY, D., ÖZDEN, H., ve GÜNEBAKAN, S., 2006, Ecophysiological and seasonal variations in Cd, Pb, Zn, and Ni concentrations in the leaves of urban deciduous trees in İstanbul, *Environmental Pollution*, 143-545-554.
- BAYÇU G. 2007, Plant species of CMC mining waste area and heavy metal accumulation. Poster paper, International Conference on Environment: Survival and Sustainability, Lefkoşa, North Cyprus, 19-24 february. In: MT-11 Environmental Science and Technology (Gökçekuş H, ed.), pp. 545- 546.
- BAYÇU, G., ÖZDEN, H., GÖREN- SAĞLAM, N., AND S.E. ROGNES, Effect of Cd, Pb, chilling and droughttreatments on activity of five antioxidant enzymes and free proline level in Albizzia leaves, FESPB congress,17-24 August2008, Tampere- Finland, *Physiologia Plantarum*,133
- BAKER A. J. M., 1981, Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals, *Journal of Plant Nutrition*, 3-643– 54.
- BAKER, A.J.M VE BROOKS R.R, 1989, Terrestrial higher plants which Hyper accumulate metallic elements-a review of their distribution, *Ecology and Phytochemistry, Biorecovery*, 1-81- 26.
- BARMAN, S.C., SAHU, R.K., BHARGAVA, S.K. ve CHATERJEE, C., 2000. Distribution of heavy metals in wheat, mustard, and weed grown in field irrigated with industrial effluents, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64-489- 496.
- BATES L.S., WALDREN R.P. ve TEARE, I.D., 1973, Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil*, 39-205–7.
- BENAVIDES, M. P. , GALLEGO, S. M. ve TOMARO, M. L., 2005, Cadmium toxicity in plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1)-21- 34.
- BRAY, E.A., BAILEY-SERRES, J., ve WERETILNYK, E., 2000, Responses to abiotic stresses. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Buchanan, B.B. Grissem, W.y and Jones, R.L. (eds.), *American Society of Plant Physiologists*, Rockville, Maryland. Syf: 1158- 1203.
- BRECKA, H., BRIBER, K.A. ve CATALFAMA, J.L., 1973, Comparative studies on tobacco pith and sweet potato root isoperoxidases in relation to injury, indolacetic acid and ethylene effects, *Plant Physiology*, 52- 43-49.

- BREKKEN, A. VE 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.
- BREWEN, L.E, MEHRA, A, LYNCH, P.T. , ve FARAGO, M.E. , 2003, Mechanisms of copper tolerance by *Armeria maritima* in Dolfrwynog Bog, North Wales— initial studies. *Environmental Geochemical Health*; 25-147– 56.
- BUIST, M., YATES,, C.J. ve LADD, P.G., 2000, Ecological characteristics of *Brachychiton populneus*(Sterculiaceae) (kurrajong) in relation to the invasion of urban bushland in south-western Australia, *Australia Ecology*, 25-487–496.
- BUSSIS, D. ve HEINEKE, D., 1998, Acclimation of potato plants to polyethylene glycol-induced water deficit. II. Contents and subcellular distribution of organic solutes, *Journal of Experimental Botany*. 49-1361-1370.
- CASPI, V., DROPPA, M., HORVATH, G., MALKIN, S., MARDER, J.B. ve RASKIN, V.I., 1999. The effect of copper on chlorophyll organization during greening of barley leaves, *Photosynthesis Research*, 62-165–174.
- CHAOUI A, MAZHOUDI S, GHORBAL M H. ve EL FERJANI E., 1997, Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L), *Plant Science*, 127-139–147.
- CHAOUI, A. ve 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.
- CHATTERJEE , J. ve CHATTERJEE, C., 2000, 'Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower', *Environmental Pollution*, 109-69±74.
- CHEN, C.T., CHEN, T.H., LO, K.F.ve CHIU, C.Y., 2004, Effects of proline on copper transport in rice seedlings under excess copper stress, *Plant Science*, 166-103–111.
- CHO UN-H, 2005, Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation, *Plant Science*, VOL 168- 113- 120.
- CLAUSSEN, W., 2005, Proline as a measure of stress in tomato plants, *Plant Science*, 168-241–248.
- CELEMENS, S., 2001, Moleküler Mechanism of Plant metal Tolerance and Homeostasis, *Planta*, 212-475-486.
