

**Kanola (*Brassica napus* L.) Fidelerinde
Krom(VI) Toleransı ve Proteom Değişimleri
Üzerine Krom(VI) ve Sülfatın Rolünün Araştırılması**

DOKTORA TEZİ

Hakan TERZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Ağustos, 2014

Bu tez çalışması, 212T225 nolu proje ile Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) ve 12.FEN.BİL.01 nolu proje ile Afyon Kocatepe Üniversitesi BAPK tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**KANOLA (*Brassica napus* L.) FİDELERİNDE KROM(VI) TOLERANSI ve
PROTEOM DEĞİŞİMLERİ ÜZERİNE KROM(VI) ve SÜLFATIN ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

Hakan TERZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Ağustos, 2014

TEZ ONAY SAYFASI

Hakan TERZİ tarafından hazırlanan “**Kanola (*Brassica napus* L.) fidelerinde krom(VI) toleransı ve proteom değişimleri üzerine krom(VI) ve sülfatın rolünün araştırılması**” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 15/08/2014 tarihinde aşığıdaki jüri tarafından oy birliğı ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

İmza

Başkan : Prof. Dr. İsmail TÜRKAN
Ege Üniversitesi Fen Fakültesi

Üye : 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

Üye : Doç. Dr. Fatma Duygu ÖZEL DEMİRALP
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

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

..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....
Prof. Dr. Yılmaz YALÇIN
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.

15.08.2014

Hakan TERZİ

ÖZET

Doktora Tezi

KANOLA (*Brassica napus* L.) FİDELERİNDE KROM(VI) TOLERANSI ve PROTEOM DEĞİŞİMLERİ ÜZERİNE KROM(VI) ve SÜLFATIN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Hakan TERZİ

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

Bu çalışmanın birinci aşamasında, 8 kanola (*Brassica napus* L.) çeşidinin (Champlain, Dante, Heros, Nelson, NK Petrol, Sary, Süzer ve Vectra) hegzavalent krom [Cr(VI)] için fitoremediasyon potansiyelleri hidroponik kültür ortamında değerlendirilmiştir. Bu amaçla, 7 gün süreyle Cr(VI) stresine (0, 10, 50 ve 100 µM potasyum dikromat) maruz bırakılan 14 günlük kanola fidelerinde büyüme, Cr birikimi, malondialdehit (MDA) içeriği, klorofil içeriği, protein olmayan tiyol (NPT) içeriği ve bazı antioksidan enzimlerin [süperoksit dismutaz (SOD), guaiakol peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT)] aktivitesindeki değişimler incelenmiştir. Cr(VI) stresi kuru ağırlık (KA), klorofil içeriği ve CAT aktivitesinde azalmaya, MDA içeriği, NPT içeriği, SOD ve POD aktivitelerinde artışa neden olmuştur. Kuru ağırlık temelinde belirlenen tolerans indeksi NK Petrol çeşidinde maksimum (%82.5-74.1), Sary çeşidinde ise minimum (%65.7-40.8) olarak bulunmuştur. Sary çeşidi, düşük klorofil seviyeleri ve yüksek MDA içeriği ile ilişkili olarak en yüksek oranda (705.8 µg g⁻¹ KA) Cr biriktirmiştir. Bununla birlikte, en düşük Cr birikimi (255.0 µg g⁻¹ KA) NK Petrol çeşidinde bulunmuştur. Ayrıca, NK Petrol çeşidi Cr(VI) stresi altında yüksek klorofil içeriğini ve CAT aktivitesini sürdürmüştür. Sary çeşidinde göre NK Petrol çeşidi nispeten Cr'u dokuları dışında tutabilen bir çeşit

olmasına rağmen, daha yüksek oranda biyokütle üreterek Cr(VI) stresini tolere edebildiği için Cr ile kirlenmiş alanların fitoremediasyonu için potansiyele sahip olabilir.

Bu çalışmanın ikinci aşamasında, Cr(VI) toleransında farklılık gösteren nispeten Cr-toleranslı (NK Petrol) ve Cr-hassas (Sary) kanola çeşitlerinde kükürt (S) beslemesi ve Cr(VI) stresi arasındaki etkileşimler değerlendirilmiştir. Kanola fideleri 7 gün süreyle S-yeterli (1 mM S) besin çözeltisinde büyütülmüştür. Sonrasında fideler farklı S konsantrasyonlarında [0 mM S (-S), 1 mM S (+S) ve 2 mM S (+HS)] 7 gün daha büyütülmüştür. On dört günlük fideler 3 gün süreyle 6 farklı uygulamaya maruz bırakılmıştır: (1) +S/-Cr; 1 mM sülfat, 0 µM Cr(VI) (kontrol), (2) +S/+Cr; 1 mM sülfat, 100 µM Cr(VI), (3) -S/-Cr; 0 mM sülfat, 0 µM Cr(VI) (kükürt eksikliği), (4) -S/+Cr; 0 mM sülfat, 100 µM Cr(VI) (kombine stres), (5) +HS/-Cr; 2 mM sülfat, 0 µM Cr(VI) (aşırı S uygulaması) ve (6) +HS/+Cr; 2 mM sülfat, 100 µM Cr(VI). Bu süre sonunda fideler büyüme, Cr birikimi, MDA içeriği, klorofil içeriği, tiyol içeriği, sistein içeriği, askorbik asit (AsA) ve glutatyon (GSH) içerikleri, bazı antioksidan enzimlerin [SOD, POD, CAT, askorbat peroksidaz (APX), glutatyon S-transferaz (GST) ve glutatyon redüktaz (GR)] aktivitesi, metallothionein protein 1 geninin (*BnMP1*) ifade seviyesi ve yaprak proteomundaki değişimleri değerlendirmek için kullanılmıştır. Sary çeşidinin büyüme parametrelerinde, -S/-Cr ve -S/+Cr uygulamaları belirgin bir azalmaya neden olmuştur. Maksimum Cr birikimi -S/+Cr bitkilerinde ve özellikle de Sary çeşidinde belirlenmiştir. Sary çeşidindeki yüksek seviyedeki Cr, MDA içeriğini arttırmış ve klorofil içeriğini azaltmıştır. Antioksidan enzimlerin aktivitesi ve sistein içeriği -S/+Cr koşulları altındaki NK Petrol çeşidinde daha yüksek bulunmuştur. Antioksidan metabolitlerin (AsA ve GSH) içerikleri her iki çeşitte -S/-Cr uygulaması tarafından azaltılmıştır. *BnMP1* geninin ifade seviyesi NK Petrol çeşidinde -S/+Cr uygulaması, Sary çeşidinde ise +S/+Cr ve +HS/+Cr uygulamaları tarafından arttırılmıştır. Bu sonuç, metallothionein proteininin S kullanılabilirliği sırasında değil, S-eksikliği altında Cr toleransında fonksiyon görebileceğini ileri sürmektedir. Sonuç olarak, kükürt beslemesinin Cr alınımını engellenmesinin yanı sıra savunma sistemleri ve gen ifadesi üzerindeki pozitif etkileri ile de toleransı arttırmıştır.

Mevcut araştırmada, nispeten Cr-toleranslı NK Petrol ve Cr-hassas Sary kanola çeşitlerinde kükürt beslemesi ve Cr(VI) stresi ile ilişkili proteom değişimleri belirlenmiştir. İki-yönlü jel elektroforezi ile analiz edilen yaprak protein profilleri, farklı S konsantrasyonları ve Cr(VI) stresine cevap olarak farklı şekilde ifade olan 65 proteini ortaya koymuştur. Farklı şekilde ifade olan bu proteinlerden 46 protein beneği MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ve veri tabanı taraması ile başarılı bir şekilde tanımlanmıştır. Farklı şekilde ifade olan proteinlerin büyük çoğunluğunun fotosentez, enerji metabolizması ve stres savunmada fonksiyon gördüğü belirlenmiştir. Stres savunma ile ilişkili olarak 2-Cys peroksiredoksin BAS1, glutatyon S-transferaz, ferritin-1, L-askorbat peroksidaz 1, tiazol biyosentetik enzim ve mirosinaz-bağlayıcı protein-benzeri proteinin nispeten Cr-hassas Sary çeşidine göre Cr-toleranslı NK Petrol eşidinde kükürt eksikliği ve Cr(VI) stresine cevap olarak daha fazla artış göstermiştir. NK Petrol eşidinde enerji metabolizmasında fonksiyon gören proteinlerin bolluğundaki daha fazla artışın muhtemelen yüksek enerji talebini karşılamak için Cr(VI) stresi altındaki hücrelere yardım edebileceği ileri sürülebilir. Diğer taraftan, NK Petrol eşidinde moleküler şaperonun (20 kDa şaperonin) artan ifadesi, yanlış katlanmış proteinlerin tekrar katlanması ve protein fonksiyonlarının stabilizasyonu için ilave savunma mekanizması olabileceği ileri sürülebilir. Mevcut proteomik çalışmanın bulguları, kanola çeşitlerinde kükürt eksikliği ve Cr(VI) toleransının moleküler mekanizmaları ile ilgili birincil verileri sağlamıştır.

Anahtar kelimeler: *Brassica napus* L., Cr(VI), Kükürt, Tolerans, Fitoremediasyon, Proteomik

2014, xv + 177 sayfa

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION OF THE CHROMIUM(VI) TOLERANCE AND THE ROLES OF CHROMIUM(VI) AND SULFATE ON THE PROTEOME CHANGES IN CANOLA (*Brassica napus* L.) SEEDLINGS

Hakan TERZİ

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

In the first stage of this study, the phytoremediation potential of 8 canola (*Brassica napus* L.) cultivars (Champlain, Dante, Heros, Nelson, NK Petrol, Sary, Süzer and Vectra) for hexavalent chromium [Cr(VI)] were evaluated in hydroponic culture. For this purpose, the alterations in seedling growth, Cr accumulation, malondialdehyde (MDA) content, chlorophyll content, non-protein thiol content (NPT) and activities of some antioxidant enzymes [superoxide dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (POD) and catalase (CAT)] were investigated in canola seedlings exposed to Cr(VI) stress (0, 10, 50 and 100 μM potassium dichromate) for 7 days. Chromium stress caused a reduction in dry weights (DW), chlorophyll content and CAT activity, and increase in lipid peroxidation, NPT content and activities of SOD and POD. Based on the dry weight, the tolerance index was found maximum in cultivar NK Petrol (%82.5-74.1) and minimum in cultivar Sary (%65.7-40.8). The cultivar Sary accumulated the maximum amount of Cr (705.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW), which was correlated with the lowest levels of chlorophyll content and highest levels of lipid peroxidation. However, Cr accumulation was found lowest (255.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW) in NK Petrol. Moreover, the cultivar NK Petrol maintained high content of chlorophyll and CAT activity under Cr(VI) stress. Although NK Petrol may

be a Cr(VI) excluder cultivar relative to Sary, it may have the potential for the phytoremediation of Cr-contaminated sites as it tolerates Cr(VI) stress by producing higher biomasses.

In the second stage of this study, the interactions between sulfur (S) nutrition and Cr(VI) stress were evaluated in relatively Cr-tolerant (NK Petrol) and Cr-sensitive (Sary) canola cultivars differing in Cr(VI) tolerance. The canola seedlings were grown S-sufficient (1 mM S) nutrient solution for 7 days. The seedlings were then grown in variable S concentrations [0 mM S (-S), 1 mM S (+S) and 2 mM S (+HS)] for another 7 days. The fourteen-day-old seedlings were exposed to 6 different treatments for 3 days: (1) +S/-Cr; 1 mM sulfate, 0 μ M Cr(VI) (control), (2) +S/+Cr; 1 mM sulfate, 100 μ M Cr(VI), (3) -S/-Cr; 0 mM sulfate, 0 μ M Cr(VI) (sulfur deficiency), (4) -S/+Cr; 0 mM sulfate, 100 μ M Cr(VI) (combined stress), (5) +HS/-Cr; 2 mM sulfate, 0 μ M Cr(VI) (excess S treatment) and (6) +HS/+Cr; 2 mM sulfate, 100 μ M Cr(VI). After this period, the seedlings were used to evaluate the alterations in growth, Cr accumulation, lipid peroxidation, chlorophyll content, thiol content, cysteine content, ascorbic acid (AsA) and glutathione (GSH) contents, activities of some antioxidant enzymes [SOD, POD, CAT, ascorbate peroxidase (APX), glutathione S-transferase (GST) and glutathione reductase (GR)], expression level of metallothionein protein 1 gene (*BnMP1*) and leaf proteome. The -S/-Cr and -S/+Cr treatments caused a marked decrease in growth parameters of cultivar Sary. The maximum Cr accumulation was measured in -S/+Cr plants, especially in cultivar Sary. The higher level of Cr in cultivar Sary increased lipid peroxidation and decreased chlorophyll content. The activities of antioxidant enzymes and cysteine content were found higher in NK Petrol under -S/+Cr condition. The levels of antioxidant metabolites (AsA and GSH) in both cultivars were decreased by -S/-Cr treatment. The expression level of *BnMP1* gene was increased by -S/+Cr treatment in NK Petrol, while increased +S/+Cr and +HS/+Cr treatments in Sary. This result suggests metallothionein protein may be involved in Cr(VI) tolerance but only under S-deficiency not during availability of S. In conclusion, the tolerance was

increased by the positive effects of sulfur nutrition on defense systems and gene expression as well as by the preventing Cr uptake.

In the present study, the proteome changes related to sulfur nutrition and Cr(VI) stress were determined in a relatively Cr-tolerant NK Petrol and a Cr-sensitive Sary cultivars of canola. Leaf protein profiles analyzed by two-dimensional gel electrophoresis revealed that 65 protein spots were differentially expressed in response to variable S concentrations and Cr(VI) stress. Of these, differentially expressed 46 protein spots were identified successfully by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry and database search. Majority of the differentially expressed proteins were involved in photosynthesis, energy metabolism and stress defense. In relation to stress defense, 2-Cys peroxiredoxin BAS1, glutathione S-transferase, ferritin-1, L-ascorbate peroxidase 1, thiazole biosynthetic enzyme and myrosinase-binding protein-like exhibited a greater increase in response to sulfur deficiency and Cr(VI) stress in the relatively Cr-tolerant NK Petrol compared to Cr-sensitive Sary. It is suggested that the greater increase in the abundance of proteins involved in energy metabolism in cultivar NK Petrol might help to Cr(VI) stressed cells to meet the high energy demand. On the other hand, it is suggested that the enhanced expression of molecular chaperone (20 kDa chaperonin) in NK Petrol might be another additional defense mechanism for refolding of misfolded proteins and to stabilize protein structure and function. The findings of the present proteomics study provide the primary information regarding the molecular basis of sulfur deficiency and Cr(VI) tolerance in canola plants.

Keywords: *Brassica napus* L., Cr(VI), Sulfur, Tolerance, Phytoremediation, Proteomics

2014, xv + 177 pages

TEŞEKKÜR

Lisansüstü öğrenimim ve tez çalışmalarım süresince her türlü desteğini esirgemeyen, değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşan, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın **Doç. Dr. Mustafa YILDIZ**'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın yürütülmesinde desteğini her zaman yanımda hissettiğim rektörümüz Sayın **Prof. Dr. Mustafa SOLAK**'a, yardım ve katkılarını esirgemeyen değerli hocalarım Sayın **Yrd. Doç. Dr. Saliha Handan YILDIZ** (Afyon Kocatepe Üniversitesi) ve Sayın **Doç. Dr. Müjgan ÖZDEMİR ERDOĞAN** (Afyon Kocatepe Üniversitesi)'a, proteomik çalışmaların son basamağı olan kütle spektrometresi ve biyoinformatik alanında bilgi ve tecrübelerini paylaşan Sayın **Doç. Dr. Murat KASAP** (Kocaeli Üniversitesi) ve Sayın **Yrd. Doç. Dr. Gürler AKPINAR** (Kocaeli Üniversitesi)'a, araştırmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen yüksek lisans öğrencileri Sayın **Nermin AKÇALI**, Sayın **Ünal ALTUĞ** ve Sayın **Hacer İrem YILDIRIM**'a, her konuda öneri ve eleştirileriyle yardımlarını gördüğüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında sabırla bana destek olan, her türlü konuda manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve bana olan inancını her zaman hissettiren sevgili eşim Sayın **Arş. Grv. Dr. E. Suna ARIKAN TERZİ**'ye ve manevi desteklerinden dolayı aileme teşekkür ederim.

Hakan TERZİ

AFYONKARAHİSAR, 2014

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	5
2.1. Kanola (<i>Brassica napus</i> L.) Bitkisi	5
2.2. Ağır Metallerin Çevreden Uzaklaştırılması: Fitoremediasyon	5
2.2.1. Fitoekstraksiyon	5
2.2.2. Rizofiltrasyon.....	6
2.2.3. Fitostabilizasyon.....	7
2.2.4. Fitovolatilizasyon.....	7
2.2.5. Fitodegradasyon (Fitotransformasyon)	8
2.3. Ağır Metal Alınımı ve Taşınımı	8
2.4. Metal Toleransı Mekanizması.....	12
2.4.1. Ağır Metallerin Vakuolde Alıkonulması.....	13
2.4.2. Ağır Metal Bağlayıcı Ligandlar	15
2.4.2.1. Fitoşelatinler	15
2.4.2.2. Metalloiyoneinler	17
2.5. Fitoremediasyon İçin Bitkilerin Geliştirilmesi	18
2.5.1. Genetik Stratejiler	18
2.5.2. Şelat-Temelli Stratejiler	23
2.6. Kükürt Metabolizması ve Ağır Metal Toleransı.....	25
2.6.1. Sülfat Alınımı ve Ağır Metallerin Etkisi	25
2.6.2. Kükürt Özümlemesi	29

2.6.2.1. Sistein Sentezi.....	31
2.6.3. Bir Kükürt İçeren Bileşik Olarak Glutasyon.....	32
2.7. Ağır Metal Toksikitesinin Değerlendirilmesinde Proteomik Yaklaşım	37
2.7.1. Bitki Proteomundaki Ağır Metal Teşvikli Değişimler	38
2.7.1.1. Karbondioksit Özümlemesi ve Fotosentez ile İlişkili Proteinler	39
2.7.1.2. Primer Karbon ve Enerji Metabolizması ile İlişkili Proteinler	41
2.7.1.3. Kükürt ve Glutasyon Metabolizması ile İlişkili Proteinler	43
2.7.1.4. Azot Metabolizması ile İlişkili Proteinler	45
2.7.1.5. Antioksidan Savunma ve Detoksifikasyon ile İlişkili Proteinler	45
2.7.1.6. Protein Metabolizması ile İlişkili Proteinler.....	48
2.7.1.7. Sinyal İletim Mekanizması ve Sekonder Metabolizma ile İlişkili Proteinler	49
2.7.1.8. Patojenle İlişkili Proteinler.....	51
3. MATERYAL ve METOT	54
3.1. Kanola Çeşitlerinin Fitoremediasyon Potansiyellerine İlişkin Analizler	54
3.1.1. Bitki Materyali ve Bitki Yetiştirme Koşulları	54
3.1.2. Toprak Üstü Organların Taze ve Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi	55
3.1.3. Krom Birikiminin Belirlenmesi.....	55
3.1.4. Malondialdehit İçeriğinin Belirlenmesi	56
3.1.5. Klorofil İçeriğinin Belirlenmesi	56
3.1.6. Tiyoil İçeriklerinin Belirlenmesi	57
3.1.7. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	57
3.2. Sülfat Kullanılabilirliğine Bağlı Krom Toleransı Analizleri	58
3.2.1. Bitki Yetiştirme Koşulları, Sülfat ve Stres Uygulamaları	58
3.2.2. Büyüme Parametreleri ve Krom Birikiminin Belirlenmesi	60
3.2.3. Malondialdehit ve Klorofil İçeriğinin Belirlenmesi	60
3.2.4. Enzimatik ve Enzimatik Olmayan Antioksidanların Belirlenmesi.....	60
3.2.5. Sistein ve Tiyoil İçeriklerinin Belirlenmesi.....	62
3.2.6. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Analizleri.....	63
3.2.7. Proteomik Analizler	65
3.2.7.1. Protein Ekstraksiyonu	65

