

**Krom Stresine Maruz Kalan Kolza (*Brassica napus* L.)
Fidelerinde Hidrojen Peroksit Ön Uygulamasının
Koruyucu Rolünün Araştırılması**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nagihan BİNGÜL

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Haziran, 2013

Bu tez çalışması **11.FENED.02**, **11.FEN.BİL.14** ve **12.HIZ.DES.24** numaralı projeler ile
Afyon Kocatepe Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KROM STRESİNE MARUZ KALAN KOLZA (*Brassica napus* L.) FİDELERİNDE
HİDROJEN PEROKSİT ÖN UYGULAMASININ KORUYUCU ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI

Nagihan BİNGÜL

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Haziran, 2013

TEZ ONAY SAYFASI

Nagihan BİNGÜL tarafından hazırlanan “Krom Stresine Maruz Kalan Kolza (*Brassica napus* L.) Fidelerinde Hidrojen Peroksit Ön Uygulamasının Koruyucu Rolünün Araştırılması” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 21/06/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

İmza

Başkan : Prof. Dr. Yasemin EKMEKÇİ
Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Mustafa YILDIZ
Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Azmi YERLİKAYA
Dumlupınar Üniversitesi Tıp Fakültesi

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
...../...../..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Mevlüt DOĞAN
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

21.06.2013
Nagihan BİNGÜL

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KROM STRESİNE MARUZ KALAN KOLZA (*Brassica napus* L.) FİDELERİNDE HİDROJEN PEROKSİT ÖN UYGULAMASININ KORUYUCU ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Nagihan BİNGÜL

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

Bu araştırmada, hidroponik olarak 1 ve 7 gün süreyle Cr(VI) stresine (50 µM potasyum dikromat) maruz bırakılan kolza (*Brassica napus* L. cv. Süzer) fidelerinde büyüme, Cr birikimi, fotosentetik pigment içeriği, tiyol içeriği, lipit peroksidasyonu, bazı antioksidant enzimlerin [süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), guaiakol peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT)] aktivitesi ve metallothionein protein 1 geninin (*BnMP1*) ekspresyon seviyesi üzerine hidrojen peroksit (200 µM H₂O₂, 24 sa) ön uygulamasının etkisi incelenmiştir. Cr(VI) stresi kolza fidelerinin taze ve kuru ağırlıklarını önemli düzeyde azaltmıştır. Fide büyümesindeki bu azalmaya yaprak dokularındaki artan lipit peroksidasyonu ve azalan fotosentetik pigment içerikleri eşlik etmiştir. Bununla birlikte, H₂O₂ ön uygulaması fide büyüme parametrelerini önemli düzeyde arttırmış ve lipit peroksidasyonu seviyesinde bir azalmaya ve fotosentetik pigment içeriklerinde artışa neden olmuştur. Bununla birlikte, H₂O₂ ön uygulaması kolza fidelerinin toprak üstü dokularındaki Cr birikimini arttırmıştır. Cr(VI) stresi altındaki kolza fidelerinin yaprak dokularında tiyol içerikleri artmıştır. Bununla birlikte, H₂O₂ ön uygulaması Cr(VI) uygulamasının 7. gününde tiyol içeriklerinde ilave artışa neden olmuştur. Kolza fidelerinin yaprak dokularında Cr(VI) stresi SOD, APX, POD ve CAT gibi antioksidant enzimlerin aktivitelerinde değişimlere neden olmuştur. Cr(VI) stresi altında SOD ve POD aktiviteleri artarken, APX ve CAT aktiviteleri azalmıştır. Cr(VI)

stresine maruz bırakılmış fidelerde SOD ve CAT aktivitesi H₂O₂ ön uygulamasından etkilenmezken, APX ve POD aktiviteleri önemli düzeyde artmıştır. Gerçek-zamanlı kantitatif PCR analizlerinde, Cr(VI) stresi altındaki fidelerde *BnMP1* geninin ekspresyon seviyesi krom uygulamasının 1. gününde artarken, krom uygulamasının 7. gününde azalmıştır. Krom uygulamasının 1. gününde, H₂O₂ ön uygulaması yalnız Cr(VI) stresi uygulanmış fidelere göre *BnMP1* ekspresyon seviyesini azaltmış; fakat bu etki önemsiz bulunmuştur. Krom uygulamasının 7. gününde, H₂O₂ ön uygulaması *BnMP1* mRNA'sının ekspresyonundaki Cr(VI)-teşvikli azalmayı hafifletmiştir. Bu sonuçlar, dışsal H₂O₂ ön uygulaması muhtemelen Cr(VI) toksisitesine karşı bitkinin toleransını geliştirmektedir. Cr(VI) toleransı, H₂O₂ ön uygulamasına bağlı olarak artan savunma sisteminden kaynaklanabilir.

2013, xi + 80 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Brassica napus* L., Cr(VI), H₂O₂ ön uygulaması, Antioksidant savunma sistemi, Metallothionein

ABSTRACT

M.Sc Thesis

INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE ROLE OF HYDROGEN PEROXIDE PRETREATMENT IN COLZA (*Brassica napus* L.) SEEDLINGS EXPOSED TO CHROMIUM STRESS

Nagihan BİNGÜL

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

In this research, the effects of hydrogen peroxide (200 μM H_2O_2 for 24 h) pretreatment on the seedling growth, Cr accumulation, photosynthetic pigment content, thiol content, lipid peroxidation, activities of some antioxidant enzymes [superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (POD) and catalase (CAT)] and expression level of metallothionein protein 1 gene (*BnMP1*) were investigated on hydroponically grown canola (*Brassica napus* L. cv. Süzer) seedlings exposed to Cr(VI) stress (50 μM potassium dichromate) for 1 and 7 days. Cr(VI) stress decreased fresh and dry weights of canola seedlings. The reductions in seedling growth were accompanied by increased lipid peroxidation and decreased photosynthetic pigment content in leaf tissues. Hydrogen peroxide pretreatment, however, significantly enhanced plant growth parameters and led to the reduction of lipid peroxidation level and enhance of photosynthetic pigments content. On the other hand, H_2O_2 pretreatment increased Cr accumulation in aerial parts of canola seedlings. Cr(VI) stress increased thiol content in the leaf tissues of canola seedlings. However, H_2O_2 pretreatment led to further enhance in the thiol content at the 7th day of Cr(VI) exposure. Cr(VI) stress caused alterations in the activities of antioxidant enzymes such as SOD, APX, POD and CAT in the leaf tissues of canola seedlings. Under Cr(VI) stress, SOD and POD activities increased, whereas APX and CAT activities decreased. The SOD and CAT activities remained unaffected due to H_2O_2 pretreatment, while activities of

APX and POD were significantly promoted in the Cr(VI)-stressed seedlings. In real-time quantitative PCR analysis, the expression level of *BnMP1* gene was increased at 1 day after treatment (DAT), whereas it was decreased at 7 DAT in Cr(VI)-stressed seedlings. At 1 DAT, pretreatment of H₂O₂ reduced the expression of *BnMP1* mRNA compared to Cr(VI) stress alone, but this effect was not significant. At 7 DAT, H₂O₂ pretreatment alleviated the Cr(VI) stress-induced decrease in the expression of *BnMP1* mRNA. These results suggest that exogenous H₂O₂ pretreatment may probably improve the tolerance of the plant to the Cr(VI) toxicity. Cr(VI) tolerance may result from an enhanced defense system depend on H₂O₂ pretreatment.

2013, xi + 80 pages

Key Words: *Brassica napus* L., Cr(VI), H₂O₂ pretreatment, Antioxidant defence system, Metallothionein

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel alışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Mustafa YILDIZ'a, araştırma ve yazım süresince yardımlarını esirgemeyen doktora ğrencisi Sayın Hakan TERZİ'ye ve yüksek lisans ğrencileri Sayın Nermin AKÇALI, nal ALTUğ ve Alperen DEDEOğLU'na, her konuda öneri ve eleştirileriyle yardımlarını gördüğüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu araştırma boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı aileme de teşekkür ederim.

Nagihan BİNGL
AFYONKARAHİSAR, 2013

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	5
2.1. <i>Brassica napus</i> L.'un Sistematığı ve Tarımsal Özellikleri	5
2.2. Kromun Oksidasyon Durumu ve Doğadaki Dağılımı	6
2.2.1. Bitkilerde Krom Alınımı, Translokasyonu ve Birikimi	7
2.2.2. Krom Toksisitesi ve Bitki Gelişimi Üzerine Etkisi.....	9
2.2.3. Kromun Çevreden Uzaklaştırılması.....	11
2.3. Ağır Metal Toleransı	13
2.3.1. Antioksidant Cevap	14
2.3.2. Metal Bağlayıcı Ligandlar	15
2.4. Ağır Metal Toleransının Arttırılmasında Bazı Ön Uygulamaların Önemi.....	20
3. MATERYAL ve METOT.....	23
3.1. Çimlenme ve Bitki Yetiştirme Koşulları	23
3.2. Toprak Üstü Organların Taze ve Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi	24
3.3. Krom Birikiminin Belirlenmesi.....	24
3.4. Yaprak Dokusunda Biyokimyasal ve Moleküler Analizler	25
3.4.1. Fotosentetik Pigment İçeriğinin Belirlenmesi.....	25
3.4.2. TiyoI İçeriklerinin Belirlenmesi.....	26
3.4.3. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi.....	27
3.4.4. Antioksidant Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	27
3.4.4.1. Enzim Ekstraksiyonu	27
3.4.4.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Belirlenmesi.....	28
3.4.4.3. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Belirlenmesi	28
3.4.4.4. Guaiakol Peroksidaz (POD) Aktivitesinin Belirlenmesi	28

3.4.4.5. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Belirlenmesi.....	29
3.4.5. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Analizleri	29
3.4.5.1. Total RNA İzolasyonu ve Miktar Tayini	29
3.4.5.2. Tek İplik cDNA Sentezi	32
3.4.5.3. Primer Tasarlanması	33
3.4.5.4. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR.....	33
3.5. İstatistiki Analizler	35
4. BULGULAR.....	36
4.1. Cr(VI) Stresi Altındaki Kolza Fidesinde Büyüme ve Krom Birikimi Üzerine Hidrojen Peroksit Ön Uygulamasının Etkisi.....	36
4.2. Cr(VI) Stresi ve Hidrojen Peroksit Ön Uygulamasına Maruz Bırakılan Kolza Fidelerinin Yaprak Dokusunda Biyokimyasal ve Moleküler Analizler	37
4.2.1. Fotosentetik Pigment İçerikleri.....	38
4.2.2. Tiyol İçerikleri.....	39
4.2.3. Lipit Peroksidasyonu	40
4.2.4. Antioksidant Enzim Aktiviteleri.....	41
4.2.5. Brassica napus Metallothionein Protein 1 (<i>BnMP1</i>) Geninin İfadesi.....	45
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	49
6. KAYNAKLAR.....	58
ÖZGEÇMİŞ.....	80

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

dH ₂ O	Distile su
Cr(VI)	Hekzavalent krom
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
OH [•]	Hidroksil radikali
Ma	Miliamper
μM	Mikromolar
mM	Milimolar
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
O ₂ ^{•-}	Süperoksit radikali

Kısaltmalar

ALAD	δ-Aminolevülinik asit dehidrataz
POD	Guaiakol peroksidaz
GSH	Glutatyon
GR	Glutatyon redüktaz
HP	Hidrojen peroksit ön uygulaması
MDA	Malondialdehit
MT	Metallotiyonein
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NBT	Nitro blue tetrazolium
NPT	Proteine bağlı olmayan tiyol
GSSG	Okside glutatyon
PAJE	Poliakrilamid jel elektroforez
PC	Fitoşelatin
PT	Proteine bağlı tiyol
ROT	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	Tiyobarbütirik asit
TCA	Trikloroasetik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kültüre yapılan Brassica türü arasındaki genetik akrabalıkları gösteren U diyagramı.....	6
Şekil 2.2. Glutasyon (a) ve fitoşelatinin (b) kimyasal yapısı.	15
Şekil 3.1. RNeasy Plant Mini kiti ile total RNA ekstraksiyonu için yöntem akış şeması.	31
Şekil 3.2. Quantitect Reverse Transcription kiti ile tek iplik cDNA sentez yöntemi.....	32
Şekil 4.1. Kolza Süzer çeşidinde Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit (HP) ön uygulamalarının toprak üstü dokuların taze ve kuru ağırlıkları üzerine etkisi.	36
Şekil 4.2. Kolza Süzer çeşidinin toprak üstü (A) ve kök (B) dokularında Cr birikimi üzerine Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit (HP) ön uygulamalarının etkisi.	38
Şekil 4.3. Kolza Süzer çeşidinin yaprak dokularında klorofil a + b ve karotenoid içerikleri üzerine Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit (HP) ön uygulamasının etkisi.	39
Şekil 4.4. Kolza Süzer çeşidinin yaprak dokularında proteine bağlı ve proteine bağlı olmayan tiyol içerikleri üzerine Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit (HP) ön uygulamasının etkisi.....	40
Şekil 4.5. Kolza Süzer çeşidinin yaprak dokularında MDA içerikleri üzerine Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit (HP) ön uygulamasının etkisi.	41
Şekil 4.6. Kolza Süzer çeşidinin yaprak dokularında süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi üzerine Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit (HP) ön uygulamasının etkisi.	42
Şekil 4.7. Kolza Süzer çeşidinin yaprak dokularında askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi üzerine Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit (HP) ön uygulamasının etkisi.	43
Şekil 4.8. Kolza Süzer çeşidinin yaprak dokularında guaiakol peroksidaz (POD) aktivitesi üzerine Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit (HP) ön uygulamasının etkisi.	44

Şekil 4.9. Kolza Süzer çeşidinin yaprak dokularında katalaz (CAT) aktivitesi üzerine Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit (HP) ön uygulamasının etkisi.	44
Şekil 4.10. Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit ön uygulamasına maruz bırakılan <i>Brassica napus</i> L. fidelerinin yaprak dokularından izole edilen bazı total RNA'ların (1 µg) %1.2'lik formaldehit agaroz jel profilleri	45
Şekil 4.11. Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit ön uygulamasına maruz bırakılan <i>Brassica napus</i> L.'da RT-Q-PCR ile belirlenmiş (A) <i>BnMP1</i> geninin transkript birikimleri ve (B) bu örneklere ait standart eğri.	46
Şekil 4.12. RT-Q-PCR'dan elde edilen β-aktin (121 bç) ve <i>BnMP1</i> (115 bç) transkriptlerinin %1.7'lik agaroz jeldeki profilleri	47
Şekil 4.13. Kolza Süzer çeşidinin yaprak dokularında <i>BnMP1</i> mRNA'sının ekspresyon seviyesi üzerine Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit (HP) ön uygulamasının etkisi.....	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Dünyadaki kromit üretimi (metrik ton).....	7
Çizelge 2.2. Fitoremediasyon teknikleri	12
Çizelge 2.3. Krom fitoremediasyonunda kullanılan bazı kültür bitkileri	13
Çizelge 3.1. On sekiz günlük kanola fidelerinin maruz kaldığı uygulamalar.....	24
Çizelge 3.2. Gerçek zamanlı kantitatif PCR reaksiyonu kurulumu	34

1. GİRİŞ

Dünyada tarımsal alanların büyük bir kısmı endüstriyel aktiviteler ve tarımsal uygulamalardan kaynaklanan ağır metal kirliliğine maruz kalmaktadır (Pilon-Smits 2005). Metaller toprakta doğal olarak bulunmasına karşın birçok endüstriyel aktivite topraktaki seviyelerini arttırmaktadır. Ayrıca, potansiyel olarak toksik bu metaller bitki, insan ve diğer organizmalar üzerine olumsuz etkilere sahip olabilmektedir (White and Brown 2010). Yoğunlukları 4 g/cm^3 'ün üzerinde olan metaller ağır metal olarak tanımlanmıştır (Duffus 2002). Ancak, bu kriterin fizyolojik açıdan önemsiz olması nedeniyle fitotoksosite ile ilgili terimlerin ilgili metallerin kimyasal özellikleri ve biyolojik etkileri temelinde yapılması gerektiği belirtilmiştir (Appenroth 2010). Ağır metaller bakır (Cu), mangan (Mn), molibden (Mo), çinko (Zn), demir (Fe) gibi mikro besin elementlerini ve kurşun (Pb), kadmiyum (Cd), kobalt (Co), krom (Cr), gümüş (Ag) ve cıva (Hg) gibi bitki büyüme gelişimi için gerekli olmayan elementleri kapsamaktadır (Nagajyoti *et al.* 2010). Mikro besin elementi olsun ya da olmasın ağır metallerin topraktaki yüksek konsantrasyonları tüm organizmalarda ciddi sorunlara neden olabilmektedir (Benavides *et al.* 2005).

Krom, dünyada en fazla bulunan yedinci elementtir (Cervantes *et al.* 2001). Krom 0 ile VI arasında değişen oksidasyon seviyelerinde bulunmaktadır. Krom (Cr) doğada çoğunlukla III veya VI oksidasyon durumunda bulunurken, diğer oksidasyon durumlarında kararsız ve kısa ömürlüdür (Kotas and Stasicka 2000, Arduini *et al.* 2006). Hem hekzavalent krom [Cr(VI)] hem de trivalent krom [Cr(III)] formları fitotoksiktir ve Cr(III) formuna göre Cr(VI) formunun daha toksik olduğu bildirilmiştir (Dixit *et al.* 2002, Vernay *et al.* 2008). Krom bitkilerde toksisiteye neden olan birkaç metabolik işlevde bozulmalara yol açmaktadır. Bitkilerde krom stresi büyüme inhibisyonuna, membran ve organellerde yapısal değişimlere, oksidatif strese ve antioksidant enzimlerin aktivitesinde değişimlere neden olmaktadır (Shanker *et al.* 2005).

Ağır metaller (1) reaktif oksijen türlerinin (ROT'lar) üretimi, (2) biyomoleküllerin fonksiyonel gruplarına bağlanma ve (3) biyomoleküllerdeki diğer metaller ile yer

değiştirmeyi kapsayan üç temel mekanizma ile bitkileri etkilemektedir (Schutzendubel and Polle 2002). Oksidatif zarar bitki dokularında ağır metal teşvikli ROT üretiminin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Apel and Hirt 2004). Reaktif oksijen türleri fotosentetik ve mitokondriyal işlevler sırasında doğal olarak oluşmakta; fakat metal iyonlarının varlığında yüksek seviyelerde birikmektedirler.

Ağır metal stresi sırasında biriken reaktif oksijen türleri fosfolipitler, nükleik asitler ve proteinlerde bozulmalara neden olmaktadır (Hao *et al.* 2006). Bitkiler yüksek seviyelerdeki metal iyonlarını tolere ve detoksifiye edecek kompleks mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu savunma sistemleri süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), guaiakol peroksidaz (POD), katalaz (CAT) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidant enzimleri ve antioksidant maddeleri içermektedir (Foyer *et al.* 1994). Antioksidant savunma sistemine ek olarak metal iyonları hücre dışında organik asitlere veya hücre çeperine bağlanabilmekte veya hücre içerisinde detoksifiye edilebilmektedir (Hall 2002). Bitkilerin toksik metallere toleransı kısmen metallothioneinler (MT'ler) ve fitoşelatinleri (PC'ler) kapsayan metal-bağlayıcı peptitlerin sentezine bağlı olabilmektedir. Bitkilerde PC'ler ve MT'lerin sistein kalıntılarındaki tiyol grupları ile metal iyonlarını bağlayabildiklerinden dolayı metal toleransı ve homeostazisinde fonksiyon gördükleri ileri sürülmüştür. Metallothioneinler düşük moleküler ağırlıklı (4-14 kDa), sisteince zengin metal bağlayıcı bir protein ailesidir (Cobbett and Goldsbrough 2002). Bitki MT'lerinin mutlak gerekli metallerin homeostazisine ve mutlak gerekli olmayan metallerin detoksifikasyonunda fonksiyon gördüğü ileri sürülmüştür (Guo *et al.* 2008).

Bitkilerde ağır metal toleransı, bitkilerde doğal olarak oluşan bileşiklere analog olan bileşiklerin dışsal olarak uygulaması ile arttırılabilmektedir. Bitkilerde metal toleransının arttırılması için bazı potansiyel metotlar metal bağlayıcı şelatörler, fitohormonlar ve hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi sinyal moleküllerinin dışsal uygulamalarını içermektedir (Israr and Sahi 2008, Hu *et al.* 2009, Lopez *et al.* 2009).

Bitkilerde savunma sisteminin düzenlenmesinde bir sinyal molekülü olduğu kabul edilen H₂O₂ küçük ve difüze olabilen bir moleküldür (Polidoros and Scandalios 1999, Neill *et al.* 2002). Hidrojen peroksit bitkilerde iki farklı rol oynamaktadır: düşük konsantrasyonlarda çok sayıda savunma geninin ifadesini teşvik eden ve abiyotik streslere karşı çoklu savunma yanıtlarını aktive eden bir sinyal molekülü olarak fonksiyon görürken, yüksek seviyelerde birikimi hücrede oksidatif hasara ve programlanmış hücre ölümüne sebep olmaktadır (Levine *et al.* 1994, Prasad *et al.* 1994). Birçok stres koşulu altında H₂O₂ üretiminin artması, bitkilerin uyum ve çapraz toleransında H₂O₂'in fonksiyon gördüğünü göstermektedir (Hu *et al.* 2009).

Ağır metallerin potansiyel toksisitesinden dolayı, tarımsal alanların temizlenmesi çevre mühendisliği için en zor görevlerden biridir. Kirlenmiş alanlardan ağır metallerinin uzaklaştırılması için kullanılan fizikokimyasal metotlar pahalıdır ve toprağın yapısını bozmaktadır (Gardea-Torresdey *et al.* 2005). Bu nedenle, mevcut remediasyon teknikleri yerine ağır metallerin uzaklaştırılmasında bitkilerin kullanıldığı düşük maliyetli ve çevre dostu olan fitoremediasyon tekniği alternatif olarak ortaya çıkmaktadır (Arthur *et al.* 2005, Cho *et al.* 2009). Bu biyolojik yaklaşım, kirleticileri toprak üstü organlarında biriktirebilen bitkilere gereksinim duymaktadır (Blaylock *et al.* 1997, Petra *et al.* 2009). Bununla birlikte, fitoremediasyon için ideal bitki hızlı büyüyebilmeli ve gövde dokularında yüksek konsantrasyonlarda metal iyonlarını biriktirme ve tolere etme yeteneğine sahip olmalıdır (McGrath *et al.* 2002). Fitoremediasyon için uygun birçok hızlı büyüyen ve yüksek biyokütleli bitki türü arasında Brassicaceae familyasına ait bitki türleri, yüksek seviyelerde Cr ve diğer ağır metalleri biriktirebilmelerinden dolayı büyük ilgi çekmiştir (Kumar *et al.* 1995, Prasad and Freitas 2003). Brassicaceae familyasına ait kolzanın (*Brassica napus* L.) da hızlı büyüyen bir akümülatör bitki türü ve fitoremediasyon için iyi bir aday olduğu bildirilmiştir (Grispen *et al.* 2006).

Bu araştırmada, ağır metallerle kirlenmiş alanların fitoremediasyonu için muhtemel potansiyele sahip kolza (*Brassica napus* L.) Süzer çeşidinde krom birikimi ve toleransı

üzerine H₂O₂ ön uygulamasının iyileştirici etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, 18 günlük kolza fideleri aşağıdaki uygulamalara maruz bırakılmıştır:

- (1) Besin çözeltisi, 24 sa → Besin çözeltisi, 1 gün
- (2) Besin çözeltisi, 24 sa → Besin çözeltisi, 7 gün
- (3) Besin çözeltisi + 200 µM H₂O₂, 24 sa → Besin çözeltisi, 1 gün
- (4) Besin çözeltisi + 200 µM H₂O₂, 24 sa → Besin çözeltisi, 7 gün
- (5) Besin çözeltisi, 24 sa → Besin çözeltisi + 50 µM K₂Cr₂O₇, 1 gün
- (6) Besin çözeltisi, 24 sa → Besin çözeltisi + 50 µM K₂Cr₂O₇, 7 gün
- (7) Besin çözeltisi + 200 µM H₂O₂, 24 sa → Besin çözeltisi + 50 µM K₂Cr₂O₇, 1 gün
- (8) Besin çözeltisi + 200 µM H₂O₂, 24 sa → Besin çözeltisi + 50 µM K₂Cr₂O₇, 7 gün

Bu uygulamalardan elde edilen fidelerde, toprak üstü ve kök dokularının taze ve kuru ağırlıkları belirlenmiş ve bu dokularda Cr birikimi analizleri gerçekleştirilmiştir. Diğer taraftan, fidelerin yaprak dokularında fotosentetik pigment içerikleri, lipid peroksidasyonu, tiyol içerikleri ve bazı antioksidant enzimlerin aktiviteleri belirlenmiştir. Yine yaprak dokularında metallothionein proteinini kodlayan *BnMP1* geninin (*Brassica napus* metallothionein protein 1) ifadesindeki değişimler değerlendirilmiştir.