- COBBETT, C. S.,2000. Phytochelatin Biosynthesis and Function in Heavy-metal Detoxification. *Curr Opin Plant Biology*, 3-211–6.
- COSTA, G., ve MOREL, J., 1994, Water relations, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce. *Plant Physiology Biochemical*, 32-561–570.

- CUYPERS, A., KOISTINEN, K., KOKKO, H., KÄRENLAMPI, S., AURIOLA, S. ve VNAGRONSVELD, J., 2005, Analysis of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins affected by copper stress, *Journal of Plant Physiology*, 162-383–392.
- DAVIES, B.E., 1995, Lead and other heavy metals in urban areas and consequences for the health of their inhabitants. *Environmental Contaminants, Ecosystems and Human Health*. Majumdar, S.K., Miller, E.W., and Brenner, F.J., (eds), *The Pennsylvania Academy of Science, Easton P.A., USA*. syf. 287-307.
- DELAUNEY A.J., ve VERNA, D.P.S., 1993, Proline biosynthesis and osmoregulation in plants, *Plant Journal*, 4-215–223.
- DEMIREVSKA-KEPOVA, K. , SIMOVA-STOILOVA, L. , STOYANOVA, Z., HOLZER, R. VE FELLER, U., 2004. Biochemical changes in barely plants after excessive supply of copper and manganese. *Environmental and Experimental Botany*, 52-253–266.
- DIETZ, K.J., BAIER, M., AND KRÄMER, U., 1999, Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. *Heavy Metal Stress in Plants: from molecules to ecosystems*. Prasad, M.N.V., and Hagemeyer, J. (eds.), Springer-Verlag, Berlin. Syf: 73-98.
- DINAKAR, N, NAGAJYOTHI, P.C., SURESH, S., UDAYKIRAN, Y. ve DAMODHARAM, T., 2008, Phytotoxicity of cadmium on protein, proline and antioxidant enzyme activities in growing *Arachis hypogaea* L. seedlings, *Journal of Environmental Sciences* 20-199-206.
- EPA, 2000, Environmental Protection Agency, “Introduction to Phytoremediation”, *Epa/600/R-99/107*, Cincinnati, Ohio, U.S.A, syf 72,
- ERNST, W.H.O., VERKLEIJ, J.A.C. ve SCHAT, H., 1992. Metal tolerance in plants. *Acta Botanica Neerl*, 41-229–248
- FARAGO M.E. ve MULLEN W.A., 1979 Plants which accumulate metals, A possible copper-proline complex from the roots of *Armeria maritima*, *Chim Acta*, 32-93–94.
- FORNAZIER, R.F., FERREIRA, R.R., VITÓRIA, A. P, MOLINA S.M.G., LEA, P. J. ve AZEVEDO, R.A. 2002, Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities in sugar cane, *Biology of Plants*, 41-91–97.
- FOYER, C.H., 1993, Ascorbate. Antioxidants in higher plants. Alscher, R.G., and Hess, J.L. (eds.), CRC Press, Boca, Raton, syf: 31- 52.
- FRIDOVICH, I., 1995, Superoxide radical and superoxide dismutases, *Annual Review of Biochemistry*, 64-97-112.

- GARRATT, L.C., JANAGOUDAR, B.S., LOWE, K.C., ANTHONY, P. POWER, J.B. ve DAVEY, M.R., 2002, Salinity tolerance and antioxidant status in cotton cultures, *Free Radical Biology and Medical*, 33 (4)-502-511.
- GHNAYA, T., NOUAIRI, I., SLAMA, I., MESSEDI, D., GRIGNON, C., ABDELLY, C. ve GHORBEL, M. H., 2005. Cadmium Effects on Growth and Mineral Nutrition of Two Halophytes: *Sesuvium portulacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum*. *Journal of Plant Physiology*, 162-1133- 1140.
- GODZIK, B., 1993, Heavy metal contents in plants from zinc dumps and reference area, *Pollution. Botanical. Study*, 5-113-132.
- GREGER, M. , JOHANSSON, M., STIHL, A., ve HAZMA, K., 1993, Foliar uptake of Cd by pea (*Pisum sativum*) and sugar beet (*Beta vulgaris*), *Physiology Plantarum*, 88-563- 570.