3.2.7.2. İki-Yönlü (2-D) Poliakrilamid Jel Elektroforezi	66
3.2.7.3. Jelleri Boyanması ve Görüntü Analizleri	66
3.2.7.4. Jeldeki Proteinlerin Tripsin ile Kesimi	68
3.2.7.5. Kütle Spektrometrisi Analizleri	68
3.4. İstatistik Analizler	69
4. BULGULAR.....	70
4.1. Kanola Çeşitlerinin Fitoremediasyon Potansiyellerinin Belirlenmesi	70
4.1.1. Fide Büyümesi ve Krom Birikimi Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi.....	70
4.1.2. Lipid Peroksidasyonu, Klorofil ve NPT İçerikleri Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi	71
4.1.3. Bazı Antioksidan Enzimleri Aktivitesi Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi	74
4.2. Sülfat Kullanılabilirliğinin Cr(VI) Toleransı Üzerine Etkisi.....	74
4.2.1. Fide Büyümesi ve Krom Birikimi Üzerine Sülfat Kullanılabilirliği ve Cr(VI) Stresinin Etkisi	75
4.2.2. Lipid Peroksidasyonu ve Klorofil İçeriği Üzerine Sülfat Kullanılabilirliği ve Cr(VI) Stresinin Etkisi	76
4.2.3. Antioksidan Savunma Sistemi Üzerine Sülfat Kullanılabilirliği ve Cr(VI) Stresinin Etkisi	77
4.2.4. Sistein ve Tiyoil İçerikleri Üzerine Sülfat Kullanılabilirliği ve Cr(VI) Stresinin Etkisi	82
4.2.5. <i>Brassica napus</i> Metalloprotein 1 (<i>BnMP1</i>) Geninin İfadesi Üzerine Sülfat Kullanılabilirliği ve Cr(VI) Stresinin Etkisi.....	83
4.2.6. Proteom Değişimleri Üzerine Sülfat Kullanılabilirliği ve Cr(VI) Stresinin Etkisi	85
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	100
5.1. Kanola Çeşitlerinin Fitoremediasyon Potansiyellerinin Belirlenmesi	100
5.2. Sülfat Kullanılabilirliğinin Cr(VI) Toleransı Üzerine Etkisi.....	105
5.2. Sülfat Kullanılabilirliği ve Cr(VI) Stresinin Proteom Değişimleri Üzerine Etkisi..	114
KAYNAKLAR.....	127
ÖZGEÇMİŞ.....	175

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

dH ₂ O	Distile su
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
[•] OH	Hidroksil radikali
μM	Mikromolar
mA	Miliamper
mM	Milimolar
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
O ₂ ⁻	Süperoksit radikali

Kısaltmalar

ALAD	δ-Aminolevülinik asit dehidrataz
AsA	Askorbik asit
POD	Guaiakol peroksidaz
GSH	Glutasyon
GR	Glutasyon redüktaz
İEF	İzoelektrik fokuslama
IPG	İmmobilize pH gradiyenti
MDA	Malondialdehit
MT	Metallotiyonein
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NBT	Nitro blue tetrazolium
NPT	Proteine bağlı olmayan tiyol
GSSG	Okside glutasyon
PAJE	Poliakrilamid jel elektroforez
PC	Fitoşelatin
ROT	Reaktif oksijen türleri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	Tiyobarbütirik asit
TCA	Trikloroasetik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Fitoremediasyon yeteneğine sahip bitkilerin elde edilme stratejisi.....	20
Şekil 2.2 Kükürt içeren savunma bileşiklerinin biyosentezi için kükürt özümleme basamakları.....	26
Şekil 2.3 Bazı çok önemli glutatyon fonksiyonlarına genel bakış.....	33
Şekil 2.4 Farklı stres cevaplarında glutatyonun biyosentezi ve multifonksiyonel rolü ..	34
Şekil 3.1 Kanola fidelerinde kükürt (S) ve Cr(VI) uygulamalarının şematize gösterimi..	59
Şekil 4.1 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda (a) MDA ve (b) klorofil içerikleri üzerine farklı sülfat konsantrasyonları (0, 1 ve 2 mM MgSO ₄) ve Cr(VI) stresinin (100 µM) etkisi	77
Şekil 4.2 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda (a) SOD ve (b) APX aktiviteleri üzerine farklı sülfat konsantrasyonları (0, 1 ve 2 mM MgSO ₄) ve Cr(VI) stresinin (100 µM) etkisi	78
Şekil 4.3 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda (a) POD ve (b) CAT aktiviteleri üzerine farklı sülfat konsantrasyonları (0, 1 ve 2 mM MgSO ₄) ve Cr(VI) stresinin (100 µM) etkisi	79
Şekil 4.4 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda (a) GR ve (b) GST aktiviteleri üzerine farklı sülfat konsantrasyonları (0, 1 ve 2 mM MgSO ₄) ve Cr(VI) stresinin (100 µM) etkisi	80
Şekil 4.5 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda (a) AsA içeriği ve (b) AsA/DHA oranı üzerine farklı sülfat konsantrasyonları (0, 1 ve 2 mM MgSO ₄) ve Cr(VI) stresinin (100 µM) etkisi	81

Şekil 4.6 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda (a) GSH içeriği ve (b) GSH/GSSG oranı üzerine farklı sülfat konsantrasyonları (0, 1 ve 2 mM MgSO ₄) ve Cr(VI) stresinin (100 µM) etkisi	82
Şekil 4.7 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda (a) sistein ve (b) NPT içerikleri üzerine farklı sülfat konsantrasyonları (0, 1 ve 2 mM MgSO ₄) ve Cr(VI) stresinin (100 µM) etkisi	83
Şekil 4.8 Farklı sülfat konsantrasyonları ve Cr(VI) stresine maruz bırakılan kanola çeşitlerinde RT-Q-PCR ile belirlenmiş (a) <i>BnMP1</i> geninin transkript birikimleri ve (b) bu örneklere ait standart eğri.....	84
Şekil 4.9 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda <i>BnMP1</i> mRNA'sının ifade seviyesi üzerine farklı sülfat konsantrasyonları (0, 1 ve 2 mM MgSO ₄) ve Cr(VI) stresinin (100 µM) etkisi	85
Şekil 4.10 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda Cr(VI) stresi ve farklı sülfat uygulamalarında farklı şekilde ifade olan 65 proteinin 2-D elektroforetik jellerdeki gösterimi	86
Şekil 4.11 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda Cr(VI) stresi ve farklı sülfat uygulamalarında tanımlanmış proteinlerin fonksiyonlarına göre sınıflandırılması	95

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Metallerin fitoremediasyonunda kullanılan bazı bitki türleri	9
Çizelge 2.2 Metal stresine cevap olarak proteomik analizlerle tanımlanmış proteinler ve fonksiyonları.....	39
Çizelge 3.1 Farklı nominal Cr konsantrasyonlarına sahip besin çözeltilerinin ölçülen Cr konsantrasyonları ve nominal konsantrasyonların geri kazanım oranları ...	55
Çizelge 3.2 <i>BnMP1</i> ve <i>BnActin</i> genleri için tasarlanmış primer çiftleri	64
Çizelge 3.3 Gümüş boyama yöntemi.....	67
Çizelge 3.4 Protein tanımlamada seçilen tarama parametreleri	69
Çizelge 4.1 Cr(VI) stresine maruz kalan kanola çeşitlerinde kuru ağırlık (KA), tolerans indeksi (Tİ), Cr birikimi (Cr), malondialdehit (MDA), klorofil (Klo), protein olmayan tiyol (NPT), süperoksit dismutaz (SOD), guaiakol peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT) verilerinin varyans analizinden elde edilen ortalama kareler	70
Çizelge 4.2 Kanola çeşitlerinin kuru ağırlık, tolerans indeksi ve Cr birikimi üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının etkisi	71
Çizelge 4.3 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda malondialdehit (MDA), klorofil ve protein olmayan tiyol (NPT) içerikleri üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının etkisi	72
Çizelge 4.4 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda SOD, POD ve CAT aktivitesi üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının etkisi	73
Çizelge 4.5 Cr-toleranslı ve Cr-hassas kanola çeşitlerinin toprak üstü organlarının taze ve kuru ağırlıkları ve Cr birikimi üzerine farklı sülfat konsantrasyonları ve Cr(VI) stresinin etkisi	75

Çizelge 4.6 Cr(VI) stresi ve farklı sülfat konsantrasyonlarına maruz bırakılan kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ile tanımlanan 46 protein 87

Çizelge 4.7 MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ve MASCOT veri tabanı taraması ile tanımlanan proteinlerin hücresel lokalizasyonu ve fonksiyonları. 97

1. GİRİŞ

Ağır metaller madencilik, enerji ve yakıt üretimi, aşırı pestisit ve gübre kullanımı gibi endüstriyel aktiviteler sonucu önemli miktarlarda çevreye yayılmaktadır (Halim *et al.* 2003; Samarghandi *et al.* 2007). Topraktaki metal konsantrasyonu tipik olarak 1 ila 100.000 mg kg⁻¹ arasında değişmektedir. Ağır metallerin yüksek seviyeleri toprak kalitesinin bozulmasına, ürün verim ve kalitesinde azalmaya neden olmakta (Long *et al.* 2002) ve dolayısıyla insan ve diğer organizmalar için önemli tehlikelere yol açmaktadır (Blaylock and Huang 2000).

Krom (Cr), dünyada en fazla bulunan yedinci elementtir (Cervantes *et al.* 2001). Metal sanayi ve kimya endüstrisi gibi alanlarında yaygın kullanımından dolayı Cr'un farklı bileşikleri hızla çevreye yayılmaktadır. Krom bileşikleri deri işleme, paslanmaz çelik üretiminde, boya pigmenti ve kromik asit üretiminde büyük ölçüde kullanılmaktadır (Shanker *et al.* 2005). Kromun trivalent [kromik formu; Cr(III)] ve heksavalent [kromat formu; Cr(VI)] olarak adlandırılan çeşitli fitotoksik formları bulunur. Cr(VI), en toksik form olup; kromat (CrO₄⁻²) veya dikromat (Cr₂O₇⁻²) oksianyonları şeklinde genellikle oksijen ile ilişkili olarak oluşmaktadır. Oldukça toksik olan Cr membran zararlarına, organellerde yapısal değişimlere, metabolik aktivitede bozulmalara ve büyümede inhibisyona neden olmaktadır (Shanker *et al.* 2005).

Ağır metallerle kirlenmiş alanların iyileştirilmesinde (remediasyon) kullanılan geleneksel mühendislik yöntemleri pahalı olmaktadır (Salt *et al.* 1995; Glass 2000). Bu nedenle, mevcut remediasyon teknikleri yerine düşük maliyetli ve çevre dostu olan fitoremediasyon tekniği üzerinde yoğunlaşmıştır (Arshad *et al.* 2008; Shi *et al.* 2009). Toprak üstü organlarında topraktaki metal konsantrasyonundan 50 ila 500 kat daha fazla metal biriktirebilen bitkiler hiperakümülatör olarak adlandırılmaktadır (Clemens 2006). Yaklaşık 450 bitki türü (angiospermilerin sadece %0.2'si) hiperakümülatör olarak tanımlanmıştır (Baker and Brooks 1989; Ellis and Salt 2003; Reeves 2006; Milner and Kochian 2008). Bununla birlikte, birçok hiperakümülatör türün fitoremediasyon potansiyeli yavaş büyüme hızı, düşük biyokütle ve genellikle belirli bir habitatla sıkı bir

ilişki nedeniyle sınırlanmaktadır (Chaney *et al.* 2005). Bu sınırlamaların üstesinden gelebilmek için istenilen özelliklere sahip genetik olarak modifiye edilmiş bitki türlerinin geliştirilmesine gerek duyulmaktadır. Bu nedenle, hiperakümülatör bitkilerde ağır metal birikimi mekanizmasının fizyolojik ve moleküler düzenlenmesinin iyi şekilde anlaşılması gerekmektedir.

Ağır metal stresine cevap ile ilişkili fonksiyonel gen veya proteinlerin teşhisi ağır metal toleransının moleküler mekanizmalarının anlaşılmasında önemli bir basamaktır. Bu tarz bilgiler ağır metallerle kirlenmiş alanların fitoremediasyonu için toleranslı transgenik bitkilerin geliştirilmesini sağlayabilmektedir. Son zamanlarda, gen ifadesindeki ağır metal teşvikli değişimler, mikroçip analizleri ile mRNA seviyesinde araştırılmış ve bitkilerde ağır metal cevaplarının anlaşılması için değerli bilgiler sağlamıştır (Chakrabarty *et al.* 2009; Yu *et al.* 2012a; Shen *et al.* 2013). Bununla birlikte, bitkilerde ağır metal stresine cevap olarak ifade olan proteinler ile ilgili birçok soru cevapsız kalmaktadır. Bu nedenle, bir hücre hattı, doku veya organda ifade olan proteinlerin kapsamlı ve nicel analizi olan proteomik, biyolojik sistemler ile ilgili genomik ve transkriptomik yaklaşımlardan sağlanamayacak önemli bilgiler vermektedir. Çünkü transkriptlerin aksine proteinler bitkilerdeki stres cevaplarını direkt olarak yansıtmaktadır. Bununla birlikte, mRNA'ların ifade seviyeleri ve ilgili proteinler arasında zayıf korelasyon bulunması transkripsiyonel analizlerde bazı sınırlamalara neden olmaktadır (Rose *et al.* 2004; Bogaert-Triboulot *et al.* 2007). mRNA ve protein seviyeleri arasında korelasyon belirlenmiş olmasına karşın (Joosen *et al.* 2007; Li *et al.* 2007), protein ifadesi sadece transkripsiyonel seviyede değil, aynı zamanda translasyonel ve post-translasyonel seviyelerde de düzenlenmektedir. Sonuç olarak, bitki proteomundaki değişimlerin araştırılması oldukça önemlidir.

Proteomik yaklaşım, farklı proteomların karşılaştırılması temeline dayanmaktadır. Ağır metaller gibi abiyotik stres çalışmalarında, kontrol ve uygulama grubu bitki dokularından izole edilen proteomlar karşılaştırılmaktadır (Kosová *et al.* 2011). İki-yönlü (2-D) elektroforez ile birlikte kütle spektrometrisi proteomik çalışmaların

gerçekleştirilmesinde en fazla kullanılan etkili bir yoldur ve biyolojik fonksiyona sahip karmaşık protein ağlarının çalışmasına olanak sağlamaktadır. Son yıllarda, bitki proteomu üzerine ağır metal stresinin etkilerini inceleyen çalışmalar artmıştır (Ahsan *et al.* 2010; Wang *et al.* 2011b; Sharmin *et al.* 2012). Yapılan bu proteomik analizler, ağır metal stresine cevap olarak bitki proteomunda meydana gelen değişimlerin anlaşılmasına katkıda bulunmuş olmasına rağmen, spesifik bir ağır metal için biyomarkörlerin teşhisini sağlayacak ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenle, ağır metallerin translokasyonu, transformasyonu, içsel alıkonulması ve hücre içerisinde bu metallerin detoksifikasyonunda muhtemel role sahip proteinlerin daha iyi tanımlanmasını sağlayacak proteomik üzerine yoğunlaşılması gerekmektedir (Ahsan *et al.* 2009).

Kükürt (S) bitki büyüme ve gelişimi için önemli bir besin elementidir ve biyotik ve abiyotik streslere karşı savunmada önemli bir rol oynamaktadır. Kükürt; sistein (Cys) ve metiyonin amino asitlerinin, kofaktörlerin, metal kümelerinin ve bitkileri çevresel streslerin etkilerinden koruyan glutatyon (GSH), fitoşelatinler (PC'ler), fitoaleksinler ve glukozinolatlar gibi primer ve sekonder metabolitlerin bileşenidir (Rausch and Wachter 2005). Ayrıca kükürt klorofil üretimi ve inorganik azotun proteinlere dönüşümü için gereklidir. Metabolik olarak kükürt metabolizması, bitkilerde ağır metal toleransı için gerekli moleküllerin sentez için temel bir yol oluşturmaktadır (Hardulak *et al.* 2011). Bitkilerde ağır metal stresinin sülfat alınımında (Nocito *et al.* 2006; Sun *et al.* 2007b; Schiavon *et al.* 2007, 2008; Shahbaz *et al.* 2010) ve kükürt özümlemesinde fonksiyon gören enzimlerin ifadesinde değişimlere neden olduğu bildirilmiştir (Herbettea *et al.* 2006; Weber *et al.* 2006; Schiavon *et al.* 2007, 2008; van de Mortel *et al.* 2008). Bu nedenle, bitkilerde ağır metal toleransı ve kükürt metabolizmasının birbirleri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Na and Salt 2011).

Kanola (*Brassica napus* L.) parlak sarı çiçekleriyle *Brassicaceae* familyasının bir üyesidir. Kanola hızlı büyüme oranı, yüksek biyokütle üretimi ve birçok ağır metale karşı belirgin toleransından dolayı fitoremediasyon prosesinde potansiyel kullanımı için çalışılmıştır

(Hernández-Allica *et al.* 2008). Bununla birlikte, kanola bitkilerinde Cr(VI) toleransı ve Cr birikimini değerlendiren az sayıda çalışma mevcuttur (Shams *et al.* 2010; Yu *et al.* 2012b). Bu araştırmada, Cr(VI) toksisitesine toleranslı ve toprak üstü dokularında yüksek seviyede Cr biriktirebilen ve dolayısıyla Cr ile kirlenmiş alanların fitoremediasyonunda kullanılabilecek kanola (*Brassica napus* L.) çeşitlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, hidroponik kùltür ortamında farklı Cr(VI) konsantrasyonlarına (0, 10, 50 ve 100 µM) maruz bırakılmış 8 kanola çeşidinde (Champlain, Dante, Heros, Nelson, NK Petrol, Sary, Süzer ve Vactra) fide büyümesi, toprak üstü dokularda Cr birikimi ve yaprak dokularında klorofil içeriği, lipid peroksidasyonu, tiyol içeriği ve süperoksit dismutaz (SOD), guaiakol peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT) gibi bazı antioksidan enzimlerin aktivitesindeki değişimler değerlendirilmiştir. Bu tez çalışmasının ikinci aşamasında ise Cr(VI) toleransı ve Cr(VI) teşvikli proteom değerişimleri üzerine sülfatın rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, nispeten Cr-toleranslı NK Petrol ve Cr-hassas Sary çeşitlerinde farklı sülfat konsantrasyonlarının [noksan (0 mM), normal (1 mM) ve aşırı (2 mM)] ve Cr(VI) stresinin (100 µM) fide büyümesi, Cr birikimi, lipid peroksidasyonu, klorofil, tiyol, sistein, askorbat ve glutatyon içerikleri, SOD, POD, CAT, askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redùktaz (GR) ve glutatyon S-transferaz (GST) gibi enzimlerin aktivitesi ve metallothionein proteinini kodlayan *BnMP1* geninin (*Brassica napus* metallothionein protein 1) ifadesindeki değerişimler üzerine etkileri belirlenmiştir. Bununla birlikte, proteomik yaklaşım kullanılarak sülfat metabolizması ve Cr(VI) stresi ile ilişkili proteinlerin belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1. Kanola (*Brassica napus* L.) Bitkisi

Kanola (*Brassica napus* L.), kültürü yapılan altı *Brassica* türünden biridir. *B. napus*'un muhtemelen yem şalgamı (*Brassica rapa*; AA, 2n = 20) ve lahanası (*Brassica oleracea*; CC, 2n=18) genotipleri arasındaki bağımsız ve kendiliğinden oluşan türler arası hibridizasyonla ortaya çıktığı düşünülmektedir (Prakash and Hinata 1980, Kimber and McGregor 1995, Gupta and Pratap 2007). 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. Kanola hızlı büyüme oranı, yüksek biyokütle üretimi ve birçok ağır metale karşı belirgin toleransından dolayı fitoremediasyon prosesinde potansiyel kullanımı için çalışılmıştır (Hernández-Allica *et al.* 2008). Bununla birlikte, kanola bitkilerinde Cr(VI) toleransı ve Cr birikimini değerlendiren az sayıda çalışma mevcuttur (Shams *et al.* 2010; Yu *et al.* 2012b).

2.2. Ağır Metallerin Çevreden Uzaklaştırılması: Fitoremediasyon

Fitoremediasyon tekniğinde çevresel kirleticileri absorbe eden, dokularında yüksek seviyelerde biriktiren (hiperakümülatör) ve fiziksel, kimyasal ve biyolojik süreçler aracılığıyla detoksifiye eden bitkilerin kullanımı tercih edilmektedir. Fitoremediasyon teknolojisi temel süreç ve uygulanabilirliği temelinde farklı gruplara ayrılabilir.