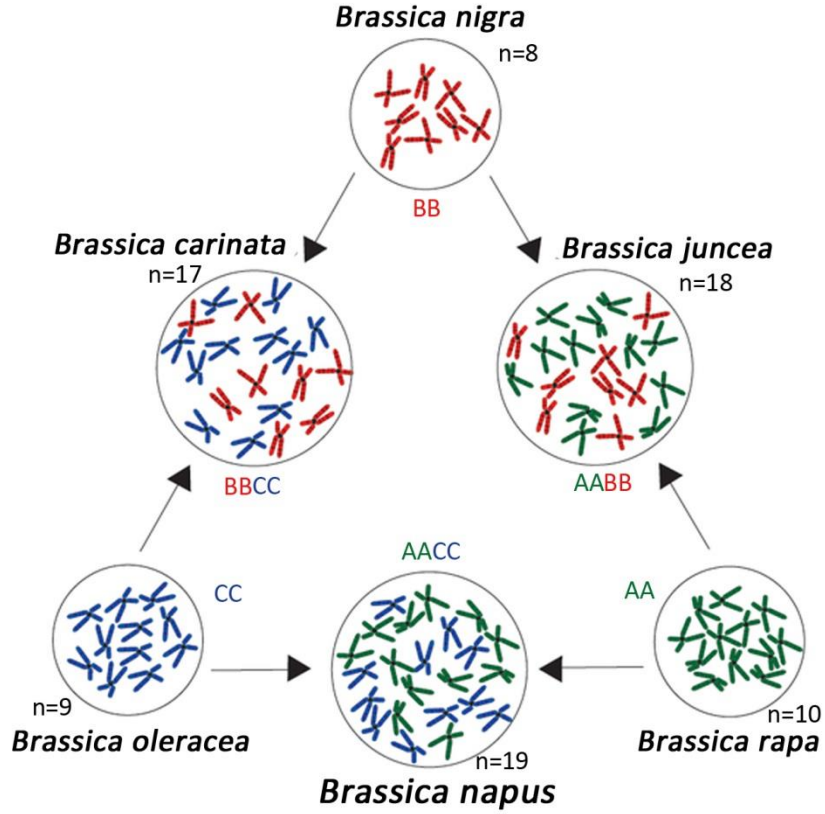
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1. *Brassica napus* L.'un Sistematığı ve Tarımsal Özellikleri

Brassicaceae (Cruciferae) yaklaşık 338 cins ve 3709 tür içeren geniş bir ailedir (Warwick *et al.* 2006). Bu aile, birçok tarımsal bitki (*Brassica oleracea*, *Brassica napus*, *Armoracia rusticana* gibi) ve süs bitkilerinin (*Aubrieta*, *Iberis*, *Lunaria*, *Arabis*, *Draba* gibi) yanı sıra bazı model organizmaları (*Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*, *Arabidopsis halleri*, *Brassica napus*, *Capsella rubella*, *Thellungiella halophila*, *Arabis alpina*) içerdiğinden büyük ilgi çekmiştir. *Brassica napus* L. (kolza), U-diyagramı (U 1935)'na göre kültürü yapılan altı *Brassica* türünden biridir (Şekil 2.1) (U 1935). *B. napus* genetik olarak dizomik kalıtım gösteren allopoliploid bir bitki türüdür. *B. napus*'un muhtemelen yem şalgamı (*Brassica rapa*; AA, $2n = 20$) ve lahana (*Brassica oleracea*; CC, $2n=18$) genotipleri arasındaki bağımsız ve kendiliğinden oluşan inter-spesifik hibridizasyonla ortaya çıktığı düşünülmektedir (Prakash and Hinata 1980, Kimber and McGregor 1995, Gupta and Pratap 2007). *B. napus* türü içinde *B. napus* L. var *rapifera* (DC) Metzger ($2n = 4 \times = 38$) ve *B. napus* L. var *oleifera* Delile ($2n = 4 \times = 38$) olmak üzere iki varyete tanımlanmıştır. *B. napus* L. var *oleifera* kolza, Arjantin kolzası veya İsveç kolzası olarak bilinmektedir. Kışlık ve yazlık olmak üzere iki fizyolojik döneme sahip bir yağ bitkisi olan *B. napus* soya fasulyesinden sonra en fazla ekimi yapılan yağlı tohum türü olarak ortaya çıkmıştır.

Kolza yağında yüksek seviyede bulunan erusik asidin ve tohumları işlendikten sonra küspesinde oluşan kükürt yönünden zengin glukozinolatların insan sağlığı için bir risk faktörü olabileceği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, erusik asit ve glukozinolat seviyeleri düşük kolza çeşidi Kanada'da ıslah edilmiştir. Kolzanın ıslahı sonucu elde edilen düşük erusik asit (%2'den az) ve glukozinolat içeriklerine (30 mg/g'dan az) sahip hatlar ticari olarak "CanOLA" (Canadian Oil Low Acid) şeklinde adlandırılmış ve Türkçe'ye "kanola" olarak girmiştir. Kolza, Türkiye'de 7.7 milyon dekar yağlı tohum ekiliş alanının 312 bin dekarını ve yaklaşık 3 milyon ton yağlı tohum üretiminin 106 bin tonu ile ayçiçeği ve çığitten sonra yer alan önemli bir bitkidir (TÜİK 2010). Dünya'da yıllık üretimi

31.7 milyon ton olup; 7.4 milyon ha ekim alanıyla en fazla Çin’de üretilmektedir (FAO 2010).



Şekil 2.1. Kültürü yapılan *Brassica* türü arasındaki genetik akrabalıkları gösteren U diyaframı (U 1935).

2.2. Kromun Oksidasyon Durumu ve Doğadaki Dağılımı

Krom (Cr) doğada çoğunlukla III veya VI oksidasyon durumunda bulunurken, diğer oksidasyon durumlarında kararsız ve kısa ömürlüdür (Kotas and Stasicka 2000, Arduini *et al.* 2006). Kromun en kararlı ve yaygın oksidasyon durumları trivalent [Cr(III)] ve heksavalent [Cr(VI)] formudur. Yüksek oksidasyon potansiyeli, çözünürlüğü ve membranlardan geçebilme özelliklerinden dolayı Cr(VI) en toksik formdur (Marqués *et al.* 1998). Trivalent Cr suda nispeten daha az çözünebilmekte ve yeraltı sularının pH değerlerinde Fe ile hidroksit çöktürme eğilimindedir. Bununla birlikte, Cr(III) toprakta kararlı kompleksler oluşturma eğilimindedir (Lopez-Luna *et al.* 2009). Diğer taraftan, yüksek oksijen veya Mn oksit konsantrasyonlarında Cr(III) Cr(VI)'a okside

olabilmektedir (Bluskov *et al.* 2005).

Krom (Cr) konsantrasyonları toprakta 1-3.000 mg/kg, deniz suyunda 5-800 µg/L, nehir ve göllerde 26 µg/L-5.2 mg/L arasında değişmekle birlikte ortalama 100 mg/L'lik konsantrasyonla yerkabuğunda en fazla bulunan 21. elementtir. Krom doğada ultramafik ve serpentin kayalarda kromit (FeCr₂O₄) şeklinde oluşmakta ve krokoit (PbCrO₄), bentorit [Ca₆(Cr,Al)₂(SO₄)₃] veya tarapakait (K₂CrO₄) gibi minerallerde diğer metallerle kompleksler oluşturmaktadır (Babula *et al.* 2008). Doğal oluşumunun yanı sıra Cr paslanmaz çelik üretimi, deri işleme, boya ve pigment üretimi gibi birkaç endüstriyel aktivite sonucu da çevreye salınmaktadır (Bluskov *et al.* 2005). Deri sanayi, toplam endüstriyel kullanımın %40'ını oluşturan ve kromun yüksek oranda biyosfere salındığı önemli bir alandır (Barnhart 1997). Sudaki Cr konsantrasyonu için önerilen sınır değerler 8 µg/L Cr(III) ve 1 µg/L Cr(VI) olarak belirlenmiş olmasına karşın, mevcut endüstrilerin atık sularındaki Cr konsantrasyonu 2-5 mg/L arasında değişmektedir (Chandra *et al.* 1997). Bazı önemli kromit üretici ülkeler ve 2006-2010 yılları arasındaki üretim miktarları Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Dünyadaki kromit üretimi (metrik ton) (http://www.indexmundi.com/en/commodities/minerals/chromium/chromium_t8.html, 21.12.2012)

Ülke	2006	2007	2008	2009	2010
Güney Afrika	7.418.326	9.646.958	9.682.640	7.560.938	10.871.095
Hindistan	3.600.400	3.320.000	3.900.000	3.760.000	3.800.000
Kazakistan	3.366.078	3.687.200	3.629.000	3.544.000	3.829.000
Türkiye	1.059.901	1.678.932	1.885.712	1.573.999	1.700.000
Diğer	4.255.295	4.666.910	4.702.648	3.061.063	3.499.905
Toplam	19.700.000	23.000.000	23.800.000	19.500.000	23.700.000

2.2.1. Bitkilerde Krom Alınımı, Translokasyonu ve Birikimi

Bitkilerde krom alınımı, translokasyonu ve birikimi oksidasyon durumu ve büyüme ortamındaki veya bitki dokularındaki Cr konsantrasyonu tarafından belirlenmektedir (Mishra *et al.* 1995, Zayed *et al.* 1998, Babula *et al.* 2008). Yüksek çözünebilirlik ve

dolayısıyla kullanılabilirlikten dolayı Cr(VI), düşük konsantrasyonlarda toprakta kararlı kompleksler oluşturan Cr(III)'e göre daha toksiktir. Ayrıca Cr(VI) taşınımının aktif bir mekanizma ile gerçekleştiği düşünülmektedir (Cervantes *et al.* 2001). Bitkilerde CrO_4^{2-} 'in sülfat içeren protein taşıyıcıları yardımıyla aktif olarak membranlardan geçtiği ve köklerde muhtemelen Fe(III) redüktaz enzimi ile Cr(III)'e indirgendiği bildirilmiştir (Zayed *et al.* 1998). Aksine Cr(III) pasif olarak alınmakta ve hücre çeperindeki katyon değişim bölgeleri tarafından tutulmaktadır (Marschner 1995). Kim vd. (2006), *Nicotiana tabacum* bitkilerinde Cr(VI)'un sülfat veya fosfat taşıyıcı sistemle ya da aktif mekanizma ile alındığını ve vakuollerde alıkonulduğunu ileri sürmüşlerdir. Bununla birlikte, nötral pH'da Cr(VI) bileşiklerinin tetrahedral yapıda olduğu ve tetrahedral iyon kanalları ile hücre membranlarından geçtiği, buna karşı Cr(III) bileşiklerinin oktahedral yapıda olduğu ve difüzyonla membranlardan geçtiği bildirilmiştir (Cohen *et al.* 2006).

Kromun indirgenme ve/veya organik asitler gibi kök salgılarıyla kompleksler oluşturarak bitki dokularına girdiği bildirilmiştir (Bluskov *et al.* 2005). Hem Cr(VI) hem de Cr(III) simplast yolla kök hücrelerine girdiği ve kortekste Cr(VI)'un indirgendiği ve biriktiği belirtilmiştir (Shanker *et al.* 2005). Bitkilerde krom alım mekanizmasını açıklamak için gerçekleştirilen çalışmalar sadece Cr(VI)'un bitki dokularında saptandığını göstermiştir. Bununla birlikte, soya fasulyesi ve sarımsak gibi bazı bitki türlerinin Cr(VI)'u kararlı olmayan Cr(V) ve Cr(IV)'a veya oldukça kararlı olan Cr(III)'a indirgeyebildikleri bildirilmiştir (Babula *et al.* 2008). Bu detoksifikasyon mekanizması köklerde gerçekleştiğinden ve kök hücrelerinin vakuollerinde Cr immobilize edildiğinden dolayı toprak üstü organlara transloke olan Cr'un miktarı oldukça düşüktür (Shanker *et al.* 2005).

Trivalent kroma göre kromat ve heksavalent kroma maruz kalan bitkilerde Cr birikiminin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Vernay *et al.* 2008). Bununla birlikte, besin ortamında kromun yüksek konsantrasyonlarının bitki dokularında Cr birikiminin artışına neden olduğu belirtilmiştir (Mishra *et al.* 1995, Zayed *et al.* 1998). Brassicaceae familyasına ait bazı bitki türlerinin [*Brassica juncea* (Hint hardalı), *Brassica oleracea* var.

capitata (lahana) ve *Brassica oleracea* var. botrytis (karnabahar)] herhangi bir toksisite semptomu göstermeksizin dokularında yüksek seviyelerde Cr biriktirebildiği bildirilmiştir (Zayed and Terry 2003, Diwan *et al.* 2008). Sonuç olarak, Brassicaceae familyasına ait bir bitki türü olan kolzada (*Brassica napus* L.) Cr biriktirebilme kapasitesinin belirlenmesi bu türün fitoremediasyon potansiyelinin değerlendirilmesinde önemli veri sağlayacaktır.

2.2.2. Krom Toksikitesi ve Bitki Gelişimi Üzerine Etkisi

Potansiyel olarak toksik metaller kentsel alanlarda (Wong *et al.* 2006), kirlenmiş (Pichtel *et al.* 2000) ve doğal çevrelerde (Yang *et al.* 2002) yaygın olarak bulunabilmektedir. Metaller doğal olarak toprakta bulunmasına karşın madencilik, atık su salınımı ve gübreleme gibi aktiviteler topraktaki metal konsantrasyonunu artırabilmektedir (Shanker *et al.* 2005). Birçok metal bitki büyüme ve gelişimi için gerekli olmasına karşın belirli bir konsantrasyonun üzerinde toksik etkilere neden olmaktadır (Adriano 2001). Eser seviyelerde Cr(III) insan ve hayvanlardaki protein ve glukoz metabolizmasında fonksiyon görmektedir. Bununla birlikte, kronik Cr(III) uygulaması karaciğer, böbrek ve akciğerlerde hasara neden olabilmektedir (Zayed and Terry 2003).

Kromun bitki büyümesi ve gelişimi üzerine olan toksik etkileri çimlenme işlevinin yanı sıra kök, gövde ve yaprak büyümesi ve dolayısıyla kuru madde üretimindeki değişimleri içermektedir (Shanker *et al.* 2005). Bitkilerde herhangi bir besleyici rolü olmamasına karşın düşük konsantrasyonlardaki (0.05-1 mg/L) Cr büyümeyi teşvik edebilmektedir. Buna karşın, 1-5 mg/L konsantrasyonlardaki Cr'un bazı bitkilerde büyüme inhibisyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Dube *et al.* 2003). Bazı esansiyel elementlere benzerliğinden dolayı Cr bitkilerin mineral beslenmesini kompleks bir yolla etkileyebilmektedir (Shanker *et al.* 2005). Bitki dokularında biriken Cr diğer esansiyel elementlerle etkileşime girerek bu elementlerin konsantrasyonunu ve dağılımını etkileyebilmektedir (Barbosa *et al.* 2007). Kromun organik asitler ile kompleksler oluşturması mineral besinlerin translokasyonunda önemli bir role sahiptir (Panda and

Choudhury 2005). Bitki dokularında aşırı Cr birikiminin Na, Fe, Mn, Cu, N, P, K ve Mg gibi besin elementlerinin alınımını engellediği bildirilmiştir (Barbosa *et al.* 2007). Krom stresine maruz kalmış bitkilerde bazı besin elementlerinin alınımındaki azalmanın plazma membranı H⁺-ATPaz aktivitesindeki azalmadan kaynaklandığı belirtilmiştir (Shanker 2003). Bitki büyümesi üzerine Cr'un inhibe edici etkisi Cr ve P, Cr ve Fe veya Cr ve Cu arasındaki spesifik etkileşimden kaynaklandığı belirtilmiştir (Barbosa *et al.* 2007). Bu durum, iyon yükü (Cr⁺³ ve Fe⁺³) ve iyonik yarıçap (Cr ve Cu) gibi kimyasal özelliklerle ilişkili olabilmektedir.

Kromun 1-5 mg/L konsantrasyonlarının bazı bitkilerde klorofil sentezinde azalma ve kloroz gibi semptomlara neden olduğu bildirilmiştir (Dube *et al.* 2003). Krom stresi, klorofil biyosentezinde fonksiyon gören enzimlerin inaktivasyonuna bağlı olarak klorofil içeriğinde azalmalara neden olmaktadır (Vajpayee *et al.* 2000, Yıldız *et al.* 2012). Fotosentetik pigmentlerin degradasyonuna neden olabilen (Vajpayee *et al.* 2000) krom stresi tarafından teşvik edilen klorozun Fe alınımındaki inhibisyondan veya N taşınımındaki azalmadan kaynaklandığı bildirilmiştir (Barbosa *et al.* 2007). Bitki dokularındaki yüksek Cr konsantrasyonu kloroplast yapısında bozulmalara neden olarak fotosentetik işlevde değişimlere yol açabilmektedir (Panda and Choudhury 2005, Barbosa *et al.* 2007).

Krom uygulamasını takiben bitki büyümesindeki azalmanın bazı enzim ve metabolitler üzerine kromun direkt etkisinden veya oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumundan kaynaklandığı belirtilmiştir (Panda and Choudhury 2005). Oksidatif hasar bitki dokularında aşırı metal birikiminin bir sonucudur ve ROT'ların aşırı üretiminden kaynaklanmaktadır (Apel and Hirt 2004). Reaktif oksijen türleri normal hücrel işlevler sırasında üretilmesine karşın Cr stresi gibi abiyotik stres koşulları üretimlerini arttırmaktadır (Dixit *et al.* 2002, Panda 2007, Ali *et al.* 2011). Hidrojen peroksit (H₂O₂), süperoksit (O₂^{•-}) ve hidroksil ([•]OH) radikalleri gibi ROT'lar metabolik işlevleri etkileyerek hücrel zarara neden olabilmektedir. Fe, Cr, Cu ve Mn gibi redoks olarak aktif metaller [•]OH radikallerinin oluşumunu katalize edebilmektedir (Kehrer

2000). Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu membran lipitlerinin peroksidasyonu, membranların fonksiyonu ve bütünlüğünü olumsuz etkilemekte ve hücre fonksiyonlarında geri dönüşümsüz zarara neden olabilmektedir (Dixit *et al.* 2002). Birçok bitki türünde krom stresinin bitki dokularında malondialdehit (MDA, lipit peroksidasyon ürünü) içeriğini arttırdığı belirlenmiştir (Sinha *et al.* 2005, Pandey *et al.* 2009, Diwan *et al.* 2010, Ali *et al.* 2011). Krom stresine maruz kalan bazı bitkilerde MDA içeriğinin arttığı ve bu artışın yüksek $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 içeriği ve oldukça toksik olan OH^{\bullet} radikali ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Shanker and Pathmanabhan 2004, Choudhury and Panda 2005, Pandey *et al.* 2005, Panda 2007). Stres koşullarında ROT'ların artan üretimi hücreler için bir tehdit olabilmekte; fakat ROT'ların stres cevabı ve savunma yollarının aktivasyonunda bir sinyal molekülü olarak fonksiyon gördüğü düşünülmektedir (Knight and Knight 2001). Bu nedenle, ROT'ların hücrel stres indikatörleri ve stres-cevap sinyal iletim yollarında sekonder mesajcı olduğu belirtilmiştir (Mittler 2002).

2.2.3. Kromun Çevreden Uzaklaştırılması

Kromla kirlenmiş alanların iyileştirilmesi (remediasyon) için kullanılan geleneksel metotlar oldukça pahalı olup; toprak yapısına zarar vermektedir. Bu nedenle, kromla kirlenmiş alanların mikroorganizmalar (Hasin *et al.* 2010) ve bitkiler (Mangkoedihardjo *et al.* 2008, Butler *et al.* 2009) kullanılarak kirlilikten uzaklaştırılması en iyi alternatif teknoloji olarak ortaya çıkmaktadır. Diğer geleneksel metotlarla karşılaştırıldığında bu teknolojiler çevre dostu ve düşük maliyetlidir. Fitoremediasyon veya yeşil remediasyon, toprak ve yeraltı sularından kirleticilerin uzaklaştırılmasında bitkilerin kullanıldığı etkili bir yöntemdir (Jena *et al.* 2004). Fitoremediasyon teknikleri fitotransformasyon, fitostabilizasyon, fitoekstraksiyon veya fitoakümülyasyon, fitovolatilizasyon, fitodegradasyon ve rizofiltrasyon gibi farklı uygulama yöntemlerini kapsamaktadır (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Fitoremediasyon teknikleri (Yang *et al.* 2005, Arthur *et al.* 2005, Solheim 2008)

Teknik	İşlev	Uygulama alanı
Fitoekstraksiyon	Gövde dokularında kirleticilerin biriktirilmesi ve sonrasında hasat edilmesi	Toprak
Rizofiltrasyon	Kökler tarafından kirleticilerin tutulması	Yüzey suyu
Fitostabilizasyon	Kök ve kök salgıları ile kirleticilerin kullanılabilirliklerinin azaltılması	Toprak Yeraltı suları
Fitovolatilizasyon	Transpirasyon ile uçucu kirleticilerin evaporasyonu	Toprak Yeraltı suları
Fitodegradasyon	Rizosferde mikrobiyal yardımlaşma ile kirleticilerin parçalanması	Toprak Yeraltı suları
Fitotransformasyon	Kirleticilerin bitkiler tarafından alınması ve parçalanması	Toprak Yeraltı suları Yüzey suyu

Fitoremediasyonun başarısı, yüksek konsantrasyonlardaki ağır metalleri dokularında biriktirebilen ve tolere edebilen bitki türlerinin teşhis edilmesine bağlıdır (Baker and Whiting 2002). Hiperakümülatör bitkiler gövde dokularında hiperakümülatör olmayan bitki türlerine göre metalleri 100 kat daha fazla biriktirebilmektedir (Claus *et al.* 2007). Akümülatör türler hücrelerinde yüksek seviyelerdeki metalleri detoksifiye edecek şekilde spesifik mekanizmalar geliştirmişlerdir (Yang *et al.* 2005). Örneğin, hücre membranlarının yapısı ve özellikleri metal alım işlevinde önemli bir rol oynamaktadır. Membranların yüklerinden dolayı metal iyonları hücre membranlarından serbest olarak geçememekte ve bu metal iyonlarının hücre içerisinde alımını membran proteinleri aracılığıyla gerçekleştirmektedir (Hooda 2007).

Birçok bitki türünün Cd, Ni, Pb, Se, Sr, Cr ve Zn gibi ağır metallere toleranslı olduğu ve bu metalleri yüksek oranlarda biriktirebildiği bildirilmiştir (Boyd *et al.* 1994, Boyd and Martens 1998, Prasad and Freitas 2003, Przedpelska and Wierzbicka 2007, Diwan *et al.* 2008). Bununla birlikte, *Alyssum* (48 spp.), *Thlaspi* (28 spp.), *Bornmuellera* (4 spp.), *Arabidopsis* (3 spp.), *Arabis* (1 sp.), *Cardamine* (1 sp.), *Cochlearia* (1 sp.), *Peltaria* (1 sp.), *Pseudosempervivum* (1 sp.), *Stanleya* (1 sp.) ve *Streptanthus* (1 sp.) genusa ait 90 bitki türü hiperakümülatör olarak tanımlanmıştır. “Kükürt-seven” bitkiler olarak bilinen Brassicaceae familyasına ait türlerin (Hsiao *et al.* 2007, Diwan *et al.* 2008) yanı sıra

Sutera fodina, *Dicoma niccolifera*, *Leptospermum scoparium*, *Genipa americana* (Rubiaceae) (Barbosa *et al.* 2007), *Typha* spp. (Dong *et al.* 2007), *Amaranthus viridis* (Zou *et al.* 2006), *Miscanthus* (Arduini *et al.* 2006), *Oryza sativa* (Bhattacharyya *et al.* 2005), *Convolvulus arvensis* (Gardea-Torresdey *et al.* 2004), *Leucaea leucocephalla* (Rout *et al.* 1999) ve söğüt (*Salix* spp.) (Yu and Gu, 2008) gibi bitki türlerinin Cr hiperakümülatörü olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, bazı kültür bitkileri kromla kirlenmiş alanların fitoremediasyonunda kullanılabilir (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Krom fitoremediasyonunda kullanılan bazı kültür bitkileri

Tür	Kaynakça
<i>Brassica juncea</i>	Kumar <i>et al.</i> 1995, Zavoda <i>et al.</i> 2001
<i>Brassica napus</i>	Claus <i>et al.</i> 2007
<i>Helianthus annuus</i>	Zavoda <i>et al.</i> 2001, Turgut <i>et al.</i> 2004, Claus <i>et al.</i> 2007
<i>Zea mays</i>	Claus <i>et al.</i> 2007

Hint hardalının (*Brassica juncea*) ciddi fitotoksik semptomlar göstermesine rağmen hem gövde hem de kök dokularında yüksek konsantrasyonlarda Cr biriktirebildiği belirtilmiştir (Han *et al.* 2004). Claus vd. (2007) kirlenmiş alanlardan Cd, Cu, Ni, Zn, Cr, ve Pb ağır metallerinin uzaklaştırılmasında ayçiçeği, mısır ve kolza bitkileri test etmişler ve kolza bitkilerinin yüksek seviyede Cr ve Pb biriktirebildiklerini bildirmişlerdir.

2.3. Ağır Metal Toleransı

Bitkiler ağır metal stresinin üstesinden gelebilmek için iki temel strateji geliştirmişlerdir (Baker 1981). Bunlar, metal iyonlarının hücre içerisine girişinin ve hareketinin sınırlandırıldığı hariç tutma, şelatlama, vakuollerde alıkoyma ve hücre çeperine bağlama gibi mekanizmalar ile ağır metallerin hücre içerisinde detoksifiye edildiği biriktirme mekanizmalarıdır (Prasad 1995; Hall 2002). Bununla birlikte, antioksidantların artan üretimi gibi diğer mekanizmalar da ağır metal toleransında önemli rol oynamaktadır (Sharma and Dietz 2006). Diğer taraftan, bitkilerin toksik metallere olan hassasiyeti kısmen metallothioneinler (MT'ler) ve fitoşelatinler (PC'ler) gibi metal bağlayıcı

proteinlerin içsel sentezi ile giderilebilmektedir (Cobbet and Goldsbrough 2002).

2.3.1. Antioksidant Cevap

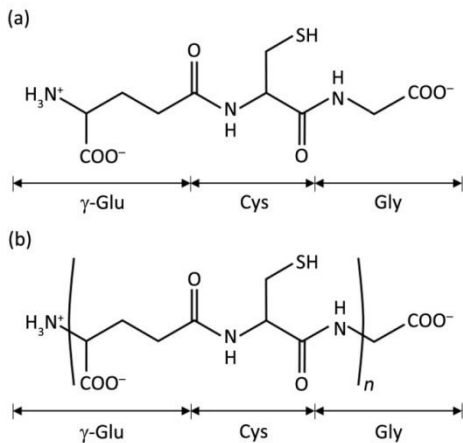
Ağır metallere hipertolerans, hiperakümülyasyon için gerekli özelliklerden biridir ve bitkilerin ağır metallere hipertoleransı fizyolojik ve moleküler mekanizmaların birbirleriyle olan etkileşimine bağlıdır. Bitkilerde ağır metal toleransının sağlanmasında önemli özelliklerden biri de güçlü bir antioksidant savunma sisteminin varlığıdır (Metwally *et al.* 2005, Lei *et al.* 2007, Diwan *et al.* 2008, Khan *et al.* 2009). Ağır metal stresi reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimini arttırmakta ve hücrel H_2O_2 seviyesinin 30 kata kadar çıkarabilmektedir (Mittler 2002). Enzimatik olmayan antioksidantlar önemli hücrel redoks tamponları olan askorbat ve glutatyonun (GSH) yanı sıra tokoferol, flavonoidler, alkaloidler ve karotenoidleri içermektedir (Foyer and Noctor 2005, Sharma and Dietz 2009). Askorbat-glutatyon döngüsünün önemli bileşenleri olan glutatyon redüktaz (GR) ve GSH farklı hücrel kompartımanlarda H_2O_2 'in uzaklaştırılmasında fonksiyon görmektedir. Abiyotik streslere cevap olarak, GSH biyosentetik enzimleri ve GSH seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (Yadav 2010).