- GREGER, M., 1999, Metal availability and bioconcentration in plants. Heavy Metal Stress in Plants from molecules to ecosystem. Prasad, M.N.V., and Hagemeyer, J., (eds.), *Springer-Verlag*, Berlin. syf. 1- 27.
- HALLIWELL, B. ve GUTTERIDGE, J., 1984, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochemical Journal*, 219-1–14.
- HALLIWEL, B., ve GUTTERIDGE, J.M.C., 1999, Free Radicals in Biology and Medicine, (3. Ed), *Oxford University Press*, New York.
- HARRISON, R.M., ve CHIRGAWI, M.B., 1989, The assessment of air and soil as contributors of some trace metals to vegetable plants I. Use of a filtered air growth cabinet, *Sci. Total Environ.*, 83-13-34.
- HE, Z., LI, J., ZHANG, H., ve 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.
- HENRY, J., 2000., An Overview of the Phytoremediation of Lead and Mercur., U.S. Epa, Office of Solid Waste and Emergency Response Technology Innovation Office. 51, syf.
- HODGES, D.M, DELONG, J.M., FORNEY, C.F., ve PRANGE, R.K., 2000, Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering commponuds, *Planta*, 207-604-611.
- HOU, W., CHEN, X. , SONG, G., WANG, Q. ve CHANG, C.C., 2007, Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted water body restoration by duckweed (*Lemna minor*), *Plant Physiology and Biochemistry*, 45-62–69.

- IANNELLÌ, M.A., PIETRİNÌ, F., FIORE, L., PETRILLÌ, L. ve MASSACCÌ, A., 2002, Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 40-977–982.
- JACKSON, P.J., UNKEFER, P.J., DELHAÏZE, E., ve ROBINSON, N.J., 1990, Mechanisms of trace metal tolerance in plants. *Environmental Injury to Plants*. Katterman, F., (ed.), Academic Press, San Diego. syf. 231- 258.
- JIN XU, HENGXIA YIN ve XIA LI, 2009, Protective effects of proline against cadmium toxicity in micropropagated hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. *Plant Cell Rep*, 28-325–333
- KABATA- PENDIAS, A. ve PENDIAS A.H., 1986, *Trace Elements in Soils and Plants*, CRC Pres. LLC(3. Ed.) Boca Raton, Florida.
- KABATA- PENDIAS, A. ve MUKHERJEE, A.B. 2007, Trace element from soil to human, *Springer*, Berlin Heidelberg New york 1-519.
- KAHVECİOĞLU, Ö. , KARTAL, G., GÜVEN, A. ve TİMUR, S. , 2001, Metallerin çevresel etkileri -1, *İTÜ, Metalürji ve Malzeme Müh. Bölümü Metalürji Dergisi*, 136- 47-53.
- KALYANARAM, B., 1996, Thiol radicals in biological systems: significant or trivial?, *Biochemical. Society Symposia*, 61-55-63.
- KHATUNA, S., 2008, Copper toxicity in *Withania somnifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of *in vitro* grown plants, *Environmental and Experimental Botany*, 64-279–285.
- KOÇ E. ve ÜSTÜN A. S. , 2008, Patojenlere karşı bitkilerde savunma ve antioksidantlar, *Erciyes Üni. Fen Bilimleri Enst. Der.* 24 (1-2)- 82 - 100
- KÖLELİ, N., EKER, S., ve ÇAKMAK, I., 2004. Effect of zinc fertilization on cadmium toxicity in durum and bread wheat grown in zinc-deficient soil, *Environmental Pollution*, 131-453-459.
- KÖLELİ, N. Ve KANTAR, Ç., 2006, Fosforlu gübrede ağır metal tehlikesi' *Ekoloji magazin dergisi*, 9. sayı.
- KUKKOLA, E., RAUTIO, P. ve HUTTUNEN, S., 2000, Stress indications in copper- and nickel-exposed Scots pine Seedlings, *Environmental and Experimental Botany* , 43-197–210.
- LASAT, M.M., 2000, Phytoextraction of metals from contaminated soil: A review of plant/ soil/ metal interaction and assessment of pertinent Agronomic Issues. *Journal of Hazardous Substance Research*, 2(5)-1- 25.

- LEÓN A.M., PALMA, J.M., CORPAS, F.J., GÓMEZ, M., ROMERO- PUERTAS, M.C., CHATTERJEE, D., MATEOS, R.M., RÍO, L.A. ve SANDALIO, L.M., 2002, Antioxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium, *Plant Physiology and Biochemistry*, 40-813–820.