2.2.1. Fitoekstraksiyon

Bitki kökleri tarafından kirleticilerin alınımı ve sonrasında toprak üstü organlarda biriktirilmesini takiben bitkilerin hasat edilerek yok edilmesini içermektedir. Bu teknik

Cu ve Zn gibi aktif olarak alınan mikrobesein elementleri ve Cd, Cr ve Pb gibi besin elementi olmayan ağır metallerin uzaklaştırılmasında kullanılabilir. Fitoekstraksiyon teknolojisi sadece metal kirliliğinin düşük veya orta seviyede olduğu alanlar için uygulanabilir. Çünkü çok fazla kirlenmiş alanlarda bitki büyümesi sürdürülemezdir (Padmavathiamma and Loretta 2007). Bu teknolojiye doğal hiperakümülatör bitki türleri kullanılmaktadır (Baker *et al.* 1994). Bununla birlikte, toprak çözeltisinde düşük çözünürlüğe sahip metallerin çözünürlüğünü arttırmak için şelatlayıcı ajanlar eklenebilir (Evangelou *et al.* 2007). Bir şelatlayıcı ajan olan EDDS (etilen diamin disüksinik asit)'nin *Helianthus annuus* bitkilerinde Cu birikimini arttırdığı bildirilmiştir (Meers *et al.* 2005). Bununla birlikte, EDTA (etilen diamin tetraasetik asit) uygulamasının *Brassica napus* bitkilerinde Zn, Mn ve Pb alınımı ve translokasyonunu arttırdığı belirtilmiştir (Zaier *et al.* 2010). Başarılı bir fitoekstraksiyon, bitkilerin hızlı bir şekilde biyokütle üretmesine ve alınan metalleri gövde dokularında yüksek miktarlarda biriktirme yeteneğine bağlıdır (Blaylock and Huang 2000). Hiperakümülatör aday bitkilerin taranması, bitki ıslahı ve genetik yöntemler kullanılarak hiperakümülatör bitkilerin geliştirilmesi fitoremediasyon teknolojilerinin geliştirilmesinde kullanılan önemli stratejilerdir.

2.2.2. Rizofiltrasyon

Bitki kökleri tarafından sıvı büyüme ortamlarından fazla miktardaki besin elementlerinin veya metal kirleticilerin alınımı ve alıkonmasını kapsamaktadır. *Brassica juncea*, *Phaseolus vulgaris* ve *Helianthus annuus* gibi hidroponik ortamda büyütülen birçok bitki türünün kökleri Cu, Cd, Cr, Ni, Pb, Zn ve U gibi toksik metallerin sıvı çözeltilerinden uzaklaştırılmasında kullanılabilir (Dushenkov *et al.* 1995; Raskin and Ensley 2000; Lee and Yang 2010). Rizofiltrasyon için ideal bitki önemli miktarda kök biyokütlesi veya yüzey alanı üretmeli, yüksek miktarda hedef metali biriktirebilmeli ve tolere edebilmeli, düşük maliyetli olmalı ve minimum düzeyde sekonder atık üretmelidir (Dushenkov and Kapulnik 2000).

2.2.3. Fitostabilizasyon

Bu teknikte, erozyonun önlenmesi, yeraltı sularına kirleticilerin sızmasının azaltılması ve toprakla doğrudan temasın önlenmesi için toprak yüzeyi bitkiler ile örtülmektedir (Bert *et al.* 2005). Bu teknikte bitki kökleri fiziksel ve kimyasal olarak kirleticileri immobilize etmektedir (Berti and Cunningham 2000). Bu teknik, kirlenmiş topraklarda büyüeyebilen ve toksik metalleri daha az toksik formlara dönüştürmek için toprağın fizyolojik, kimyasal ve biyolojik özelliklerini değiştirebilen bitkilere gereksinim duymaktadır. Fitostabilizasyon için kullanılacak bitkiler geniş bir kök sistemine sahip olmalı, yüksek konsantrasyonlardaki ağır metallerin varlığında yüksek oranda biyokütle üretebilmeli ve ağır metalleri gövdeye en az seviyede transloke etmelidir (Rizzi *et al.* 2004).

2.2.4. Fitovolatilizasyon

Bu teknolojide, bitkiler tarafından absorbe edilen ağır metaller daha az toksik uçucu formlara dönüştürülerek transpirasyon ile atmosfere verilmektedir. As, Hg ve Se gibi metaller doğada gaz formunda bulunabilmektedir. Doğal olarak oluşan veya genetiği değiştirilmiş *Brassica juncea* ve *Arabidopsis thaliana* gibi bazı bitkilerin ağır metalleri absorbe ettikleri ve gaz formuna dönüştürerek atmosfere verebildikleri bildirilmiştir (Ghosh and Singh 2005). Bununla birlikte, *Populus* ve *Salix* gibi ağaç türleri etkin fitoremediasyon özelliklerinden dolayı sıklıkla bu teknikte kullanılmaktadır (Pulford ve Watson 2003). Selenyum içeren besi ortamında büyüyen *Arabidopsis thaliana* ve *Brassica juncea* bitkilerinin dimetilselenit ve dimetildiselenit formunda uçucu Se üretebildikleri gösterilmiştir (Banuelos 2000). Fitovolatilizasyon hidrojenin radyoaktif bir izotopu olan ve helyuma dönüştürülen trityumun (^3H) uzaklaştırılmasında da kullanılmaktadır (Dushenkov 2003). İyonik formdaki cıvayı (Hg^{+2}) daha az toksik olan forma (Hg^0) dönüştüren cıva redüktaz genini içeren *Nicotiana tabacum* ve *Arabidopsis thaliana* bitkileri genetik olarak modifiye edilmiştir (Meagher *et al.* 2000).

2.2.5. Fitodegradasyon (Fitotransformasyon)

Bu metotta, bitkilerdeki metabolik işlevler ve toprak mikroorganizmaları arasındaki rizosferik birliktelikle organik kirleticiler parçalanmaktadır. Organik kirleticilerin fitodegradasyonu bitki içerisinde veya rizosferde gerçekleşebilmektedir. Yeraltı sularındaki çözücüler, topraktaki petrol ve aromatik bileşikler ve havadaki uçucu bileşikler gibi birçok farklı kirletici bu metot ile uzaklaştırılabilmektedir (Newman and Reynolds 2004). Kirleticileri metabolize eden dehalojenaz, nitroredüktaz, peroksidaz, lakkaz ve nitrilaz gibi bitki enzimleri, kirleticilerin transformasyonunda aktif rol oynadıkları rizosfere salınmaktadır. Trinitrotolueni (TNT) daha az zararlı bileşiklere indirgeyen iki bakteriyel enzim (PETN redüktaz ve nitroredüktaz) tütün bitkilerinde TNT toleransının artırılması için kullanılmıştır. *Onr* ve *nfs* genlerinin, yabancı tip bitkilerin gelişimini ciddi şekilde etkileyen TNT konsantrasyonuna karşı transjenik bitkilerin tolerans göstermesini sağladığı bildirilmiştir (Hannink *et al.* 2001). Bununla birlikte, Banks vd. (2003), polisiklik aromatik hidrokarbonlarla (PAH) kirlenmiş alanların remediasyonunda *Sorghum bicolor* bitkilerinin oldukça etkin olduğunu bildirmişlerdir. Toprak ya da su ortamında bulunan metal kirleticilerin fitoremediasyonunda kullanılan teknolojiler ve bitkiler Çizelge 2.1’de listelenmiştir.

2.3. Ağır Metal Alınımı ve Taşınımı

Bitkiler tarafından metal iyonlarının alınımı; metal iyonlarının kök yüzeyine tutunması, kök içine alınımı ve kütle akışı ve difüzyon aracılığıyla gövdeye translokasyonunu kapsamaktadır. Toprak partiküllerine bağlı halde bulunan metallerin alınımı köklerden rizosfere salgılanan metal şelatlayıcı moleküller, plazma membranına bağlı metal redüktaz ve proton salınımıyla sağlanmaktadır (Salt *et al.* 1995). Bitki türüne ve metal tipine bağlı olarak, metal iyonları kökler tarafından ya simplast (interselüler) ya da apoplast (ekstraselüler) yolla alınmaktadır. Apoplastik taşınım hücre çeperinin katyon değişim kapasitesi ile sınırlandırılmaktadır (Raskin *et al.* 1997). Simplastik taşınım, metal iyonları yaklaşık 170 mV’luk negatif potansiyele sahip plazma membranından geçmektedir. Bu membran potansiyeli, metal iyonlarının hücre içine hareketi için

kuvvetli bir elektrokimyasal gradiyent sağlamaktadır (Ghosh and Singh 2005). Metal iyonlarının çoğu enerji gerektiren bir işlemle spesifik veya genel iyon taşıyıcıları veya kanalları aracılığıyla bitki hücrelerine girmektedir (Bubb and Lester 1991).

Çizelge 2.1 Metallerin fitoremediasyonunda kullanılan bazı bitki türleri (Jabeen *et al.* 2009'dan değiştirilerek).

Metal	Ortam	Metot	Bitki
As	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Pteris vittata</i>
		Fitostabilizasyon	<i>Piricum sativum</i>
B	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Gypophila sphaerocephala</i>
Cd	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Oryza sativa</i>
		Fitostabilizasyon	<i>Vetiveria zizanioides</i>
	Su	Rizofiltrasyon	<i>Lemna minor</i>
Co	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Berkheya coddii</i>
Cr	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Brassica juncea</i>
	Su	Rizofiltrasyon	<i>Brassica juncea</i>
Cu	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Elsholtzia splendens</i>
		Fitostabilizasyon	<i>Festuca rubra</i>
	Su	Rizofiltrasyon	<i>Lemna minor</i>
Hg	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Marrubium vulgare</i>
	Su	Rizofiltrasyon	<i>Pistia stratiotes</i>
Mn	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Phytolacca americana</i>
Ni	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Alyssum lesbiacum</i>
		Fitostabilizasyon	<i>Agropyron elongatum</i>
	Su	Rizofiltrasyon	<i>Lemna minor</i>
Pb	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Chenopodium album</i>
		Fitostabilizasyon	<i>Vetiveria zizanioides</i>
	Su	Rizofiltrasyon	<i>Hemidesmus indicus</i>
Se	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Brassica rapa</i>
		Fitovolatilizasyon	<i>Brassica spp.</i>
Zn	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Cynodon dactylon</i>
	Su	Rizofiltrasyon	<i>Brassica juncea</i>

Bitkilerde birkaç protein sınıfı ağır metal taşınımında fonksiyon görmektedir. Bitkilerde ağır metal toleransı ile ilişkili olarak metal iyonu homeostazisi ve toleransında fonksiyon gören ağır metal (veya CPx-tip) ATPaz'ları (Williams *et al.* 2000), doğal dirençle ilişkili makrofaj protein (Nramp) ailesi, katyon-difüzyon hızlandırıcı (CDF) protein ailesi ve çinko-demir permeaz (ZIP) ailesi (Guerinot 2000) gibi metal taşıyıcıların birkaç sınıfı belirlenmiştir.

CPx-tip ağır metal ATPaz'ların Cu, Zn, Cd ve Pb gibi toksik metallerin hücre membranlarından geçişinde rol aldığı bildirilmiştir (Williams *et al.* 2000). Korunmuş bir membran içi sistein-prolin-sistein, sistein-prolin-histidin veya sistein-prolin-serin (CPx) motifine sahip oldukları için tip IB olarak sınıflandırılan ağır metal taşıyıcıları CPx-ATPaz'lar olarak adlandırılmaktadır. *Arabidopsis* P-tip ATPaz (PAA1) yüksek bitkilerde teşhis edilen ilk CPx-ATPaz'dır (Belouchi *et al.* 1997). Bu proteinlerin plazma membranında bulunduğu ve sitoplazmadan toksik metallerin uzaklaştırılmasında pompalar olarak fonksiyon gördüğü veya çeşitli hücre içi membranlarda bulunabildiği ve ağır metallerin kompartımanlaşmasından sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür (Yang *et al.* 2005).

Nramp gen ailesi, demir taşınımına aracılık eden integral zar proteinini kodlamaktadır (Belouchi *et al.* 1997). Bununla birlikte, bitkilerde toksik metal iyonlarının taşınımında Nramp proteininin fonksiyonu tam olarak açıklanmamıştır. Divalent metal iyonlarının taşınımı ile ilişkili Nramp proteinini kodlayan genlerin homologları pirinç bitkilerinde teşhis edilmiştir (Belouchi *et al.* 1997). *Nramp* genine homoloji gösteren iki *Arabidopsis* geni teşhis edilmiştir (Alonso *et al.* 1999). Tütün bitkilerinde *Thlaspi caerulescens* *Nramp3* (*TcNramp3*) geninin aşırı ifadesinin Cd hassasiyetine neden olduğu ve *TcNramp3* taşıyıcısının bitkilerde katyon homeostazisinde rol oynadığı ileri sürülmüştür (Wei *et al.* 2009). Benzer olarak, *AtNramp1*, *AtNramp3*, *AtNramp4* ve *AtNramp6* taşıyıcılarını ifade eden mayada ve *AtNramp3*, *AtNramp4* ve *AtNramp6* genlerini aşırı ifade eden *Arabidopsis* bitkilerinde aşırı Cd hassasiyetinin görüldüğü belirtilmiştir (Thomine *et al.* 2000; Lanquar *et al.* 2004; Cailliatte *et al.* 2009). Bununla birlikte, A.

thaliana bitkilerinde *AtNramp3* ve *AtNramp4* genlerinin inaktivasyonunun aşırı Cd ve Zn hassasiyetine neden olduğu bildirilmiştir (Oomen *et al.* 2008).

Elektrokimyasal gradiente karşı metal iyonlarının ATP hidrolizi ile taşınması önemlidir. *Arabidopsis* ve *Oryza sativa* bitkileri sekiz HMA (ağır metal ATPaz) genine sahip olup (Baxter *et al.* 2003); ağır metal taşıyıcı ATPaz4 (HMA4) olarak da adlandırılan P_{1B}-tip ATPaz'lar metal transportunda önemli bir rol oynamaktadır. *Arabidopsis* bitkilerinde yapılan genom analizleri, HMA'ların bir grubu olan HMA1-4'ün Zn, Co, Cd ve Pb taşınımı ve diğer grubu olan HMA5-8'in ise Cu ve Ag taşınımından sorumlu olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, *Arabidopsis* bitkilerinde HMA4 taşıyıcılarının Zn homeostazisi ve Cd detoksifikasyonu ile bu metallerin kökten gövdeye translokasyonunda rol aldığı bildirilmiştir (Mills *et al.* 2005; Hussain *et al.* 2004; Verret *et al.* 2005; Courbot *et al.* 2007).

Bitkilerde ABC taşıyıcıları arasında sadece AtMRP3 (Bovet *et al.* 2003) ve AtATM3 (Kim *et al.* 2006) taşıyıcılarının Cd transportunda fonksiyon gördüğü ileri sürülmüştür. Mitokondriyal ABC taşıyıcı AtATM3'ün *Arabidopsis* bitkilerinde Cd ve Pb toleransında artışa neden olduğu bildirilmiştir (Kim *et al.* 2006). Demir, Zn, Mn ve Cd iyonlarının taşınımında rol oynayan ZIP gen ailesine ait birçok gen ve ZIP gen homologu olan ZNT1 hiperakümülatör *Thlaspi caerulescens* bitkilerinde teşhis edilmiştir (Pence *et al.* 2000). Yang vd. (2005), *Thlaspi caerulescens* bitkilerinde metal birikim kapasitesi ve ZIP protein ailesine ait proteinlerin aşırı birikimi arasında bir korelasyonun olduğunu bildirmişlerdir. Zn stresi koşulları altında, hiperakümülatör olmayan *T. arvense* aksesyonlarına göre *T. caerulescens* aksesyonlarının köklerinde iki ZIP cDNA'sının (ZNT1 ve ZNT2) önemli düzeyde daha yüksek seviyede ifade olduğu bildirilmiştir (Pence *et al.* 2000, Assunção *et al.* 2001). Ayrıca *ZNT1*, *ZNT5* ve *MTP1* genlerinin hücresel ifadelerindeki Cd-teşvikli değişimlerin Cd toksisitesine *T. caerulescens* bitkilerinin uyumu ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Küpper and Kochian 2010).

Hiperakümülatör bitkilerin köklerinde metal bağlayıcı ligandlar olarak fonksiyon görebilen birçok küçük organik molekül bulunmaktadır (Rascio and Navari-Izzo 2011). Ağır metal hiperakümülyasyonunda histidin ve nikotinamin gibi bivalent katyonlarla kararlı kompleksler oluşturan amino asitler fonksiyon görmektedir. Serbest histidinin (His) Ni hiperakümülyasyonunda fonksiyon gören önemli bir ligand olduğu bildirilmiştir (Callahan *et al.* 2006). Nikel hiperakümülatörü *Alyssum lesbiacum* köklerinde *TP-PRT1* geninin (histidin biyosentez yolunun ilk basamağında fonksiyon gören ATP-fosforibozil transferaz enzimini kodlayan gen) aşırı ifadesinin His konsantrasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Kerkeb and Krämer 2003; Ingle *et al.* 2005a). Farklı Ni hiperakümülatörü *Thlaspi* türlerinin köklerinde histidinin yüksek seviyelerde bulunması, bu amino asidin diğer hiperakümülatör bitkilerde de aynı fizyolojik yolda fonksiyon görebileceğini göstermektedir (Assunção *et al.* 2003).

MATE (Multidrug And Toxin Efflux) protein ailesi, hiperakümülatör bitkilerde ağır metallerin translokasyonunda aktif olarak fonksiyon gören diğer bir membran proteindir. Bu protein ailesinin bazı üyeleri, toksik bileşikler veya sekonder metabolitlerin sitosolden hücre dışına çıkartılması veya vakuollerde alıkonulmasında rol alan katyon antiportörleri olarak fonksiyon gördükleri bildirilmiştir (Delhaize *et al.* 2007). MATE protein ailesinin bir üyesi olan FDR3 kök dokularında sitratın vaskular dokulara salınmasında fonksiyon görmektedir. *FDR3* geninin *Thlaspi caerulescens* ve *Arabidopsis halleri* köklerinde yapısal olarak aşırı ifade edildiği bildirilmiştir (Talke *et al.* 2006; van de Mortel *et al.* 2006). Perisikl plazma membranında lokalize olmuş FDR3 proteinin Fe taşınımı için gerekli bir ligand olan sitratın ksileme salgılanmasında fonksiyon gördüğü bildirilmiştir (Durreet *et al.* 2007). Bununla birlikte, hiperakümülatör bitkilerde bu genin aşırı ifade olması FDR3 proteininin Zn gibi diğer metallerin de translokasyonunda bir rol oynayabileceğini ileri sürmektedir (Krämer *et al.* 2007).

2.4. Metal Toleransı Mekanizması

Bir bitkinin herhangi bir ağır metale olan tolerans mekanizmasının anlaşılması, kirlenmiş alanların fitoremediasyonu için uygun bitkilerin geliştirilmesi için oldukça

önemlidir. Bitkilerde ağır metal toleransı birbiriyle ilişkili fizyolojik ve moleküler mekanizmalar tarafından belirlenmektedir. Toksik metallerin artan seviyelerine tolerans, toksik elementlerin bitki dışında tutulması (exclusion) veya metabolik toleranstan kaynaklanmaktadır (Singh *et al.* 2003).

Detoksifikasyon ve içsel alıkoyma, toprak üstü organlarında herhangi bir fitotoksik etki göstermeksizin yüksek miktarlarda ağır metalleri biriktirebilen hiperakümülatör bitkiler için önemli bir özelliktir. Hiperakümülatör bitkilerin toprak üstü organlarında detoksifikasyon ve alıkoyma mekanizmaları genel olarak ağır metallerin ligandlar ile kompleks oluşturulmasını veya ağır metallerin metabolik olarak aktif sitoplazmadan vakuol ve hücre duvarı gibi inaktif bölgelere taşınımını kapsamaktadır (Rascio and Navari-Izzo 2011). Hiperakümülatör ve hiperakümülatör olmayan bitkiler arasında yapılan karşılaştırmalı transkriptom analizleri içsel alıkoyma mekanizmasının, en azından tonoplast ve/veya plazma membranından ağır metallerin taşınımını sağlayan proteinleri kodlayan genlerin aşırı ifadesine bağlı olduğunu göstermiştir.