Bitkilerde enzimatik antioksidant savunma mekanizmaları oksijenin aktif formları ile etkileşime girerek ROT'ları düşük seviyelerde tutmakta ve toksik eşik değerlerinin aşılmasını engellemektedir (Apel and Hirt 2004). Bitki hücrelerinde antioksidant koruma komplekstir ve farklı hücrel kompartımanlarda lokalize olmuştur. Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) $O_2^{\bullet-}$ 'in H_2O_2 'e dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzim ailesidir (Alscher *et al.* 2002). Oluşan H_2O_2 ise peroksizomlarda lokalize olan katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) ve vakuollerde, hücre çeperi ve sitozolde lokalize olan peroksidazlar (EC 1.11.1.7) tarafından temizlenmektedir (Mittler 2002). Bununla birlikte, H_2O_2 seviyesinin düzenlenmesi askorbat-glutatyon döngüsünün enzimleri ve metabolitleri tarafından sağlanmaktadır (Shigeoka *et al.* 2002). Askorbat peroksidaz (APX, EC 1.11.1.11) ise kloroplast ve mitokondrilerde küçük miktardaki H_2O_2 'in temizlenmesinde fonksiyon görmektedir (Dat *et al.* 2000).

Krom gibi ağır metallere maruz kalan bitkilerde metal toksisitesi ve antioksidantların seviyesi arasındaki korelasyon olduğu belirtilmiştir (Sinha *et al.* 2009, Diwan *et al.* 2010, Ali *et al.* 2011). Bitkilerdeki metal teşvikli oksidatif strese karşı geliştirilen antioksidant cevap bitki genotipine ve metal türüne bağlı olarak değişebilmektedir. Örneğin, Cr(VI) stresi altındaki *Vigna radiata* bitkilerine göre *Brassica juncea* bitkilerinin daha yüksek antioksidant seviyelerine sahip olduğu bildirilmiştir (Diwan *et al.* 2010). Reaktif oksijen türlerinin (serbest radikal) oluşumu ve savunma mekanizmaları arasındaki denge, bitkilerin yaşam döngülerini sürdürebilmeleri için oldukça önemlidir. Antioksidant enzimlerin aktivitesindeki artışın mitokondriyal elektron taşınım zincirindeki Cr teşvikli kısıtlama ile $O_2^{\bullet-}$ radikalinin oluşumuna cevap olarak ortaya çıktığı belirtilmiştir. Diğer taraftan, Cr konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak antioksidant enzimlerin aktivitelerindeki düşüşün, enzim sisteminin kendisi üzerine Cr iyonlarının inhibe edici etkisinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Hayat *et al.* 2012).

2.3.2. Metal Bağlayıcı Ligandlar

Ağır metal stresine maruz kalan birçok bitki türünde ağır metallere bağlanma afinitesine sahip düşük moleküler ağırlıklı tiyollerin sentezlendiği bildirilmiştir (Seth *et al.* 2008, Malec *et al.* 2010, Sinha *et al.* 2010). Cys-sülfidril kalıntılarının yüksek yüzdesine sahip non-protein tiyoller sülfidril kısımlarının disülfidlere oksidasyonu ile ağır metal detoksifikasyonunda önemli rol oynamaktadır. Birçok bitki türünde non-protein tiyoller genellikle bir tripeptid olan glutatyon (GSH) veya polipeptid olan fitoşelatin (PC) formlarında bulunmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Glutatyon (a) ve fitoşelatinin (b) kimyasal yapısı.

Glutasyon kükürt içeren bir tripeptit tiyoldür (γ -glutamatsistein-glisin) ve PC sentezi için öncüdür (Cobbett 2000). Non-protein tiyollerin en önemli bileşeni olan indirgenmiş GSH ağır metal toleransı ve içsel alıkonmada rol oynayabilmektedir (Zhu *et al.* 1999). Glutatyondaki tiyol gruplarının kimyasal reaktivitesi birçok biyokimyasal fonksiyonda GSH'ü uygun hale getirmektedir. Tiyol gruplarının nükleofilik yapısı ağır metaller ile merkaptit bağının oluşumunda oldukça önemlidir. Bu reaktiviteye ek olarak GSH'un nispeten kararlı yapısı ve sudaki yüksek çözünürlüğü glutasyonu birçok stres koşuluna karşı bitkileri koruyan önemli bir biyokimyasal haline getirmektedir (Millar *et al.* 2003, Foyer and Noctor 2005, Rausch *et al.* 2007).

Glutasyon bitki hücrelerinde H_2O_2 seviyesinin kontrolünde fonksiyon görmektedir (Foyer and Noctor 2005, Shao *et al.* 2005). Hidrojen peroksidin parçalanması sırasında indirgenmiş (GSH) ve yükseltgenmiş (GSSG) formları arasındaki oransal değişimin redoks sinyal iletim yolunda önemli olduğu belirtilmiştir (Millar *et al.* 2003). Glutasyonun bir antioksidant olarak fonksiyon gördüğü ve stres koşullarında oluşan ROT'ların direkt olarak indirgenmesine katıldığı bildirilmiştir (Millar *et al.* 2003, Foyer and Noctor 2005, Shao *et al.* 2008). *Lemna trisulca* bitkilerinde Cd stresine cevap olarak tiyol gruplarının seviyesindeki artış ile Cd birikimindeki artış arasındaki korelasyona bağlı olarak tiyol içeren şelatörlerin Cd'un içsel olarak alıkonulmasında önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür (Malec *et al.* 2010). Bununla birlikte, *Vigna radiata*, *Brassica juncea*, *Brassica oleracea* gibi bitki türlerinde Cr konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak tiyol gruplarının seviyesinde kademeli bir artış gösterdiği bildirilmiştir (Özdener *et al.* 2001, Sinha *et al.* 2010). Bununla birlikte, Cr'un tiyol gruplarına bağlanabildiği ve böylelikle glutasyon redüktaz gibi tiyol içeren enzimleri inaktive edebildiği bildirilmiştir (Diwan *et al.* 2010). Kroma toleranslı *Brassica juncea* genotipinde (Pusa Jai Kisan) GSH içeriği ve Cr seviyeleri arasında pozitif bir korelasyonun olduğu belirlenmiştir (Diwan *et al.* 2008). Benzer olarak, kroma toleranslı *B. juncea* bitkilerinde GSH içeriğinin Cr(VI) stresine bağlı olarak arttığı, buna karşın kroma hassas *V. radiata* bitkilerinde GSH içeriğinin Cr(VI) uygulamalarına bağlı olarak azaldığı bildirilmiştir (Diwan *et al.* 2010). Bununla birlikte, *Ocimum tenuiflorum* L. bitkisinin yaprak dokularında Cr(VI)

konsantrasyonunun artışına bağı olarak proteine bağı olmayan tiyol içeriğinin azaldığı bildirilmiştir (Rai et al. 2004).

Bitkilerde fitoşelatinler (PC'ler) ve metallotiyoneinlerin (MT'ler) sistein kalıntılarındaki tiyol grupları ile metal iyonlarını bağılayabildiklerinden dolayı metal toleransı ve homeostazisinde fonksiyon gördükleri ileri sürülmüştür (Cobbett and Goldsbrough 2002). Fitoşelatinler (γ -Glu-Cys)_n-Gly genel yapısına sahip küçük metal bağılayıcı peptitler olup; mantar, bitki ve diğ er organizmalarda bulunmaktadır (Cobbett and Goldsbrough 2002). PC'ler birçok ağır metal tarafından aktive olan fitoşelatin sentaz (PCS) enzimi ile indirgenmiş glutatyondan (GSH) sentezlenmektedir (Clemens and Peršoh 2009). PC'ler sistein sülfidril grupları aracılığıyla ağır metaller ile kompleksler oluşturmakta ve bu PC-metal kompleksleri vakuollere taşınmaktadır (Cobbett and Goldsbrough 2002). Birçok çalışmada, PC'lerin bitkilerdeki metal ve metalloid toleransında önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Iglesia-Turiño et al. 2006, Guo et al. 2008). Zıt olarak, *Thlaspi caerulescens*, *Silene vulgaris*, *Salix viminalis* ve *Pteris vittata* gibi birkaç bitki türünün ağır metallere toleranslı genotiplerine göre hassas genotiplerinin daha yüksek PC seviyelerine sahip olmasından dolayı metal toleransı ve PC'lerin birikimi arasında korelasyon belirlenmemiştir (Ebbs et al. 2002, Arnetoli et al. 2008). Bununla birlikte, PC'lerin metal ve metalloidlerin detoksifikasyonu ile ilişkili olmasına rağmen, PC'ler için yeni fonksiyonlar ileri sürülmüştür. PC'lerin genellikle floemde Cd'un uzun mesafeli taşınımında (Mendoza-Cozatl et al. 2008) ve çinkonun içsel olarak alıkonulmasında (Tennstedt et al. 2009) fonksiyon gördüğü bildirilmiştir.

Metallotiyoneinler (MT'ler) düşük moleküler ağırlıklı (4-14 kDa) ve sisteince zengin metal bağılayıcı proteinlerin bir sınıfı ve mRNA translasyon ürünleridir (Cobbett and Goldsbrough 2002). MT proteinleri sistein kalıntılarının düzenlenişine göre sınıflandırılmaktadır (Cherian and Chan 1993):

a) Sınıf I MT'ler: Oldukça korunmuş 20 adet sistein kalıntısı içermekte ve omurgalılarda yaygın olarak bulunmaktadır.

- b) Sınıf II MT'ler: Genel karakteristik özelliklere sahip olmalarına karşın peptit boyunca sistein dağılımları onları Sınıf I MT'lerden ayırmaktadır. Sınıf II MT'ler omurgasız hayvanların yanı sıra bitki ve mantarlarda bulunmaktadır.
- c) Sınıf III MT'ler: Glutatyondan enzimatik olarak sentezlenen PC'leri kapsamaktadır.

Bitki MT'leri filogenetik ilişkileri ve dizi benzerliklerine göre sınıflandırılmaktadır (Cobbett and Goldsbrough 2002, Zimeri *et al.* 2005, Freisinger 2009). Bitki MT'leri tip 1 (p1), tip 2 (p2), tip 3 (p3) ve tip 4 (pec) olmak üzere dört gruba ayrılabilir. MT'ler dokuya özgü biçimde ifade olmakla birlikte, MT transkriptleri farklı bitki türlerinin kök, gövde, yaprak, çiçek, meyve ve tohum gibi farklı dokularında belirlenmiştir. Tip 1 MT'lere ait genlerin çoğunlukla köklerde ifade olduğu (Guo *et al.* 2003, Kohler *et al.* 2004, Yang *et al.* 2009), tip 2 MT'lere ait genlerin ise genellikle yapraklarda ifade olduğu bildirilmiştir (Huang and Wang 2009, 2010). Bununla birlikte, tip 3 MT'ler olgunlaşan etli meyve ve yapraklarda (Guo *et al.* 2003, Kohler *et al.* 2004), buğday MT proteini (E_c-1) gibi tip 4 MT'ler ise gelişen tohumlarda ifade olmaktadır (Cobbett and Goldsbrough 2002).

Ağır metallerin plazma membranı aracılığıyla sitozolden atılması veya sitozolik metal bağlanmasını takiben vakuolde bu komplekslerin alıkonulması ağır metal toleransındaki temel mekanizmalardır. Hayvanlarda MT'ler Cd, Pb ve Hg gibi gerekli olmayan metallerin detoksifikasyonunu, Cu ve Zn gibi esansiyel metallerin homeostazisini ve serbest radikallerin temizlenmesini içeren birkaç işlevde rol oynamaktadır (Foley *et al.* 1997). Son yıllarda, çok sayıda çalışma bitki MT'lerinin de hayvan ve mantarlardaki gibi önemli roller oynadığını göstermiştir (Cobbett and Goldsbrough 2002, Chiang *et al.* 2006, *et al.* 2006, Huang *et al.* 2011). Ağır metallerle maruz kalan bitkilerde MT transkriptlerinin seviyesi artmış olmasına rağmen genel bir sonuç ortaya konulamamıştır (Usha *et al.* 2007, Yang *et al.* 2009). Bitkilerde MT'lerin kesin fonksiyonları tamamen anlaşılammış olmasına karşın, birkaç çalışma MT'lerin ağır metal toleransı ve homeostazisinde fonksiyon görebileceğini göstermiştir (Cobbett and Goldsbrough 2002, Jack *et al.* 2007). Örneğin, bakıra toleranslı *Silene vulgaris*

populasyonlarında yüksek seviyede *SvMT2b* gen transkriptlerinin bulunduğu ve hassas mayada aşırı *SvMT2b* gen ifadesinin Cu toleransını arttırdığı bildirilmiştir (van Hoof *et al.* 2001). Bununla birlikte, *Medicago sativa* bitkilerinde *MsMT2a* geninin hem kontrol hem de Cd stresi uygulamalarında, *MsMT2b* geninin ise sadece Cd stresi uygulamasında ifade olduğu bildirilmiştir. Bu bağlamda, *MsMT2a*'nın tüm gelişim evrelerinde yaygın olarak bulunabileceği, buna karşın *MsMT2b*'nin ağır metalle teşvik edilen bir gen olabileceği ileri sürülmüştür (Wang *et al.* 2011).

Metallotiyoneinlerin ağır metal detoksifikasyonundaki fonksiyonlarına ek olarak bitki MT'lerinin oksidatif ve diğer stres koşullarına maruz kalan bitkilerin savunma sisteminde fonksiyon gördüğüne dair kanıtlar bulunmaktadır. Reaktif oksijen türlerini uzaklaştırma yeteneği ile ilişkili olarak metallotiyoneinlerin ozmotik, tuz, soğuk ve ağır metal streslerinde bir savunma rolünün olduğu ileri sürülmüştür (Lee *et al.* 2004, Mir *et al.* 2004, Wong *et al.* 2004, Xue *et al.* 2009). Kolza (*Brassica napus*) MT1 geni olan *LSC54* ifadesinin ROT üretimi ile teşvik edildiği ve yaprak senesensi sırasında ROT metabolizmasındaki dengesizlik ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (Navabpour *et al.* 2003). Bununla birlikte, *Tamarix hispida* metallotiyonein-benzeri *ThMT3* genini ifade eden mayada H₂O₂ içeriği azalırken Cd, Zn ve Cu toleransının arttığı bildirilmiştir (Yang *et al.* 2011). Pamuk fidelerinde *GhMT3a* mRNA seviyesinin yüksek tuzluluk, kuraklık, düşük sıcaklık, absisik asit, etilen, reaktif oksijen türleri, Zn ve Cu tarafından arttığı ve GhMT3a proteininin etkili bir ROT temizleyicisi olabileceği bildirilmiştir (Xue *et al.* 2009). Kuraklık ve Zn stresi altında *OsMT1a* genini aşırı ifade eden çeltik bitkilerinin daha etkin bir antioksidant sisteme sahip olması, *OsMT1a*'nın doğrudan veya dolaylı olarak antioksidant sistemine katıldığını desteklemektedir (Yang *et al.* 2009). Metal bağlanması ve ROS temizlenmesi arasındaki karşılıklı etkileşim henüz açık değildir. ROT temizlenmesi sırasında, MT'lerin sistein kalıntılarında ROT bağlandığında metaller serbest kalabilmektedir. Sonuç olarak, serbest kalmış metallerin birbirini tetikleyen sinyal iletimine katılabileceği ileri sürülmüştür (Hassinen *et al.* 2011).

2.4. Ağır Metal Toleransının Arttırılmasında Bazı Ön Uygulamaların Önemi

Bitkilerde ağır metal toleransı, bitkilerde doğal olarak oluşan bileşiklere analog olan bileşiklerin dışsal olarak uygulaması ile arttırılabilmektedir. Yani, bitkilerde metal toleransının arttırılması için metal bağlayıcı şelatörler, fitohormonlar ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi sinyal moleküllerinin dışsal uygulamaları kullanılmaktadır (Lopez *et al.* 2009, Hu *et al.* 2009, Sharma *et al.* 2011).

Kimyasal veya fiziksel uygulamalar ile teşvik edilen orta düzeydeki oksidatif stres, daha sonradan uygulanacak strese karşı bitkileri koruyabilmektedir (Gong *et al.* 2001, Uchida *et al.* 2002). Hidrojen peroksit nispeten kararlı ve membranlardan difüze olabildiğinden dolayı bitki hücrelerinde uyum/savunma mekanizmalarını tetikleyen bir sinyal molekülü olarak düşünülmektedir (Chen *et al.* 1993, Prasad *et al.* 1994, Cruz de Carvalho 2008). Düşük konsantrasyonlarda H_2O_2 birçok savunma geninin ifadesini arttırmakta ve abiyotik streslere karşı oluşturulan çoklu savunma cevaplarını aktive ederken, yüksek konsantrasyonları oksidatif zarara ve hatta programlanmış hücre ölümüne neden olmaktadır (Levine *et al.* 1994, Prasad *et al.* 1994). Uygun seviyedeki H_2O_2 ön uygulamasının düşük sıcaklık (Prasad *et al.* 1994, Yu *et al.* 2003), tuzluluk (Uchida *et al.* 2002, Azevedo Neto *et al.* 2005, Wahid *et al.* 2007, Xu *et al.* 2008) ve ağır metal (Hsu and Kao 2007, Hu *et al.* 2009) gibi stres koşullarına karşı toleransı arttırdığı belirtilmiştir.

Krom stresi altındaki buğday tohumlarında çimlenme yüzdesinin azaldığı, buna karşın hidrojen sülfid (H_2S) vericisi olarak sodyum hidrosülfid (NaHS) ön uygulamasının bu inhibisyonu azalttığı bildirilmiştir (Zhang *et al.* 2010). Ayrıca, Cr(VI) stresine maruz kalmış çimlenen tohumlarda NaHS ön uygulamasının amilaz, esteraz, süperoksit dismutaz, katalaz, askorbat peroksidaz ve guaiakol peroksidaz aktivitelerini arttırdığı, lipoksijenaz aktivitesi ve MDA ile H_2O_2 'in aşırı üretimini azalttığı belirtilmiştir (Zhang *et al.* 2010). *Raphanus sativus* bitkilerinde büyüme, klorofil, protein ve prolin içeriklerindeki inhibisyonun ve MDA içeriğindeki artışın 28-homobrassinolid ve epibrassinolid uygulamaları ile iyileştirildiği bildirilmiştir (Sharma *et al.* 2011,

Choudhary *et al.* 2011). Krom stresine maruz bırakılan çeltik bitkilerinde besi ortamına ilave edilen glutasyonun antioksidant enzimlerin aktivitesinde artışa, MDA birikiminde ise azalışa neden olduğu belirtilmiştir (Zeng *et al.* 2012). Bununla birlikte, dışsal glutasyon uygulamasının Cr alınımını ve gövde dokularına Cr translokasyonunu azalttığı bildirilmiş ve buna bağlı olarak glutasyonun kök hücrelerindeki Cr kompartımanlaştırılmasında fonksiyon gördüğü ileri sürülmüştür (Zeng *et al.* 2012).

Gong vd. (2001), mısır fidelerinde 42°C'de 4 saat ön uygulamasının üşütme, yüksek sıcaklık, kuraklık ve tuz streslerine karşı adaptasyonu teşvik ettiğini ve yüksek sıcaklık teşvikli H₂O₂ birikiminin bu adaptasyonun sağlanmasında fonksiyon gördüğünü bildirmişlerdir. Diğer taraftan, ağır metal toksisitesinin iyileştirilmesinde salisilik asit ön uygulamalarının önemi üzerine çalışmalar mevcuttur (Metwally *et al.* 2003, Guo *et al.* 2007a, b).

Ağır metal toleransının artırılması için farklı sinyal yollarının düzenlenmesinde H₂O₂ seviyelerinin önemli olduğu ve birçok stres koşulunda H₂O₂ üretimindeki artışın bitkilerin uyum ve toleransında önemli rol oynadığını göstermektedir.

Bu araştırmada, ağır metallere kirlenmiş alanların fitoremediasyonu için muhtemel potansiyele sahip kolza (*Brassica napus* L.) Süzer çeşidinde krom birikimi ve toleransı üzerine H₂O₂ ön uygulamasının iyileştirici etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, 18 günlük kolza fideleri aşağıdaki uygulamalara maruz bırakılmıştır:

- (1) Besin çözeltisi, 24 sa → Besin çözeltisi, 1 gün
- (2) Besin çözeltisi, 24 sa → Besin çözeltisi, 7 gün
- (3) Besin çözeltisi + 200 µM H₂O₂, 24 sa → Besin çözeltisi, 1 gün
- (4) Besin çözeltisi + 200 µM H₂O₂, 24 sa → Besin çözeltisi, 7 gün
- (5) Besin çözeltisi, 24 sa → Besin çözeltisi + 50 µM K₂Cr₂O₇, 1 gün
- (6) Besin çözeltisi, 24 sa → Besin çözeltisi + 50 µM K₂Cr₂O₇, 7 gün
- (7) Besin çözeltisi + 200 µM H₂O₂, 24 sa → Besin çözeltisi + 50 µM K₂Cr₂O₇, 1 gün
- (8) Besin çözeltisi + 200 µM H₂O₂, 24 sa → Besin çözeltisi + 50 µM K₂Cr₂O₇, 7 gün

Bu uygulamalardan elde edilen fidelerde, toprak üstü ve kök dokularının taze ve kuru ağırlıkları belirlenmiş ve bu dokularda Cr birikimi analizleri gerçekleştirilmiştir. Diğer taraftan, fidelerin yaprak dokularında fotosentetik pigment içerikleri, lipit peroksidasyonu, tiyol içerikleri ve bazı antioksidant enzimlerin aktiviteleri belirlenmiştir. Yine yaprak dokularında metallothionein proteinini kodlayan *BnMP1* geninin (*Brassica napus* metallothionein protein 1) ifadesindeki değişimler değerlendirilmiştir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Çimlenme ve Bitki Yetiştirme Koşulları

Bu araştırmada, kanola (*Brassica napus* L. cv. Süzer) tohumları Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden elde edilmiştir. Kanola çeşidine ait tohumların kabuk yüzey sterilizasyonu %1'lik NaOCl'de 10 dakika süreyle yapıldıktan sonra 5 kez distile sudan geçirilmiştir. Sterilizasyon sonrasında tohumlar, içerisinde distile su ile ıslatılmış iki kat filtre kâğıdı bulunan 20×11.5×5 cm boyutlarında şeffaf plastikten yapılmış çimlendirme kaplarında kontrollü iklim kabininde (23°C, karanlık, %60 nem) 24 saat çimlendirilmiştir. Yaklaşık aynı kök uzunluğuna sahip çimlenmiş tohumlar 0.5 L besin çözeltisi [(mM): 2.4 Ca(NO₃)₂, 1.0 KH₂PO₄, 3.0 KNO₃, 1.0 MgSO₄ ve 0.5 NaCl, (µM): 23.1 H₃BO₃, 4.6 MnCl₂, 0.38 ZnSO₄, 0.16 CuSO₄, 0.052 H₂MoO₄ ve 44.8 FeEDTA; pH: 6.0] içeren hidroponik kültür ortamına transfer edilmiştir. Fideler 3 gün daha kontrollü iklim kabininde büyütülmüştür. Dördüncü günün sonunda, her bir kültür kabında toplam 10 fide kalacak şekilde seyreltmeye gidilmiştir. Dört günlük etiyole fideler kontrollü iklim kabininde (23°C, 260 µmol m⁻² s⁻¹ ışık yoğunluğu, 16:8 saat fotoperiyot ve %60 nem) 14 gün boyunca büyütülmüş ve besin çözeltileri gün aşırı değiştirilmiştir. On sekiz günlük fideler aşağıdaki uygulamalara maruz bırakılmış (Çizelge 3.1) ve mevcut süreler sonunda hasat edilmiştir.

Kanola Süzer çeşidinin fideleri için Cr(VI) stresi ve Cr(VI) toleransının teşviki ile ilgili konsantrasyonlar ön çalışmalar ile belirlenmiştir. Buna göre, fide büyümesinin önemli düzeyde inhibisyona uğradığı; fakat daha sonraki analizler için örneklemelerin yapılabileceği düzeyde fide gelişiminin gözlemlendiği 50 µM Cr(VI) konsantrasyonu Cr(VI) stres uygulaması olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, 200 µM H₂O₂ konsantrasyonu kanola fidelerinin Cr(VI) toleransını teşvik etmek için optimum konsantrasyon olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.1. On sekiz günlük kanola fidelerinin maruz kaldığı uygulamalar

Uygulama no	Uygulama kodu	Uygulama adı	Uygulama
1	K-1	Kontrol-1	Besin çözeltisi, 24 sa → Besin çözeltisi, 1 gün
2	K-7	Kontrol-7	Besin çözeltisi, 24 sa → Besin çözeltisi, 7 gün
3	HP-1	H ₂ O ₂ uygulamalı-1	Besin çözeltisi + 200 µM H ₂ O ₂ , 24 sa → Besin çözeltisi, 1 gün
4	HP-7	H ₂ O ₂ uygulamalı-7	Besin çözeltisi + 200 µM H ₂ O ₂ , 24 sa → Besin çözeltisi, 7 gün
5	Cr(VI)-1	Cr (VI) uygulaması-1	Besin çözeltisi, 24 sa → Besin çözeltisi + 50 µM K ₂ Cr ₂ O ₇ , 1 gün
6	Cr(VI)-7	Cr (VI) uygulaması-7	Besin çözeltisi, 24 sa → Besin çözeltisi + 50 µM K ₂ Cr ₂ O ₇ , 7 gün
7	HP-Cr(VI)-1	H ₂ O ₂ ön uygulamalı Cr (VI) uygulaması-1	Besin çözeltisi + 200 µM H ₂ O ₂ , 24 sa → Besin çözeltisi + 50 µM K ₂ Cr ₂ O ₇ , 1 gün
8	HP-Cr(VI)-7	H ₂ O ₂ ön uygulamalı Cr (VI) uygulaması-7	Besin çözeltisi + 200 µM H ₂ O ₂ , 24 sa → Besin çözeltisi + 50 µM K ₂ Cr ₂ O ₇ , 7 gün

3.2. Toprak Üstü Organların Taze ve Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi

Kontrol [K-1 ve K-7], hidrojen peroksit [HP-1 ve HP-7], Cr(VI) uygulaması [Cr(VI)-1 ve Cr(VI)-7] ve H₂O₂ ön uygulamalı 50 µM Cr(VI) uygulamalarını [HP-Cr(VI)-1 ve HP-Cr(VI)-7] içeren 8 farklı uygulamadan elde edilen fidelerin toprak üstü organlarının (gövde+yaprak) taze ağırlıkları (mg fide⁻¹) belirlendikten sonra 80°C'lik etüvde 48 sa süreyle kurutulmuş ve bu süre sonunda kuru ağırlıkları (mg fide⁻¹) belirlenmiştir.