- LEWITT, J., 1980, Responses of plants to environmental stresses, Vol, II, (2.ed.), *Academic Press*. New York, syf: 607.
- LOMBARDI, L., 2005, Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants, *Plant Science* , 168-797–802.
- LOMBI, E., TEARALL, K. L., HOWARTH, J. R., ZHAO, F. J., HAWKESFORD, M. J. ve MCGRATH, S. P., 2002. Influence of Iron Status on Calcium and Zinc Uptake by Different Ecotypes of the Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology*, 128-1359–67.
- LICHTENTHALER, H.K., 1998, The stress concept in plants: An introduction, *Annals of The NewYork of Sciences*, 851-187-198.
- LIN, R., WANG, X., LUO, Y., DU,W., GUO, H. ve YIN, D., 2007, Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum L.*) , *Chemosphere*, 69-89–98.
- LINDBERG, S., MEYERS, T.P., TAYLOR G.E.J., TURNER, R.R., ve SCHROEDER, W.H., 1992, Atmosphere–surface exchange of mercury in a forest: results of modeling and gradient approaches, *Journal of Geophysical Research*, 97-2519-2528.
- LIU, S., LI, P.J. ve QI, X.M.,2005, DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis, *Chemosphere* ,61-158–167.
- LORING, D.H. ve RANTALA, T.T., 1992, ‘Manual for the geochemical analyses of marine sediments and suspended particulate matter’, *Earth-Science. Review*, 32-235–83.
- LU, C.M., CHAU, C.W., ve ZHANG, J.H., 2000. Acute Toxicity of Excess Mercury on The Photosynthetic Performance of *Cyanobacterium, S. platensis*- Assessment by Chlorophyll Fluorescence Analysis. *Chemosphere.*, 41-191- 196.
- LUTTS, S., KINET, J.M., ve BOUHARMONT J., 1996, Effects of salt stress on growth, mineral nutrition and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice cultivars differing in salt resistance. *Plant Growth Regulation*, 1-207–218.
- MA, L.Q., KOMAR, TU, C., ZHANG W., CAI, Y. Ve KENNELLY, E.D. 2001, A fern that hyper accumulates arsenic, *Nature*,409-579- 582.

- MACFARLANE, G.R., ve 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.
- MAYWALD, F. Ve WERGEL, H.J., 1997. Biochemistry and molecular biology of heavy metal accumulation in higher plants. *Landbauforsch*, volk. 47-103, 126.
- MEHTA, SK, ve GAUR, JP., 1999, Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. *Journal of Botanical*, 143-253–259.
- MENCH, M., MOREL, J.L., CUCKERT, A., AND GUILLET, B., 1988, Metal binding with root exudates of low molecular weight, *Journal of Soil Science*, 33-521-527.
- MIRSAL IA, 2004 Soil pollution: origin, Monitoring and Remediation. *Springer – Verlag Berlin Heidelberg*
- MISHRA, S., SRIVASTAVA, S., TRIPATHI, R.D., GOVINDARAJAN, R., KURIAKOSE, S.V. ve PRASAD, M.N.V., 2006, Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44-25–37.
- MONNI, S., UHLIG, C., HANSEN, E. ve MAGEL, E., 2001, Ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to heavy metal pollution, *Environmental Botany*, 112: 121-129,
- MURANYI, A., SEELING, B., LADEWIG, E. ve JUNGK, A., 1994, Acidification in the rhizosphere of rape seedlings and in bulk soil by nitrification and ammonium uptake, *Z. Pflanzenernähr Bodenkd.*, 157-61-65.
- NAGOOR, S., 1997, A study of influence of cadmium and mercury on growth and protein metabolism in cowpea seedlings. *Journal of Physiology Research*, 10-31-34.
- NIKOOKAR, K., MORADSHAHĪ, A., ve HOSSEINI, L., 2005, Physiological responses of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* to copper toxicity, *Biomolecular Engineering*, 22 (4)-141-146.
- NYITRAI, P., BOKA, K., GASPAR, L., SARVARI, E., LENTI, K., ve KERESZTES, A., 2003, Characterization of the stimulating effect of low-dose stressors in maize and bean seedlings, *Journal of Physiology Research*, 160-1175–1184.