2.4.1. Ağır Metallerin Vakuolde Alıkonulması

Bitkilerde vakuol genellikle metal iyonları için ana depolama bölgesi olarak kabul edilmekte ve fitoşelatin (PC)-metal kompleksleri vakuollere pompalanmaktadır (Salt *et al.* 1995). Tütün mezofil protoplastları, Cd ile muamele edildiklerinde Cd ve PC'lerin büyük bir çoğunluğunun vakuolde biriktiği belirtilmiştir (Tong *et al.* 2004). Vakuolde metal iyonlarının kompartımanlaştırılması bazı hiperakümülatör bitkilerde tolerans mekanizmasının bir parçasını oluşturmaktadır (Tong *et al.* 2004). ABC-tip taşıyıcı protein ailesinin bir üyesi olan vakuolar membran proteinini (HMT1) kodlayan *hmt1* geni yüksek moleküler ağırlıklı PC-Cd komplekslerini oluşturamayan mutant *S. pombe*'den izole edilmiştir (Ortiz *et al.* 1992). Ortiz vd. (1995), HMT1 proteinin düşük moleküler ağırlıklı PC-Cd komplekslerinin ATP'ye bağımlı olarak sitosolden vakuollere taşınımına aracılık ettiğini bildirmişlerdir. PC-Cd kompleksinin taşınımı, vakuolar-ATPaz inhibitöleri tarafından engellenmediği için bu taşınımın pH gradiyentinden bağımsız olduğu belirtilmiştir. Benzer olarak, PC'ler ve PC-Cd komplekslerinin taşınımı için

HMT1'in ATP bağımlı ve proton gradiyentinden bağımsız aktivitesi yulaf köklerinde de belirlenmiştir (Salt and Rauser 1995). Diğer taraftan, *abcc1 abcc2* çift mutantına sahip *Arabidopsis* bitkilerinin As stresine aşırı hassas olduğu ve yabancı tip bitkilere göre PC-As komplekslerini daha az oranda vakuole aldığı bildirilmiştir (Song *et al.* 2010). İlginç olarak, ABCC1 ve ABCC2 taşıyıcıları glutatyon-konjugat komplekslerini vakuole taşıyan ABC taşıyıcıları olarak tanımlanmıştır (Liu *et al.* 2001; Rea 2007).

Kasyon difüzyon kolaylaştırıcı (CDF) protein ailesinin üyesi olan metal tolerans proteinleri (MTP'ler), Zn, Mn, Fe, Ni, Cd ve Co gibi metal iyonlarının sitoplazmadan hücre dışına veya vakuole taşınımında fonksiyon görmektedir (Montanini *et al.* 2007). Bitkilerde teşhis edilen ilk MTP geni *Arabidopsis thaliana* bitkilerinden izole edilen *AtMTP1* genidir (van der Zaal *et al.* 1999). *AtMTP1* geninin tüm organlarda teşhis edildiği, keza Zn uygulamasından etkilenmediği bildirilmiştir (van der Zaal *et al.* 1999; Kobae *et al.* 2004). Diğer taraftan, *AtMTP1* geni transfer edilmiş transjenik bitkilerin köklerinde Zn konsantrasyonunun ve toleransının arttığı ve bu gen susturulmuş bitkilerin aşırı Zn hassasiyeti gösterdiği bildirilmiştir (Desbrosses-Fonrouge *et al.* 2005). *AtMTP1* homologu olan *AhMTP1* geni, bir Zn hiperakümülatörü olan *Arabidopsis halleri* bitkisinde teşhis edilmiştir (Drager *et al.* 2004). Diğer bir MTP geni metal hiperakümülatörü *Thlaspi goesingense* bitkilerinden izole edilen *TgMTP1* genidir. *T. goesingense* bitkilerinde vakuolar metal-iyon taşıyıcısının (TgMTP1) yüksek seviyedeki ifadesinin gövde vakuollerinde Ni iyonlarının birikimini arttırdığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, *Thlaspi goesingense* membran MTP proteinini aşırı ifade eden mayada Cd, Co, Ni ve Zn iyonlarına toleransın arttığı bildirilmiştir (Persans *et al.* 2001).

Bitki hücrelerinde, glutatyon (GSH) ve PC'ler tarafından oluşturulan PC-metal kompleksleri tonoplastta bulunan bir ABC-tip taşıyıcı protein tarafından vakuole alınmaktadır (Lu *et al.* 1997). Cd-fitoşelatin kompleksleri konsantrasyon gradiyentine zıt yönde spesifik taşıyıcılar ile tonoplasttan taşınmakta ve tonoplast vezikülleri içinde birilmektedir (Salt and Rauser 1995). Ayrıca, multidrug direnç proteinleri (MRP), PC-Cd veya GSH-Cd komplekslerinin tonoplasttan geçişinde fonksiyon görmektedir (Rea *et al.*

1998). Antosiyaninler de ağır metallere bağlanabilmekte (Pilon-Smits and Pilon 2002) ve ağır metallerin alıkonulmasında rol oynayabilmektedirler. Bugüne kadar, metal toleransı ile ilişkili vakuolar taşıyıcı ve kanalların en iyi karakterize edileni *Saccharomyces cerevisiae*'den izole edilen YCF1 (maya kadmiyum faktör 1)'dir. Transjenik *Brassica juncea* bitkilerinde YCF1 geninin aşırı ifadesinin Cd ve Pb birikimi ve toleransında artışa neden olduğu bildirilmiştir (Bhuiyan *et al.* 2011). Bu gibi vakuolar taşıyıcı proteinlerin aşırı ifadesi, güvenli hücresel bölgelerde ağır metalleri biriktirebilme yeteneği arttırılmış bitkilerin üretilmesinde kullanılabilir.

2.4.2. Ağır Metal Bağlayıcı Ligandlar

Ağır metaller hücre-içi olarak fitoşelatinler (PC'ler) veya metalotiyoneinler (MT'ler) gibi ligandlarla kompleksler oluşturabilmektedir.

2.4.2.1. Fitoşelatinler

Fitoşelatinler (PC'ler) genel yapısı $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ olan ve sisteince zengin küçük polipeptitlerdir (Cobbett 2000). Bu peptitler, birçok metali metal-tiyolat kompleksleri şeklinde alıkoyabilmekte ve ağır metal detoksifikasyonunda önemli rol oynamaktadır (Cobbett and Goldsbrough 2002; Clemens 2006). Gen ürünleri olan MT'lerin aksine PC'ler, PC sentaz enziminin fonksiyon gördüğü bir transpeptidasyon reaksiyonu ile glutatyondan (γ -glutamilsisteinilglisin, GSH) enzimatik olarak sentezlenmektedir (Pal and Rai 2010). Glu-Cys birimlerinin sayısına bağlı olarak PC'ler PC₂, PC₃, PC₄, PC₅ ve PC₆ olarak sınıflandırılmaktadır (Rauser 1995). Bitkilerde ağır metal birikimi PC'lerin üretimini teşvik etmektedir (Ramos *et al.* 2007; Mendoza-Cozatl *et al.* 2008). Bitki dokularında PC üretiminin ağır metal birikimi ile pozitif korelasyon göstermesi PC'lerin ağır metal stresi tarafından teşvik edildiğini göstermektedir. Iglesia-Turino vd. (2006), Hg stresine maruz bırakılan *Brassica napus* bitkilerinde Hg birikiminin PC₂ konsantrasyonu ile kuvvetli bir şekilde ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Fitoşelatin sentezi metal türüne bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Vestergaard vd. (2008), Mg⁺², Mn⁺², Ca⁺² ve Na⁺² uygulamalarının PC sentezini etkilemediğini, buna karşın Cd⁺²

ve Zn⁺² uygulamalarının PC üretimine neden olduğunu bildirmişlerdir. Benzer olarak, Zhang vd. (2008), *Sedum alfredii* bitkilerinde Cd ve Pb stresinin PC üretimini arttırdığını, buna karşın Zn stresinin etki göstermediğini belirtmişlerdir.

Bitkilerde glutatyon (GSH) γ -glutamil-cis sentaz (γ -ECS) ve glutatyon sentetaz (GS) tarafından kataliz edilen iki basamaklı bir reaksiyonla sisteinden sentezlenmektedir. γ -glutamil-cis sentaz aktivitesi sisteinin kullanılabilirliğine bağlıdır ve glutatyon tarafından geri-bildirim regülasyonu ile kontrol edilmektedir (Mejare and Bullock 2001). Bu enzimi kodlayan gen *Arabidopsis thaliana* ve *Triticum aestivum* gibi bitkilerde teşhis edilmiştir (Clemens *et al.* 1999). Bakteriyel γ -ECS ve GS genlerini aşırı ifade eden *Brassica juncea* bitkilerinde yüksek oranda GSH ve PC'lerin biriktiği ve Cd toleransı ve birikiminde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Reisinger *et al.* 2008). Benzer olarak, *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde γ -ECS veya GS genlerinin aşırı ifadesinin yabancı tip bitkilere göre daha yüksek seviyede GSH, PC₂, PC₃ ve PC₄ birikimine ve Hg ve As toleransında artışa neden olduğu bildirilmiştir (Li *et al.* 2006a). Diğer taraftan, *Brassica juncea* bitkilerinde PC sentazın aşırı ifadesinin yüksek oranda GSH ve PC birikimine neden olarak As, Cd ve Zn toleransının artmasına neden olduğu bildirilmiştir (Gasic and Korban 2007). Clemens vd. (1999), yabancı tip mayalarda Cd toleransında artışa neden olan bir buğday cDNA'sı (TaPCS1) teşhis etmişlerdir. Vakuol eksik mutantlarda AtPCS1 ve TaPCS1 proteinlerinin toleransa neden olması, PC'lerin sitosolde lokalize olduğunu ve tolerans mekanizmasında önemli rol oynadığını göstermektedir. Gisbert vd. (2003), tütün bitkilerde buğday *TaPCS1* geninin aşırı ifadesinin Pb ve Cd stresine toleransı büyük ölçüde arttırdığını ve yabancı tip bitkilere göre kök büyümesinde %160 artışa neden olduğunu bildirmiştir. Kurşun içeren toprakta (1.572 mg/kg) büyütülen transjenik fidelerin yabancı tip fidelere göre iki kat daha fazla Pb ve Cd biriktirdiği belirtilmiştir. Ağır metal detoksifikasyonunda yüksek PC seviyelerinin pozitif bir rolünün olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, *A. thaliana* bitkilerinde aşırı PC sentazı kodlayan *AtPCS1* geninin ifadesinin Cd hassasiyetine neden olduğu bildirilmiştir (Lee *et al.* 2003). Benzer olarak, tütün bitkilerinde *AtPCS1* geninin aşırı ifadesinin Cd hassasiyetine neden olduğu belirtilmiştir (Wojas *et al.* 2008). Lee vd. (2003), Cd hassasiyetinin supraoptimal

seviyelerdeki fitoşelatinlerin ve glutasyon tüketiminin neden olduğu toksisiteden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

2.4.2.2. Metallotiyoneinler

Metallotiyoneinler (MT'ler) düşük moleküler ağırlıklı, sisteince zengin ve metal şelasyonu için tiyol gruplarına sahip bir grup metal bağlayıcı proteindir. Sistein kalıntılarının sayısı ve düzenlenişine bağlı olarak tüm bitki MT'leri sınıf II'ye aittir ve amino asit sekanslarına göre dört farklı tipe ayrılmaktadır (Cobbett and Goldsbrough 2002). İfade analizleri tip 1 MT'lerin genel olarak köklerde (Hudspeth *et al.* 1996), tip 2 MT'lerin çoğunlukla yapraklarda (Zhou and Goldsbrough 1995; Hsieh *et al.* 1995), tip 3 MT'lerin olgunlaşmış meyveler ve *Arabidopsis* yapraklarında (Guo *et al.* 2003) ve tip 4 MT'lerin ise sadece gelişmekte olan tohumlarda ifade olduğunu göstermiştir (Chyan *et al.* 2005). MT'lerin metal bağlayıcı özellikleri onların metal homeostazisi ve detoksifikasyonunda rol oynayabileceğini göstermektedir. Bitkilerde MT'ler sadece Cu ve Zn gibi mikro besin elementlerinin homeostazisinin sürdürülmesinde değil, aynı zamanda Cd ve As gibi toksik metallerin detoksifikasyonunda da fonksiyon görebilmektedir (Lee *et al.* 2004; Merrifield *et al.* 2004; Zimeri *et al.* 2005). Sucul *Azolla filiculoides* bitkilerinde tip 2 MT gen (*AzMT2*) ifade seviyesinin Cd, Cu, Zn ve Ni uygulamalarına cevap olarak arttığı bildirilmiştir (Schor-Fumbarov *et al.* 2005). Wang vd. (2011a), *Medicago sativa* bitkilerinde *MsMT2a* geninin kontrol ve Cd uygulamalarında, *MsMT2b* geninin ise sadece Cd uygulamalarında ifade olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, MT'lerinin oksidatif stresten bitkileri koruyucu özelliklere de sahip olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (Akashi *et al.* 2004; Brkljacic *et al.* 2004; Wong *et al.* 2004). Pamuk *GhMT3a* genini aşırı ifade eden transjenik tütün bitkilerinde abiyotik stres koşullarına karşı toleransın arttığı ve GhMT3a proteininin reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde fonksiyon görebildiği bildirilmiştir (Xue *et al.* 2009).

Metal şelatörlerinin sentezi ile ilişkili genlerin aşırı ifadesi metal alınımının artmasına veya azalmasına, metallerin translokasyonuna ve/veya alikonulmasına neden olabilmektedir (Cherian and Oliveira 2005). Örneğin, metallicolous (bir ağır metali

normal konsantrasyonun üzerinde içeren topraklarda büyümeye adapte olmuş populasyon, tür ya da aksesyon) olmayan bitkilere göre metalicolous bitkilerde *MT2b* ortologlarının (farklı türlerde bulunan benzer işlevli proteini kodlayan genler) aşırı ifade olduğu gösterilmiştir (Mengoni *et al.* 2003; van de Mortel *et al.* 2006; Jack *et al.* 2007; Hassinen *et al.* 2009). *Brassica oleracea* bitkilerinde bir MT geninin (*CUP1*) aşırı ifadesinin 16 kat daha fazla Cd toleransına neden olduğu belirtilmiştir (Hesegawa *et al.* 1997). Benzer olarak, bezelye MT genini aşırı ifade eden *Arabidopsis thaliana* bitkisinde Cu birikiminin arttığı bildirilmiştir (Pan *et al.* 1994). Transjenik tütün bitkilerinde *AtMT2b* ve *AtHMA4* genlerinin birlikte ifadesinin Cd toleransını ve gövde dokusuna Cd ve Zn translokasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Grispen *et al.* 2011). Kloroplastik *mt1* genini aşırı ifade eden tütün bitkilerinde Hg toleransının arttığı ve herhangi bir olumsuz etki olmaksızın bitki dokularında daha fazla seviyede Hg biriktiği bildirilmiştir (Ruiz *et al.* 2011). Diğer taraftan, *Arabidopsis AtMT2b* genini ifade eden transjenik tütün hatlarında As birikiminin kök dokusunda azaldığı, gövde de ise arttığı ve yabancı tip bitkilere göre As toleransının azaldığı bildirilmiştir (Grispen *et al.* 2009). Metalloiyonein-metal komplekslerinin glutatyonlanabildiği (Brouwer *et al.* 1993), bu kompleksin uzun süreli alıkonma için vakuollere taşınabildiği ileri sürülmüştür (Jabeen *et al.* 2009). Bununla birlikte, *OsMT1a* genini aşırı ifade eden çeltik bitkilerinde kuraklık toleransının arttığı bildirilmiştir (Yang *et al.* 2009). Yüksek sıcaklık stresi ve alüminyum gibi diğer stres koşullarının MT'lere ait genlerin ifadesini teşvik ettiği için genel bir stres cevabı olarak ifade oldukları ileri sürülmüştür (Cobbett and Golsbrough 2002).

2.5. Fitoremediasyon İçin Bitkilerin Geliştirilmesi

Bitkilerin ağır metalleri biriktirebilme kapasiteleri genetik düzenlemeler veya şelatlama stratejileri ile arttırılabilmektedir.

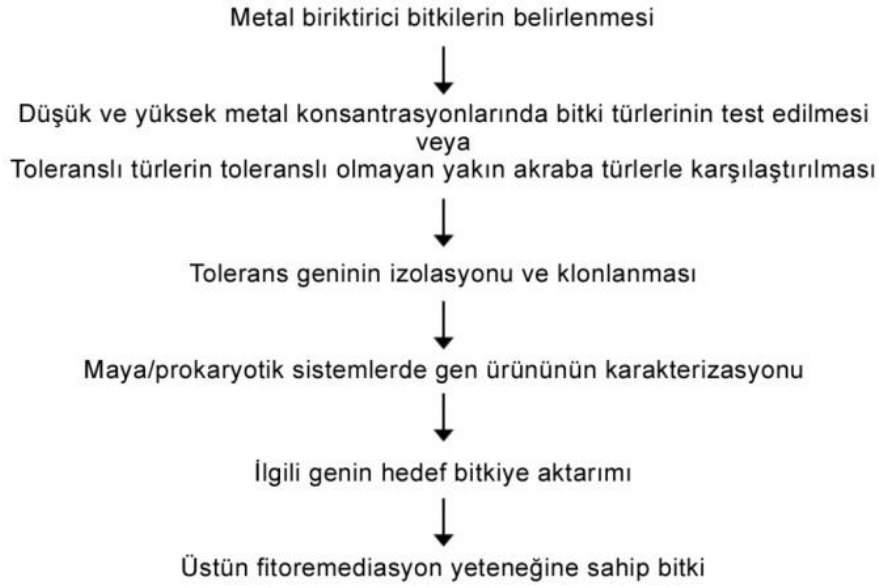
2.5.1. Genetik Stratejiler

Hiperakümülatör bitkilerin teşhisi, kirlenmiş alanların temizlenmesinde bu bitkilerin genetik bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Hiperakümülatör bitkilerin küçük

boyutlara ve düşük büyüme oranlarına sahip olmaları, fitoremediasyon potansiyelini olumsuz etkilemekte ve mekanik hasat gibi tarımsal uygulamaları sınırlamaktadır (Tong *et al.* 2004). Bu dezavantajların üstesinden gelebilmek için yavaş büyüyen ve düşük biyokütleli bitkilerden yüksek biyokütleli çeşitlerin geliştirilmesi temelinde klasik ıslah yöntemleri kullanılmaktadır (Li *et al.* 2004). Diğer bir yaklaşım ise bitkilerin ağır metalleri şelatlayarak ile sitoplazmada detoksifiye etme, toksik iyonların daha az toksik formlara dönüştürme ya da kompartımanlaştırma kapasitelerinin arttırılmasını hedeflemektedir. *Arabidopsis* genom projesinin tamamlanmasını takiben birçok diğer bitkinin genom taraması ile ağır metal homeostazisi ve birikimi ile ilişkili olan bir dizi genin teşhisi sağlanmıştır (Dhankher *et al.* 2002). İyonmik taramalar değişken element içerikli mutantların teşhis edilmesi için *A. thaliana* mutant populasyonlarında yapılan multi-element profillemeyi içeren fitoremediasyon ilişkili araştırmalarda başlamıştır (Lahner *et al.* 2003; Salt 2004). Metal alınımı, taşınımı ve birikiminin genetik ve biyokimyasının anlaşılması fitoremediasyon kapasitesi yüksek transjenik bitkilerin geliştirilmesine neden olabilmektedir (Salt and Kramer 2000; Baker *et al.* 2000). Metal biriktirici bitkilerin geliştirilmesi için gerekli strateji Şekil 2.1’de verilmiştir (Karenlampi *et al.* 2000).

Bitkilerde esensiyel metallerin plazma veya organel membranlarından primer veya sekonder aktif taşıyıcılar ile taşınımı metal homeostazisinde önemli rol oynamaktadır. Tütün bitkilerinde, plazma membranına lokalize olmuş NtCBP4 (kalmodulin bağlayıcı protein) taşıyıcısının aşırı ifadesinin Pb alınımını ve gövde dokularına translokasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Arazi *et al.* 1999). *A. thaliana* metal iyonu/H⁺ antiportırları olan CAX2 ve CAX4’ü aşırı üreten transjenik tütün bitkilerinin etkin şekilde Cd, Zn ve Mn metallerini detoksifiye edebildikleri belirtilmiştir (Hirschi *et al.* 2000; Korenkov *et al.* 2007).