3.3. Krom Birikiminin Belirlenmesi

Krom birikiminin daha belirgin farklılıklarla ortaya konulması amacıyla, fidelerin toprak üstü ve kök dokularındaki toplam Cr içeriği 7. günde belirlenmiştir. Kontrol [K-7], hidrojen peroksit [HP-7], Cr(VI) uygulaması [Cr(VI)-7] ve H₂O₂ ön uygulamalı 50 µM

Cr(VI) uygulamasını [HP-Cr(VI)-7] takiben elde edilen fideler %10'luk HNO₃ ile yıkandıktan sonra 3 kez distile sudan geçirilmiştir. Bu ağır metal uzaklaştırma işlemini takiben fidelerin toprak üstü organları ve kök dokuları ayrılmış ve kuru materyalin elde edilmesi için 80°C'lik etüvde 48 sa inkübe edilmiştir. Kuru bitki örnekleri (1 g), 10 mL %65'lik HNO₃ kullanılarak mikrodalga fırında (Berghof Products + Instruments, Germany) yakılmıştır. Yakma işlemi sonucunda örneklerin hacimleri bidistile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Stok Cr çözeltisi (1000 ppm) seyreltilerek hazırlanan kör dahil dört farklı konsantrasyondaki çözelti ile kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı ($r^2 = 0.999$ ve üzeri) ve örneklerin Cr konsantrasyonları, Winlab32 paket programı kullanan ICP/OES (Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry, Perkin Elmer 2100 DV) cihazı ile hesaplanmıştır. Toprak üstü ve kök dokularında Cr birikimi $\mu\text{g g}^{-1}$ KA olarak hesaplanmıştır.

3.4. Yaprak Dokusunda Biyokimyasal ve Moleküler Analizler

Kontrol [K-1 ve K-7], hidrojen peroksit [HP-1 ve HP-7], Cr(VI) uygulaması [Cr(VI)-1 ve Cr(VI)-7] ve H₂O₂ ön uygulamalı 50 μM Cr(VI) uygulamalarını [HP-Cr(VI)-1 ve HP-Cr(VI)-7] içeren 8 farklı uygulamadan elde edilen fidelerin yaprak dokuları biyokimyasal ve moleküler analizler için kullanılmıştır.

3.4.1. Fotosentetik Pigment İçeriğinin Belirlenmesi

Sekiz farklı uygulamaya maruz bırakılan kanola fidelerinin yaprak dokularından toplam klorofil (Klo $a + b$) ve karotenoidlerin ekstraksiyonu ve konsantrasyon tayinleri Wellburn (1994)'e göre yapılmıştır. Uygulamalara ait fidelerin yapraklarından yaklaşık 50 mg taze yaprak dokusu alınmıştır. Küçük parçalara ayrılan dokular, 10 mL soğutulmuş metanol içeren ağzı kapaklı cam test tüplerine alınmıştır. Pigmentlerin tamamen metanole geçmesi için tüpler 48 sa süresince +4°C ve karanlıkta bekletilmiştir. Her uygulamaya ait çözeltinin Klo a , Klo b ve karotenoidlerin absorbanları sırasıyla 666, 653 ve 470 nm dalga boylarında, TU-1880 Double Beam UV-VIS spektrofotometre kullanılarak ölçülmüş ve konsantrasyonlar aşağıdaki

formüllere göre taze ağırlık (TA) temelinde mg g^{-1} TA olarak hesaplanmıştır (Wellburn 1994):

$$\text{Klorofil } a \text{ (Klo } a) = 15.65A_{666} - 7.34A_{653} \times S^*$$

$$\text{Klorofil } b \text{ (Klo } b) = 27.05A_{653} - 11.21A_{666} \times S$$

$$\text{Karotenoidler} = (1000A_{470} - 2.86\text{Klo } a - 129.2\text{Klo } b)/221 \times S$$

* S: Seyreltme katsayısı

3.4.2. Tiyol İçeriklerinin Belirlenmesi

Sekiz farklı uygulamaya maruz bırakılan kanola fidelerinin yaprak dokularında tiyol içerikleri Nagalakshmi ve Prasad (2001)'a göre belirlenmiştir. Yaprak dokuları (500 mg) sıvı azot kullanılarak havanda toz haline getirildikten sonra 20 mM EDTA ve 20 mM askorbik asit içeren ekstraksiyon tamponunda homojenize edilmiştir. Homojenantlar $+4^{\circ}\text{C}$ ve $12.000 \times g'$ de 20 dakika santrifüj edildikten sonra 0.5 mL süpernatant, 2.4 mL 200 mM Tris tamponu (pH 8.2) ve 0.1 mL 10 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoik asit (Ellman's ayırıcı) çözeltileri ile karıştırılmıştır. Karışım 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 412 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Toplam tiyol grupları ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 13.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplanmıştır (Harmens *et al.* 1993).

Protein olmayan (non-protein) tiyol içeriklerinin belirlenmesi için 1 mL süpernatant 2 mL %10'luk (w/v) sülfosalisilik asit ile karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışım 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 15 dakika $3.000 \times g'$ de santrifüj edilmiştir. Santrifügasyondan sonra 2 mL süpernatant 1.9 mL 400 mM Tris-HCl (pH 8.9) tamponu ve 0.1 mL Ellman's ayırıcı ile karıştırılmıştır. Karışımlar 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 412 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Toplam tiyol içeriklerinden protein olmayan tiyol içeriklerinin çıkarılması ile proteine bağlı tiyol içeriği hesaplanmıştır.

3.4.3. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi

Sekiz farklı uygulamaya maruz bırakılan kanola fidelerinin yaprak dokularında lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi Kosugi ve Kikugawa (1985)'nin bildirdiği metoda göre yapılmıştır. 250 mg yaprak dokusu 5 mL %5'lik trikloroasetik asit (TCA) ile homojenize edilmiştir. Homojenatlar +4°C ve 12.000×g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan 250 µL alınarak üzerine %0.5 tiyobarbitirik asit (TBA) içeren %20'lik TCA çözeltisi eklenmiştir. Bu karışım daha sonra 95°C'de 30 dakika su banyosunda tutulmuştur. Su banyosundan çıkarılan tüplerdeki reaksiyonları durdurmak için tüpler buz banyosuna konulmuştur. Sonrasında örnekler 2 mL'lik test tüplerine alınarak 10.000×g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar kuvars küvetlere alınarak 532 ve 600 nm'de TU-1880 Double Beam UV-VIS spektrofotometre ile absorbansları ölçülmüştür. Kör olarak %0.5 TBA ihtiva eden %20'lik TCA çözeltisi (örnek içermeyen) kullanılmıştır. Yaprak dokularının MDA içeriği molar ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ TA}$ olarak belirlenmiştir.

3.4.4. Antioksidant Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.4.4.1. Enzim Ekstraksiyonu

Sekiz farklı uygulamaya maruz bırakılan kanola fidelerinin yaprak dokuları (500 mg) 1 mM EDTA, %1 (w/v) polivinilpirrolidon (PVP) ve 5 mM askorbik asit (yalnızca APX için) içeren 5 mL 50 mM potasyum fosfat tamponunda (pH 7.0) homojenize edilmiştir. Homojenat +4°C ve 14.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), guaiakol peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT) gibi antioksidant enzimlerin aktivitesinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Süpernatantlardaki protein miktarı Bradford (1976)'a göre belirlenmiştir.

3.4.4.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Belirlenmesi

Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) aktivitesi, nitroblue tetrazolium (NBT) metoduna göre (Beauchamp and Fridovich 1971) NBT'nin fotoindirgenmesinin 560 nm'de ölçülmesi ile belirlenmiştir. Aktivite tayini için 50 mM fosfat tamponu (pH 7.8), 0.1 mM EDTA, 13 mM metionin, 75 µM NBT ve %1'lik Triton X-100 içeren karışıma 70 µl enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Daha sonra bu karışıma ve 2 µM riboflavin eklenmiş ve test tüplerinin 10 dakika için beyaz ışık kaynağı altına yerleştirilmesiyle reaksiyon başlatılmıştır. Örneklerin absorbans değerleri 560 nm dalga boyunda spektrofotometrik (TU-1880 Double Beam UV-VIS) olarak belirlenmiştir. Bir ünite SOD, deneysel koşullar altında NBT indirgenmesinde %50 inhibisyona neden olan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir. Toplam SOD aktivitesi U mg⁻¹ protein olarak hesaplanmıştır.

3.4.4.3. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Belirlenmesi

Askorbat peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) aktivitesi Nakano ve Asada (1987)'ya göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 50 mM fosfat tamponu (pH 7.0), 0.1 mM EDTA, 0.25 mM askorbat, 5 mM H₂O₂ ve 20 µL enzim ekstraktından oluşmaktadır. Reaksiyon, 100 µL 5 mM H₂O₂'in ilavesi ile başlatılmıştır. Askorbik asidin oksidasyon oranı, spektrofotometre kullanılarak 3 dakika için 290 nm'de absorbanstaki azalmayı takiben belirlenmiştir. Toplam APX aktivitesi, askorbatın ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak µmol min⁻¹ mg⁻¹ protein olarak hesaplanmıştır.

3.4.4.4. Guaiakol Peroksidaz (POD) Aktivitesinin Belirlenmesi

Guaiakol peroksidaz (POD; EC 1.11.1.7) aktivitesi Mika ve Lüthje (2003)'e göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 25 mM sodyum-asetat-HCl (pH 5.0), 51.3 mM guaiakol, 12.5 mM H₂O₂ ve enzim ekstraktı içermektedir. Reaksiyon enzim ekstraktının ilavesiyle başlatılmış ve absorbanstaki değişim 470 nm'de 3 dakika süre boyunca takip edilmiştir. Toplam POD aktivitesi, guaiakolun ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak µmol min⁻¹ mg⁻¹ protein olarak belirlenmiştir.

3.4.4.5. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Belirlenmesi

Toplam katalaz aktivitesi (CAT; EC 1.11.1.6) Aebi (1984)'ne göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) ve 10.6 mM H₂O₂ içermektedir. Reaksiyon 25 µL enzim ekstraktının ilave edilmesi ile başlatılmıştır. CAT aktivitesi, H₂O₂'in 3 dakika için 240 nm'de ($\epsilon = 39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bozunması ile $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein olarak belirlenmiştir.

3.4.5. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Analizleri

3.4.5.1. Total RNA İzolasyonu ve Miktar Tayini

Sekiz farklı uygulamaya maruz bırakılan kanola fidelerinin yaprak dokularından total RNA izolasyonu RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Yaklaşık 50 mg yaprak dokusu steril havan ve tokmağı kullanılarak sıvı azot ile toz haline getirilmiş ve sıvı azot ile soğutulmuş steril 1.5 mL'lik test tüplerine alınarak lizis tamponu ile muamele edilmiştir. Lizatlar 2 mL'lik toplama tüplerine yerleştirilmiş QIAshredder spin kolonlara transfer edilmiş ve 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpünde oluşan süpernatant yeni bir 1.5 mL'lik test tüpüne alınmış ve üzerine 0.5 hacim etanol (%96–100) eklenmiştir. Daha sonra bu karışım 2 mL'lik toplama tüplerine yerleştirilmiş RNeasy spin kolonlara transfer edilmiştir. Transfer sonrası tüpler 10.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve toplama tüpünde biriken süpernatant uzaklaştırılmıştır. Spin kolonların yıkanması için kolonlar 3 kez yıkama çözeltisi ve santrifügasyon serilerinden geçirilmiştir. Daha sonra RNA elüsyonu için spin kolonlar 50 µL RNaz içermeyen su ile yıkanmış ve RNA örneklerini içeren elüsyon -20°C'de saklanmıştır. RNA konsantrasyonu 260 nm'de absorbansın ölçülmesiyle spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. RNeasy ile saflaştırılmış total RNA'nın bütünlüğü ve boyut dağılımı %1.2'lik denatüre edici agaroz jel elektroforezi ve etidyum bromür boyama ile kontrol edilmiştir.

Formaldehit (FA) agaroz jelin hazırlanması:

- %1.2'lik FA jelinin hazırlanması (10 x 14 x 0.7 cm boyutlu jel için):
 - 1.2 g agaroz
 - 10 mL 10X FA jel tamponu
 - RNaz içermeyen su ile son hacim 100 mL'ye tamamlanır.

10X FA jel tamponu:

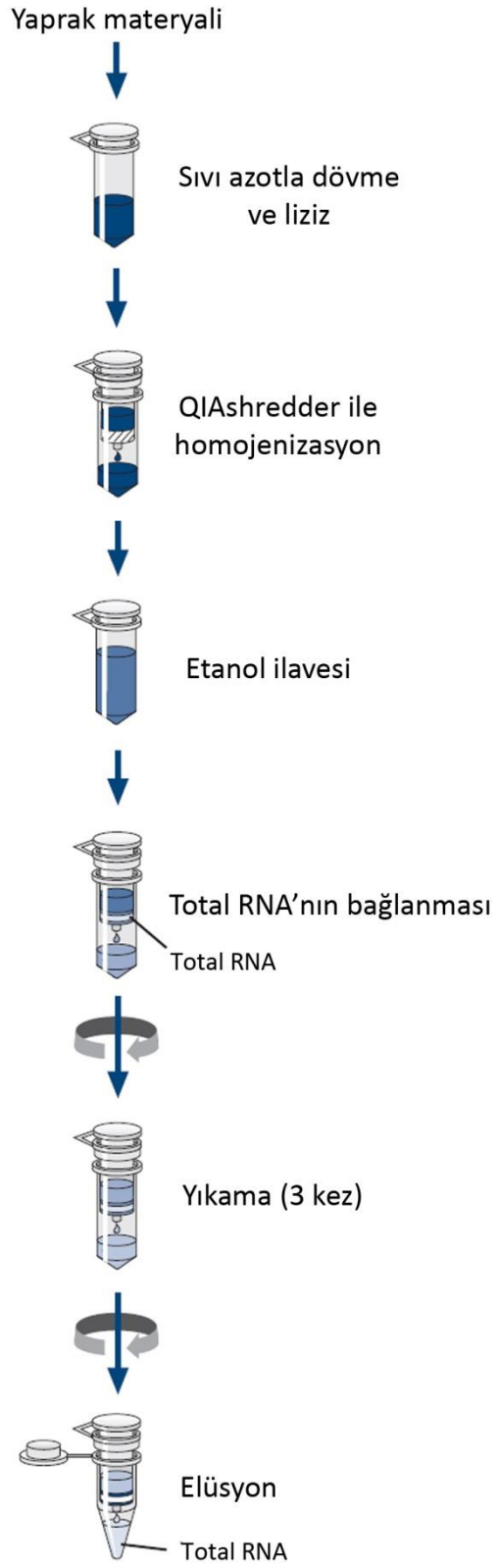
- 200 mM 3-[N-morfolino]propansülfonik asit (MOPS)
- 50 mM sodyum asetat
- 10 mM EDTA
- NaOH ile pH 7.0'ye ayarlanır.

1X FA jel yürütme tamponu:

- 100 mL 10X FA jel tamponu
- 20 mL %37 (12.3 M) formaldehit
- 880 mL RNaz içermeyen su

5X RNA yükleme tamponu:

- 16 µL doymuş bromophenol blue solüsyonu
- 80 µL 500 mM EDTA, pH 8.0
- 720 µL %37'lik (12.3 M) formaldehit
- 2 mL %100 gliserol
- 3.084 mL formamid
- 4 mL 10X FA jel tamponu
- RNaz içermeyen su ile 10 mL'ye tamamlanır.

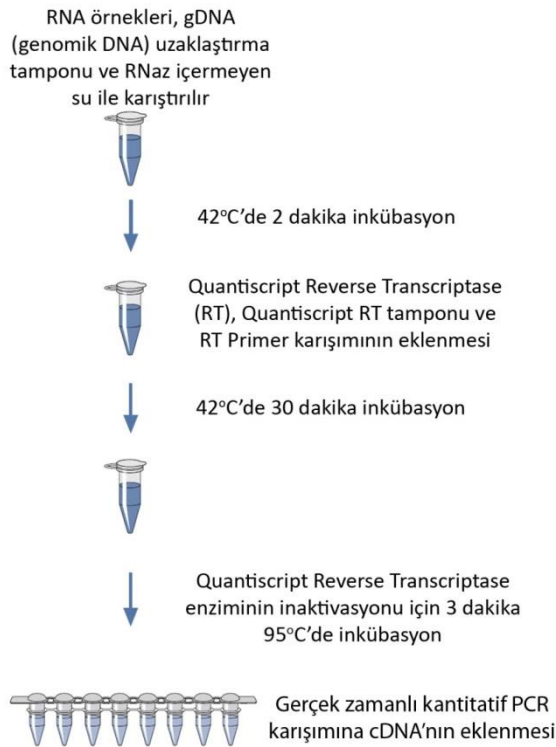


Şekil 3.1. RNeasy Plant Mini kiti ile total RNA ekstraksiyonu için yöntem akış şeması.

Bir hacim 5X RNA yükleme tamponu 4 hacim RNA örneğine ilave edilmiş ve karışım birkaç dakika 65°C'de inkübe edilmiş ve dengelenmiş FA jele yüklenmiştir. 1X FA jel yürütme tamponunda RNA örnekleri 5–7 V/cm olacak şekilde yürütülmüştür.

3.4.5.2. Tek İplik cDNA Sentezi

Tek iplik cDNA (komplementer DNA=tamamlayıcı DNA) sentezi QuantiTect[®] Reverse Transcription kiti (Qiagen) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). Saflaştırılmış 1 µg RNA içeren örnekler genomik DNA'nın etkin bir şekilde uzaklaştırılması için 2 dakika 42°C'de gDNA (genomik DNA) uzaklaştırma tamponunda inkübe edilmiştir. Daha sonra örnekler Quantiscript Reverse Transcriptase (RT), Quantiscript RT tamponu ve RT Primer karışımını içeren master karışımı ile muamele edilmiştir. Tüpler daha sonra 42°C'de 30 dakika inkübe edilmiş ve bu süre sonunda Quantiscript Reverse Transcriptase enziminin inaktivasyonu için 3 dakika 95°C'ye maruz bırakılmıştır. Sentezlenen tek iplik cDNA'lar gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonlarında (RT-QPCR veya qPCR) kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.2. Quantitect Reverse Transcription kiti ile tek iplik cDNA sentez yöntemi.

3.4.5.3. Primer Tasarlanması

Brassica napus metalloprotein proteini (*BnMP1*; Gen bankası aksesyon no: GU189581.1) ve β -aktin (*BnActin*; Gen bankası aksesyon no: AF111812.1) kodlayan transkriptler ileri ve geri primerler kullanılarak amplifiye edilmiştir. Hedef cDNA'ların amplifikasyonu için kullanılacak primerler NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri bankasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) *Brassica napus* genlerine göre tasarlanmıştır. Her iki gene ait ileri ve geri primerler yaklaşık 120 bp uzunluğunda, %45-58 GC oranına ve 56 ila 57°C aralığında erime sıcaklığına sahip olacak şekilde tasarlanmıştır. Bitki hücrelerinde sürekli ifade olan β -aktin geni gerçek zamanlı kantitatif PCR'ı doğrulamak için iç kontrol olarak kullanılmıştır. *BnMP1* ve *BnActin* genleri için primerler aşağıdaki gibi tasarlanmıştır:

BnMP1 Fw: 5'-TACCACCACCCAGACTCTTG

BnMP1 Rev: 5'-GCAGACAGATCCGCACTTG

BnActin Fw: 5'-CAGACCGTATGAGCAAAGAGAT

BnActin Rev: 5'-CTGAGGGAAGCAAGAATGGAA

3.4.5.4. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR

mRNA seviyelerinin kantitatif değerlendirmeleri Rotor-Gene Q cihazı (QIAGEN) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gerçek zamanlı kantitatif PCR amplifikasyonu, üretici firma tarafından sağlanan protokole göre QuantiTect® Probe RT-PCR Master karışımı (QIAGEN) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Karışımı
HotStarTaq® DNA Polimeraz
QuantiTect Probe RT-PCR tamponu
dUTP içeren dNTP karışımı
ROX™ pasif referans boya
8 mM MgCl ₂

Hedef cDNA'ların amplifikasyonu için gerekli reaksiyonlar Çizelge 3.2'deki hacim ve son konsantrasyon değerleri dikkate alınarak kurulmuştur. PCR koşulları 95°C'de 15 dakika ve 40 döngülük 94°C'de 15 s ve 60°C'de 60 s olacak şekilde ayarlanmıştır. cDNA konsantrasyonları 15-30. döngüler arasında C_T (eşik döngüsü; reaksiyon flüoresans sinyalinin eşik değerini kestiği döngü sayısı) değerleri oluşturmak için kullanılmıştır. Hedef gene ait transkriptlerin miktarı β-aktin mRNA'sı ile normalize edilmiştir. Kontrol bitkilerine göre *BnMP1* mRNA ifadesindeki artış Livak ve Schmittgen (2001)'in standart $2^{-\Delta\Delta C_T}$ metodu ile belirlenmiştir.

Çizelge 3.2. Gerçek zamanlı kantitatif PCR reaksiyonu kurulumu

İçerik	Hacim	Son konsantrasyon
2x QuantiTect Probe RT-PCR Master karışımı	12.5 µL	1x
Primer-Prob	1 µL	0.4 µM
Kalıp cDNA	5 µL	≤500 ng
RNaz içermeyen su	6.5 µL	
Toplam reaksiyon hacmi	25 µL	

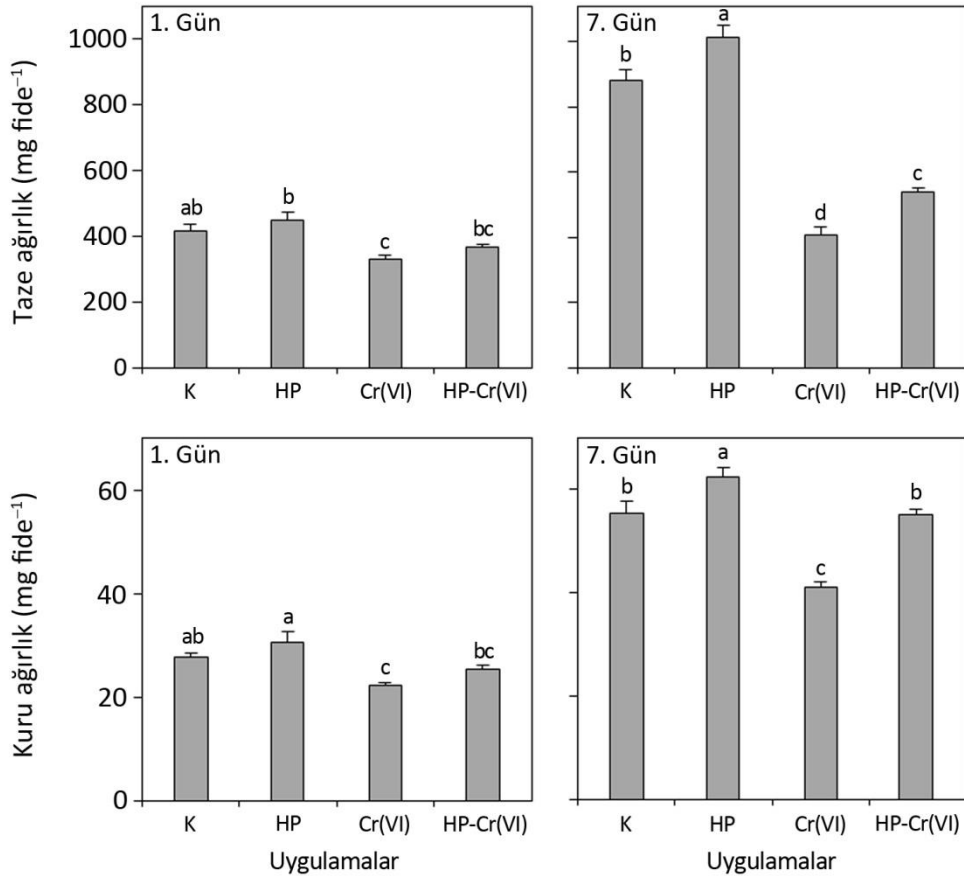
3.5. İstatistiki Analizler

Denemeler, rastgele deneme deseninde düzenlenmiştir. Denemelerden elde edilen veriler en az üç tekrarlı olarak düzenlenmiş üç bağımsız denemeden elde edilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel varyans analizleri SPSS paket programı kullanılarak test edilmiştir. Farklı parametrelerden elde edilen veriler arasındaki önemli farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir ($P<0.05$).

4. BULGULAR

4.1. Cr(VI) Stresi Altındaki Kolza Fidesinde Büyüme ve Krom Birikimi Üzerine Hidrojen Peroksit Ön Uygulamasının Etkisi

Bu araştırmada, kolzanın (*Brassica napus* L.) Süzer çeşidinde Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit ön uygulamasının fide büyümesi ve Cr birikimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, 18 günlük kolza fideleri kontrol [K], hidrojen peroksit [HP], Cr(VI) uygulaması [Cr(VI)] ve H₂O₂ ön uygulamalı 50 µM Cr(VI) uygulamalarına [HP-Cr(VI)] maruz bırakılmıştır. Uygulamaların 1. ve 7. gününde fide büyümesi (toprak üstü dokuların taze ve kuru ağırlıkları) ve Cr birikimi belirlenmiştir (Şekil 4.1 ve 4.2).



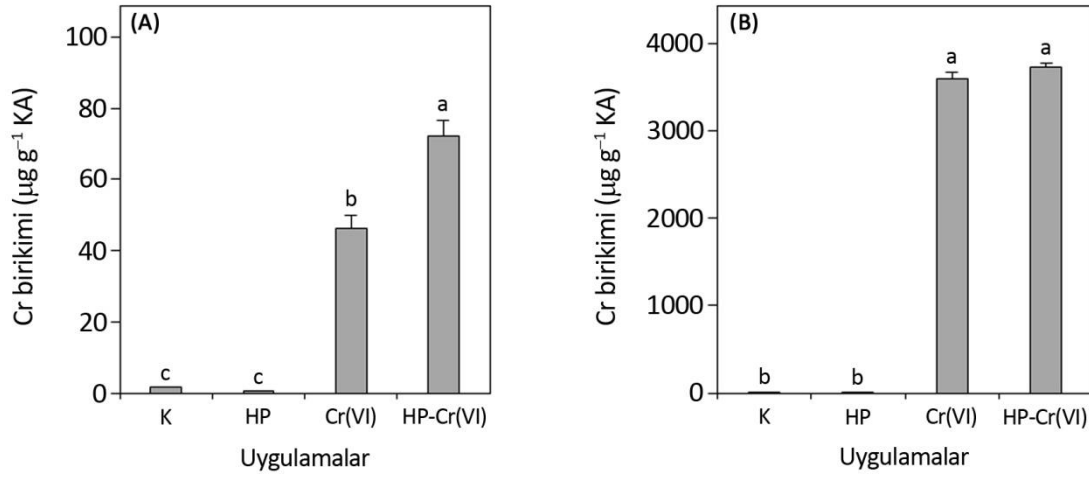
Şekil 4.1. Kolza Süzer çeşidinde Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit (HP) ön uygulamalarının toprak üstü dokuların taze ve kuru ağırlıkları üzerine etkisi. Farklı harfler, uygulamalar arasında Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki ($P<0.05$) farklılıkları göstermektedir. Barlar standart hatayı ($\pm SH$) göstermektedir.