- OUARITI, O, GOUIA, H. ve GHORBAL H.M. 1997, Responses of bean and tomato plants to cadmium: Growth, mineral nutrient and nitrate reduction, *Plant Physiology and Biochemistry* 35-347-354
- OUZOUNIDOU, G., ELEFTERIOU, E.P. ve KARATAGLIS, S., 1992, Ecophysiological and ultrastructural effects of copper in *Thlaspi ochroleucum* (Cruciferae). *Canadian Journal of Botany*, 70-947– 957.

- OUZOUNIDOU, G., 1995, Cu-ions mediated changes in growth, chlorophyll and other ion contents in a Cu-tolerans *Koeleria splendens*, *Biologia Plantarum* 37-71-79.
- ÖNCEL, I., KELEŞ, Y. Ve ÜSTÜN, A.S., 2000, Interactive effects of temperature and the metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings, *Environmental Botany*, 107- 315-320.
- ÖZDEN, H.ve 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* Vol.13(3)-268-273.
- PANOU-FILOTHEOU, H., BOSABALIDIS, A. M. ve KARATAGLIS, S., 2001, Effects of Copper Toxicity on Leaves of Oregano (*Origanum vulgare subsp. hirtum*) *Annals of Botany*, 88-207- 214,
- PARIDA, A.K., DAS, A.B. ve MITTRA, B., 2004, Effects of Salt on Growth, Ion Accumulation, Photosynthesis and Leaf Anatomy of the Mangrove, *Bruguiera parviflor.* Trees, 18-167.
- PRASAD , M.N.V., MALEC, P., WALOSZEK, A., BOJKO, M. ve STRZAŁKA , K., 2001, Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation, *Plant Science*, 161: 881–889.
- PRASAD M. N.V., 2008, Cadmium as an Environmental Contaminant: Consequences to Plant and Human Health, Trace Elements as Contaminants and Nutrients: Consequences in Ecosystems and Human Health, Wiley, U.S.A, 7-373-411.
- PENG, K.J., LI, X.D., LUO, C.L., ve 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.
- PINTO, E., SIGAUD-KUTNER, T.C.S., LEITÃO, M.A.S., OKAMOTO, A.K., MORSE D., ve COLEPÍCOLO, P., 2003, Heavy metal-induced oxidative stress in algae, *The Journal of Phycology*, 39-1008-1018.
- POSCHENRIEDER, C. , BECH, J. , LLUGANY, M., PACE, A. , FENES, E. ve BARCELO, J. , 2001, Copper inplant species in a copper gradient in Catalonia (North East Spain) and their potential for phytoremediation. *Plant and Soil*, 230-247– 56.
- PUTHOTÁ, V., CRUZ-ORTEGA, R., JOHNSON, J., ve OWNBY, J., 1991, An ultrastructural study of the inhibition of mucilage reaction in the wheat root cap by aluminium. *Plant-Soil Interactions at Low pH*. Wright, R.J., Baligar, V.C., and Murrmann, R.P. (eds.), Kluwer, Dordrecht. pp.779- 787

- RALPH, P.J., ve BURCHETT, M.D., 1998, Photosynthetic response of *Halophila ovalis* to heavy metal stress, *Environmental Pollution*, 103-91-101.
- REEVES, R.D. ve BAKER, A. J. M., 2000. Metal- Accumulating Plants. in: Raskin, I. and Ensley, B.D., Eds. *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean-Up the Environment*. New York, John Wiley and Sons, syf:193-230.
- RIVETTA, A., NEGRINI, N., ve COCUCCI, M., 1997, Involvement of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin in Cd<sup>2+</sup> toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination, *Plant Cell Environmental*, 20-600-608.
- RULEY, A.T., SHARMA, N.C. ve SAHİ, S.V., 2004, Antioxidant defense in a lead accumulating plant, *Sesbania drummondii*, *Plant Physiology and Biochemistry* 42-899-906.
- SADOWSKY, M. J., 1999. "Phytoremediation: Past Promises and Future Practises" Microbial Biosystems: New Frontiers, Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology, Bell Cr, Brylinsky M, Johnson-Green P Ed, Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- SAĞLAM, N. ve CİHANGİR N., 1995 ,Ağır metallerin biyolojik süreçlerle biyosorbisyonu çalışmaları, *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi* 11-157-161.