Bitkilerdeki konsantrasyonu 2-3 mM olan glutatyon (GSH), sadece PC’lerin öncüsü değil aynı zamanda ağır metal cevabında rol alan diğer mekanizmaların önemli bir bileşenidir (Noctor *et al.* 2002). Bir antioksidan molekül olarak GSH hücrelerde ağır metal iyonları



Şekil 2.1 Fitoremediasyon yeteneğine sahip bitkilerin elde edilme stratejisi (Karenlampi *et al.* 2000'den değiştirilerek).

tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerinin direkt olarak temizlenmesinde fonksiyon görmekte (Schützendübel and Polle 2002) ve metabolizma, sinyal iletimi ve gen ifadesi için redoks homeostazisinin sürdürülmesi için askorbat-glutatyon döngüsünde indirgeyici eşdeğer güç sağlamaktadır (Foyer and Noctor 2005). Ağır metal hiperakümülatörü *Thlaspi goesingense* bitkilerinde GSH'un aşırı üretiminin Cd ve Ni tarafından oluşturulan oksidatif strese karşı toleransı arttırdığı bildirilmiştir (Boominathan and Doran 2003; Freeman and Salt 2007). Bununla birlikte, Cd hiperakümülatörü *S. alfredii* bitkilerinin kirlenmiş alanlara adaptasyonunun PC'lerden ziyade aşırı GSH üretimine bağlı olduğu belirtilmiştir (Sun *et al.* 2007a). GSH ve PC sentezi ile ilişkili enzimlerin modifikasyonu ve aşırı ifadesi ağır metal toleransının ve dolayısıyla fitoremediasyon potansiyellerinin arttırılması için iyi bir yaklaşım olabilmektedir. Maya *GSH1* ve *Allium sativum* *AsPCS1* genlerini aşırı ifade eden *A. thaliana* bitkilerinin daha yüksek seviyede arsenit ve arsenat toleransı ve birikimi gösterdiği belirtilmiştir (Guo *et al.* 2008). Zhu *et al.* (1999), *E. coli* γ -ECS ve GS genlerini

aşırı ifade eden *Brassica juncea* bitkilerinin yabancı tip bitkilere göre daha fazla Cd biriktirdiğini bildirmiştir.

Hiperakümülyasyonun genetik temelleriyle ilişkili kapsamlı bilgi, etkin fitoremediasyon kapasitesine sahip transjenik bitkilerin geliştirilmesinde oldukça önemlidir. Doğal metal hiperakümülatörü bitkilerde metal alınımı, translokasyonu, birikimi ve toleransı mekanizmalarının kritik analizleri metal bağlayıcı protein veya peptitlerin sentezinden sorumlu genlerin teşhisine yardım edecektir. Metalloproteinleri ve PC sentezi ile ilişkili enzimleri kodlayan genlerin teşhisi, fitoremediasyonun moleküler mekanizmasının aydınlatılmasında ilk basamağı oluşturmaktadır. Transjenik *Nicotiana tabaccum*, *Brassica oleracea* ve *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde fare *MT-1*, insan *hMT-1A* ve *hMT-II* genlerinin ifadesinin Cd toleransını arttırdığı, buna karşın gövde dokularındaki metal birikiminde %20 ila 70 azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Eapen and D'Souza 2005; Cherian and Oliveira 2005). *HisCUP1* genini aşırı ifade eden tütün bitkilerinde Cd için fitoekstraksiyon potansiyelinin arttığı belirtilmiştir (Macek *et al.* 2002; Pavlíková *et al.* 2004). *A. thaliana* köklerinde buğday *TaPCS1* geninin aşırı ifadesinin gövde dokularına Cd translokasyonunu arttırdığı ve yabancı tip bitkilere göre kök dokularında metal birikimini azalttığı rapor edilmiştir (Gong *et al.* 2003). Bununla birlikte, *Nicotiana glaucum* bitkilerinde *TaPCS1* geninin aşırı ifadesinin Pb ve Cd toleransını (Gisbert *et al.* 2003) ve gövde dokusunda Cu, Zn, Pb ve Cd birikimini (Martínez *et al.* 2006) arttırdığı bildirilmiştir. Zıt olarak, *A. thaliana* bitkilerinin yapraklarında (Peterson and Oliver 2006) ve kloroplastlarında (Picault *et al.* 2006) aşırı *AtPCS1* üretiminin sadece Cd toleransını arttırdığı, buna karşın gövde dokusunda metal birikime bir etkisi olmadığı belirtilmiştir. Bununla birlikte, tütün bitkilerinde *AtPCS1* geninin aşırı ifadesinin PC seviyesini 14 kat arttırdığı, köklerde Cd toleransı ve birikimini arttırdığı, ancak gövde dokusuna translokasyonu etkilemediği bildirilmiştir (Pomponi *et al.* 2006).

Ağır metallerin temizlenmesi için transjenik bitkilerin geliştirilmesi, mikroorganizmaların araştırılması ve tarla denemeleri fitoremediasyon teknolojisini daha etkili ve uygulanabilir hale getirmektedir. Bakteriler birkaç ağır metali daha az

toksik formlara indirgeyebilmektedir (Lovely 1993). Gram-negatif bakterilerde cıva toleransı cıva-iyon redüktaz (*merA*) genini içeren bir operon tarafından kodlanmaktadır. MerA enzimi toksik Hg^{+2} 'yi daha az toksik cıvaya (Hg^0) dönüştürmektedir. Rugh vd. (1996), *merA* genini içeren transjenik *Arabidopsis thaliana* fidelerinin kontrol fidelerine göre 2-3 kat daha fazla Hg^0 ürettiklerini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, metilcıva liyaz organik cıva detoksifikasyonu için bitki potansiyelini arttırabilmektedir (Bizily *et al.* 2003). *A. thaliana* (Yang *et al.* 2003), *N. tabacum* (Ruiz *et al.* 2003), *Oryza sativa* (Heaton *et al.* 2003), *Spartia alterniflora* (Czakó *et al.* 2006) ve *Populus deltoides* (Lyyra *et al.* 2007) gibi bitki türlerinde *merA*, *merB* veya her iki genin birlikte aşırı ifadesinin Hg toleransı ile sonuçlandığı belirtilmiştir. Bununla birlikte, Hg^{+2} 'nin sitoplazmaya aktarılması ve sonrasında metalik cıvaya indirgenmesini kapsayan bakteriyel Hg direnci, metal iyonlarını MerT, MerC veya MerF taşıyıcılarına kanalize eden periplazmik Hg^{+2} -bağlama proteini MerP'ye bağlı gerçekleşmektedir (Silver and Phung 2005). Bitki hücre membranlarında ve veziküllerinde lokalize olmuş MerP'nin transjenik *A. thaliana* bitkilerinde aşırı üretiminin Hg toleransını ve birikimini arttırdığı bildirilmiştir (Hsieh *et al.* 2009).

Dhankher vd. (2002), kirlenmiş alanlardan As'in temizlenmesi için *E. coli* *AsrC* geni (arsenat redüktazı kodlayan) ve *E.coli* γ -ECS genini aşırı ifade eden transjenik *Arabidopsis* bitkileri geliştirmişlerdir. Gövde ve yaprak dokusunda yüksek seviyede ifade olan *AsrC* proteini arsenatın arsenite indirgenmesini katalizlerken, PC biyosentez yolunun ilk enzimi olan γ -ECS bitkilerde PC havuzunun artışına neden olmaktadır. *AsrC* ve γ -ECS proteini içeren transjenik bitkilerin yabani tip bitkilere göre 4-17 kat daha fazla gövde taze ağırlığına sahip olduğu ve dokularında 2-3 kat daha fazla As biriktirdiği bildirilmiştir (Dhankher *et al.* 2002). Selenyum hiperakümülatörü *Astragalus bisulcatus* bitkisinden izole edilen selenosistein metiltransferaz (*SMT*) genini aşırı ifade eden transjenik *A. thaliana* bitkilerinin selenit (SeO^{-3}) ile kirlenmiş topraklarda yetiştirdiklerinde yabani tip bitkilere göre 8 kat daha fazla Se biriktirdikleri bildirilmiştir (Ellis *et al.* 2004). Transjenik *B. juncea* bitkilerinde Se toleransı, birikimi ve volatizasyon kapasitesinin arttırılması için *SMT* geninin kullanımı, tarımsal gereksinimler için bir

hiperakümülatör geni ile modifiye edilen ilk bitki örneğini temsil etmektedir (LeDuc *et al.* 2006; Bañuelos *et al.* 2007).

Metal homeostazisi ile ilişkili genlerin karakterizasyonu ile bu genlerin fonksiyonları ve fitoremediasyonda kullanılabilme potansiyelleri hakkında önemli bilgiler sağlanmıştır (Song *et al.* 2004). *A. thaliana*'da yüksek afiniteli demir alım sistemi (*IRT1*) (Connolly *et al.* 2002; Vert *et al.* 2002; Verret *et al.* 2003) ve köklerden gövdeye Zn^{+2} ve Cu^{+2} taşınımında fonksiyon gören iki P_{1B} -tip Zn^{+2}/Cu^{+2} -ATPaz'lar (*HMA2* ve *HMA4*) (Eren & Arguello 2004; Hussein *et al.* 2004; Papoyan and Kochian 2004; Verret *et al.* 2004) bu genlerden en önemlileridir. Kurşun akümülatörü *B. juncea* ve Zn ve Ni hiperakümülatörü olarak bilinen *Thlaspi caerulescens* arasında yapılan somatik hücre hibridlerinin Pb, Ni ve Zn stresine artan tolerans gösterdiği ve yüksek oranda Pb'ü fitoekstrakte ettiği rapor edilmiştir (Gleba *et al.* 1999; Dushenkov *et al.* 2002). Böylece, yüksek ve düşük biyokütleli metal hiperakümülatör bitkiler arasında yapılan somatik hücre hibridizasyonu, yüksek biyokütleli ve hiperakümülatör kapasitesine sahip hibridlerin geliştirilmesine olanak sağlayabilmektedir.

2.5.2. Şelat-Temelli Stratejiler

Kirlenmiş alanlarda ağır metalleri yüksek oranlarda biriktirebilen ve yüksek biyokütleli bitkilerin geliştirilmesi fitoremediasyonun etkinliğini belirleyen bir faktördür. Herhangi bir ürün kaybı olmaksızın yüksek biyokütleli bitkilerde ağır metal birikiminin arttırılması fitoremediasyon gelişiminde en uygun strateji olarak ortaya çıkmaktadır. Hiperakümülatör olmayan bitkilerde metal alım kapasitesinin ve alım hızının arttırılması için şelatlayıcı ajanların kullanılabileceği belirtilmiştir. Etilen diammin tetraasetik asit (EDTA) gibi aminopolikarboksilik asitler (APCA'lar) birçok fitoekstraksiyon denemelerinde kullanılmıştır. Etilen diammin disüksinat (EDDS) ve nitrilo triasetik asit (NTA) gibi biyolojik olarak degrade edilebilen APCA'lar EDTA ve diğer kalıcı APCA'lara alternatif olarak kullanılmaktadır. Sentetik şelatörlerin kullanımı birçok ağır metalin alımını ve köklerden gövde translokasyonunu arttırmakta ve böylelikle metallerin fitoekstraksiyonunu kolaylaştırmaktadır (Meers *et al.* 2008; Luo *et al.* 2008;

Petra *et al.* 2009; Zaier *et al.* 2010). Bununla birlikte, birçok çalışmada düşük moleküler ağırlıklı organik asitler ağır metal alınımını arttırmada kullanılmıştır (Evangelou *et al.* 2007). Bu şelatörler birçok farklı ağır metal için kuvvetli bir afinite göstermekte (Meers *et al.* 2005; Lotte *et al.* 2007) ve oluşan ağır metal-şelatör kompleksleri köklerden gövde dokusuna kolaylıkla transloke olabilmektedir (Wenger *et al.* 2003; Tandy *et al.* 2006). Böylelikle, şelatörler ağır metallerin alınımı ve translokasyonunu arttırmakla kalmaz (Wu *et al.* 2004; Tandy *et al.* 2006), aynı zamanda serbest metal iyonlarının fotosentetik organlara zarar vermesini de engellemektedir (Hernandez-Allica *et al.* 2003).

Tarımsal alanlarda kullanılan şelatlayıcı ajanlar, toprağın katı fazından metallerin ayrılmasını sağlayarak veya çökelmiş metal iyonlarını daha çözünür hale getirerek toprak çözeltisi içerisinde metal iyonlarının bitkiler tarafından kullanılabilirliğini arttırmaktadır (Prasad 2003). Akümülatör olmayan bir bitkide toksik metallerin şelatör aracılığıyla birikimi şelat-destekli hiperakümüülasyon olarak adlandırılmaktadır (Huang *et al.* 1997). Şelat-destekli hiperakümüülasyonda, mısır gibi tarımsal bitkilerin hızla büyümesine izin verecek şekilde kirlenmiş alanlardaki metallerin önceden immobilize edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, şelat-destekli hiperakümüülasyon bitkilerin toprak çözeltisindeki toksik olmayan seviyelerdeki metallere maruz bırakıldığı ve bitki büyümesiyle birlikte kademeli olarak metal birikiminin gerçekleştiği normal fitoekstraksiyon yönteminden farklılık göstermektedir. Bununla birlikte, sentetik şelatörlerin kullanımı ağır metallerin mobilizasyonunu arttırmasına karşın önemli çevresel sorunlara neden olabilmektedir (Blaylock *et al.* 1997). Wenzel vd. (2003), metal mobilizasyonundaki artış sonucu yeraltı sularının kirlenme riskinden dolayı şelat-destekli fitoekstraksiyonun sınırlı etkinliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle, şelatlayıcı ajanlar tarafından mobilize edilen metaller ile yeraltı sularının kirlenmesinin önlenmesi için sentetik şelatör uygulamasının topraktan sızacak suyu toplayabilecek bir sistem ile birleştirilmesi gerekmektedir (Navari-Izzo and Quartacci 2001).

2.6. Kükürt Metabolizması ve Ağır Metal Toleransı

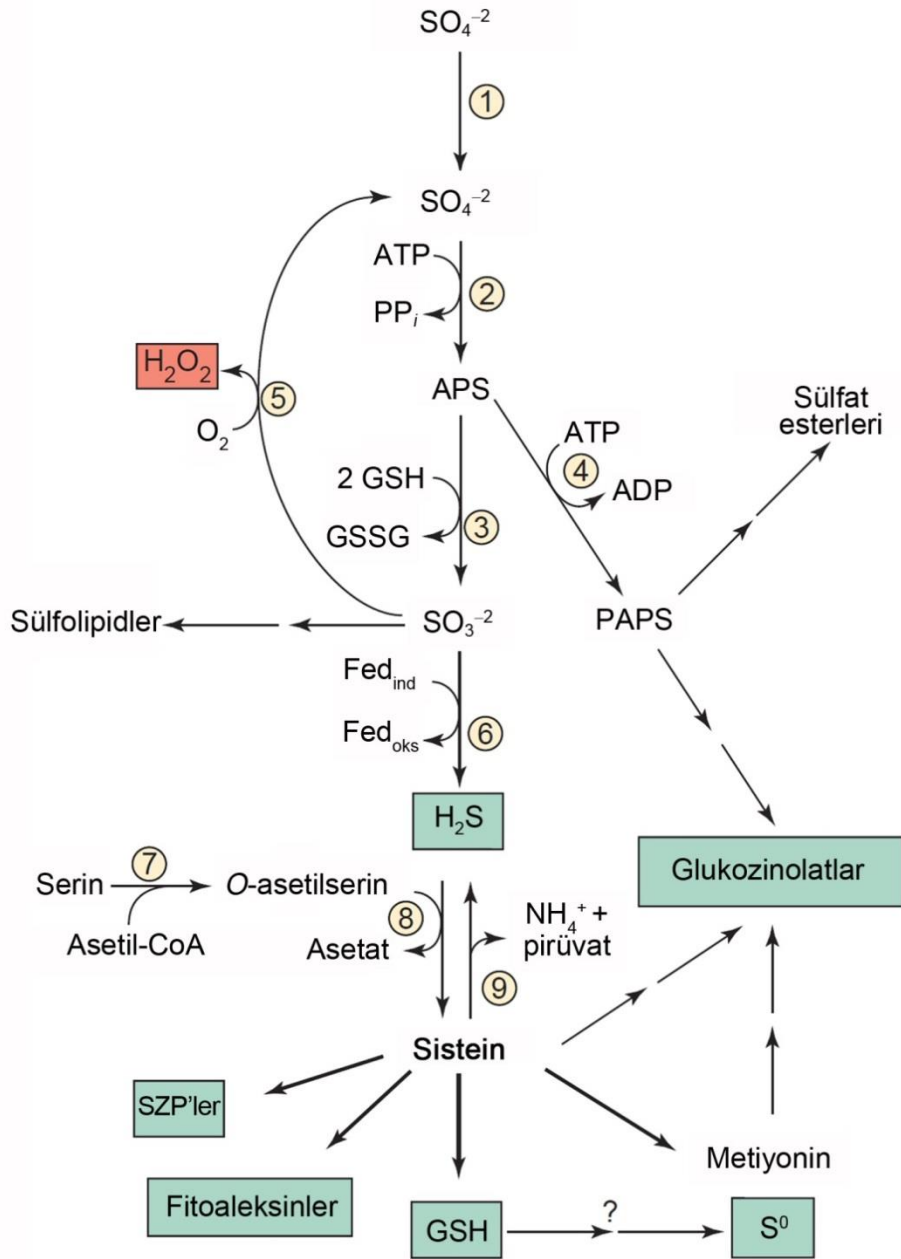
Bitki büyüme ve gelişimi için önemli bir besin elementi olan kükürt, biyotik ve abiyotik streslere karşı savunmada önemli bir rol oynamaktadır. Kükürt elementi sistein (Cys) ve metiyonin amino asitleri, kofaktörler, metal kümeleri ve bitkileri çevresel streslerin etkilerinden koruyan glutatyon (GSH), fitoşelatinler (PC'ler), fitoaleksinler ve glukozinolatlar gibi primer ve sekonder metabolitlerin bileşenidir (Rausch and Wachter 2005). Kükürt toprakta sülfat formunda bulunmaktadır. Bitkiler topraktaki kükürdü köklerindeki sülfat için farklı afinitelere sahip sülfat taşıyıcıları ile almaktadır (Bick and Leustek 1998). Sülfat Cys ve homosistein (HCys) gibi organik metabolitlerin yapısına katılmadan önce kükürt özümleme yolunu oluşturan bir seri reaksiyonla sülfide dönüştürülmektedir. Bununla birlikte, kükürt indirgenmiş veya yükseltgenmiş formda özümlelenebilmektedir. Yükseltgenmiş formda indirgeyici olmayan yol, direkt olarak sülfatı glukozinolatlar, hormonlar, flavonoidler ve jasmonatlar gibi metabolitlerin yapısına katmaktadır (Mugford *et al.* 2010).

Metabolik olarak kükürt metabolizması, bitkilerde ağır metal toleransı için gerekli moleküllerin sentezi için temel bir yol oluşturmaktadır (Hardulak *et al.* 2011). Bitkilerde ağır metal stresinin sülfat alınımında (Nocito *et al.* 2006; Sun *et al.* 2007b; Schiavon *et al.* 2007, 2008; Shahbaz *et al.* 2010) ve kükürt özümlemesinde fonksiyon gören enzimlerin ifadesinde değişimlere neden olduğu bildirilmiştir (Herbettea *et al.* 2006; Weber *et al.* 2006; Schiavon *et al.* 2007, 2008; van de Mortel *et al.* 2008). Bu nedenle, bitkilerde ağır metal toleransı ve kükürt metabolizmasının birbirleri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Na and Salt 2011).

2.6.1. Sülfat Alınımı ve Ağır Metallerin Etkisi

Bitki için biyolojik olarak kullanılabilir moleküle kükürdün özümlemesindeki ilk basamak sülfat taşıyıcıları aracılığı ile alımdır (Şekil 2.2). Sülfat alınımı ve özümleme basamakları enerji bağımlıdır ve gerekli enerji bu taşıyıcıları içeren kök tüyü ve kök epidermis hücrelerinin plazma membranlarında oluşturulan proton gradiyenti ile sağlanmaktadır

(Takahashi 2010). Sülfat alınımının regülasyonu transkripsiyonel, translasyonel ve/veya post translasyonel seviyede kontrol edilebilmektedir.



Şekil 2.2 Kükürt içeren savunma bileşiklerinin biyosentezi için kükürt özümleme basamakları. (1) Yüksek afiniteli taşıyıcılar, (2) ATP sülfürlaz, (3) APS redüktaz, (4) APS kinaz, (5) sülfid oksidaz, (6) sülfid redüktaz, (7) serin asetil transferaz, (8) O-asetil(tiyol)liyaz, (9) sülfidraz (Rausch and Wachter 2005'den değiştirilerek).