Kolza Süzer çeşidinin toprak üstü dokularının taze ve kuru ağırlıkları 50 µM Cr(VI) uygulamasında önemli düzeyde ($P<0.05$) azalmıştır (Şekil 4.1). 50 µM Cr(VI) uygulamasının 1. gününde, kolza fidelerinin taze ve kuru ağırlıkları kontrole göre sırasıyla %20.9 ve %19.3 oranında azalmıştır. 50 µM Cr(VI) uygulamasının 7. gününde taze ve kuru ağırlıklar kontrole göre sırasıyla %53.6 ve %25.9 oranında azalmıştır. Diğer taraftan, 50 µM Cr(VI) stresinden önce uygulanan 200 µM H₂O₂ ön uygulaması büyümdaki inhibisyonu önemli düzeyde iyileştirmiştir. Cr(VI) stresi uygulanmış fidelere göre H₂O₂ ön uygulamasını takiben Cr(VI) [HP-Cr(VI)] stresine maruz bırakılan fidelerde, taze ve kuru ağırlıklar krom uygulamasının 1. gününde sırasıyla %11.0 ve %13.4 oranında, krom uygulamasının 7. gününde ise sırasıyla %32.1 ve %34.1 oranında artış göstermiştir. Diğer taraftan, kontrol fidelerine göre H₂O₂ ön uygulanmış fidelerin (HP) taze ve kuru ağırlıkları %8.3-15 oranında artmıştır (Şekil 4.1).

Kolza Süzer çeşidinde, besin ortamına verilen 50 mM Cr(VI) 7. günün sonunda toprak üstü ve kök dokularında yüksek oranda Cr birikimine neden olmuştur (Şekil 4.2A ve B). Bununla birlikte, toprak üstü dokulara göre kök dokusunda yaklaşık 78 kat daha fazla Cr birikimi belirlenmiştir. Yalnızca 50 µM Cr(VI) uygulaması ile karşılaştırıldığında, H₂O₂ ön uygulaması toprak üstü dokulardaki Cr konsantrasyonunda %56.1 oranında önemli düzeyde artışa neden olmuştur ($P<0.05$). Bununla birlikte, H₂O₂ ön uygulaması kök dokularında Cr konsantrasyonunu arttırmış olmasına karşın bu artış önemsiz bulunmuştur (Şekil 4.2A ve B).

4.2. Cr(VI) Stresi ve Hidrojen Peroksit Ön Uygulamasına Maruz Bırakılan Kolza Fidelerinin Yaprak Dokusunda Biyokimyasal ve Moleküler Analizler

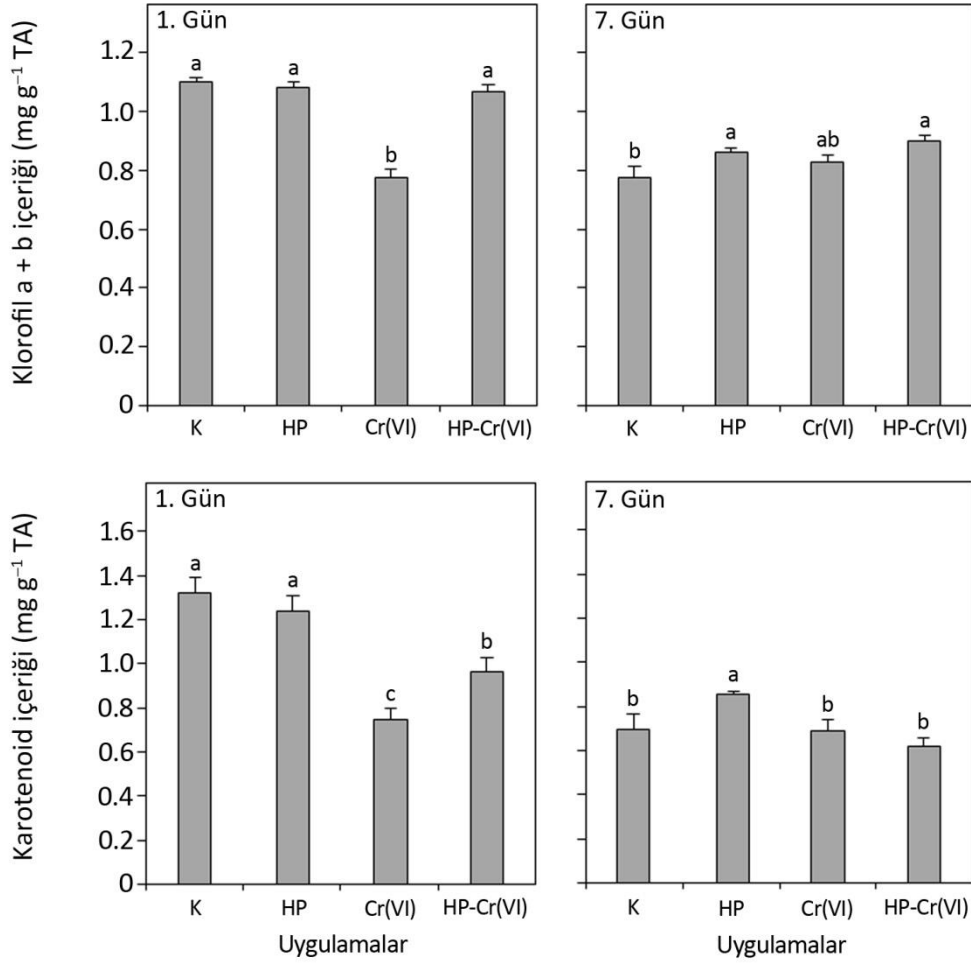
Kontrol [K-1 ve K-7], hidrojen peroksit [HP-1 ve HP-7], Cr(VI) uygulaması [Cr(VI)-1 ve Cr(VI)-7] ve H₂O₂ ön uygulamalı 50 µM Cr(VI) uygulamalarını [HP-Cr(VI)-1 ve HP-Cr(VI)-7] içeren 8 farklı uygulamadan elde edilen fidelerin yaprak dokularında fotosentetik pigment, tiyol, malondialdehit (MDA) içerikleri, bazı antioksidant enzimlerin aktivitesi ve metallothionein proteinini kodlayan *BnMP1* geninin (*Brassica napus* metallothionein protein 1) ifadesindeki değişimler değerlendirilmiştir.



Şekil 4.2. Kolza Süzer çeşidinin toprak üstü (A) ve kök (B) dokularında Cr birikimi üzerine Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit (HP) ön uygulamalarının etkisi. Farklı harfler, uygulamalar arasında Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki ($P<0.05$) farklılıkları göstermektedir. Barlar standart hatayı ($\pm SH$) göstermektedir.

4.2.1. Fotosentetik Pigment İçerikleri

Brassica napus L. cv. Süzer çeşidinin yaprak dokularında toplam klorofil (klorofil *a* + *b*) ve karotenoid içerikleri Şekil 4.3'de gösterilmiştir. Krom uygulamasının 1. gününde, 50 μM Cr(VI) uygulaması toplam klorofil ve karotenoid içeriklerinde sırasıyla %29.8 ve %43.2 oranında azalmaya neden olurken, krom uygulamasının 7. gününde önemli bir etki göstermemiştir. Bununla birlikte, yalnızca krom uygulamasının 1. gününde, 50 μM Cr(VI) stresinden önce uygulanan 200 μM H_2O_2 ön uygulaması klorofil içeriğindeki inhibisyonu önemli düzeyde iyileştirmiştir. Yalnızca Cr(VI) stresi uygulanmış fidelere göre H_2O_2 ön uygulamasını takiben Cr(VI) stresine maruz bırakılan fidedelerde, toplam klorofil ve karotenoid içerikleri krom uygulamasının 1. gününde ise sırasıyla %37.6 ve %28.9 oranında artış göstermiştir. Diğer taraftan, hidrojen peroksit ön uygulamasının iyileştirici etkisi krom uygulamasının 7. gününde saptanmamıştır (Şekil 4.3A ve B).

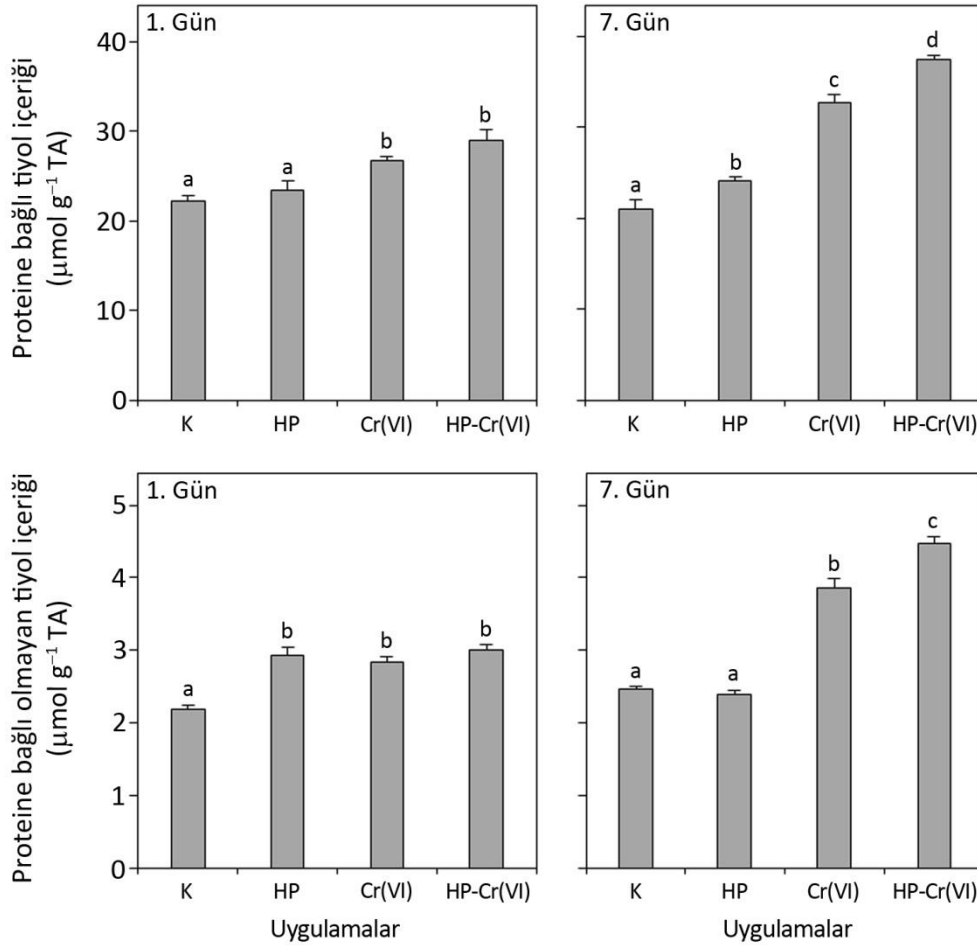


Şekil 4.3. Kolza Süzer çeşidinin yaprak dokularında klorofil a + b ve karotenoid içerikleri üzerine Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit (HP) ön uygulamasının etkisi. Farklı harfler, uygulamalar arasında Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki ($P < 0.05$) farklılıkları göstermektedir. Barlar standart hatayı ($\pm SH$) göstermektedir.

4.2.2. TiyoI İçerikleri

Brassica napus L. cv. Süzer çeşidinin yaprak dokularında 50 μM Cr(VI) uygulaması tiyoI içeriklerinde önemli düzeyde ($P < 0.05$) artışa neden olmuştur (Şekil 4.4). Krom uygulamasının 1. gününde, 50 mM Cr(VI) uygulaması kolza fidelerinin proteine bağı (PT) ve protein bağı olmayan tiyoI (NPT) içeriklerinde kontrole göre sırasıyla %19.9 ve %29.9 oranında artışa neden olmuştur. Krom uygulamasının 7. gününde ise PT ve NPT içerikleri kontrole göre sırasıyla %55.4 ve %56.2 oranında artmıştır. Bununla birlikte, 50 μM Cr(VI) stresinden önce uygulanan 200 μM H₂O₂ ön uygulaması tiyoI içeriklerinde

ilave artışa neden olmuştur. Yalnızca Cr(VI) stresi uygulanmış fidelere göre H₂O₂ ön uygulamasını takiben Cr(VI) stresine maruz bırakılan fidelerde, PT ve NPT içerikleri krom uygulamasının 1. gününde sırasıyla %8.7 ve %6.5 oranında, krom uygulamasının 7. gününde ise sırasıyla %14.3 ve %15.9 oranında artış göstermiştir (Şekil 4.4A ve B).

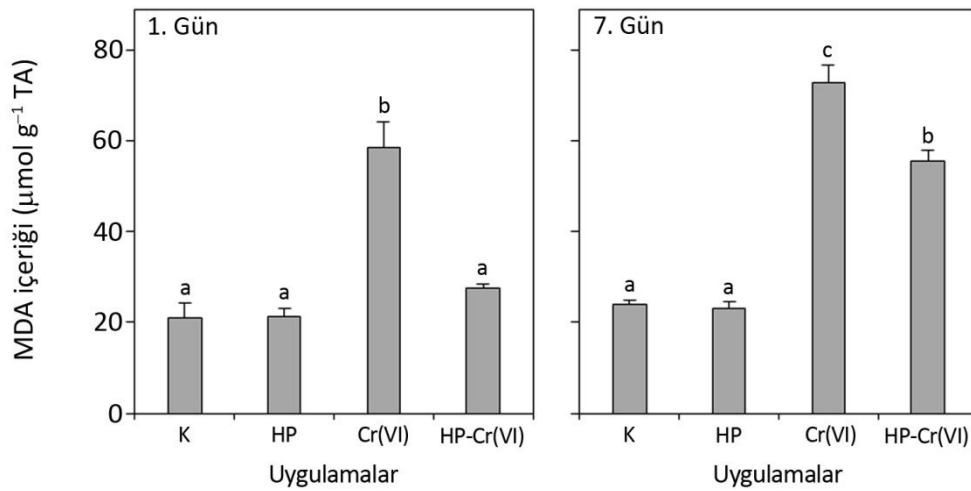


Şekil 4.4. Kolza Süzer çeşidinin yaprak dokularında proteine bağlı ve proteine bağlı olmayan tiyol içerikleri üzerine Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit (HP) ön uygulamasının etkisi. Farklı harfler, uygulamalar arasında Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki ($P < 0.05$) farklılıkları göstermektedir. Barlar standart hatayı ($\pm SH$) göstermektedir.

4.2.3. Lipit Peroksidasyonu

Brassica napus L. cv. Süzer çeşidinin yaprak dokularında lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) içerikleri 50 µM Cr(VI) uygulamasında önemli düzeyde ($P < 0.05$) artmıştır (Şekil 4.5). Krom uygulamasının 1. ve 7. gününde, 50 µM

Cr(VI) uygulaması MDA içeriklerinde kontrole göre sırasıyla 2.8 ve 3.0 kat artışa neden olmuştur. Bununla birlikte, 50 μM Cr(VI) stresinden önce uygulanan 200 μM H_2O_2 ön uygulaması lipid peroksidasyonunu önemli düzeyde iyileştirmiştir. Yalnızca Cr(VI) stresi uygulanmış fidelere göre H_2O_2 ön uygulamasını takiben Cr(VI) stresine maruz bırakılan fidelerde MDA içerikleri krom uygulamasının 1. ve 7. gününde sırasıyla %53.0 ve %23.5 oranında azalmıştır. Diğer taraftan, kontrol fidelerine göre H_2O_2 ön uygulanmış fidelerin (HP) MDA içeriklerinde önemli farklılık belirlenmemiştir (Şekil 4.5).

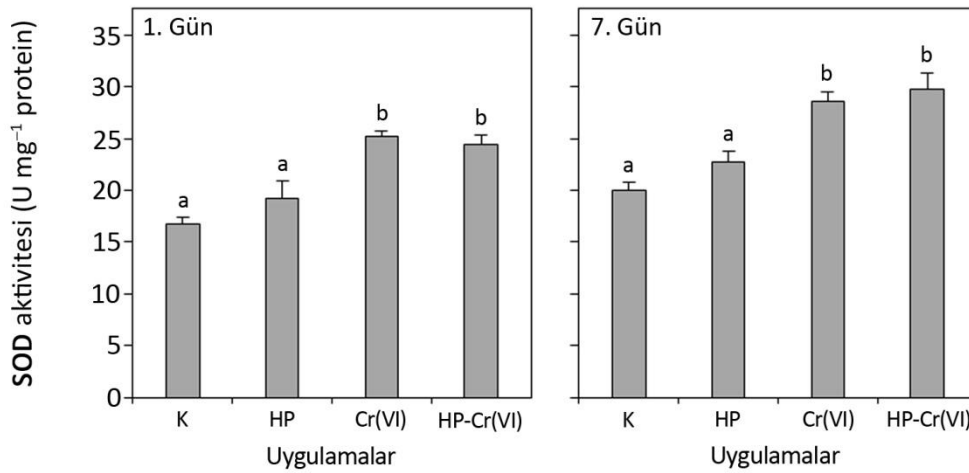


Şekil 4.5. Kolza Süzer çeşidinin yaprak dokularında MDA içerikleri üzerine Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit (HP) ön uygulamasının etkisi. Farklı harfler, uygulamalar arasında Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki ($P<0.05$) farklılıkları göstermektedir. Barlar standart hatayı ($\pm\text{SH}$) göstermektedir.

4.2.4. Antioksidant Enzim Aktiviteleri

Bu araştırmada, kontrol [K-1 ve K-7], hidrojen peroksit [HP-1 ve HP-7], Cr(VI) uygulaması [Cr(VI)-1 ve Cr(VI)-7] ve H_2O_2 ön uygulamalı 50 μM Cr(VI) uygulamalarına [HP-Cr(VI)-1 ve HP-Cr(VI)-7] maruz bırakılan kolzanın (*Brassica napus* L.) Süzer çeşidinde süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), guaiakol peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT) gibi antioksidant enzimlerin aktivitelerindeki değişimler belirlenmiştir (Şekil 4.6-4.9).

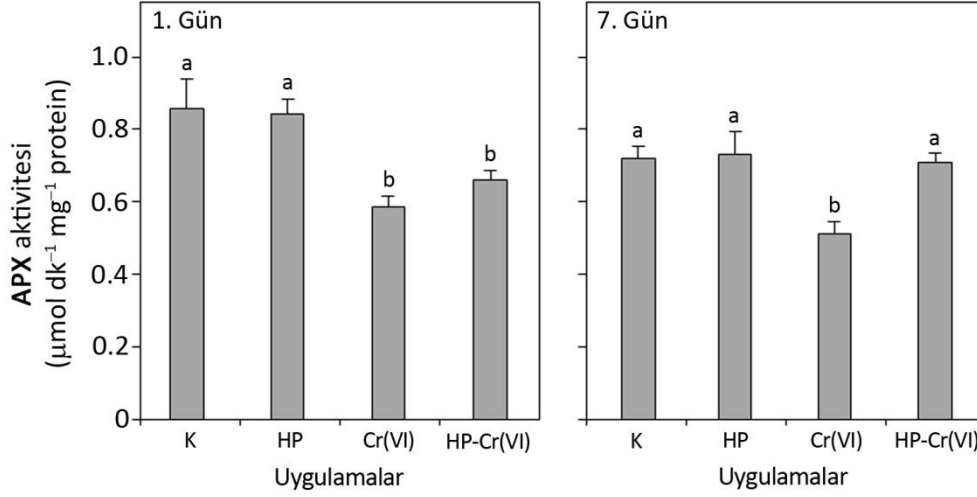
Kolza fidelerinin yaprak dokularında, Cr(VI) uygulaması ve H₂O₂ ön uygulamalı 50 µM Cr(VI) uygulaması süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinde önemli düzeyde ($P<0.05$) artışa neden olmuştur (Şekil 4.6). Krom uygulamasının 1. gününde, 50 µM Cr(VI) uygulaması ve H₂O₂ ön uygulamalı 50 µM Cr(VI) uygulamaları SOD aktivitesinde kontrole göre sırasıyla %50.1 ve %45.7 oranında, krom uygulamasının 7. gününde ise sırasıyla %43.0 ve %49.0 oranında artışa neden olmuştur. Bununla birlikte, yalnızca Cr(VI) stresi uygulanmış fidelerin ve H₂O₂ ön uygulamasını takiben Cr(VI) stresine maruz bırakılan fidelerin SOD aktiviteleri arasında önemli farklılık belirlenmemiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Kolza Süzer çeşidinin yaprak dokularında süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi üzerine Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit (HP) ön uygulamasının etkisi. Farklı harfler, uygulamalar arasında Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki ($P<0.05$) farklılıkları göstermektedir. Barlar standart hatayı ($\pm SH$) göstermektedir.

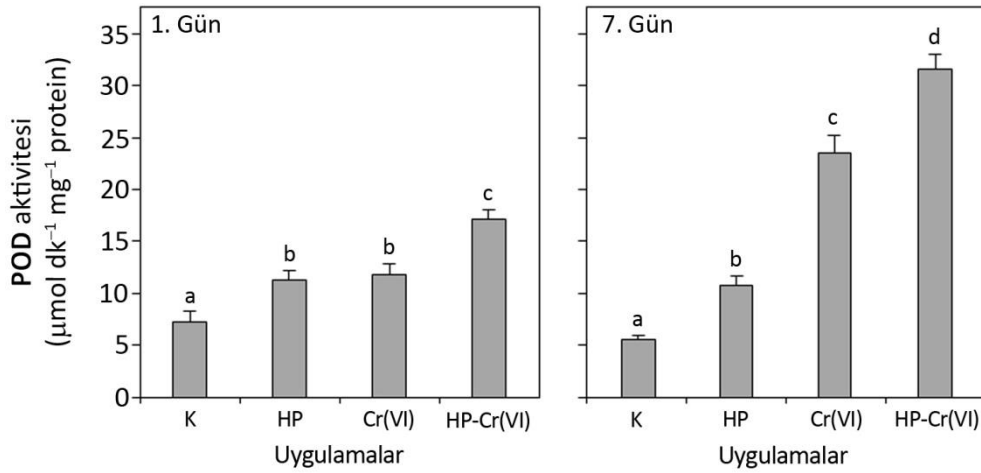
Kolza fidelerinin yaprak dokularında, 50 µM Cr(VI) uygulaması askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinde önemli düzeyde ($P<0.05$) inhibisyona neden olmuştur (Şekil 4.7). Krom uygulamasının 1. ve 7. gününde, 50 mM Cr(VI) uygulaması APX aktivitesini kontrole göre sırasıyla %31.7 ve %28.8 oranında azaltmıştır. Bununla birlikte, 50 µM Cr(VI) stresinden önce uygulanan 200 µM H₂O₂ ön uygulaması sadece krom uygulamasının 7. gününde APX aktivitesindeki inhibisyonu önemli düzeyde iyileştirmiştir. Yalnızca Cr(VI) stresi uygulanmış fidelere göre H₂O₂ ön uygulamasını takiben Cr(VI) stresine maruz bırakılan fidelere, APX aktivitesi krom uygulamasının 7. gününde %38.0 oranında artış göstermiştir. Diğer taraftan, kontrol fidelerine göre H₂O₂

ön uygulanmış fidelerin (HP) yaprak dokularında APX aktiviteleri arasında önemli farklılık belirlenmemiştir (Şekil 4.7).

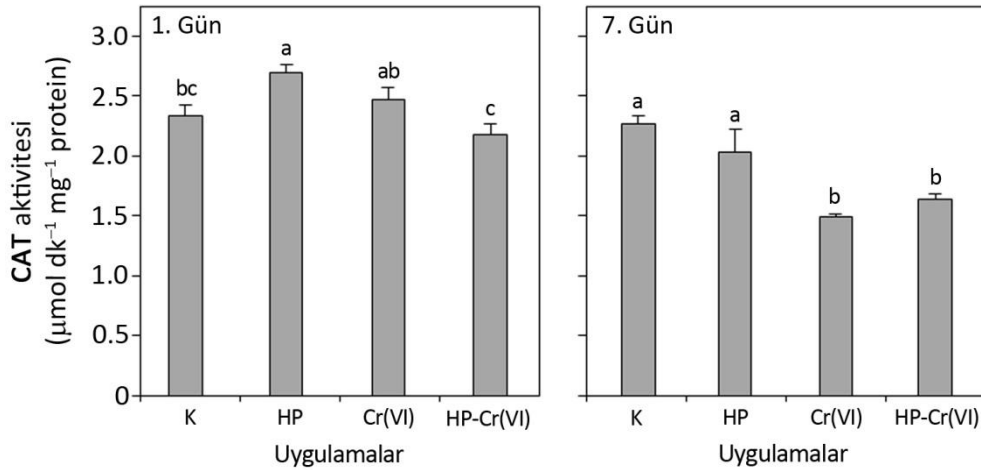


Şekil 4.7. Kolza Süzer çeşidinin yaprak dokularında askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi üzerine Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit (HP) ön uygulamasının etkisi. Farklı harfler, uygulamalar arasında Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki ($P < 0.05$) farklılıkları göstermektedir. Barlar standart hatayı ($\pm SH$) göstermektedir.

Kolza fidelerinin yaprak dokularında, Cr(VI) uygulaması ve H₂O₂ ön uygulamalı 50 µM Cr(VI) uygulaması guaiakol peroksidaz (POD) aktivitesinde önemli düzeyde ($P < 0.05$) artışa neden olmuştur (Şekil 4.8). Krom uygulamasının 1. gününde, 50 µM Cr(VI) uygulaması ve H₂O₂ ön uygulamalı 50 µM Cr(VI) uygulamaları POD aktivitesinde kontrole göre sırasıyla 1.6 ve 2.4 kat, krom uygulamasının 7. gününde ise sırasıyla 4.2 ve 5.7 kat artışa neden olmuştur. Yalnızca Cr(VI) stresi uygulanmış fidelere göre H₂O₂ ön uygulamasını takiben Cr(VI) stresine maruz bırakılan fidelerde, APX aktivitesi krom uygulamasının 1. ve 7. gününde sırasıyla %44.9 ve %34.3 oranında önemli düzeyde artış göstermiştir. Diğer taraftan, kontrol fidelerine göre H₂O₂ ön uygulanmış fidelerin (HP) yaprak dokularındaki POD aktivitesinde önemli düzeyde artış belirlenmemiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Kolza Süzer çeşidinin yaprak dokularında guaiakol peroksidaz (POD) aktivitesi üzerine Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit (HP) ön uygulamasının etkisi. Farklı harfler, uygulamalar arasında Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki ($P < 0.05$) farklılıkları göstermektedir. Barlar standart hatayı ($\pm SH$) göstermektedir.