- SCANDALIOS, J.G. 1994. *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*, Regulation and properties of plant catalases syf. 275- 316, In C. H. Foyer and P.M. Mullineaux (ed.). CRC Press, London.
- SCANDALIOS, J.G., 2002. The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences*, 27-483-486.
- SCHAT, H., SHARMA, S. S., ve VOOİJS, R. 1997, Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Plant Physiology*, 101-477-482.
- SCHICKLER, H. ve CASPI, H., 1999, Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. *Plant Physiology*. 105-39-44.
- SHAH, K., ve DUBEY, R.S., 1998, Effect of cadmium on proline accumulation and ribonuclease activity in rice seedlings: Role of proline as a possible enzyme protectant, *Biology of Plant*. 40-121-130.
- SHAH, K., KUMAR, R.G., VERMA, S., ve 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.

- SHARMA, S.S., KAUL, S., METWALLY, A., GOYAL, K.C., FINKEMEIER, I., ve DIETZ, K.J., 2004, Cadmium toxicity to barley (*Hordeum vulgare*) as affected by varying Fe nutritional status, *Plant Science*, 166-1287-1295.
- SHARMA P., ve DUBEY, R.S., 2005, Lead toxicity in plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1)-35-52.
- SINGH, S., EAPEN, S., ve S.F.D., SOUZA, 2006, Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. *Chemosphere* 62- 233–246
- SIRIPORNADULSIL, S. , TRAINA, S., VERMA, ve SAYRE, R. T. , 2002, Molecular Mechanisms of Proline-Mediated Tolerance to Toxic Heavy Metals in Transgenic Microalgae, *The Plant Cell*, Vol. 14-2837–2847,
- SINGH, R.P. ve AGRAWAL, M., 2007, Effects of sewage sludge amendment on heavy metal accumulation and consequent responses of *Beta vulgaris* plants, *Chemosphere*, 67- 2229–2240.
- SMEETS, K., CUYPERS, A., LAMBRECHTS, A, SEMANE, B., HOET, P., LAERE, A.V., ve VANGRONVELD, J., 2005, Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application, *Plant Physiology and Biochemistry*, 43-: 437-444.
- SMITH, I. K., VIERHELLER, T. L. ve THORNE, C. A., 1988, Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), *Analytical Biochemistry*, 175-408-413 .
- SOBKOWIAK, R., RYMER, K., RUCIŃSKA, R. ve DECKERT, J., 2004, Cadmium-induced changes in antioxidant enzymes in suspension culture of soybean cells, *Acta Biochimica Polonica*, 51-219-222.
- SOMERS, E., 1974. The Toxic Potential of Trace Metals in Foods. *A Review*, 39-215-217.
- SRIVASTAVA, S., MISHRA, S., TRIPATHI, R. D., DWIVEDI, S., ve GUPTA, D. K., 2006, Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Aquatic Toxicology* 80-405–415.
- STEVENS, R.G, CREISSEN, G.P. ve MULLINEAUX, P.M., 1997, Cloning and characterisation of a cytosolic glutathione reductase cDNA from pea (*Pisum sativum* L.) and its expression in response to stress. *Plant Molecular Biology*. 35-641–654.
- STREET, R.A., KULKARNI, M.G., STIRK, W.A., SOUTHWAY, C. ve STADEN, J. VAN, 2010, Effect of cadmium on growth and micronutrient distribution in wild garlic (*Tulbaghia violacea*), *South African Journal of Botany* 76-332–336.

- STROINSKI, A, KUBIS, J. ve ZIELEZINSKA, M., 1999, Effect of cadmium on glutathione reductase in potato tubers. *Acta Physiologia Plantarum*, 21-201–207.
- SUN, Y.B., ZHOUA,Q., LIUA, W., ANA, J., XUA, Z. ve WANGA, L., 2009, Joint effects of arsenic and cadmium on plant growth and metal bioaccumulation: A potential Cd-hyperaccumulator and As-excluder *Bidens pilosa* L, *Journal of Hazardous Materials* 165-1023–1028.
- TAYLOR, C.B., 1996, Proline and water deficit: Ups, downs, ins and outs. *Plant Cell* 8-1221–1224.
- TESTER, M., ve LEIGH, R.A., 2001, Partitioning of nutrient transport processes in roots, *Journal Experiment of Botanical*, 52-445-457.