Glutasyon gibi tiyol bileşiklerinin yanı sıra dışsal ve içsel sülfat konsantrasyonunun sülfat taşıyıcılarının ifadesi ve aktivitesinin kontrolünde fonksiyon gördüğü ileri sürülmüştür (Hawkesford and De Kok, 2006; Rouached *et al.* 2009). Bitkilerde sülfat taşıyıcıları, *Arabidopsis thaliana*'da belirlenen amino asit sekansları temelinde 5 gruptan (AtSULTR1-5) oluşmaktadır (Nocito *et al.* 2007). Bu taşıyıcılar sülfat için afiniteleri, taşınma hızları ve lokalize oldukları doku tiplerine göre farklılık göstermektedir. Sülfat taşıyıcılarının lokasyonları ve kapasiteleri çevredeki kükürdün kullanılabilirliğinden önemli derecede etkilenmektedir (Takahashi *et al.* 1997). Grup 1 yüksek afiniteli sülfat taşıyıcıları kökler tarafından primer alımı sağlamaktadır. Deneysel olarak sağlanan düşük S konsantrasyonunun kök tüyleri, epidermis ve korteks hücrelerinin plazma membranında bulunan yüksek afiniteli sülfat taşıyıcısı *SULTR1;1* (HAST)'in ifadesini artan yönde düzenlediği gösterilmiştir (Maruyama-Nakashita *et al.* 2004). Köklerde bulunan yüksek afiniteli taşıyıcıların (*SULTR1;1* ve *SULTR1;2*) ifadesinin kükürt eksikliğine cevap olarak arttığı, buna karşın *SULTR1;2*'in yüksek kükürt konsantrasyonlarında da ifadesinin arttığı belirtilmiştir (Yoshimoto *et al.* 2002; Herbette *et al.* 2006). Cd ve Zn'ye maruz kalan bitkilerde artan *SULTR1;1* ifadesinin köklerde daha yüksek sülfat konsantrasyonu ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Nocito *et al.* 2006; Sun *et al.* 2007b; Fässler *et al.* 2011). *Stylosanthes hamata*'dan yüksek afiniteli sülfat taşıyıcı geni *SHST1*'i ifade eden transgenik *Brassica juncea* hatlarının aynı *SHST1* transkript seviyelerine sahip olmalarına karşın, hatlardan birinin köklerde artan Cd seviyelerinin yeterli şekilde detoksifiye edemediğinden dolayı Cd'a hassas olduğu bildirilmiştir (Lindblom *et al.* 2006). Mısır bitkilerinde Cd uygulamasının yüksek afiniteli sülfat taşıyıcısı *ZmST1;1*'i teşvik ettiği ve içsel sülfat içeren bileşikleri tükettiği bildirilmiştir (Nocito *et al.* 2006). Cu (2 ve 5 µM Cu) stresine maruz kalan *Brassica pekinensis* bitkisinin köklerinde *SULTR1;2*geninin yüksek düzeyde ifade edildiği buna karşın *SULTR1;1*geninin neredeyse hiç ifade edilmediği bildirilmiştir (Shahbaz *et al.* 2010, 2013). Bu çalışmalarda, *SULTR1;2*'nin ifade seviyesindeki artışa artan sülfat alım kapasitesinin eşlik ettiği belirtilmiştir (Shahbaz *et al.* 2010, 2013). Diğer taraftan, sülfat eksikliğinin mısırdaki yüksek afiniteli sülfat taşıyıcısı *ZmST1;1* ve *B. juncea*'da düşük afiniteli sülfat taşıyıcısı *BjST1*'in ifade seviyesinde önemli artışa neden olduğu

belirtilmiştir (Lindblom *et al.* 2006; Nocito *et al.* 2006). Ayrıca Cr(VI) stresinin her iki bitkide sülfat taşıyıcılarının ifade seviyesini azalttığı bildirilmiştir (Schiavon *et al.* 2007, 2008).

Grup 2 taşıyıcıları düşük afiniteli sülfat taşıyıcılarıdır. Grup 3 taşıyıcıları nispeten karakterize edilememiş olmasına rağmen SULTR3;5 izoformunun *Arabidopsis*'te kökten gövdeye kükürt taşınımını kolaylaştıran SULTR2;1 ile bir heterodimer oluşturabildiği bildirilmiştir (Kataoka *et al.* 2004). Ayrıca grup 3 taşıyıcılar tercihen yapraklarda ifade edilmektedir (Takahashi 2010). *Brassica napus* ve *B. juncea*'da Cd stresinin SULTR2;2 (LAST) transkript seviyelerini kök dokularında azalttığı buna karşın yaprak dokularında arttırdığı gösterilmiştir (Heiss *et al.* 1999; Sun *et al.* 2007b).

Kök dokusundaki sülfid, GSH ve non-protein tiyollerin seviyelerindeki artış ile gösterildiği gibi, köklerdeki taşıyıcı aktivitesindeki azalmanın Cd detoksifikasyonu için köklerde yeterli kükürdü sağlayabildiği ileri sürülmüştür (Sun *et al.* 2007b). *A. thaliana*'da SULTR2;1 köklerden yapraklara kükürt taşınımı için ksilem borularına sülfatın yüklenmesini sağladığı bilinmektedir (Kataoka *et al.* 2004). Cr(VI) stresi altında *B. juncea* *BjSULTR2;1*'in ifade seviyesinin hızlı şekilde azaldığı ve sistein seviyesini direkt veya dolaylı olarak arttıran kromatinin bu etkiden sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür (Schiavon *et al.* 2012).

Grup 4 taşıyıcıları esas olarak kök ve gövdede vakuolar sülfat havuzlarının mobilizasyonunda fonksiyon görmektedir. Bitkiler tüm olası kullanılabilir sülfatı vakuolden tekrar mobilize etmeye ve tekrar dağıtmaya çalıştığında, yapısal sülfat taşıyıcısı SULTR4;1 ve teşvik edilebilir sülfat taşıyıcısı SULTR4;2 genellikle kükürt eksikliğinde sadece artan yönde regüle olmaktadır (Buchner *et al.* 2004; Koralewska *et al.* 2009; Stuver *et al.* 2009). Düşük kükürt koşullarında büyüyen buğdayda artan SULTR4;1 ifadesinin tohumda Se ve Mo birikimini arttırdığı bildirilmiştir (Shinmachi *et al.* 2010). *Brassica pekinensis* bitkilerinde SULTR4;1 ifadesinin 10 µM Cu konsantrasyonunda gövdede artarken, kökte azaldığı belirlenmiştir. Diğer taraftan,

SULTR4;2 kök ve gövdede çok az ifade olmasına karşın gövdedeki ifadenin konsantrasyondaki artışa bağlı olarak arttığı rapor edilmiştir (Shahbaz *et al.* 2010). *B. juncea* bitkisinde *BjSULTR4;1*'in *BjSULTR2;1*'e benzer bir gen ifade profili gösterdiği ve bu nedenle, Cr(VI) stresine cevapta her iki genin koordineli regülasyonu olduğu ileri sürülmüştür (Schiavon *et al.* 2012).

Grup 5'i oluşturan kısa amino asit sekanslarına sahip olan taşıyıcılar hakkında bilinenler azdır. *Arabidopsis*'te *SULTR5;2*'in Mo birikiminde fonksiyon gördüğü düşünülmekte; fakat kükürt noksanlığı koşullarında büyütülen buğdayda *SULTR5;2*'nin ifade profilleri bitki dokularında Mo'in dağılım profillerini tam olarak açıklamamaktadır (Shinmachi *et al.* 2010). Sülfat taşıyıcılarının temel filogenetik grupları ve fonksiyonları belirlenmiş olmasına karşın, bu taşıyıcıların etki mekanizmaları ve düzenlenişleri ile ilgili ilave çalışmalara gereksinim vardır.

2.6.2. Kükürt Özümlemesi

Sülfat ve sülfidin indirgenmesinden sorumlu olan ilk iki enzim ATP sülfürilaz (ATPS) ve APS redüktaz (APSR) (Şekil 2.2) (Leustek *et al.* 1994; Bick *et al.* 1998) olup; sadece plastidde lokalize olmuştur. Sülfat bir kez bitki bünyesine alındığında, ATPS enzimi sülfatın indirgeyici asimilasyon yoluna giriş basamağını kataliz etmektedir. ATPS, sülfat ve ATP'den adenozin-5'-fosfosülfatın oluşumu yoluyla sülfatı aktive eder (Leustek *et al.* 1994) ve APSR enzimi elektron donörü olarak GSH kullanarak APS'den sülfidi oluşturur (Bick *et al.* 1998). APSR kükürt özümlemesinde ilk kararlı basamağı katalizlediğinden, bitkilerde ağır metal toleransının arttırmada transgenik yaklaşım için hedef olmuştur (Khan *et al.* 2009). Cd uygulaması *A. thaliana* (Harada *et al.* 2002) ve *B. juncea* (Heiss *et al.* 1999)'da her iki enzimin transkripsiyonunu artan yönde regüle etmektedir. Ayrıca *A. thaliana*'daki proteomik analizler her iki enzimin miktar ve aktivitesinin Cd'a maruz kalmadan sonra arttığını göstermiştir (Roth *et al.* 2006; Sarry *et al.* 2006; Yamaguchi *et al.* 2010). Benzer olarak, sülfat noksanlığı ve normal koşullar altındaki *A. thaliana* bitkilerinde ATPS aktivitesinin Cd stresine cevap olarak arttığı ve bu artışın sülfat noksan bitkilerde daha düşük olduğu belirtilmiştir (Bashir *et al.* 2013). ATPS'yi aşırı

ifade eden transgenik *B. juncea* bitkilerinde glutasyon ve toplam tiyol içeriklerinin yabancı-tip bitkilere göre daha yüksek seviyelerde olduğu belirlenmesine rağmen, Cd, Zn, Cr, Cu, Pb ve Mn'in birikiminin yabancı tipe göre değişmediği bildirilmiştir (Bennett *et al.* 2003). *B. juncea*'da ATPS'nin aşırı ifadesinin, As, Cd, Cu ve Zn'ya karşı bazal toleransı arttırdığı ve transgenik bitkilerin gövdelerinde Cd, Cu ve S'ü daha yüksek seviyelerde biriktirdiği belirtilmiştir (Wangelin *et al.* 2004).

Kükürt özümlemesi yolunda ilk ürün olan adenosin-5'-fosfosülfat (APS) APS redüktaz (APSR) ve APS kinaz (APSK) için bir substrattır. APSR daha ileri indirgeme için bileşikteki kükürdü işlerken (Suter *et al.* 2000), APSK ise glukozinolatlar ve flavonoidlerin sentezine katılan bir kükürt vericisi sağlamak için APS'yi fosforile etmektedir (Kopriva 2006). APSR'nin kükürt özümleme yolunun esas düzenleyici basamağı olarak düşünülmekte ve bitkinin kükürt durumu (sistein veya glutasyonla inhibe edilen ve kükürt eksikliğiyle teşvik edilir) ile regüle edilmektedir (Kopriva and Koprivova 2004). Mısır bitkisinin kök dokusunda *ATP-S* ve *APS-R* transkript birikiminin Cr(VI) uygulaması ile büyük oranda arttığı bildirilmiştir (Schiavon *et al.* 2007). *APSR* transkriptlerinin birikimi tütün bitkilerinin kök ve yapraklarında Cd uygulaması ile önemli oranda artmıştır (Fässler *et al.* 2011). Bununla birlikte, *Brassica pekinensis* bitkisinde *APSR*'in ifadesi kök ve gövdelerde 10 µM'dan düşük Cu konsantrasyonlarından etkilenmediği, 10 µM Cu'ın ise köklerde yaklaşık %50 azalmaya, gövdede ise 1.5 kat artışa neden olduğu gösterilmiştir (Shahbaz *et al.* 2010). Krom stresi altındaki *B. juncea* bitkilerinde artan *APSR* transkripsiyonunun dokularda kükürt ve GSH içeriklerinin azalmasından kaynaklandığı belirtilmiştir. Ayrıca Cr(VI) stresi altındaki bitkilerde yüksek oranda biriken sisteinin *APSR*'nin azalan yönde regülasyonuna neden olmadığı bildirilmiştir (Schiavon *et al.* 2012). Bunlara ilaveten, *A. thaliana*'da *Pseudomonas aeruginosa* *PaAPSR* geninin heterolog ifadesinin Se indirgenmesinde azalışa neden olduğu bildirilmiştir (Sors *et al.* 2005).

Sülfat redüktaz (SiR) sülfatın sülfide indirgenmesinde görev alan son enzimdir. SiR yapısal olarak ifade olur ve allosterik efektörlere veya posttranslasyonel

modifikasyonlara maruz kalmamaktadır (Nakayama *et al.* 2000). Sentez yolunun kontrolünde SiR'in rolü bazen ihmal edilmesine rağmen, SiR'in aktivitesindeki azalmanın tüm indirgeyici yol ve sülfat içeren metabolitlerin sentezi için engelleyici bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Khan *et al.* 2010).

2.6.2.1. Sistein Sentezi

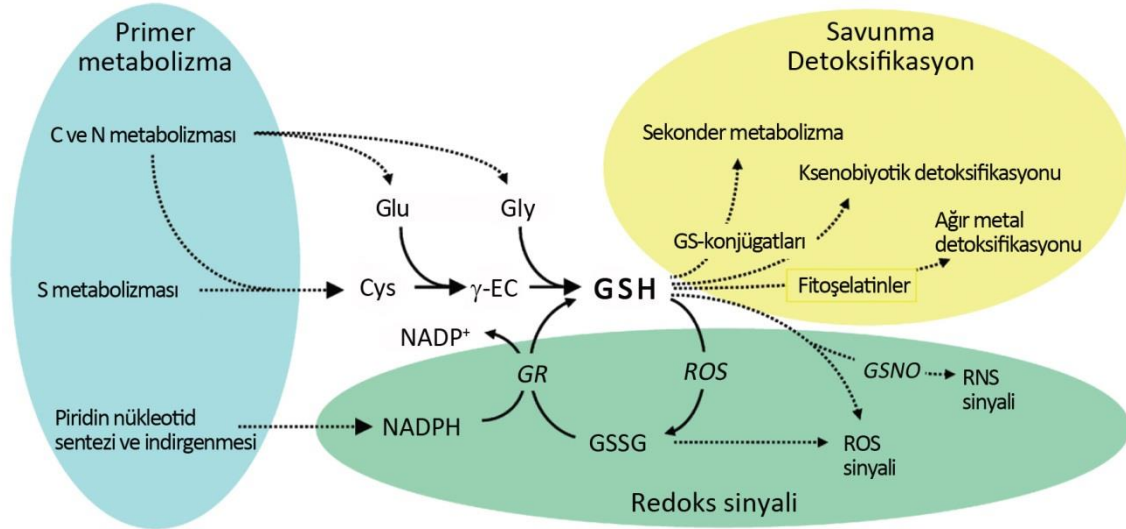
Sistein (Cys), protein yapısı ve redoks kontrolünün sürdürülmesini içeren çeşitli biyolojik fonksiyonlarda önemli rollere sahiptir (Leustek *et al.* 2000; Saito, 2004). Cys; metiyonin (Met), glutatyon (GSH) ve fitoşelatinler (PC'ler)'in öncülüdür. Cys biyosentezi tiyol grupları içeren organik moleküllere kükürdün katılımı için giriş noktası sağlamaktadır (Şekil 2.2). Cys biyosentezi; asetil-CoA ile serinin asetilasyonu sonucu *O*-asetilserinin oluşumunu ve *O*-asetilserindeki bir asetil grubunun sülfid ile yer değiştirmesini kapsayan iki basamakta gerçekleşmektedir (Yi *et al.* 2010). Serin asetil transferaz (SAT) ilk reaksiyonu katalizler ve *O*-asetil (tiyol) liyaz (OAS-TL) ise ikinci reaksiyonu gerçekleştirir. SAT, asetil-CoA ve serinin biyosentezinden sorumludur ve Cys ise OAS-TL'nin katalizlediği reaksiyonla OAS ve sülfidden sentezlenir. Her iki enzim birçok bitki türünde multigen familyaları tarafından kodlanmakta (Inoue *et al.* 1999) ve sistein sentaz (CS) kompleksi olarak Cys biyosentezinde birlikte fonksiyon görmektedir (Feldman-Salit *et al.* 2009). SAT ağır metal toleransı ve birikiminde önemli rol oynamaktadır (Freeman and Salt 2007). *Arabidopsis*'te Cd'a maruz kalmayı takiben yapılan gen ifade çalışmalarında SAT izoformlarının ifadesinde artış olduğu belirlenmiştir (Howarth *et al.* 2003). *Thlaspi*'nin hiperakümülatör ve hiperakümülatör olmayan türlerinin karşılaştırılması, artan SAT aktivitesinin Ni hiperakümülasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Freeman *et al.* 2004). *Thlaspi goesingense*'nin *TgSATm* tarafından kodlanan mitokondrial SAT'ın aşırı üretimi, *A. thaliana*'nın yapraklarında GSH'un birikimini teşvik etmiş ve esas olarak Ni, Co, Zn ve Cd'a karşı artan tolerans sağlamıştır (Freeman and Salt 2007). Farklı As(V) konsantrasyonlarına (100–1000 µM) maruz kalan *Sesuvium portulacastrum* türünde SAT ve CS gibi Cys biyosentez enzimlerinin aktivitesi kadar Cys seviyesi de azalma eğilimi göstermiştir (Lokhande *et al.* 2011). Kadmiyum (Dominguez-Solis *et al.* 2001; Roth *et al.* 2006), As (Ahsan *et al.*

2008) ve Al (Yang *et al.* 2007) uygulamalarının *OAS-TL* ifadesini arttırdığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, *OAS-TL* ifadesinin *N. tabacum*'da Cd, Se ve Ni direnci (Kawashima *et al.* 2004), çeltikte Cd direnci (Harada *et al.* 2001) ve *A. thaliana*'da Cd direncindeki (Dominguez-Solis *et al.* 2001) artışla ilişkili olduğu belirtilmiştir. Ağır metal stresi koşullarında (400 μ M Cd) azalan *OAS-TL* aktivitesinin, Cys ve GSH seviyelerinin azalmasına neden olduğu bildirilmiştir. Sitozolik *OAS-TL*'yi aşırı ifade eden bitkilerin, yabancı tip bitkilere göre Cd'a 9 kat daha toleranslı olduğu ve fitoremediasyon için potansiyel bir araç olduğu bildirilmiştir (Dominguez-Solis *et al.* 2004). Bu bulgular, fitoremediasyon uygulamasında genetik mühendisliği için SAT ve *OAS-TL*'nin kullanımının önemli bir potansiyel olduğunu göstermektedir.