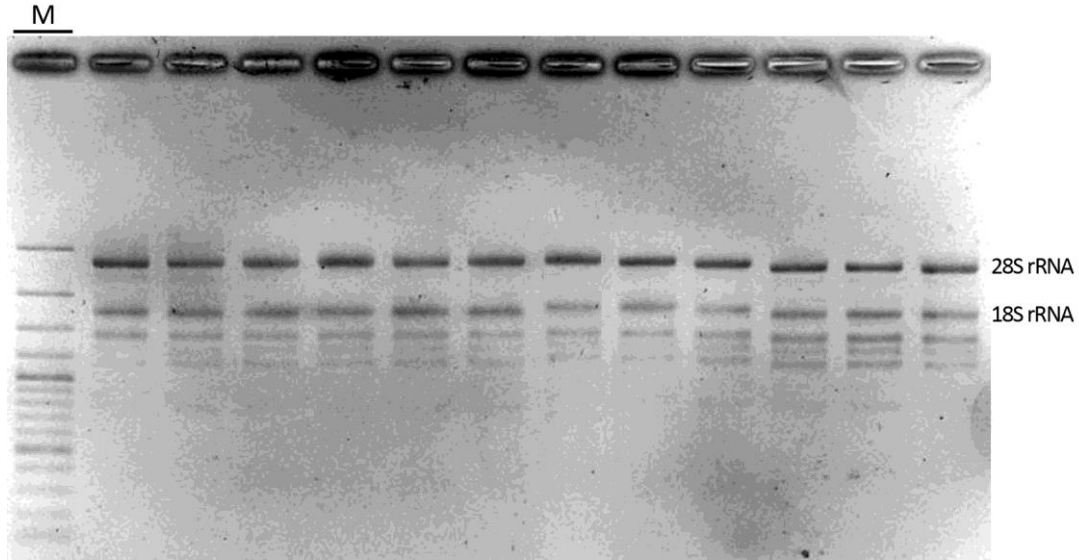
Şekil 4.9. Kolza Süzer çeşidinin yaprak dokularında katalaz (CAT) aktivitesi üzerine Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit (HP) ön uygulamasının etkisi. Farklı harfler, uygulamalar arasında Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki ($P < 0.05$) farklılıkları göstermektedir. Barlar standart hatayı ($\pm SH$) göstermektedir.

Kolza fidelerinin yaprak dokularında, Cr(VI) uygulaması ve H₂O₂ ön uygulaması 50 µM Cr(VI) uygulaması katalaz (CAT) aktivitesinde önemli düzeyde ($P < 0.05$) bazı farklılıklara neden olmuştur (Şekil 4.9). Krom uygulamasının 7. gününde, 50 µM Cr(VI) uygulaması ve H₂O₂ ön uygulaması 50 µM Cr(VI) uygulamaları CAT aktivitesinde kontrole göre sırasıyla %34.3 ve %27.9 oranında önemli düzeyde azalmaya neden olmuştur. Diğer

tarafından, Yalnızca Cr(VI) stresi uygulanmış fidelere göre H₂O₂ ön uygulamasını takiben Cr(VI) stresine maruz bırakılan fidelerin yaprak dokularında CAT aktiviteleri arasında önemli farklılık belirlenmemiştir (Şekil 4.9).

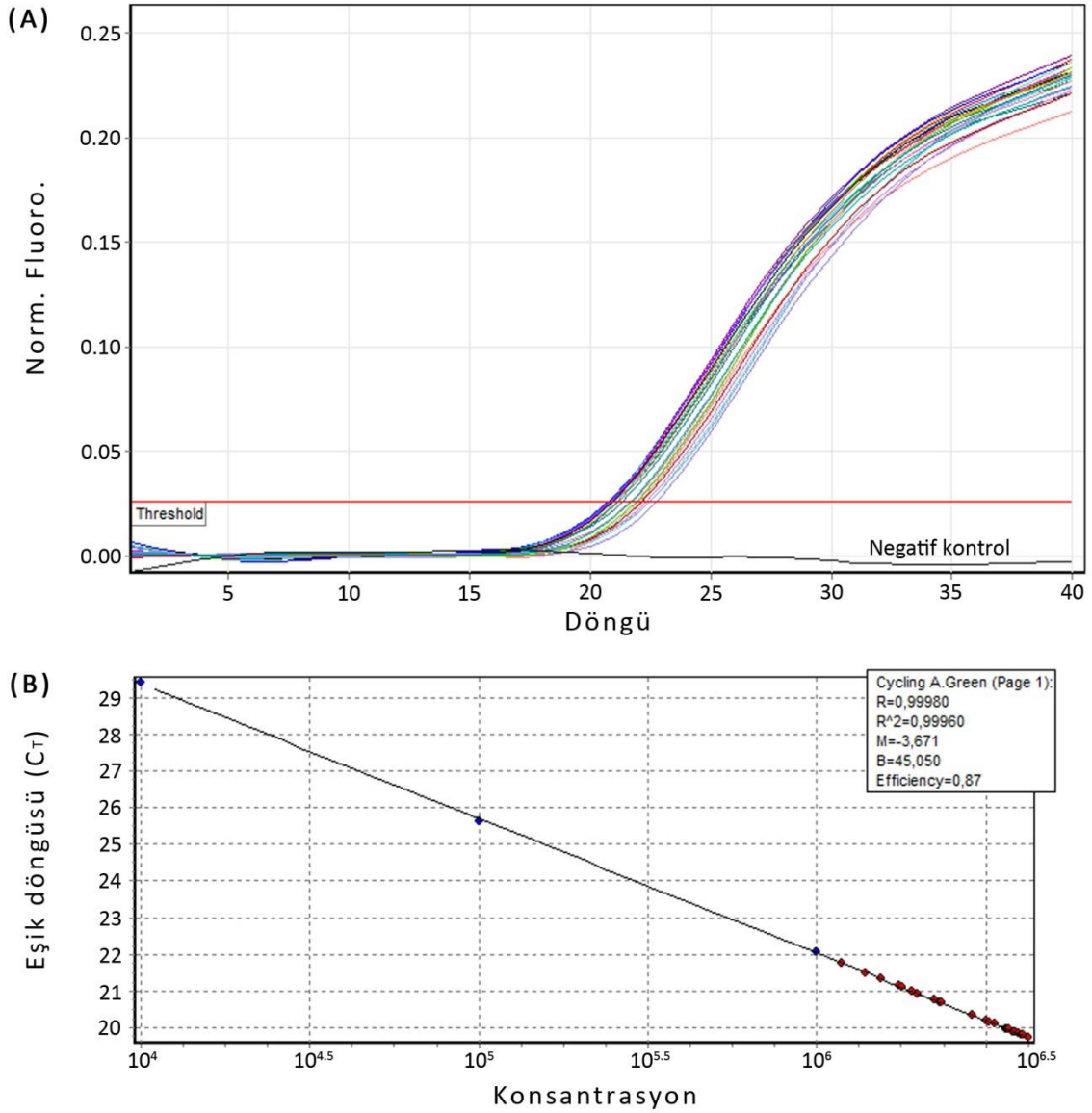
4.2.5. *Brassica napus* Metallothionein Protein 1 (*BnMP1*) Geninin İfadesi

Bu araştırmada, kolzanın (*Brassica napus* L.) Süzer çeşidinde, metallothionein proteinini kodlayan genin (*BnMP1*) ifadesi üzerine Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit ön uygulamasının etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, 18 günlük kolza fideleri kontrol [K-1 ve K-7], hidrojen peroksit [HP-1 ve HP-7], Cr(VI) uygulaması [Cr(VI)-1 ve Cr(VI)-7] ve H₂O₂ ön uygulamalı 50 µM Cr(VI) uygulamalarına [HP-Cr(VI)-1 ve HP-Cr(VI)-7] maruz bırakılmıştır. Bu sekiz uygulamadan elde edilen fidelerin yaprak dokularından total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA'nın miktarı ve saflığı, 260 ve 280 nm dalga boyunda absorbanlarının ölçülmesi ile belirlenmiştir. RNA örneklerinin A₂₆₀/A₂₈₀ oranları 1.9-2.2 arasında belirlenmiştir. Yaprak dokularından izole edilen total RNA'nın bütünlüğü ve boyut dağılımı %1.2'lik denatüre edici agaroz jel elektroforezi ve etidyum bromür boyama ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.10).

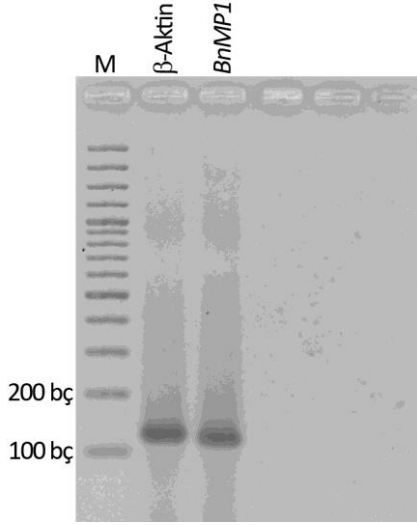


Şekil 4.10. Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit ön uygulamasına maruz bırakılan *Brassica napus* L. fidelerinin yaprak dokularından izole edilen bazı total RNA'ların (1 µg) %1.2'lik formaldehit agaroz jel profilleri. M=Markör.

BnMP1 geninin ekspresyon profilini belirlemek için, yaprak dokularından total RNA izole edilmiş ve gerçek-zamanlı kantitatif PCR (qPCR) analizlerine maruz bırakılmıştır. Kolza *BnMP1* ve β -aktin genleri için gerçekleştirilen qPCR analizleri her iki gen için de başarılı bir amplifikasyonun olduğunu göstermiştir (Şekil 4.11). Bununla birlikte, amplifiye edilmiş gen ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir (Şekil 4.12).

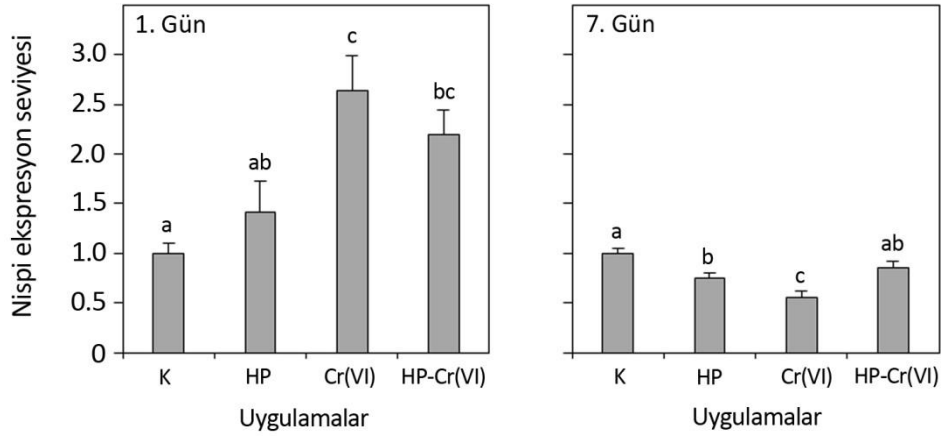


Şekil 4.11. Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit ön uygulamasına maruz bırakılan *Brassica napus* L.'da RT-Q-PCR ile belirlenmiş (A) *BnMP1* geninin transkript birikimleri ve (B) bu örneklere ait standart eğri.



Şekil 4.12. RT-Q-PCR'dan elde edilen β -aktin (121 bç) ve *BnMP1* (115 bç) transkriptlerinin %1.7'lik agaroz jeldeki profilleri. M = markör.

Kolza *BnMP1* geni üzerine H_2O_2 ön uygulaması ve Cr(VI) stresinin etkisini değerlendirmek için ön uygulamalı ve uygulamasız Cr(VI) stresine maruz bırakılan fidelerin yaprak dokularında *BnMP1* mRNA'sının ekspresyon seviyesi incelenmiştir (Şekil 4.13). Krom uygulamasının 1. gününde *BnMP1* geninin ekspresyon seviyesi 50 μ M Cr(VI) uygulamasında önemli düzeyde artmasına karşın, 7 günlük Cr(VI) uygulaması transkript birikiminde önemli azalmaya neden olmuştur ($P < 0.05$). Krom uygulamasının 1. gününde, Cr(VI) stresinden önce uygulanan H_2O_2 *BnMP1* geninin ekspresyon seviyesini Cr(VI) uygulamasına göre azaltmış; fakat bu etki önemli bulunmamıştır. Bununla birlikte, tek başına H_2O_2 ön uygulaması kontrole göre önemsiz bir artışa neden olmuştur. Krom uygulamasının 7. gününde, dışsal olarak uygulanan H_2O_2 , *BnMP1* geninin ekspresyon seviyesindeki Cr(VI) stresi teşvikli azalmayı ortadan kaldırmıştır. Cr(VI) stresi uygulanmış fidelere göre H_2O_2 ön uygulamasını takiben Cr(VI) [HP-Cr(VI)] stresine maruz bırakılan fidelerde, ekspresyon seviyesi %55 oranında artış göstermiştir. Ayrıca, kontrole göre tek başına H_2O_2 ön uygulaması ekspresyon seviyesini önemli düzeyde azaltmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Kolza Süzer çeşidinin yaprak dokularında BnMP1 mRNA'sının ekspresyon seviyesi üzerine Cr(VI) stresi ve hidrojen peroksit (HP) ön uygulamasının etkisi. Nispi *BnMP1* gen ekspresyonu seviyesi $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile belirlenmiş ve β -aktin mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Kontrol grubu kalibrasyon için kullanılmıştır. Farklı harfler, uygulamalar arasında Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki ($P < 0.05$) farklılıkları göstermektedir. Barlar standart hatayı ($\pm SH$) göstermektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Büyüme, içsel ve dışsal büyüme faktörlerinden oluşan genotip ve çevrenin bir fonksiyonu olarak ifade edilmektedir. Krom (Cr) bitkilerde herhangi bir metabolik işleve sahip değildir ve eşik değerinin üzerinde toksiktir (Dixit *et al.* 2002). Bitkilerde krom toksisitesi asimilatların üretimi ve translokasyonunu azaltarak büyüme ve gelişmeyi olumsuz etkilemektedir (Hayat *et al.* 2012). Birçok çalışmada, farklı konsantrasyonlarda uygulanan Cr(VI)'un bitki büyümesinde inhibisyona neden olduğu rapor edilmiştir (Vernay *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2010, Choudhary *et al.* 2011, Sharma *et al.* 2011). Mevcut araştırmada, Cr(VI) stresi kolza (*Brassica napus* L. cv. Süzer) fidelerinin taze ve kuru ağırlıklarında önemli azalmaya neden olmuştur. Büyümedeki bu azalmanın, normal büyüme için gerekli olan divalent iyonlarla (Fe ve S) krom iyonlarının rekabetinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Shanker *et al.* 2005). Çeltik bitkilerinde Cr(VI) stresinin Ca, Mg, Zn ve Fe gibi besin elementlerinin alınımı, translokasyonu ve birikimini engelleyerek büyümeyi önemli derecede inhibe ettiği belirtilmiştir (Zeng *et al.* 2010). Bununla birlikte, büyümedeki Cr(VI) nedenli azalmanın hücre bölünmesinin inhibisyonuna neden olan kromozomal aberasyonlardan kaynaklanabileceği de ileri sürülmüştür (Liu *et al.* 1993). Hayat vd. (2012), bitkilerdeki Cr(VI) teşvikli lipid peroksidasyonunun hücre membranlarında hasara neden olarak fotosentetik pigmentlerin degradasyonuna ve dolayısıyla büyümede inhibisyona yol açtığını bildirmiştir.

Bitkilerde ağır metal toleransı metal bağlayıcı şelatörler, fitohormonlar ve hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi sinyal moleküllerinin dışsal uygulamaları ile arttırılabilmektedir (Lopez *et al.* 2009, Hu *et al.* 2009, Sharma *et al.* 2011). Hidrojen peroksit (H₂O₂) nispeten kararlı ve membranlardan difüze olabildiğinden dolayı bitki hücrelerinde uyum/savunma mekanizmalarını tetikleyen bir sinyal molekülü olarak düşünülmektedir (Prasad *et al.* 1994, Cruz de Carvalho 2008). Düşük konsantrasyonlarda H₂O₂'in birçok savunma geninin ifadesini arttırdığı ve abiyotik streslere karşı oluşturulan çoklu savunma cevaplarını aktive ettiği bildirilmiştir (Levine *et al.* 1994, Prasad *et al.* 1994). Bazı bitki türlerinde H₂O₂ ön uygulamasının düşük sıcaklık (Prasad *et al.* 1994, Yu *et al.*

2003), tuzluluk (Uchida *et al.* 2002, Azevedo Neto *et al.* 2005, Wahid *et al.* 2007, Xu *et al.* 2008) ve ağır metal (Hsu and Kao 2007, Hu *et al.* 2009) gibi stres koşullarına karşı toleransı arttırdığı belirtilmiştir. Mevcut araştırmada, dışsal olarak uygulanan 200 µM H₂O₂ hem kontrol hem de Cr(VI) stresine maruz bırakılan kolza fidelerinin taze ve kuru ağırlıklarında artışa neden olmuştur. Bununla birlikte, bu artış Cr(VI) stresi altındaki fidelerde daha belirgin ve önemli olarak belirlenmiştir. Hidrojen peroksit ön uygulamasının iyileştirici etkisi Cd stresine maruz bırakılan çeltik fidelerinde de rapor edilmiştir (Hu *et al.* 2009, Chao *et al.* 2010). Diğer taraftan, *Raphanus sativus* bitkilerinde dışsal olarak uygulanan brassinosteroidlerin (28-homobrassinolid ve epibrassinolid) büyümedeki Cr(VI) teşvikli azalmayı iyileştirdiği bildirilmiştir (Choudhary *et al.* 2011, Sharma *et al.* 2011). Choudhary vd. (2011), dışsal olarak uygulanan epibrassinolidin indol-3-asetik asit (IAA) sentezini arttırarak Cr(VI) stresi altında normal fide büyümesini teşvik ettiğini ve absisik asit (ABA) üretimini arttırarak Cr(VI) toleransını sağladığını belirtmiştir. Bununla birlikte, Cr(VI) stresi altındaki buğday fidelerinde dışsal olarak uygulanan hidrojen sülfidin (H₂S) antioksidant savunma sistemini aktive ederek büyümeyi teşvik ettiği ve H₂S'in abiyotik streslere karşı bitki cevaplarında işlev gören bir sinyal molekülü olabileceği ileri sürülmüştür (Zhang *et al.* 2010).

Bitkilerde krom alınımı, translokasyonu ve birikimi oksidasyon durumu ve büyüme ortamındaki veya bitki dokularındaki Cr konsantrasyonu tarafından belirlenmektedir (Mishra *et al.* 1995, Zayed *et al.* 1998, Babula *et al.* 2008). Yüksek bitkilerde Cr(VI) alınımının muhtemelen sülfat veya fosfat translokasyon taşıyıcıları aracılığıyla oldukça hızlı ve aktif bir mekanizmayla oluştuğu belirtilmiştir (Barceló and Poschenrieder 1997, Cervantes *et al.* 2001, Kim *et al.* 2006). Bitkilerde CrO₄⁻²'in sülfat içeren protein taşıyıcıları yardımıyla aktif olarak membranlardan geçtiği ve köklerde muhtemelen Fe(III) redüktaz enzimi ile Cr(III)'e indirgeniği bildirilmiştir (Zayed *et al.* 1998). Aksine Cr(III)'un pasif olarak alındığı ve hücre çeperindeki katyon değişim bölgeleri tarafından tutulduğu belirtilmiştir (Marschner 1995). Mevcut araştırmada, Cr(VI) stresine maruz bırakılan kolza fidelerinin kök ve toprak üstü dokularında önemli miktarda Cr

birikmiştir. Kolza fidelerinin toprak üstü dokularında $46 \mu\text{g Cr g}^{-1}$ KA birikirken, kök dokusunda $3600 \mu\text{g Cr g}^{-1}$ KA birikmiştir. Bu sonuç toprak üstü dokulara Cr'un düşük oranda transloke olduğunu ve kökler tarafından Cr absorbe edildikten sonra fidelerin köklerinde alıkonulduğunu göstermektedir. Benzer sonuçlar, Cr(VI) stresine maruz bırakılan bezelye, *Brassica juncea* ve *Raphanus sativus* bitkilerinde de belirlenmiştir (Pandey *et al.* 2009, Diwan *et al.* 2010, Sharma *et al.* 2011). Toprak üstü dokulara düşük orandaki translokasyonun kök hücrelerinin vakuollerinde Cr iyonlarının alıkonmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Diwan *et al.* 2010). Shanker vd. (2005), bir detoksifikasyon mekanizması olarak bazı bitki türlerinin köklerinde Cr(VI)'u oldukça kararlı olan Cr(III)'a indirgeyebildiklerini ve kök hücrelerinin vakuollerinde Cr'un immobilize olmasından dolayı toprak üstü organlara translokasyonunun sınırlı olduğunu bildirmişlerdir.

Mevcut araştırmada, 24 saat $200 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ön uygulamasını takiben $50 \mu\text{M Cr(VI)}$ stresine maruz bırakılan kolza fidelerinin toprak üstü dokularında Cr birikiminde önemli düzeyde artış saptanmıştır. Kolza fidelerinin toprak üstü dokularında Cr birikimi H_2O_2 ön uygulamasına bağlı olarak $46 \mu\text{g Cr g}^{-1}$ KA'dan $72 \mu\text{g Cr g}^{-1}$ KA'a çıkmıştır. Benzer olarak, çeltik fidelerinde 3 saat $10 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ ön uygulamasının yaprak dokularında Cd birikimini arttırdığı bildirilmiştir (Chao *et al.* 2010). Aksine Hu vd. (2009), çeltik fidelerinde 24 saat $0.1 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ ön uygulamasının Cd translokasyonunu azalttığını bildirmiştir. Kadmiyum translokasyonundaki H_2O_2 nedenli bu azalmanın muhtemelen kök hücre çeperinde Cd'un immobilize edilmesinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Hu *et al.* 2009). Bununla birlikte, Cr(VI) stresine maruz bırakılan çeltik bitkilerinde besin ortamına verilen silikonun Cr alım ve translokasyonunu azalttığını bildirilmiştir. Ma vd. (2006), silikonun kök hücre çeperinin lignin içeriğini değiştirerek metal iyonlarının köklerden toprak üstü organlara translokasyonunu azalttığını belirtmiştir. Diğer taraftan, Cr(VI) stresine maruz kalan *Raphanus sativus* bitkilerinde dışsal 28-homobrassinolid uygulamasının yaprak dokularındaki Cr birikimini azalttığını bildirilmiştir (Sharma *et al.* 2011). Sonuç olarak, Cr(VI) toksisitesini azaltan hidrojen peroksidin kolza bitkilerinde Cr alım ve translokasyonundaki muhtemel rollerinin

anlaşılması, Cr(VI) ile kirlenmiş alanların remediasyonunda bu sinyal molekülünün kullanımını arttıracaktır.

Plazma membranının fonksiyonları çevresel stresler tarafından olumsuz şekilde etkilenmekte ve bu etki lipid peroksidasyonunun seviyesi olarak ölçülebilmektedir. Malondialdehit (MDA, lipid peroksidasyonu ürünü) seviyesinin ölçümü oksidatif stresin hassas bir indeksi olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Diwan *et al.* 2010). Mevcut araştırmada, Cr(VI) stresi MDA içeriğinde önemli artışa neden olmuştur. Kolza fidelerinin yaprak dokularındaki MDA içeriğindeki artış Cr(VI) stresi altında artan reaktif oksijen türlerinin üretimini göstermektedir. Lipid peroksidasyonu ve dolayısıyla oksidatif stresin bir göstergesi olan MDA içeriğindeki artış Cr(VI) stresi altındaki buğday (Zhang *et al.* 2010), arpa (Ali *et al.* 2011), *Brassica juncea* (Diwan *et al.* 2010) ve *Raphanus sativus* L. (Choudhary *et al.* 2011, Sharma *et al.* 2011) gibi bitki türlerinde de belirlenmiştir. Diğer taraftan, H₂O₂ ön uygulamasını takiben Cr(VI) stresine maruz kalan kolza fidelerinin yaprak dokularında MDA içeriğinde azalma saptanmıştır. Bunun nedeni, H₂O₂ ön uygulamalı Cr(VI) stresi koşullarında muhtemelen reaktif oksijen türlerinin oluşumunun azalması olabilir. Benzer olarak, çeltik fidelerinde H₂O₂ ön uygulamasının Cd teşvikli MDA ve H₂O₂ birikimini azalttığı rapor edilmiştir (Hu *et al.* 2009, Chao *et al.* 2010). Ayrıca, yüksek sıcaklık ve salisilik asit uygulamaları ile biriken H₂O₂'in çeltik fidelerini Cd teşvikli oksidatif stresten koruyarak MDA içeriğini azalttığı ileri sürülmüştür (Hsu and Kao 2007, Chao *et al.* 2010). Bununla birlikte, dışsal olarak uygulanan hidrojen sülfidin (H₂S) buğday ve brassinosteroidlerin (28-homobrassinolid ve epibrassinolid) *Raphanus sativus* L. bitkilerinde Cr(VI) teşvikli MDA birikimini azalttığı bildirilmiştir (Zhang *et al.* 2010, Choudhary *et al.* 2011, Sharma *et al.* 2011).