- TİRYAKİOĞLU, M., 2002, Effect of Cadmium on Growth and Antioxidant Enzymes in Two Barley Cultivars. *Sabancı Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi*.
- TOPPI, S.D.L. Vve GABBRIELLI, R., 1999, Response to cadmium in higher plants, *Environmental and Experimental Botany*, 41-105–130.
- UPADHYAY, R. K. ve PANDA. S. K., 2009, Copper-induced growth inhibition, oxidative stress and ultrastructural alterations in freshly grown water lettuce (*Pistia stratiotes* L.) *C. R. Biologies*, 332-623–632.
- VANLI Ö., ve YAZGAN M., 2001, Ağır Metallerle Kirlenmiş Toprakların Temizlenmesinde Fitoremediasyon Tekniği, [www. tarimsal. com/ fitoremediasyon/ fitoremediasyon. Html](http://www.tarimsal.com/fitoremediasyon/fitoremediasyon.html). (10.06.2010)
- VERKLEIJ, J.A.C., ve SCHAT, H., 1990, Mechanisms of metal tolerance in higher plants. *Heavy metal tolerance in plant: evolutionary aspects*. Shaw, J. (ed.), CRC Press, Boca Raton. pp. 179-193.
- VERMA S. ve DUBEY R.S., 2003, Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants, *Plant Science*, 164-645-655.
- VITÓRIA, A.P, LEA. PJ ve AZEVEDO R.A, 2001, Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* 57- 710– 710.
- VIVEK, D., VIVEK P. ve SHAM, R., 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. Cv. Azad), *Journal Experiment of Botanical*, 52-1101-1109.
- VOGEL-MÍKUS~ K, DROBNE D, ve REGVAR M., 2005. Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonisation of pennycres *Thlaspi praecox* Wulf (Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and smelter in Slovenia, *Environmental Pollution*, 133-233– 42.

- WANG, S., NAN, Z., LIU, X., LI, Y., QIN, S. VE DING, H., 2009, Accumulation and bioavailability of copper and nickel in wheat plants grown in contaminated soils from the oasis, northwest China, *Geoderma*, 152-290–295.
- WAGNER, G.J., 1993, Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health, *Advances in Argonomy*, 51-173-212.
- WECKX, J. E. J. ve CLIJSTERS, H. M. M., 1996, Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper, *Physiologia plantarum* 96-506- 512.
- WEI, S.H., ZHOU, Q.X. ve WANG, X., 2005, Identification of weed plants excluding the uptake of heavy metals, *Environment International*, 31-829–834.
- WENZEL, WW, BUNKOWSKI, M, PUSCHENRERTER, M. ve HORAK, O., 2003, Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. *Environmental Pollution*, 123-131– 8.
- WU, F., ZHANG, G., AND DOMINY, P., 2003, Four barley genotypes respond differently to cadimium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity, *Environmental and Experimental Botany*, 50-67-78.
- XIONG, Z.T., LIU, C., VE GENG,B., 2006, Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in Brassica pekinensis Rupr., *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64-273–280.
- XU, Q.S., HU, J.Z., XIE, K.B., YANN, H.Y., DU, K.H. ve G.X. SHI, 2010, Accumulation and acute toxicity of silver in Potamogeton crispus L, *Journal of Hazardous Materials* 173-186–193.
- YANG, X. E., YANG, M. J., 2001. Some Mechanisms of Zinc and Cadmium Detoxification in a Zinc and Cadmium Hyperaccumulating Plant Species (*Thlaspi*). In: Orst W, et al. Editors. Plant Nutrition-food Security and Sustainability of Agro- Ecosystems. Dordrecht, The Netherlands: *Kluwer Academic Publishers*, p. 444–500.
- YRUELA I. , 2005, Copper in plants, *Brazillian Journal Plant Physiology*,17(1)-145 156,
- ZHANG, S., CHEN, M., LI, T., XU, X. ve DENG, L., 2010, A newly found cadmium accumulator—Malva sinensis Cavan, *Journal of Hazardous Materials* 173-705–709.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1985 yılında istanbul ili Üsküdar ilçesinde doğdu. İlk orta ve lise öğrenimi tamamladıktan sonra 2003 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümüne girdi ve 2007 yılında üniversiteden mezun oldu. Ayrıca 2007 yılında Yüksek Lisans Öğrenimine başladı.