2.6.3. Bir Kükürt İçeren Bileşik Olarak Glutasyon

Bitkilerde tiyol-içeren tripeptid glutasyon (GSH) hücrel redoks durumunun önemli bir düzenleyicisi olduğu kadar ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, ağır metallerin alıkonulması, sistein formunda fazla kükürdün depolanması ve kükürt asimilasyonunda APSR için bir substrat olarak işlevlere sahiptir (Noctor *et al.* 2012). Glutasyon çok fonksiyonlu bir moleküldür ve hücre farklılaşması, ölüm, senesens, patojen direnci ve enzimatik regülasyonda önemli rol oynamaktadır (Şekil 2.3) (Noctor *et al.* 2012). Ayrıca GSH ağır metal koşulları altında fitoşelatin sentaz (PCS) ile sentez edilen sisteince zengin peptidler olan fitoşelatinlerin öncüsüdür (Cobbett and Goldsbrough 2002). Glutasyonun sentezi iki ardışık ATP-bağımlı basamakta gerçekleşir. İlk basamakta, plastidlerde lokalize olan γ -GluCys sentaz (γ -ECS) enziminin katalizlediği reaksiyonla sistein ve glutamat amino asitlerinden γ -glutamil sistein (γ -EC) sentezlenmektedir (Şekil 2.4) (Rausch and Wachter 2005). İkinci basamak, sitozolde lokalize olan GSH sentaz tarafından γ -EC'ye glisin katılmaktadır. Her iki enzim *GSH1* ve *GSH2* olmak üzere birer gen tarafından kodlanmaktadır (Rausch *et al.* 2007). γ -ECS'yi kodlayan *GSH1* ifadesinin devre dışı bırakılması embriyo evresinde (Cairns *et al.* 2006), glutasyon sentazı kodlayan *GSH2*'nin devre dışı kalması ise fide evresinde letaliteye neden olmaktadır (Pasternak *et al.* 2008). Bununla birlikte, düşük GSH seviyesine sahip *A. thaliana*'nın γ -ECS allel mutantları (*pad2-1*) Cd ve Hg streslerine karşı hassasiyet göstermiştir

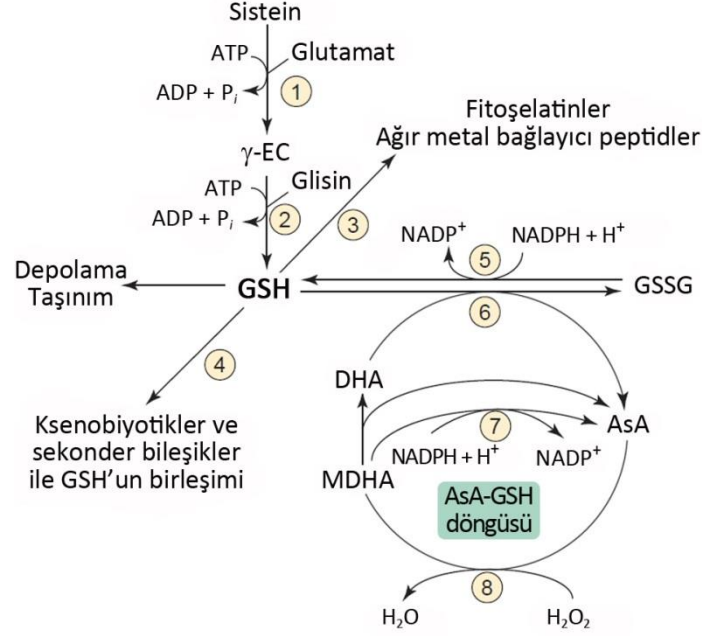
(Sobrino-Plata *et al.* 2014). Bununla birlikte, Cr(VI) stresinin *B. juncea*'da *GSH2*'nin transkript seviyelerini arttırdığı ve Cr(VI) toleransı ve birikiminde kükürt metabolizmasının önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Schiavon *et al.* 2008).



Şekil 2.3 Bazı çok önemli glutasyon fonksiyonlarına genel bakış. Cys: Sistein, γ -EC: g-glutamil sistein, GS-konjüгатları: glutasyon S-konjüгатları, GSNO: S-nitrosoglutasyon, Glu: glutamat, Gly: glisin, RNS: reaktif azot türleri, ROS: reaktif oksijen türleri (Noctor *et al.* 2012'den değiştirilerek).

Transgenik bitkilerde *GSH1* ve *GSH2* genlerinin ifadesi, ağır metal stresini içeren farklı abiyotik streslere karşı toleransı arttırabilmektedir. Bir γ -ECS eksik *A. thaliana* mutantının yapraklarında *E. Coli* γ -ECS geninin ifadesi Hg, Cd ve As(V)'e karşı toleransın artmasına neden olmuştur (Li *et al.* 2006b). Transgenik *B. juncea* bitkisinde bakteriyel γ -ECS veya *GS* genlerinin aşırı ifadesinin, GSH ve fitoşelatinlerin yüksek seviyede birikimine ve ağır metal toleransı ve birikime neden olduğu bildirilmiştir (Reisinger *et al.* 2008). Sitolde aşırı *GSH1* ifadesinin ağır metallerle kontamine olmuş toprakta transgenik kavak bitkilerinin performansını arttırdığı belirtilmiştir (Ivanova *et al.* 2011). Yabani tip bitkilere göre bakteriyel γ -ECS genini aşırı ifade eden *A. thaliana* (*A2::ECS*) bitkilerinin As, Hg ve Cd stresleri koşullarında 3 ila 20 kat daha yüksek γ -EC, GSH ve fitoşelatin seviyelerine sahip olduğu bildirilmiştir. *A2::ECS* transgenik bitkilerin As'e son derece dirençli ve Hg'ya direncinin ise zayıf olduğu ve Cd stresinin bu bitkilerde γ -EC ile

ilişkili peptidlerin seviyelerinde 3 ila 5 kat artışa neden olmasına rağmen Cd'a önemli düzeyde duyarlı oldukları gösterilmiştir (Li *et al.* 2005).



Şekil 2.4 Farklı stres cevaplarında glutatyonun biyosentezi ve multifonksiyonel rolü. (1) γ -Glutamil sistein sentaz, (2) glutatyon sentaz, (3) fitoşelatin sentaz, (4) GSH-S-transferazlar, (5) glutatyon redüktaz, (6) dehidroaskorbat redüktaz, (7) monodehidroaskorbat (MDHA) redüktaz; (8) askorbat peroksidaz (Rausch and Wachter, 2005'den değiştirilerek).

Glutatyon serbest metal iyonlarının potansiyel olarak duyarlı sisteince zengin proteinlere bağlanmasını önlemekte ve dolayısıyla bu proteinlerin fonksiyonlarını etkilemektedir. Metallerle toksik olmayan kompleksleri oluşturduktan sonra GSH hücrelerdeki hassas bölgelerden uzakta metallerin alıkonulmasını kolaylaştırmaktadır (Foyer and Noctor 2011). Bununla birlikte, sadece serbest metaller değil aynı zamanda herbisitler gibi potansiyel tehlikeye sahip ksenobiyotikler ve antosiyaninler gibi metabolitler GSH'a bağlanabilmektedir. Glutatyon sülfotransferazlar (GST'ler) tarafından katalizlenen reaksiyon GSH'un kükürt atomu ve bir elektrofilik bileşik arasındaki kovalent bağın oluşumudur (Noctor *et al.* 2012). GST aktivitesinin Cu ve Cd streslerine maruz bırakılan *Arabidopsis*'te arttığı gösterilmiştir (Skorzynska-Polit *et al.* 2010; Bashir *et al.* 2013). GST'lerin farklı sınıflarının birçok bitki türünde kimliklendirilmesi ve karakterize edilmesi bu multigen familyasının çeşitliliği ve

fonksiyonunu anlamada bilgi sağlamıştır. Transgenik bitkilerde GST genlerinin aşırı veya heterolog ifadesinin ağır metal stresini içeren farklı abiyotik streslere toleransı arttırdığı ileri sürülmüştür. Örneğin, bir fungus GST genini ifade eden transgenik tütün bitkilerinin kadmiyuma çok toleranslı olduğu gösterilmiştir (Dixit *et al.* 2011). İlaveten, çeltik *OsGSTL2* geninin transgenik *Arabidopsis* bitkilerindeki ifadesinin ağır metallere (As, Cd ve Cr) ve soğuk, ozmotik ve tuz stresi gibi diğer abiyotik streslere karşı toleransı arttırdığı bildirilmiştir (Kumar *et al.* 2013).

Glutasyon, reaktif oksijen türlerinin (ROT) temizlenmesinde önemli fonksiyona sahip olması ve hücrel redoks durumunu dengede tutmak için bir redoks tamponu olması nedeniyle antioksidatif savunma sisteminin önemli bir bileşenidir (Meyer and Hell 2005). GSH ile farklı ROT'ların enzimatik olmayan reaksiyonları sırasında, GSH (indirgenmiş form) GSSG (glutasyon disülfid; okside form)'ye dönüştürülür (Szalai *et al.* 2009). H₂O₂'i içeren ROT'ların parçalanması sırasında GSH'un GSSG'a olan oranındaki değişim redoks sinyal yollarında önemlidir (Millar *et al.* 2003). İndirgenmiş durumda, sistemin tiyol grubu ROT'lar gibi kararsız moleküllere direkt olarak indirgeyici bir elektron verebilme yeteneğindedir. Bir elektron verdiğinde, GSH kendi kendine reaktif hale gelir; fakat GSSG oluşturmak için diğer reaktif GSH ile kolayca reaksiyona girmektedir. ROT'lar ile reaksiyona girebilen birkaç diğer primer ve sekonder metabolitlerin okside formlarından farklı olarak GSSG, sitozol ve anahtar organellerde glutasyon redüktaz (GR) ile hızlıca tekrar döngüye girmektedir (Kataya and Reumann 2010). GR, bitkilerde ROT'ların temizlenmesinde hücrenin savunma sisteminin anahtar bir bileşenidir. GR çoğunlukla kloroplastlarda lokalize olmuştur; fakat bu enzimin küçük miktarı mitokondri ve sitozolde bulunmuştur (Gill and Tuteja 2010). Kloroplast ve mitokondriyal GR, *GR2* geni tarafından kodlanırken, *GR1* sitozol ve peroksizomda bulunan bir proteini kodlamaktadır (Kataya and Reumann 2010). *Arabidopsis*'in kloroplast veya mitokondriyal *GR2* için T-DNA mutantları embriyo-letalken (Tzafrir *et al.* 2004), *gr1* devre dışı mutantları ekstrakte edilebilir enzim aktivitesinde %30-60 azalma göstermesine rağmen fenotipik etkileri göstermez (Marty *et al.* 2010). Toksik metaller ve metalloidleri içeren birçok biyotik ve abiyotik stres faktörü bitkilerde GR'nin aktivitesini etkilemektedir (Anjum *et al.* 2010; Gill and Tuteja 2010;

Bashir *et al.* 2013). GR aktivitesinde %111-178 aralığındaki bir artış Cr(VI) stresine maruz kalan *B. juncea*'da gözlenirken, *Vigna radiata*'da uygulamadan sonra GR aktivitesinde %56-77 aralığında bir artış belirlenmiştir (Diwan *et al.* 2010).

Glutasyon, antioksidan kapasitesinin yanı sıra farklı hücre-altı kompartımanlarda askorbat-glutasyon (AsA-GSH) siklusuna katılmaktadır. AsA-GSH yolu, ROT'ların büyük çoğunluğunun etkili bir biçimde eliminasyonu için önemli enzimleri ve metabolitleri içeren reaksiyonlar ağında anahtar bir kısımdır ve böylece bitkilerde ROT-aracılı oksidatif zararı önlemektedir (Anjum *et al.* 2010). AsA-GSH yolu, indirgeyici eşdeğerlerin siklik bir transferi ile AsA ve GSH'ın ard arda oksidasyonu ve indirgenmesini içerir ve böylece bitkiye özgü askorbat peroksidaz (APX) H₂O₂'i H₂O'ya indirgeyebilmektedir. Glutasyon peroksidazlar (GPX'ler), geniş substrat spektrumuna sahip olan farklı izozimlerin geniş bir familyasıdır. GPX'ler; sitozol, kloroplast, mitokondri, peroksisom ve apoplastı içeren bitki hücrelerinde yaygın olarak gözlenen antioksidan enzim olarak etki eder. GPX'ler indirgeyici güç olarak direkt GSH havuzunu kullanarak H₂O₂, organik ve lipid hidroperoksitlerin indirgenmesini kataliz etmekte ve böylelikle oksidatif zarara karşı hücreleri korumaktadır (Anjum *et al.* 2010). Millar ve ark. (2003), *Arabidopsis*'de AtGPX1–7 olarak adlandırılan yedi protein familyası teşhis etmiştir. İzofomlar arasında, kloroplastlara post-translasyonel olarak hedeflenen AtGPX1 ve AtGPX7'nin (Milla *et al.* 2003) antioksidan koruma sağladığı ve salisilik ve ROT ile tetiklenen bitki immün cevaplarını regüle ettiği ileri sürülmüştür (Chang *et al.* 2009). GPX'lerin diğer izofomları sitozol, mitokondri ve endoplazmik retikulumda lokalize olmuştur (Milla *et al.* 2003). Farklı bitki türlerinde birkaç toksik metal ve metalloidin değişen konsantrasyonlarına karşı GPX'lerin cevabına ilişkin çelişkili raporlar mevcuttur. Arsenik stresine toleranslı *B. juncea* genotipi TPM-1'de GPX aktivitesinin As(V) ve As(III) uygulamalarında arttığı, buna karşın As'e duyarlı TM-4 genotipinde ise GPX aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (Srivastava *et al.* 2010). Fatima ve Ahmad (2005), birçok ağır metalin (Hg, Pb, Cr, Cu, Zn veya Cd) benzer konsantrasyonlarına maruz kalan *Allium cepa*'da GPX aktivitesinde önemli artış

gözlemişler ve artan GPX aktivitesinin metal teşvikli serbest radikal oluşumunun bir sonucu olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Kükürt metabolizması, bitki büyüme ve gelişiminin yanı sıra birçok çevresel strese karşı oluşturulan savunmada fonksiyon görmektedir. Yapılan fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler çalışmalar kükürt özümlemesi, taşınımı ve metabolizması ile ilgili bazı bilgileri sağlamaktadır. Kükürt içeren bileşiklerin sentezinde rol alan birçok enzimin aktivitesi, ağır metal stresine cevap olarak teşvik edilmekte ve transgenik bitkilerde bu enzimlerin aşırı üretiminin ağır metal stresine karşı toleransı arttırdığı bilinmektedir. Kükürt içeren bileşiklerin bitkilerde ağır metallerin detoksifikasyonunda önemli bir rol oynaması nedeniyle kükürt ve kükürt içeren bileşiklerin ağır metal toleransındaki rollerinin anlaşılabilmesi için transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi kapsamlı araştırmalara gereksinim duyulmaktadır.

2.7. Ağır Metal Toksisitesinin Değerlendirilmesinde Proteomik Yaklaşım

Ağır metal stresine cevap ile ilişkili fonksiyonel gen veya proteinlerin teşhisi ağır metal toleransının moleküler mekanizmalarının anlaşılmasında önemli bir basamaktır. Bu tarz bilgiler ağır metallerle kirlenmiş alanların fitoremediasyonu için toleranslı transgenik bitkilerin geliştirilmesini sağlayabilmektedir. Son zamanlarda, gen ifadesindeki ağır metal teşvikli değişimler, mikroçip analizleri ile mRNA seviyesinde araştırılmış ve bitkilerde ağır metal cevaplarının anlaşılması için değerli bilgiler sağlamıştır (Chakrabarty *et al.* 2009; Yu *et al.* 2012a; Shen *et al.* 2013). Bununla birlikte, bitkilerde ağır metal stresine cevap olarak ifade olan proteinler ile ilgili birçok soru cevapsız kalmaktadır. Bu nedenle, bir hücre hattı, doku veya organda ifade olan proteinlerin kapsamlı ve nicel analizi olan proteomik, biyolojik sistemler ile ilgili genomik ve transkriptomik yaklaşımlardan sağlanamayacak önemli bilgiler vermektedir. Çünkü transkriptlerin aksine proteinler bitkilerdeki stres cevaplarını direkt olarak yansıtmaktadır. Bununla birlikte, mRNA'ların ifade seviyeleri ve ilgili proteinler arasında zayıf ilişki bulunması transkripsiyonel analizlerde bazı sınırlamalara neden olmaktadır (Rose *et al.* 2004; Bogeat-Triboulot *et al.* 2007). mRNA ve protein seviyeleri arasında

korelasyon belirlenmiş olmasına karşın (Joosen *et al.* 2007; Li *et al.* 2007), protein ifadesi sadece transkripsiyonel seviyede değil, aynı zamanda translasyonel ve post-translasyonel seviyelerde de düzenlenmektedir. Sonuç olarak, bitki proteomundaki değişimlerin araştırılması oldukça önemlidir.

Proteomik yaklaşım, farklı proteomların karşılaştırılması temeline dayanmaktadır. Ağır metaller gibi abiyotik stres çalışmalarında, kontrol ve uygulama grubu bitki dokularından izole edilen proteomlar karşılaştırılmaktadır (Kosová *et al.* 2011). İki-yönlü (2-D) elektroforez ile birlikte kütle spektrometrisi proteomik çalışmaların gerçekleştirilmesinde en fazla kullanılan etkili bir yoldur ve biyolojik fonksiyona sahip karmaşık protein ağlarının çalışılmasına olanak sağlamaktadır. Son yıllarda, bitki proteomu üzerine ağır metal stresinin etkilerini inceleyen çalışmalar artmıştır (Ahsan *et al.* 2010; Wang *et al.* 2011b; Sharmin *et al.* 2012). Yapılan bu proteomik analizler, ağır metal stresine cevap olarak bitki proteomunda meydana gelen değişimlerin anlaşılmasına katkıda bulunmuş olmasına rağmen, özgül bir ağır metal için biyomarkörlerin teşhisini sağlayacak ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenle, ağır metallerin translokasyonu, transformasyonu, içsel alıkonulması ve hücre içerisinde bu metallerin detoksifikasyonunda muhtemel role sahip proteinlerin daha iyi tanımlanmasını sağlayacak proteomik üzerine yoğunlaşılması gerekmektedir (Ahsan *et al.* 2009).

2.7.1. Bitki Proteomundaki Ağır Metal Teşvikli Değişimler

Birçok proteomik çalışmada, bazı protein sınıflarının ağır metal stresine cevap olarak teşvik edildiği ve bu proteinlerin savunma ve uyum süreçlerinde önemli rol oynayabileceği gösterilmiştir (Çizelge 2.2). Bitkilerde ağır metal stresi, metal bağlayıcı ligandlar ile şelatlama, antioksidan savunma sistemi ve şaperonlar gibi birkaç savunma mekanizmasını teşvik etmektedir. Bununla birlikte, ağır metal stresine cevap olarak patojenle ilişkili (PR) proteinlerin sentezinde artış görülmektedir. Ayrıca, ağır metaller fotosentez ve fotosolunum gibi primer metabolizmada değişimlere neden olabilmektedir (Çizelge 2.2) (Ahsan *et al.* 2009).

Çizelge 2.2 Metal stresine cevap olarak proteomik analizlerle tanımlanmış proteinler ve fonksiyonları (Ahsan vd. 2009'den değiştirilerek)

Protein	Fonksiyon	Metal	Kaynak
APX, CS, CAT, DHAR, GSH1, GPX, GST, MDHAR, POD, Prx, SOD, Trx	Antioksidatif savunma	Al, As, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb	Fecht-Christoffers <i>et al.</i> 2003; Bona <i>et al.</i> 2007; Ahsan <i>et al.</i> 2010; Bah <i>et al.</i> 2010; Cai <i>et al.</i> 2011; Wang <i>et al.</i> 2011b; Sharmin <i>et al.</i> 2012; Hossain <i>et al.</i> 2012a, Song <i>et al.</i> 2013
Şaperonin 60, HSP70, Dnaj-benzeri protein, küçük HSP, Şaperonin 21, DnaK-tip moleküler şaperon, HSP101, PDI	Şaperonlar	Al, As, B, Cd, Cu, Hg, Ni	Ingle <i>et al.</i> 2005b; Tuomainen <i>et al.</i> 2006; Patterson <i>et al.</i> 2007; Ahsan <i>et al.</i> 2008; Zhao <i>et al.</i> 2011; Chen <i>et al.</i> 2012; Wang <i>et al.</i> 2013
SAMS, ACC oksidaz, OPR, CHS, lipoksigenez, ABP19, jasmonat-teşvikli protein-benzeri, oksin-teşvikli protein	Sinyal molekülleri Sekonder metabolizma	Al, As, B, Cd, Cs, Cr, Cu, Hg	Labra <i>et al.</i> 2006; Aina <i>et al.</i> 2007; Fukuda <i>et al.</i> 2007; Patterson <i>et al.</i> 2007; Ahsan <i>et al.</i> 2008; Wu <i>et al.</i> 2013
RuBisCO büyük ve küçük alt birimler, RuBisCO aktivaz	CO ₂ özümlemesi Fotosentez	As, B, Cd, Co, Cu, Hg, Mn, Pb, Zn	Führs <i>et al.</i> 2008; Li <i>et al.</i> 2009; Ahsan <i>et al.</i> 2010; Bah <i>et al.</i> 2010; Tuomainen <i>et al.</i> 2010; Zhao <i>et al.</i> 2011; Hossain <i>et al.</i> 2012b
PR-1 protein, PR protein P4, PR protein 5-1, PR10-benzeri proteinler, PR protein 5 öncüsü, sınıf I kitinaz, kitinaz 2, kitinaz III C10701, kitinaz 4, taumatin-benzeri protein 1, taumatin-benzeri protein TLP5, taumatin-benzeri protein PR-5a, β-1,3-glukanaz	Patojen savunma	Al, B, Cd, Cu, Mn, Hg, Pb	Patterson <i>et al.</i> 2007; Zhen <i>et al.</i> 2007; Führs <i>et al.</i> 2008; Farinati <i>et al.</i> 2009; Zhang <i>et al.</i> 2009; Walliwagedara <i>et al.</i> 2010; Cai <i>et al.</i> 2011

2.7.1.1. Karbondioksit Özümlemesi ve Fotosentez ile İlişkili Proteinler

Ağır metal stresi altındaki bitkilerde farklı şekilde ifade olan proteinlerin büyük çoğunluğunu fotosentez ile ilişkili proteinler oluşturmaktadır (Farinati *et al.* 2009; Ahsan *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2011). RuBisCO (ribuloz 1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz) çözünebilir yaprak proteininin %30-70'ini oluşturmaktadır (Douillard and Mathan 1994) ve fotosentezde önemli rol oynamaktadır. RuBisCO, karbon metabolizmasının ilk basamağı olan CO₂ fiksasyonunu kataliz etmektedir. Bununla birlikte, RuBisCO-bağlayıcı alt birim, RuBisCO aktivaz ve fosforibulokinaz CO₂ fiksasyonu için gerekli bileşenlerdir. RuBisCO-bağlayıcı alt birim, RuBisCO büyük alt biriminin katlanması için gerekli bir proteindir (Boston *et al.* 1996). RuBisCO aktivaz, RuBisCO'nun katalitik aktivitesini sağlamaktadır (Portis 2003). Fosforibulokinaz, Calvin

döngüsünün CO₂ fiksasyonu için bir alıcı molekül olan ribuloz-1,5-bifosfatın oluşumunu kataliz etmektedir (Miziorko 2000).