Fotosentetik pigmentlerin degradasyonu ağır metal stresine maruz kalan bitkilerde gözlenmektedir (Hayat *et al.* 2012). Fotosentetik pigmentlerin içeriğindeki bu azalma ışık yakalama kapasitesinde (Mazhoudi *et al.* 1997) ve dolayısıyla bitkinin fotosentetik kapasitesinde azalmaya neden olmaktadır. Bununla birlikte, bitki büyümesindeki ağır metal nedenli azalmanın fotosentetik pigmentlerin içeriğindeki azalmayla ilişkili olduğu

bildirilmiştir (Sharma and Sharma 2003). Mevcut araştırmada, Cr(VI) stresi kolza fidelerinin yaprak dokularında klorofil içeriğinde azalmaya neden olmuştur. Hekzavalent kromun klorofil içeriği üzerine olan olumsuz etkisi buğday (Subrahmanyam 2008), *Raphanus sativus* (Sharma *et al.* 2011) ve *Datura innoxia* (Vernay *et al.* 2008) gibi bitki turlerinde belirlenmiştir. Klorofil içeriğindeki bu azalmanın Cr(VI) teşvikli oksidatif stresin pigmentler üzerine olan olumsuz etkisinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Vajpayee *et al.* 2000). Bununla birlikte, Cr(VI) stresinin klorofil biyosentezinde fonksiyon goren önemli bir enzim olan δ -aminolevulinik asit dehidratazı (ALAD) degrade ederek klorofil içeriğinde azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (Vajpayee *et al.* 2000, Yıldız *et al.* 2012). Mevcut araştırmada, H₂O₂ n uygulaması Cr(VI) stresi altındaki kolza fidelerinde klorofil içeriğinin artışına neden olmuştur. Bu durum, kolza fidelerinde oksidatif stresin baskılanmasında H₂O₂'in rol oynayabileceğini göstermektedir. Krom stresi altındaki *Raphanus sativus* fidelerinde 28-homobrassinolid uygulamasının klorofil içeriklerinde artışa neden olduğu belirlenmiştir (Sharma *et al.* 2011). Bununla birlikte, 50 μ M Cd stresine maruz bırakılan kolza fidelerinin klorofil içeriğindeki azalmanın absisik asit ve jasmonik asit gibi büyüme düzenleyicilerinin dışsal uygulamaları ile hafifletildiği bildirilmiştir (Meng *et al.* 2009).

Bitkiler ağır metallerin detoksifikasyonu veya homeostazisi için sistein ve fitoşelatinler gibi tiyol bileşiklerine sahiptirler (Cobbett 2000). Tiyol gruplarının oksidatif strese karşı bitkileri koruyucu özelliklerinden dolayı Cr(VI) teşvikli oksidatif streste bu bileşiklerin fonksiyon görebileceği bildirilmiştir (Sinha *et al.* 2005). Bununla birlikte, tiyollerin antioksidant zellikleri –SH gruplarının oksidasyonuna bağlıdır (Toppi and Gabbrielli 1999). Yüksek oranda sistein-sülfidril rezidelerine sahip protein bağlı olmayan tiyoller ağır metal detoksifikasyonunda önemli rol oynamaktadır. Proteine bağlı olmayan tiyollerin önemli bir bileşeni olan indirgenmiş glutatyon (GSH) ağır metal toleransı ve içsel alıkonulmasında önemli roller oynamaktadır (Zhu *et al.* 1999). Araştırmamızda, Cr(VI) stresi altındaki kolza fidelerinde proteine bağlı ve bağlı olmayan tiyollerin konsantrasyonundaki artış tiyoll bileşiklerin Cr(VI) toleransında fonksiyon gördüğünü göstermektedir. Bununla birlikte, H₂O₂ n uygulamasını takiben Cr(VI) stresine maruz

bırakılan kolza fidelerinde H₂O₂ ön uygulaması tiyol içeriklerinde önemli artışa neden olmuştur. Tiyol içeriğindeki artış Cr(VI) stresi altındaki *Brassica juncea*, *Vigna radiata* (Sinha *et al.* 2009) ve *Pistia stratiotes* (Sinha *et al.* 2005) gibi bitki türlerinde de belirlenmiştir. Diğer taraftan, *Ocimum tenuiflorum* bitkilerinde Cr(VI) stresinin protein bağlı olmayan tiyol içeriklerinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Rai *et al.* 2004). Mevcut araştırmada, kolza fidelerinde krom birikimi ve tiyol konsantrasyonundaki artışın korelasyon göstermesi, tiyol içeren şelatörlerin Cr'un içsel olarak alıkonulmasında önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Hidrojen peroksidin antioksidant enzimlerin aktivitesi ve gen ekspresyonunu arttıran bir sinyal molekülü olarak fonksiyon gördüğü düşünülmektedir (Hong *et al.* 2009, Chao *et al.* 2010). Bu nedenle, krom stresi altındaki kolza fidelerinde H₂O₂ ön uygulamasının koruyucu etkilerinin daha iyi anlaşılması için reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde fonksiyon gören antioksidant enzimler çalışılmıştır. Ağır metal gibi çevresel stresler reaktif oksijen türlerinin üretimini arttırarak hücrel zarara neden olabilmektedir (Mittler 2002). Bu nedenle, Cr(VI) stresine karşı tolerans birçok antioksidant enzim ve bileşikten oluşan antioksidant sisteminin teşvikine bağlı olabilmektedir. Çeltik bitkilerinde H₂O₂ ön uygulamasının antioksidant enzimlerin aktivitesinde artışa neden olduğu ve bu artışın Cd toleransındaki artıştan sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (Hu *et al.* 2009). Antioksidant enzimlerin aktivitesindeki artışın, mitokondrilerdeki elektron taşıma zincirinin Cr iyonları tarafından engellenmesi ile oluşan süperoksit radikallerine (O₂^{•-}) cevap olarak ortaya çıktığı belirtilmiştir (Hayat *et al.* 2012). Süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit radikallerinin O₂ ve H₂O₂'e dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzim ailesidir. SOD aktivitesi ile oluşan H₂O₂ ise peroksidazlarda bulunan katalaz (CAT) veya kloroplastlardaki askorbat peroksidaz (APX) ya da membran bağlı peroksidazlar (POD) tarafından uzaklaştırılmaktadır (Foyer *et al.* 1997). Araştırmamızda, SOD ve POD aktiviteleri Cr(VI) stresi altındaki kolza fidelerinin yaprak dokularında kontrole göre artış göstermesine karşın APX aktivitesi azalmıştır. Kolza fidelerinde SOD aktivitesinin artması Cr(VI)'un oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, H₂O₂ ön uygulaması hem kontrol hem de Cr(VI)

stresine maruz kalan fidelerin SOD aktivitelerinde önemli bir değişime neden olmamıştır. Hu vd. (2009), çeltik fidelerinin yaprak dokularında Cd stresinin SOD aktivitesini azalttığını, fakat Cd uygulamasına göre H₂O₂ ön uygulamalı Cd uygulamasında SOD aktivitesinin arttığını bildirmiştir. Bununla birlikte, Cr(VI) stresi altındaki *Raphanus sativus* fidelerinde dışsal olarak uygulanan brassinosteroidlerin (28-homobrassinolid ve epibrassinolid) SOD aktivitesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Choudhary *et al.* 2011, Sharma *et al.* 2011). Araştırmamızda, Cr(VI) stresi kolza fidelerinde APX aktivitesinde azaltmıştır. Hayat vd. (2012), APX enziminin Cr(VI) oldukça hassas olduğunu bildirmiştir. Cr(VI) stresi altındaki bitkilerde enzim aktivitesindeki azalmanın Cr iyonlarının enzim sistemi üzerine olan inhibe edici etkisinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Hayat *et al.* 2012). Araştırmamızda, Cr(VI) stresi altındaki kolza fidelerinde H₂O₂ ön uygulaması APX aktivitesinde artışa neden olmuştur. Benzer sonuçlar Cd stresi altındaki çeltik fidelerinde de belirlenmiştir (Hu *et al.* 2009). Bununla birlikte, Cr(VI) stresine maruz bırakılan buğday ve *Raphanus sativus* bitkilerinde sırasıyla hidrojen sülfid (H₂S) ve 28-homobrassinolid ön uygulamalarının APX aktivitesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Zhang *et al.* 2010, Sharma *et al.* 2011). Guaiakol peroksidaz (POD) aktivitesinin metal toksisitesi için bir biyomarkör olarak kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Radotić *et al.* 2000). Araştırmamızda, kolza fidelerinde Cr(VI) stresi POD aktivitesinde artışa neden olmuştur. Bununla birlikte, Cr(VI) stresi altındaki kolza fidelerinde H₂O₂ ön uygulaması POD aktivitesinde ilave bir artışa neden olmuştur. Bu sonuçlar, Cr(VI) stresi altında H₂O₂ teşvikli POD aktivitesinin H₂O₂ ve MDA seviyelerini azaltarak Cr(VI) toleransını arttırdığının bir göstergesi olabilir. Bununla birlikte, ağır metallerin detoksifikasyonundaki muhtemel mekanizmalar POD'un lokalize olduğu hücre duvarı ve vakuollerde metallerin alıkonulmasını içermektedir (Asada 1992). Bu nedenle, H₂O₂ ön uygulanmış kolza fidelerinde daha fazla Cr birikiminin artan POD aktivitesi ile ilişkili olabileceği ileri sürülebilir.

Ağır metal detoksifikasyonunda metallotiyoneinler (MT'ler) ve fitoşelatinler (PC'ler) gibi ağır metal bağlayıcı ligandlar birlikte fonksiyon görmektedirler. Bazı MT genlerinin ağır metallerce teşvik edilmesi (Mendoza-Cozalt *et al.* 2007, Schor-Fumbarov *et al.*

2005, Usha *et al.* 2007), bu genlerin maya gibi organizmalardaki ekspresyonunun ağır metal toleransını arttırması (Kohler *et al.* 2004) ve bazı MT proteinlerinin metal bağlayıcı özellik göstermesinden dolayı (Bilecen *et al.* 2005, Usha *et al.* 2009) MT'lerin bitkilerde ağır metal toleransı ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, bitkilerde MT'lerin sistein kalıntılarındaki tiyol grupları ile metal iyonlarına bağlanabilmelerinden dolayı metal toleransı ve homeostazisinde işlev görebileceği ileri sürülmüştür (Hassinen *et al.* 2011). Mevcut araştırmada, Cr(VI) stresinin *BnMP1* geninin ekspresyon seviyesini teşvik edip etmediğini belirlemek için kolza (*Brassica napus* L.) fideleri, 50 µM Cr(VI) ve H₂O₂ ön uygulamalı 50 µM Cr(VI) uygulamalarına maruz bırakılmıştır. Bu fidelerin yaprak dokularından total RNA izole edilmiş ve gerçek-zamanlı kantitatif PCR analizlerine maruz bırakılmıştır. Cr(VI) stresi koşullarında, *BnMP1* geninin ekspresyon seviyesi krom uygulamasının 1. gününde artarken, uzun uygulama süresi (7 gün) ekspresyon seviyesini azaltmıştır. Şuana kadar, Cr(VI) stresine cevap olarak bitki türlerinde MT mRNA'ları ekspresyon profilleri üzerine çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Goupil vd. (2009), domates *LeMT2* gen ekspresyon seviyesinin 24 sa 80 µM Cr(VI) uygulaması tarafından teşvik edildiğini, buna karşın 160 µM ve üzerindeki Cr(VI) uygulamalarının *LeMT2* ekspresyon seviyesini kontrole göre önemli derecede azalttığını bildirmiştir. Bununla birlikte, bazı bitki türlerinde Cu, Zn, Pb ve As streslerine cevap olarak bazı MT genlerinin ekspresyon seviyelerinde artış belirlenmiştir (Goupil *et al.* 2009, Huang and Wang 2010). Mevcut araştırmada, Cr(VI) stresi altında kolza fidelerinde sürenin artışına bağlı olarak *BnMP1* geninin ekspresyon seviyesindeki azalma, muhtemelen *BnMP1* proteininin Cr(VI) stresine karşı savunma mekanizmalarından biri olarak fonksiyon görmediğini göstermektedir. Bu sonuç, Cr(VI) detoksifikasyonu için alternatif mekanizmaların olabileceğini ileri sürmektedir. Bizim sonuçlarımıza zıt olarak, Huang vd. (2011), *Bruguiera gymnorrhiza* *BgMT2* gen ekspresyonunun Cd konsantrasyonu ve uygulama süresindeki artışa bağlı olarak artış göstermesinden dolayı bu genin kodladığı proteinin Cd tolerans mekanizmalarından biri olarak fonksiyon gördüğünü ileri sürmüştür. Diğer taraftan araştırmamızda, 200 µM H₂O₂ ön uygulamalı 50 µM Cr(VI) uygulamasının 7. gününde, H₂O₂ ön uygulaması kolza fidelerinde *BnMP1* geninin ekspresyon seviyesindeki Cr(VI) teşvikli azalmayı ortadan

kaldırılmıştır. Navabpour vd. (2003), kolza fidelerinde *LSC54* (*MT1* geni) ekspresyonunun yaprak senesensi sırasındaki reaktif oksijen türlerinin üretimi tarafından teşvik edildiğini bildirmiştir. Bununla birlikte, pamuk *GhMT3a*'nın çevresel streslere cevap olarak bir reaktif oksijen türleri temizleyicisi olarak fonksiyon görebileceği belirtilmiştir (Xue *et al.* 2009). Kolza fidelerinde *BnMP1* geninin ekspresyon seviyesi üzerine H_2O_2 ön uygulamasının teşvik edici etkisi *BnMP1* proteininin reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde önemli rol oynayabileceğini ileri sürmektedir. Reaktif oksijen türlerini uzaklaştırma yeteneği ile ilişkili olarak MT'lerin ozmotik, tuz, soğuk ve ağır metal streslerinde bir savunma rolünün olduğu ileri sürülmüştür (Mir *et al.* 2004, Wong *et al.* 2004, Xue *et al.* 2009).

Sonuç olarak, Cr(VI) stresi altındaki kolza fidelerinde H_2O_2 ön uygulaması büyüme, fotosentetik pigment içeriği, tiyol içeriği, antioksidant enzimlerin aktivitesini arttırmış ve lipit peroksidasyon seviyesini azaltmıştır. Böylece H_2O_2 ön uygulamasının Cr(VI) stresinin olumsuz etkilerini hafifletmede bir potansiyele sahip olduğunun önemli bir göstergesidir. Bununla birlikte, kolza fidelerinin Cr(VI) toleransında *BnMP1* gen ekspresyonunun 7. gündeki H_2O_2 teşvikli artışı *BnMP1* proteininin reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde önemli bir rol oynayabileceğinin göstergesi olabilir.

6. KAYNAKLAR

- Adriano, D.C. (2001). Trace Elements in Terrestrial Environments, Second Edition, Springer, New York.
- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, **105**: 121-126.
- Alan, J. M., Baker and Steven N. Whiting. (2002). In search of the Holy Grail-a further step in understanding metal hyperaccumulation? *New Phytologist*, **155**: 1-4.
- Ali, S., Bai, P., Zeng, F., Cai, S., Haider, I., Boyin Qiu, S., Wu, F. and Zhang, G. (2011). The ecotoxicological and interactive effects of chromium and aluminum on growth, oxidative damage and antioxidant enzymes on two barley genotypes differing in Al tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, **70**: 185-191.
- Alscher, R.G., Ertürk, N. and Heath, L.S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, **53**: 1331-1341.
- Apel, K. and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, **55**: 373-399.
- Appenroth, K.J. (2010). Definition of "heavy metals" and their role in biological systems. In: Sherameti I, Varma A (eds.) Soil heavy metals. *Springer*, Berlin, **19**: 19-29.
- Arduini, I., Masoni, A. and Ercoli, L. (2006). : Effects of high chromium applications on *Miscanthus* during the period of maximum growth. *Environmental and Experimental Botany*, **58**: 234-243.
- Arnetoli, M., Vooijs, R., Gonnelli, C., Gabbrielli, R., Verkleij, J.A.C. and Schat, H. (2008). High-level Zn and Cd tolerance in *Silene paradoxa* L. from a moderately Cd and Zn contaminated copper mine tailing. *Environmental Pollution*, **156**: 380-386.
- Arthur, E., Rice, P., Rice, P., Anderson, T., Baladi, S. and Henderson, K. (2005). Phytoremediation-an overview. *Critical Reviews of Plant Sciences*, **24**: 109-122.

- Asada, K. (1992). Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, **85**: 235–241.
- Azevedo Neto, A.D., Prisco, J.T., Ene’as-Filho, J., Medeiros, J.V.R. and Gomes-Filho, E. (2005). Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt stress acclimation in maize plants. *Journal of Plant Physiology*, **162**: 1114-1122.
- Babula, P., Adam, V., Opatrilova, R., Zehnalek, J., Havel L. and Kizek, R. (2008). Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Environmental Chemistry Letters*, **6**: 189-213.
- Baker, A.J.M. (1981). Accumulators and excluders—strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*, **3**: 643–654.
- Baker, A.J.M. and Whiting, S.M. (2002). In Search for the Holy Grail—another step in understanding metal hyperaccumulation? *New Phytologist*, **155**: 1-7.
- Barbosa, R.M.T., Almeida, Alex-Alan F., Mielke, M.S., Loguercio, L.L., Mangabeira, P.A.O. and Gomes, F.P. (2007). A physiological analysis of *Genipa americana* L.: a potential phytoremediator tree for chromium polluted watersheds. *Environmental and Experimental Botany*, **61**: 264-271.
- Barcelò, J. and Poschenrieder, C. (1997). Chromium in plants”, In: Carati, S., Tottarelli, F., Sequeeni, P., (Eds.), Chromium Environmental Issue, Milan: Francoteengati Press, 101-129.
- Barnhart, J. (1997). Occurrences, uses, and properties of chromium. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **26**: 3–7.
- Benavides, M.P., Gallego, S.M. and Tomaro, M.L. (2005). Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **17**: 21-34.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, **44**: 276-287.
- Bhattacharyya, P., Chakraborty, A., Chakrabarti, K., Tripathy, S. And Powell, M.A. (2005). Chromium uptake by rice and accumulation in soil amended with municipal solid waste compost. *Chemosphere*, **60**: 1481-1486.

- Bilecen, K., Ozturk, U.H., Duru, A.D., Sutlu, T., Petoukhov, M.V., Svergun, D.I., Koch, M.H., Sezerman, U.O., Cakmak, I. and Sayers, Z. (2005). *Triticum durum* metallothionein: Isolation of the gene and structural characterization of the protein using solution scattering and molecular modeling. *Journal of Biological Chemistry*, **280**: 13701-13711.
- Blaylock, M.J., Salt, D.E., Dushenkov, S., Zakharova, O., Gussman, C., Kapulnik, Y., Ensley, B.D. and Raskin, I. (1997) Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. *Environmental Science and Technology*, **31**: 860–865.
- Bluskov, S., Arocena, J. M., Omotoso, O.O. and Young, J. P. (2005). Uptake, Distribution, and Speciation of Chromium in *Brassica Juncea*, *International Journal of Phytoremediation*, **7**: 153–165.
- Boyd, R.S., Shaw, J.J. and Martens, S.N. (1994). Nickel hyperaccumulation defends *Streptanthus polygaloides* (*Brassicaceae*) against pathogens *American journal of botany*, **81**: 294-300.
- Boyd, R.S. and Martens, S.N. (1998). The significance of metal hyperaccumulation for biotic interactions. *Chemoecology*, **8**: 1-7.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248-254.
- Butler, L.R., Edwards, M.R., Farmer, R., Greenly, K.J, Hensler, S., Jenkins, S.E., Joyce, J.M, Mann, J.A., Prentice, B.M., Puckette, A.E., Shuford, C.M., Porter, S.E.G. and Rhoten, M.C. (2009). Investigation of the use of *Cucumis sativus* for remediation of chromium from contaminated environmental matrices. An interdisciplinary instrumental analysis project. *Chemistry Education Research and Practice*, **86**: 1095.

- Cervantes, C., Campos-Garcia, J., Devars, S., Gutierrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzman, J.C. and Moreno-Sanchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, **25**: 335-347.
- Chandra, P., Sinha, S. and Rai, U.N. (1997). Bioremediation of Cr from water and soil by vascular aquatic plants. In: Kruger EL, Anderson TA, Coats JR, editors. *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*. ACS Symposium Series, Washington, DC: American Chemical Society, **664**: 274-82.
- Chao, Y.-Y., Chen, C.-Y., Huang, W.-D. and Kao, C.H. (2010). Salicylic acid-mediated hydrogen peroxide accumulation and protection against Cd toxicity in rice leaves. *Plant and Soil*, **329**: 327-337.
- Chen, Z., Silva, H. and Klessig, R.F. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, **262**: 1883-1886.
- Cherian, M.G. and Chan, H.M. (1993). Biological functions of metallothionein: A review. In: *Metallothionein III: Biological Roles and Medical Implications* (Suzuki, K.T., Imura, n. and Kimura, M., Eds.), Birkhauser Verlag, Basel, pp. 87–109.
- Chiang, H.C., Lo, J.C. and Yeh, K.C. (2006). Genes associated with heavy metal tolerance and accumulation in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*: a genomic survey with cDNA microarray. *Environmental Science and Technology*, **40**: 6792-6798.
- Cho, Y., Bolick, J.A. and Butcher, D.J. (2009). Phytoremediation of lead with green onions (*Allium fistulosum*) and uptake of arsenic compounds by moonlight ferns (*Pteris cretica* cv. Mayii). *Microchemical Journal*, **91**: 6-8.
- Choudhury, S. and Panda, S.K. (2005). Toxic effect, oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxitheelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under lead and chromium toxicity. *Water Air Soil Pollution*, **167**: 73-90.
- Choudhary, S.P., Kanwar, M., Bhardwaj, R., Gupta, B.D. and Gupta, R.K. (2011). Epibrassinolide ameliorates Cr (VI) stress via influencing the levels of indole-3-

acetic acid, abscisic acid, polyamines and antioxidant system of radish seedlings. *Chemosphere*, **84**: 592-600.

Cobbett, C.S. (2000). Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**: 211–216.

Cobbett, C.S. and Goldsbrough, P. (2002). Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, **53**: 159-182.

Cohen, M.D., Prophete, C., Sisco, M., Chen, L.C., Zelikoff, J.T., Smee, J.J., Holder, A.A. and Crans, D.C. (2006). Pulmonary immunotoxic potentials of metals are governed by select physicochemical properties: chromium agents. *Journal of immunotoxicology*, **3**: 69-81

Claus, D., Dietze, H., Gerth, A., Grosser, W. and Hebner, A. (2007). Application of agronomic practice improves phytoextraction on a multipolluted site. *Journal of Environmental Engineering and Landscape Management*, **15**: 208-212.

Clemens and Peršoh (2009). Multi-tasking phytochelatin synthases. *Plant Science*, **177**: 266-271.

Cruz de Carvalho, M.H. (2008). Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signaling and Behavior*, **3**: 156-165.

Cruz-Jimenez G, Cano-Aguilera I (2005) Differential uptake and transport of trivalent and hexavalent chromium by tumbleweed (*Salsola kali*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **48**: 225-232.

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranova, E., Van Montagu M, Inzé, D. and Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress response. *Cellular and Molecular Life Science*, **57**: 779-795.

Dixit, V., Pandey, V. and Shyam, R. (2002). Chromium ion inactivate electron transport and enhance superoxide generation in vivo in pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) root mitochondria. *Plant Cell and Environment*, **25**: 687-693.

- Diwan, H., Ahmad, A. and Iqbal, M. (2008). Genotypic variation in the phytoremediation potential of Indian mustard for chromium. *Environmental Management*, **41**: 734-741.
- Diwan, H., Ahmad, A. and Iqbal, M. (2009). Chromium-induced modulation in the antioxidant defense system during phenological growth stages of *Indian mustard*. *Internatinonal Journal of Phytoremediation*, **12**: 142-158.
- Diwan, H., Khan, I., Ahmad, A. and Iqbal, M. (2010). Induction of phytochelatins and antioxidant defence system in *Brassica juncea* and *Vigna radiata* in response to chromium treatments. *Plant Growth Regulation*, **61**: 97-107.
- Dong, J., Wu, F., Huang, R. and Zang, G. (2007). A Chromium tolerant plant in Cr contaminated land. *International Journal of Phytoremediation*, **9**: 167-179.
- Dube, B.K, Tewari, K., Chatterjee, J. and Chatterjee, C. (2003). Excess chromium alters uptake and translocation of certain nutrients in citrullus. *Chemosphere*, **53**: 1147-1153.
- Duffus, J.H. (2002). "Heavy Metals"- a meaningless term. *Pure and Applied Chemistry*, **74**: 793-807.
- Ebbs, S., Lau, I., Ahner, B. and Kochian, L. (2002). Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, *Planta*, **214**: 635-640.
- FAO (2010). Food and Agricultural Production.
- Freisinger, E. (2009). Metallothioneins in plants. *Metal Ions in Life Sciences*, **5**: 369-380.
- Foley, R.C., Liang, Z.M. and Singh, K.B. (1997). Analysis of type 1 metallothionein cDNAs in *Vicia faba*. *Plant Molecular Biology*, **33**: 583-591.
- Foyer, C.H., Lelandais, M. And Kunert, K.J. (1994). Photooxidative stres inplants. *Physiologia Plantarum*, **92**: 696–717.

- Foyer, C.H., Looez-Delgado, H., Dat, J.F. and Scott, I.M. (1997). Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. *Physiologia Plantarum*, **100**: 241-254.
- Foyer, C.H. and Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, **17**: 1866-1875.
- Gardea-Torresdey, J.L., Peralta-Videa, J.R., Montes, M., de la Rosa, G. and Corral-Diaz, B. (2004). Bioaccumulation of cadmium, chromium and copper by *Convolvulus arvensis* L.: impact on plant growth and uptake of nutritional elements. *Bioresource Technology*, **92**: 229-235.
- Gardea-Torresdey, J.L., Peralta-Videa, J.R., Rosa, G. and Parsons, J.G. (2005). Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy. *Coordination Chemistry Reviews*, **249**: 1797-1810.
- Grispen, V.M.J., Nelissen, H.J.M. and Verkleij, J.A.C. (2006). Phytoextraction with *Brassica napus* L.: A tool for sustainable management of heavy metal contaminated soils. *Environmental Pollution*, **144**: 77-83.
- Gong, M., Chen, B., Li Z.G. and Guo, L.H. (2001). Heat-shock-induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedlings and involvement of H₂O₂. *Journal of Plant Physiology*, **158**: 1125-1130.
- Goupil, P., Souguir, D., Ferjani, E., Faure, O. (2009). Expression of stress-related genes in tomato plants exposed to arsenic and chromium in nutrient solution. *Journal of Plant Physiology*, **166**: 1446–1452.
- Guo,W.J., Bundithya, W. and Goldsbrough, P.B. (2003). Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytologist*, **159**: 369-381.
- Guo, B., Liang, Y.C., Li, Z.J. and Guo, W. (2007a). Role of salicylic acid in alleviating cadmium toxicity in rice roots. *Journal of Plant Nutrition*, **30**: 427-439.

- Guo, B., Liang, Y.C., Zhu, Y.G. and Zhao, F.J. (2007b). Role of salicylic acid in alleviating oxidative damage in rice roots (*Oryza sativa*) subjected to cadmium stress. *Environmental Pollution*, **147**: 743-49.
- Guo, J., Dai, X., Xu, W. and Ma, M. (2008). Overexpressing gsh1 and AsPCS1 simultaneously increases the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere*, **72**: 1020-1026
- Gupta, S.K. and Pratap, A. (2007). History, origin and evolution. In: Gupta S.K. (Ed.) Advances in botanical research, incorporating advances in plant pathology, rapeseed breeding, vol 45. Academic Press-Elsevier, London, UK, pp 2-17.
- Gupta, S., Srivastava, S. and Saradhi, P.P. (2009). Chromium increases photosystem 2 activity in *Brassica juncea*. *Biologia Plantarum*, **53**: 100-104.
- Hall, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *In Journal of Experimental botany*, **53**: 1-11.
- Han, F.X., MaruthiSridhar, B.B., Monts, D.L. and Su,Y. (2004). Phytoavailability and toxicity of trivalent and hexavalent chromium to *Brassica juncea*. *New Phytologist*, **162**: 489-499.
- Hao, F., Wang, X. and Chen, J. (2006). Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in nickel-induced oxidative stress in roots of wheat seedlings. *Plant Science*, **170**: 151-158.
- Harmens, H., Den Hartog, P.R., ten Bookum, W.M. and Verkleij, J.A.C. (1993). Increased zinc tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke is not due to increased production of phytochelatins. *Plant Physiology*, **103**: 1305-1309.
- Hasin, A., Gurman, S.J., Murphy, L.M., Perry, A., Smith, T.J. and Gardiner, P.H.E. (2010). Remediation of chromium(VI) by a methane-oxidizing bacterium. *Environmental Science and Technology*, **44**: 400-405.
- Hassinen, V.H., Tervahauta, A.I., Schat, H. and Kärenlampi, S.O. (2011). Plant Metallothioneins-metal chelators with ROS scavenging activity? *Plant Biology*, **13**: 225-232.

- Hayat, S., Khalique, G., Irfan, M., Wani, A.S., Tripathi, B.N. and Ahmad, A. (2012). Physiological changes induced by chromium stress in plants: an overview. *Protoplasma*, **249**: 599-611.
- Hong, C.-Y., Chao, Y.-Y., Yang, M.-Y., Cheng, S.-Y., Cho, S.-C. and Kao, C.H. (2009). NaCl-induced expression of glutathione reductase in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings is mediated through hydrogen peroxide but not abscisic acid. *Plant and Soil*, **320**: 103-115.
- Hooda, V. (2007). Phytoremediation of toxic metals from soil and waste water. *Journal of Environmental Biology*, **28**: 367-376.
- Hsiao, K.H., Kao, P. and Hseu, Z.Y. (2007). Effects of chelators on chromium and nickel uptake by *Brassica juncea* on serpentine-mine tailings for phytoextraction. *Journal of Hazardous Materials*, **148**: 366-376.
- Hsu, Y.T. and Kao, C.H. (2007). Toxicity in leaves of rice exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant and Soil*, **298**: 231-241.
- Hu, Y., Ge, Y., Zhang, Z., Ju, T. and Cheng, W. (2009). Cadmium toxicity and translocation in rice seedlings are reduced by hydrogen peroxide pretreatment. *Plant Growth Regulation*, **59**: 51-61.
- Huang, G.Y. and Wang, Y.S. (2009). Expression analysis of type 2 metallothionein gene in mangrove species (*Bruguiera gymnorhiza*) under heavy metal stress. *Chemosphere*, **77**: 1026-1029.
- Huang, G.Y. and Wang, Y.S. (2010). Expression and characterization analysis of type 2 metallothionein from grey mangrove species (*Avicennia marina*) in response to metal stress. *Aquatic Toxicology*, **99**: 86-92.
- Huang, G.Y., Wang, Y.S. and Ying, G.G. (2011). Cadmium-inducible BgMT2, a type 2 metallothionein gene from mangrove species (*Bruguiera gymnorhiza*), its encoding protein shows metal-binding ability. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **405**: 128-132.

- Iglesia-Turino, S., Febrero, A., Jauregui, O., Caldelas, C., Araus, J.L. and Bort, J. (2006). Detection and quantification of unbound phytochelatin 2 in plant extracts of *Brassica napus* grown with different levels of mercury. *Plant Physiology*, **142**: 742-749.
- Israr, M. and Sahi, S.V. (2008). Promising role of plant hormones in translocation of lead in *Sesbania drummondii* shoots. *Environmental Pollution*, **153**: 29-36.
- Jack, E., Hakvoort, H.W.J., Reumer, A., Verkleij, J.A.C., Schat, H. And Ernst, W.H.O., (2007). Real-Time PCR analysis of metallothionein-2b expression in metalicolous and non-metallicolous populations of *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. *Environmental and Experimental Botany*, **59**: 84-91.
- Jena, A.K., Mohanty, M. and Patra, H.K. (2004). Phytoremediation of environmental chromium-a review. *e-Planet*, **2**: 227-233.
- Kehrer, J.P. (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, **149**: 43-50.
- Khan, I., Ahmad, A. and Iqbal, M. (2009). Modulation of antioxidant defencesystem for arsenic detoxificationin *Indian mustard*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**: 626-634.
- Kim, Y.J., Kim, J.H., Lee, C.E., Mok, Y.G., Choi, J.S., Shin, H.S. and Hwanga, S. (2006). Expression of yeast transcriptional activator MSN1 promotes accumulation of chromium and sulfur by enhancing sulfate transporter level in plants. *FEBS Letters*, **580**: 206-210.
- Kimber, D.S. and McGregor, D.I. (1995). The species and their origins, cultivation and world production. In: Kimber, D.S. and McGregor, D.I. (Eds.) *Brassica Oilseeds: Production and Utilization*. CABI Publishing, Wallingford, CT, pp. 1-9.
- Knight, H. and Knight, M.R. (2001). Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science*, **6**: 262-267.
- Kohler, A., Blaudez, D., Chalot, M. And Martin, F. (2004). Cloning and expression of multiple metallothioneins from hybrid poplar. *New Phytologist*, **164**: 83-93.

- Kosugi, H. and Kikugawa, K. (1985). Thiobarbituric acid reaction of aldehydes and oxidized lipids in glacial acetic acid. *Lipids*, **20**: 915-920.
- Kotas, J. and Stasicka, Z. (2000). Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environmental Pollution*, **107**: 263-283.
- Kumar, P.B.A.N., Dushenkov, V., Motto, H. and Raskin, I. (1995). Phytoextraction-the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science and Technology*, **29**: 1232-1238.
- Ledoigt, G. and Hitmi, A. (2008). Effect of chromium species on phytochemical and physiological parameters in *Datura innoxia*. *Chemosphere*, **72**: 763-771
- Lee, J., Shim, D., Song, W.Y., Hwang, I. and Lee, Y. (2004). *Arabidopsis* metallothioneins 2a and 3 enhance resistance to cadmium when expressed in *Vicia faba* guard cells. *Plant Molecular Biology*, **54**: 805-815.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. and Lamb, C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, **79**: 583-593.
- Lei, Y., Korpelainen, H. and Li, C. (2007). Physiological and biochemical responses to high Mn concentrations in two contrasting *Populus cathayana* populations. *Chemosphere*, **68**: 686-694.
- Liu, D.H., Jaing, W.S. and Li, M.X. (1993). Effect of chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. *Israel Journal of Plant Science*, **42**: 235-243.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*, **25**: 402-408.
- Lopez, M.L, Peralta-Videa, J.R., Parsons, J.G., Gardea-Torresdey, J.L. and Duarte-Gardea, M. (2009). Effect of indole-3-acetic acid, kinetin, and ethylenediaminetetraacetic acid on plant growth and uptake and translocation of lead, micronutrients, and macronutrients in alfalfa plants. *International Journal of Phytoremediation*, **11**: 131-149.

- Ma, J.F., Tamal, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katuhara, M., Ishiguro, M. and Yano, M. 2006. A sitransporter in rice. *Nature*, **440**: 688-691.
- Malec, P., Maleva, M.G., Prasad, M.N.V. and Strzalka, K. (2010). Responses of *Lemna trisulca* (Duckweed) exposed to low doses of cadmium: thiols, metal binding complexes, and photosynthetic pigments as sensitive biomarkers of ecotoxicity. *Protoplasma*, **240**: 69-74.
- Mangkoedihardjo, S., Ratnawati, R. and Alfianti, N. (2008). Phytoremediation of hexavalent chromium polluted soil using *Pterocarpus indicus* and *Jatropha curcas* L. *World Applied Sciences Journal*, **4**: 338-342.
- Marques, M.J., Salvador, A., Morales-Rubio, A.E. and De La Guardia, M. (1998). Analytical methodologies for chromium speciation in solid matrices: a survey of literature. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **362**: 239-248.
- Marschner, H. (1995). Functions of mineral nutrients: Macronutrients, in mineral nutrition of higher plants, Marschner, H. (Ed.), Academic Press, London, 229-312 pp.139
- Mazhoudi, S., Chaoui, A., Ghorbal, M.H. and Ferjani, E.E. (1997). Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Science*, **127**: 129-137.
- Mendoza-Cozatl, D.G., Moreno, A.Q. and Zapata-Perez, O. (2007). Coordinated responses of phytochelatin synthase and metallothionein genes in black mangrove, *Avicennia germinans*, exposed to cadmium and copper. *Aquatic Toxicology*, **83**: 306-314.
- Mendoza-Cozatl, D.G., Butko, E., Springer, F., Torpey, J.W., Komives, E.A., Kehr, J. and Schroeder, J.I. (2008). Identification of high levels of phytochelatin, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *Plant Journal*, **54**: 249-259

- Meng, H., Hua, S., Shamsi, I.H., Jilani, G., Li, Y. and Jiang, L. (2009). Cadmium induced stress on the seed germination and seedling growth of *Brassica napus* L., and its alleviation through exogenous plant growth regulators. *Plant Growth Regulation*, **58**: 47-59.
- Metwally, A., Finkemeier, I., Georgi, M. and Dietz, K.J. (2003). Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiology*, **132**: 272-281.
- Metwally, A., Safronova, V.I., Belimov, A.A. and Dietz, K.J. (2005). Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. *Journal of Experimental Botany*, **56**: 167-178.
- McGrath, S.P., Zhao, F.J. and Lombi, E. (2002). Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. *Advances in Agronomy* **75**: 1-56.
- Mika, A. and Lüthje, S. (2003). Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiology*, **132**: 1489-1498.
- Millar, A.H., Mittova V. and Kiddle, G. (2003). Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiology*, **133**: 443-447.
- Mir, G., Domenech, J., Huguet, G., Guo, W.J., Goldsbrough, P., Atrian, S. and Molinas, M. (2004). A plant type 2MT from cork tissue responds to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, **55**: 2483-2493.
- Mishra, S., Singh, V., Srivastava, S., Srivastava, R., Srivastava, M., Dass, S., Satsang, G. and Prakash, S. (1995). Studies on uptake of trivalent and hexavalent Cr by maize (*Zea mays*). *Food and Chemical Toxicology*, **33**: 393- 397.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress. *Trends in Plant Sciences*, **7**: 405-410.
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D. and Sreekanth, T.V.M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, **8**: 199-216.
- Nagalakshmi, N. and Prasad, M.N.V. (2001). Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Science*, **160**: 291-299.

- Nakano, Y. and Asada, K. (1987). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Physiologia Plantarum*, **115**: 393-400.
- Navabpour, S., Morris, K., Allen, R., Harrison, E., A.H.Mackerness, S. and Buchanan-Wollaston, V. (2003). Expression of senescence enhanced genes in response to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, **54**: 2285-2292.
- Neill, S., Desikan, R. and Hancock, J. (2002). Hydrogen peroxide signaling, *Current Opinion in Plant Biology*, **5**: 388-395.
- Özdener, Y., Aydin, B.K., Fatma Aygün, S. ve Yürekli, F . (2001). Effect of hexavalent chromium on the growth and physiological and biochemical parameters on *Brassica oleracea* L. var. acephala DC. *Acta Biologica Hungarica*, **62(4)**: 463-476.
- Panda, S.K. and Choudhury. (2005). Chromium stress in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **17**: 95-102.
- Panda, S.K. (2007). Chromium-mediated oxidative stress and ultrastructural changes in root cells of developing rice seedlings. *Journal of Plant Physiology* **164**: 1419-1428.
- Pandey, V., Dixit, V. and Shyam, R. (2005). Antioxidative responses in relation to growth of mustard (*Brassica juncea* cv. Pusa Jaikisan) plants exposed to hexavalent chromium. *Chemosphere* **61**: 40-47.
- Pandey, V., Dixit, V. and Shya, R. (2009). Chromium (VI) induced changes in growth and root plasma membrane redox activities in pea plants. *Protoplasma*, **235**: 49-55
- Petra, K., Juan, B., Pilar Bernal, M., Flavia, N., Charlotte, P., Stefan, S., Rafael, C. and Carmela, M., (2009). Trace Element Behaviour at the Root-Soil Interface. Implications in Phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany*, **67**: 243-259.
- Pichtel, J., Kuroiwa, K. and Sawyerr, H.T. (2000). Distribution of Pb, Cd and Ba in soils and plants of two contaminated sites. *Environmental Pollution*, **110**: 171-178.
- Pilon-Smits, E.A.H. (2005). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, **56**: 15-39.

- Prakash, S. and Hinata, K. (1980). Taxonomy, cytogenetics, and origin of crop *Brassica*, a review. *Opera Botanica*, **55**: 1-57.
- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A., Stewart, C.R. (1994). Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell*, **6**: 65-74.
- Prasad, M.N.V. (1995). Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environmental and Experimental Botany*, **35**: 525-545.
- Prasad, M.N.V. and Freitas, H.M. (2003). Metal hyperaccumulation in plants- Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*, **16**: 285-321.
- Przedpelska, E. and Wierzbicka, M. (2007). *Arabidopsis arenosa* (*Brassicaceae*) from a lead-zinc waste heap in southern Poland - a plant with high tolerance to heavy metals. *Plant and Soil*, **299**: 43-53.
- Polidoros, A.N. and Scandalios, J.G. (1999). Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiologia Plantarum*, **106**: 112-120.
- Radotić, K., Dučić, T. and Mutavdžić, D. (2000). Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, **44**: 105-113.
- Rai, V., Vajpayee, P., Singh, S.N. and Mehrotra, S. (2004). Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. *Plant Science*, **167**: 1159-1169.
- Rout, G.R., Samantaray, S. and Das, P. (1999). Chromium, nickel and zinc tolerance in *Leucaena leucocephala* (K8). *Silvae Genetica*, **48**: 151-157.
- Rausch, T., Gromes, R., Liedschulte, V., Müller, I., Bogs, J., Galovic, V. and Wachter, A. (2007). Novel insight into the regulation of GSH biosynthesis in higher plants. *Plant Biology*, **9**: 565-572.

- Schor-Fumbarov, T., Goldsbrough, P.B., Adam, Z. and Tel-Or, E. (2005). Characterization and expression of a metallothionein gene in the aquatic fern *Azolla filiculoides* under heavy metal stress. *Planta*, **223**: 69-76.
- Seth, C.S., Chaturvedi, P.K. and Misra, V. (2008). The role of phytochelatins and antioxidants in tolerance to Cd accumulation in *Brassica juncea* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **71**: 76-85.
- Schutzendubel, A. and Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, **53**: 1351-1365.
- Shankar, V., Thekkeetil, V., Sharma, G. and Agrawal, V. (2012). Alleviation of heavy metal stress in *Spilanthes cavla* L. (antimalarial herb) by exogenous application of glutathione. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, **48**: 113-119.
- Shanker, A.K. and Pathmanabhan, G. (2004). Speciation dependant antioxidative response in roots and leaves of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench cv CO 27) under Cr (III) and Cr (VI) stress. *Plant Soil*, **265**: 141-151.
- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H. and Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment International*, **31**: 739-753.
- Shanker AK. Physiological, biochemical and molecular aspects of chromium toxicity and tolerance in selected crops and tree species. PhD Thesis, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, India; 2003.
- Shao, H.B., Liang, Z.S. and Shao, M.A. (2005). Adaptation of higher plants to environmental stresses and stress signal transduction. *Acta Ecologica Sinica*, **25**: 1772-1781.
- Shao, H.B., Chu, L.Y., Lu, Z.H. and Kang, C.M. (2008). Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences*, **4**: 8-14.

- Sharma, D.C. and Sharma, C.P. (2003). Chromium uptake and toxicity effects on growth and metabolic activities in wheat, *Triticum aestivum*. *Indian Journal of Experimental Biology*, **34**: 689-691.
- Sharma, S.S. and Dietz, K-J. (2006). The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, **57**: 711-726.
- Sharma, S. and S, Dietz. K.J. (2009). The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science*, **14**: 43-50.
- Sharma, I., Pati, P.K. and Bhardwaj, R. (2011). Effect of 28-homobrassinolide on antioxidant defence system in *Raphanus sativus* L. under chromium toxicity. *Ecotoxicology*, **20**: 862-874.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y. and Yoshimura, K. (2002). Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, **53**: 1305-1319.
- Sinha, S., Saxena, R. and Singh, S. (2005). Chromium induced lipid peroxidation in the plants of *Pistia stratiotes* L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes. – *Chemosphere*, **58**: 595-604.
- Sinha, S., Basant, A., Malik, A. and Singh, K.P. (2009). Multivariate modeling of chromium-induced oxidative stress and biochemical changes in plants of *Pistia stratiotes* L. *Ecotoxicology* **18**: 555-566
- Sinha, S., Sinam, G., Mishra, R.K. and Mallick, S. (2010). Metal accumulation, growth, antioxidants and oil yield of *Brassica juncea* L. exposed to different metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **73**: 1352-1361.
- Solheim, C. (2008). Identification and characterization of copper-responsive proteins in *Arabidopsis*. PhD thesis, department of plant sciences, university of Saskatchewan.

- Subrahmanyam, D. (2008). Effects of chromium toxicity on leaf photosynthetic characteristics and oxidative changes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Photosynthetica*, **46**: 339-345.
- Tennstedt, P., Peisker, D., Böttcher, C., Trampczynska, A. and Clemens, S. (2009). Phytochelatin synthesis is essential for the detoxification of excess zinc and contributes significantly to the accumulation of zinc. *Plant Physiology*, **149**: 938-948.
- Toppi, L.S. and Gabbrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, **41**: 105-130.
- Turgut, C., Pepe, M.K. and Cutrigh, T.J. (2004). The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr, and Ni from soil using *Helianthus annuus*. *Environmental Pollution*, **131**: 147-154.
- TÜİK (2010). Bitkisel Üretim İstatistikleri, Ankara.
- Uchida, A., Jagendorf, A.T., Hibino, T., Takabe, T. and Takabe, T. (2002). Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sciences*, **163**: 515-523.
- Usha, B., Prashanth, S.R. and Parida, A. (2007). Differential expression of two metallothionein encoding genes during heavy metal stress in the mangrove species, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Current Science*, **93**: 1215-1219.
- Usha, B., Venkataraman, G. and Parida, A. (2009). Heavy metal and abiotic stress inducible metallothionein isoforms from *Prosopis juliflora* (SW) D.C. show differences in binding to heavy metals in vitro. *Molecular Genetics and Genomics*, **281**: 99-108.
- U.N. (1935). Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and its peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany*, **7**: 389-452.

- Vajpayee, P., Tripathi, R.D., Rai, U.N., Ali, M.B. and Singh, S.N. (2000). Chromium accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content of *Nymphaea alba*. *Chemosphere*, **41**: 1075-1082.
- Van, Hoof, N.A.L.M., Hassinen, V.H., Hakvoort, H.W.J., Ballintijn, K.F., Schat, H., Verkleij, J.A.C., Ernst, W.H.O., Karenlampi, S.O. and Tervahauta, A.I. (2001). Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. *Plant Physiology*, **126**: 1519-1526.
- Vernay, P., Gauthier-Moussard, C., Jean, L., Bordas, F.O., Faure, F., Ledoigt, G. and Hitmi, A. (2008). Effect of chromium species on phytochemical and physiological parameters in *Datura innoxia*, *Chemosphere*, **72**: 763-771.
- Wahid, A., Perveen, M., Gelani, S. and Basra, S.M.A. (2007). Pretreatment of seed with H₂O₂ improves salt tolerance of wheat seedlings by alleviation of oxidative damage and expression of stress proteins. *Journal of Plant Physiology*, **164**: 283-294.
- Wang, X., Song, Y., Ma, Y., Zhuo, R. and Jin, L., (2011). Screening of Cd tolerant genotypes and isolation of metallothionein genes in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environmental Pollution*, **159**: 3627-3633.
- Warwick, M.D., Windham. and I.A. Al-Shehbaz. (2006). Toward a global phylogeny of the *Brassicaceae*. *Molecular Biology and Evolution*, **23**: 2142-2160.
- Wellburn, A.R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, **144**: 307-313.
- White, P.J. and Brown, P.H. (2010). Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany*, **105**: 1073-1080
- Wong, H.L., Sakamoto, T., Kawasaki, T., Umemura, K. And Shimamoto, K. (2004). Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. *Plant Physiology*, **135**: 1447-1456.

- Wong, C.S.C., Li, X. and Thornton, I. (2006). Urban environmental geochemistry of trace metals. *Environmental Pollution* **142**: 1-16.
- Xu, Q., Xu, X., Zhao, Y., Jiao, K., Herbert, S.J. and Hao, L. (2008). Salicylic acid, hydrogen peroxide and calcium-induced saline tolerance associated with endogenous hydrogen peroxide homeostasis in naked oat seedlings. *Plant Growth Regulation*, **54**: 249-259.
- Xue, T., Li, X., Zhu, W., Wu, C., Yang, G. and Zheng, C., (2009). Cotton metallothionein GhMT3a, a reactive oxygen species scavenger, increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast. *Journal of Experimental Botany*, **60**: 339-349.
- Yadav, S.K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, **76**: 167-179.
- Yang, H., Rose, N.L., Battarbee, R.W. and Monteith, D. (2002). Trace metal distribution in the sediments of the whole lake basin for Lochnagar, Scotland: a palaeolimnological assessment. *Hydrobiologia* **479**: 51–61
- Yang, X., Feng, Y., He, Z. and Stoffella, P.J. (2005). Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **18**: 339-353.
- Yang, X., Jin, X., Feng, Y. and Islam, E. (2005). Molecular mechanisms and genetic basis of heavy metal tolerance/hyperaccumulation in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, **47**: 1025-1035.
- Yang, Z., Wu, Y., Li, Y., Ling, H.Q. and Chu, C. (2009). *OsMT1a* a type 1 metallothionein plays the pivotal role in zinc homeostasis and drought tolerance in rice. *Plant Molecular Biology*, **70**: 219-229.
- Yang, J., Wang, Y., Liu, G., Yang, C. and Li, C. (2011). *Tamarix hispida* metallothionein-like ThMT3, a reactive oxygen species scavenger, increases tolerance against

Cd²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, and NaCl in transgenic yeast. *Molecular Biology Reports*, **38**: 1567-1574.

Yıldız, M., Terzi, H., Cenkci, S. ve Yıldız, B. (2012). Chromium (VI) induced alterations in 2-D protein profiles and antioxidant defence systems of barley cultivars. *Hacettepe Journal Biology and Chemistry*, **40**: 257-265.

Yu, C., Cai, Q., Guo, Z., Yang, Z. and Khoo, S.B. (2003). Speciation analysis of tellurium by solid-phase extraction in the presence of ammonium pyrrolidine dithiocarbamate and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **376**: 234-242.

Yu, X.Z. and Gu, J.D. (2008). Effect of available nitrogen on phytoavailability and bioaccumulation of hexavalent and trivalent chromium in hankow willow (*Salix matsudana* Koidz). *Ecotoxicology Environmental Safety*, **70**: 216-222.

Zayed, A., Lytle, C.M., Jin-Hong, Q., Terry, N. and Qian, J.H. (1998). Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops. *Planta*, **206**: 293-9.

Zayed, A. and Terry, N. (2003). Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant and Soil*, **249**: 139-56.

Zavoda, J., Cutright, T., Szpak, J. and Fallon, E. (2001). Uptake, selectivity, and inhibition of hydroponic treatment of contaminants. *Journal of Environmental Engineering and Science*, **127**: 502 -508.

Zeng, F.R., Qiu, B.Y., Ali, S. and Zhang, G.P. 2010. Genotypic differences in nutrient uptake and accumulation in rice under chromium stress. *Journal of Plant Nutrition*, **33**: 518-528.

Zeng, F., Qiu, B., Wu, X., Niu, S., Wu, F. and Zhang, G. (2012). Glutathione-mediated alleviation of chromium toxicity in rice plants. *Biological Trace Element Research*, **148**: 255-263.

- Zhang, P., Jin, C., Zhao, Z. and Tian, G. (2010). 2D crossed electric field for electrokinetic remediation of chromium contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, **177**: 1126-1133.
- Zhang, H., Hu, L.-Y., L, P., Hu, K.-D., Jian, C.-X. and Luo, J.-P. (2010). Hydrogen sulfide alleviated chromium toxicity in wheat. *Biologia Plantarum*, **54(4)**: 743-747.
- Zhigang, A., Cuijie, L., Yuangang, Z., Yejie, D., Wachter, A., Gromes, R. and Rausch, T. (2006). Expression of BjMT2, a metallothionein 2 from *Brassica juncea*, increases copper and cadmium tolerance in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*, but inhibits root elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of Experimental Botany*, **57**: 3575-3582.
- Zhu, Y.L., Zayed, A.M., Quian, J.H., De Souza, M. and Terry, N. (1999). Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: II. Water hyacinth. *Journal of Environmental Quality*, **28**: 339-344.
- Zimeri, A.M., Dhankher, O.P., McCaig, B. and Meagher, R.B. (2005). The Plant MT1 metallothioneins are tabilized by binding cadmiums and are required for cadmium tolerance and accumulation. *Plant Molecular Biology*, **58**: 839-855.
- Zou, J.H., Wang, M., Jiang, W.S. and Liu, D.H. (2006). Chromium accumulation and its effects on other mineral elements in *Amaranthus viridis* L. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, **48**: 7-12.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nagihan BİNGÜL
Doğum Yeri ve Tarihi : 17.08.1986
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (Telefon/e-posta) : binnagihan@hotmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : İzmit Mimar Sinan Lisesi, 2004
Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2010
Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2013

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : ---

Yayınları (SCI ve diğer) : Yıldız, M., Terzi, H. and Bingül, N. 2013.
Protective role of hydrogen peroxide pretreatment on defense systems and *BnMP1*
gene expression in Cr(VI)-stressed canola seedlings. *Ecotoxicology*, Revision.