Metal stresine cevap olarak RuBisCO proteininin miktarındaki azalma birçok bitki türünde rapor edilmiştir (Hajduch *et al.* 2001; Fühns *et al.* 2008; Kieffer *et al.* 2009; Ahsan *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2011). Bununla birlikte, RuBisCO alt birimlerindeki azalma Cd stresine maruz kalan hiperakümülatör *Thlaspi caerulescens* bitkilerinde de belirlenmiştir (Tuomainen *et al.* 2006). Ayrıca, As'e toleranslı bitki türlerinin yanı sıra toleranslı bitkilerde de RuBisCO alt birimlerinin As stresine cevap olarak azaldığı bildirilmiştir (van Keulen *et al.* 2008; Duquesnoy *et al.* 2009; Ahsan *et al.* 2010). Arsenik stresi altındaki bitkilerde fotosentezdeki azalmanın RuBisCO alt birimlerindeki azalma ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Ahsan *et al.* 2010). Bununla birlikte, protein miktarındaki azalmanın yanında RuBisCO aktivitesinde de önemli bir azalmanın olduğu bildirilmiştir (Nováková *et al.* 2004). Karbon fiksasyonu proteinlerinin miktarındaki azalmayla birlikte, fotosentezin ışık evresi, fotosistem II kompleksi ve klorofil biyosentezi ile ilişkili proteinlerin miktarında da azalma olduğu rapor edilmiştir (Kieffer *et al.* 2008). Sonuç olarak, ağır metal stresine cevap olarak fotosentezdeki inhibisyon ve klorofil üretimindeki azalmanın RuBisCO ve diğer fotosentezle ilişkili proteinlerin miktarındaki azalmadan kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Ahsan *et al.* 2009).

Fotosentez ile ilişkili proteinlerin (klorofil a/b bağlayıcı proteinin özel alt birimleri ve fotosistem II'nin membran ekstrasik alt birimi miktarındaki artış Cd ve Zn stresine maruz bırakılan hiperakümülatör *Arabidopsis halleri* (Farinati *et al.* 2009) ve As stresine maruz bırakılan *Pteris vittata* bitkilerinde (Bona *et al.* 2010) belirlenmiştir. Benzer sonuçlar, Zn/Cd hiperakümülatörü *Arabis paniculata* ve Pb hiperakümülatörü *Helianthus annuus* bitkilerinde de belirlenmiştir (Walliwagedara *et al.* 2010; Zeng *et al.* 2011). Ağır metal stresi altında artan enerji ihtiyacı, hiperakümülatör türlerde miktarı artan fosforibulokinaz, fruktoz bifosfat aldolaz ve RuBisCO'nun büyük alt birimi gibi enerji metabolizması ve Calvin döngüsü ile ilişkili enzimlerin aktivasyonunu gerektirmektedir (Bona *et al.* 2010; Zeng *et al.* 2011). Farinati vd. (2009), ağır metal stresi altındaki bitkilerde ışık toplayıcı komplekslerin alt birimlerinin (klorofil a/b

bağlayıcı protein) aşırı ifadesinin tüm hücrel metabolizmanın artan enerji ihtiyacını karşılamak için gerekli olduğunu belirtmiştir. Bununla birlikte, *Thlaspi caerulescens* bitkilerinin hassas aksesyonlarına göre toleranslı aksesyonlarında bazı Calvin döngüsü enzimlerinin (RuBisCO büyük alt birimi, gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz ve sedoheptuloz-1,7-bifosfat) daha fazla ifade olduğu bildirilmiştir (Tuomainen *et al.* 2006). Bah vd. (2010), Cr(VI) stresi altındaki bitkilerde ATP sentaz, RuBisCO küçük alt birimi ve koproporfirinojen III oksidazın ifadesinin artmasından dolayı bu proteinlerin Cr(VI) detoksifikasyonunda ve klorofil biyosentezi ve karbon metabolizmasının yüksek seviyelerde sürdürülmesinde önemli rol oynadığını rapor etmiştir.

2.7.1.2. Primer Karbon ve Enerji Metabolizması ile İlişkili Proteinler

Ağır metal stresi birçok katabolik yolu etkilemekte ve ATP üretimini azaltmaktadır. Ağır metal stresine maruz kalan bitkilerde artan enerji ihtiyacına cevap olarak enerji metabolizması (karbohidrat metabolizması, pentoz fosfat yolu ve trikarboksilik asit döngüsü) ile ilgili birçok enzimin miktarı değişim göstermektedir (Ahsan *et al.* 2010; Hossain *et al.* 2012b; Sharmin *et al.* 2012; Visioli *et al.* 2012).

Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH), fruktoz-1,6-bifosfatın gliseraldehit-3-fosfat ve sonunda 1,3-bifosfogliserata dönüşümünü sağlayan bir housekeeping enzimdir. Bununla birlikte, Giege vd. (2003), bu enzimin programlanmış hücre ölümü, DNA onarımı ve DNA replikasyonunda işleve sahip olduğunu bildirmiştir. Birçok proteomik çalışmada, ağır metal stresine cevap olarak GAPDH proteininin farklı şekilde ifade olduğu belirtilmiştir (Kieffer *et al.* 2009; Ahsan *et al.* 2010; Sharmin *et al.* 2012). Arsenik stresi altındaki çeltik yapraklarında artan GAPDH miktarından dolayı As stresi sırasında karbohidrat metabolizmasının köklere göre yapraklarda daha aktif olduğu bildirilmiştir (Ahsan *et al.* 2010). Domates köklerinde glikolitik yolla ilişkili GADPH, pirüvat dehidrogenaz ve enolaz enzimlerinin 10 µM Cd uygulamasında arttığı, buna karşın 100 µM Cd uygulamasının bu enzimlerin ifadesini baskıladığı rapor edilmiştir (Rodríguez-Celma *et al.* 2010). Bununla birlikte, Cd'a toleranslı *Brassica juncea* bitkilerinde glikolitik enzimlerin 250 µM Cd uygulamasında azaldığı, *Arabidopsis*

thaliana bitkilerinde ise 10 µM Cd uygulamasında arttığı bildirilmiştir (Sarry *et al.* 2006; Alvarez *et al.* 2009). Kadmiyum stresine maruz kalan bitkilerde karbohidrat metabolizması ile ilişkili proteinlerin ifadesindeki değişimlerin doz ve türe bağlı olduğu belirtilmiştir (Rodríguez-Celma *et al.* 2010). Bununla birlikte, enolaz ve GAPDH gibi glikolitik yol ile ilişkili proteinlerin Cr(VI) altındaki *Miscanthus sinensis* köklerinde azaldığı ve bu nedenle glikolize karbon akışının Cr(VI) stresi tarafından inhibe edildiği ileri sürülmüştür (Sharmin *et al.* 2012). Chen vd. (2012), enolaz ve fruktokinaz gibi enzimlerin Hg stresi altındaki çeltik köklerinde azaldığı ve karbohidrat metabolizmasının ciddi şekilde Hg stresinden etkilendiğini belirtmiştir. Song vd. (2013), Cu'a toleranslı çeltik köklerinde pirüvat dekarboksilaz miktarının azaldığı ve bu nedenle karbonun etanol fermantasyonundan ziyade trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne katıldığını bildirmiştir.

Pirüvat dehidrogenaz kompleksinin (PDC) bileşenleri, akonitaz, NADP-bağımlı malik enzim (NADP-ME), süksinat dehidrogenaz ve malat dehidrogenaz (MDH) gibi TCA döngüsü ile ilişkili enzimlerin ifadesindeki değişimler ağır metal stresine maruz kalan bitkilerde belirlenmiştir (Ahsan *et al.* 2010; Rodríguez-Celma *et al.* 2010; Chen *et al.* 2012). Dihidrolipoamid dehidrogenaz, plastidlerde PDC, mitokondrilerde ise glisin dekarboksilaz kompleksinin (GDC) alt birimidir. Karbonun TCA döngüsüne girişini düzenleyen PDC ve fotosolunumun mitokondriyal basamağını kataliz eden GDC solunumda önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle, PDC ile ilgili proteinlerin miktarındaki artış glikolitik ürünlerin TCA döngüsüne girişini arttırabilmektedir (Ahsan *et al.* 2010). Ağır metal stresine cevap olarak bu proteinin ifadesinde artış gözlenmiş olmasına karşın (Fukuda *et al.* 2007; Ahsan *et al.* 2010; Sharmin *et al.* 2012), ağır metal stresindeki kesin rolü henüz bilinmemektedir.

Bitkilerde farklı metabolik yollara katılan NADP-ME'ler solunum ve ATP üretimi için mitokondrilere pirüvat sağlamaktadır. Bununla birlikte, NADP-ME'in çevresel stresler ile ilişkili olarak savunma reaksiyonlarında fonksiyon gördüğü bildirilmiştir (Casati *et al.* 1999). Tuz, ozmotik ve kuraklık stresi altındaki çeltik bitkilerinde NADP-ME transkript

ve NADP-ME aktivitesinin arttığı bulunmuştur (Liu *et al.* 2007; Ke *et al.* 2009). Ayrıca, Arabidopsis bitkilerinde aşırı NADP-ME ifadesinin tuz ve ozmotik stres toleransına katkıda bulunduğu belirtilmiştir (Cheng and Long 2007; Liu *et al.* 2007). Arsenik stresi altındaki bitkilerde artan NADP-ME aktivitesinin yüksek enerji üretimi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Ahsan *et al.* 2010).

Mitokondri membranlarında ADP'den ATP oluşumunu kataliz eden mitokondriyal ATP sentazın miktarının arttığı ve bu nedenle Cr(VI) stresi altında mitokondriyal solunumun artabileceği belirtilmiştir (Sharmin *et al.* 2012). Bununla birlikte, ATP üretimi için gerekli dihidrolipoamid dehidrogenaz (pirüvat dehidrogenazın E-3 bileşeni) enziminin miktarında artış belirlenmiştir. Bu enzimlerin miktarındaki artış Al ve As stresine maruz bırakılan çeltik bitkilerinde de belirlenmiştir (Fukuda *et al.* 2007; Ahsan *et al.* 2010). Bununla birlikte, *Phytolacca americana* bitkilerinin tilakoid membranlardaki CF1 ATP sentazın β alt biriminin Cd stresine cevap olarak artış gösterdiği belirtilmiştir (Zhao *et al.* 2011). Diğer taraftan, düşük Cd uygulamasının (10 μ M) ATP sentazın beta alt biriminin miktarında artışa neden olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, yüksek Cd uygulamasının (100 μ M) ATP sentaz ve sitokrom c redüktaz alt birimlerini azaltarak enerji üretimini baskıladığını bildirilmiştir (Rodríguez-Celma *et al.* 2010). Benzer sonuçlar Cd stresine maruz bırakılan *Solanum torvum* köklerinde de belirlenmiştir (Wu *et al.* 2013). Ağır metallerin etkilerinin metal tipi, bitki türü ve dokuya bağlı olarak değişebilmektedir (Ahsan *et al.* 2009).

2.7.1.3. Kükürt ve Glutasyon Metabolizması ile İlişkili Proteinler

Karbon metabolizmasına ek olarak kükürt metabolizması da ağır metal stresinden etkilenmektedir (Chen *et al.* 2012; Hossain *et al.* 2012; Song *et al.* 2013). Bitkilerde S-adenozil-L-metiyonin (SAM) birkaç transmetilasyon reaksiyonunda önemli bir metil vericisidir (Van Breusegem *et al.* 1994). L-metiyonin ve ATP'den SAM sentetaz ile SAM oluşmaktadır. Kobalamin-bağımsız metiyonin sentaz (MS) ise L-homosisteine bir metil grubunun transferini kataliz etmektedir (Pejchal and Ludwig 2005). Metal stresine maruz kalan birçok bitki türünde gerçekleştirilen proteomik çalışmalarda SAMS ve MS

enzimlerinin miktarında artış belirlenmiştir (Farinati *et al.* 2009; Ge *et al.* 2009; Zhao *et al.* 2011). Ayrıca, Cd stresi altındaki hücrelere uygulanan SAM'in koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Noriega *et al.* 2007). Bu enzimlerin metiyonin oluşumu ve metil döngüsündeki ara reaksiyonların kataliz edilmesindeki fonksiyonundan dolayı (Sarry *et al.* 2006), bu proteinlerin miktarındaki artışın metiyonin seviyesinde bir artışa neden olabileceği ve bu artışın Cd toksisitesinin üstesinden gelmede birçok biyosentetik yoldaki metilasyon reaksiyonları için gerekli metil gruplarının sağlanmasıyla sonuçlanabileceği bildirilmiştir (Zhao *et al.* 2011). Bununla birlikte, çeltik bitkilerinde Cu stresinin SAM sentetaz miktarını arttırdığı, buna karşın MS ifadesini arttırdığı ve bu durumun metiyonin seviyesinde azalmaya neden olabileceği bildirilmiştir (Song *et al.* 2013).

İnorganik kükürt özümlemesinde anahtar bir enzim olan sistein sentaz (CS) sistein amino asidini sentezlemektedir. Protein yapısına katılmasının yanı sıra sistein enzimatik olmayan bir antioksidan olan glutatyonun (GSH) öncüsüdür. Bitkilerde γ -glutamilsistein sentetaz (γ -ECS) ve glutatyon sentetaz enzimleri tarafından GSH sentezlenmektedir. GSH ise sisteince zengin ve ağır metal bağlayıcı özelliğe sahip fitoşelatinlerin (PC'ler) öncüsüdür (Cobbett and Goldsbrough 2002). Çeltik köklerinde Cu stresinin kükürt özümlemesi ve GSH biyosentezi ile ilgili proteinlerin ifadesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Song *et al.* 2013). Bununla birlikte, bu proteinlerde CS'nin bakıra hassas çeltik çeşidine göre toleranslı çeşitte daha fazla oranda ifade olduğu belirtilmiştir. Diğer taraftan, kükürt özümlemesi ve GSH metabolizması ile ilgili enzimleri kodlayan bazı genlerin Pb tarafından teşvik edildiği rapor edilmiştir (Liu *et al.* 2009). Song vd. (2013), Cu stresi altındaki çeltik bitkilerinde GSH, PC ve MT'lerin sentezi için artan sistein gereksinimi karşılamak amacıyla kükürt özümlemesinin arttığını ileri sürmüştür. Ingle *et al.* (2005b), hiperakümülatör *Alyssum lesbiacum* bitkilerinde kükürt metabolizması ile ilgili bazı proteinlerin Ni toleransında önemli bir rol oynayabileceğini bildirmiştir. Diğer taraftan, Hg stresine maruz kalan çeltik köklerinde CS ifadesinin ve GSH içeriğinin azaldığı ve GSH içeriğindeki azalmanın artan PC biyosentezinden veya CS ifadesindeki azalmadan kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Chen *et al.* 2012).

2.7.1.4. Azot Metabolizması ile İlişkili Proteinler

Glutamin sentetaz (GS) amonyum özümlemesinde önemli bir enzimdir. Bu enzim, glutamini oluşturmak için amonyum iyonları ile glutamatın ATP bağımlı birleşmesini kataliz etmektedir. Ağır metal stresinin bazı bitki türlerinde GS proteininin miktarında azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (Lee *et al.* 2010; Zeng *et al.* 2011; Hossain *et al.* 2012a; Sharmin *et al.* 2012). Foto-oksidatif stres koşullarında, GS proteininin hidroksil radikalleri tarafından süratle parçalandığı rapor edilmiştir (Ishida *et al.* 2002). Sharmin vd. (2012), Cr(VI) stresi altındaki bitkilerde GS miktarındaki azalmanın artan oksidatif stres koşullarına bağlı olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte, Cr(VI) stresi altındaki bitkilerde azot metabolizması ile ilgili bir enzim olan nitrat redüktaz proteininin miktarında azalma belirlenmiştir (Sharmin *et al.* 2012). Diğer taraftan, Cd stresine maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* ve soya fasulyesi bitkilerinde GS proteininin ifadesinde artış belirlenmiştir (Semane *et al.* 2010; Hossain *et al.* 2012a). GS proteininin ifadesindeki artış daha fazla GSH oluşumuna neden olabilmektedir. GSH biyosentezindeki artış, oksidatif strese karşı hücrel savunma mekanizmasının artmasının yanı sıra metal bağlama kapasitesinin de artması anlamına gelmektedir (Verbruggen *et al.* 2009).

2.7.1.5. Antioksidan Savunma ve Detoksifikasyon ile İlişkili Proteinler

Bitkilerde ağır metal stresinin etkilerinden biri de oksidatif stresle ilişkili birkaç enzimin ifadesindeki değişimlerdir. Ağır metal stresi altındaki bitkilerde reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde fonksiyon gören askorbat-glutatyon döngüsü enzimlerinin yanı sıra birçok antioksidan enzimin arttığı proteomik çalışmalarla gösterilmiştir (Alvarez *et al.* 2009; Wang *et al.* 2010; Chen *et al.* 2012). Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit radikallerinin ($O_2^{\bullet-}$) hidrojen perokside (H_2O_2) dönüşümünü katalizleyen detoksifikasyon işleminin ilk enzimidir. Birçok proteomik çalışma metal toksisitesinin SOD proteininin miktarında artışa neden olduğunu göstermiştir (Labra *et al.* 2006; Alvarez *et al.* 2009; Wang *et al.* 2013). Alvarez *et al.* (2009), *Brassica juncea* bitkilerinde Cd stresinin Fe-SOD proteininin miktarında artışa, Cu/Zn-SOD proteininin miktarında

ise azalmaya neden olduğunu bildirmiştir. Araştırmacılar, bu durumun Cd stresinin Cu ve Zn alınımını azaltmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, Al'a hassas çeltik çeşidine göre toleranslı çeşitte SOD proteininin miktarının daha fazla artış gösterdiği belirtilmiştir (Wang *et al.* 2013). Askorbat peroksidaz (APX), indirgenmiş askorbik asidin (AsA) varlığında H₂O₂'in suya indirgenmesinde işlev görmekte ve oluşan dehidroaskorbat indirgenmiş glutasyonu elektron vericisi olarak kullanıldığı reaksiyonla dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) tarafından AsA'ya dönüştürülmektedir. Bu askorbat döngüsü enzimlerinin yanında monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) ve okside glutasyonun (GSSG) GSH'a indirgenmesini sağlayan glutasyon redüktaz (GR) proteininin de ağır metallerce teşvik edildiği birçok proteomik çalışmada gösterilmiştir (Lee *et al.* 2010; Song *et al.* 2013; Chen *et al.* 2012). Bu enzimlerden APX ve DHAR'ın yanı sıra bir diğer H₂O₂ temizleyici enzim olan peroksidazların (POD) bakıra toleranslı çeltik çeşidinde daha fazla ifade olduğu belirtilmiştir (Song *et al.* 2013). Peroksiredoksinler kloroplast ve mitokondrilerde lokalize olmuş düşük etkinlikli peroksidazlardır (Dietz 2003). Peroksiredoksinler gelişim, antioksidan, içsel apoptoz düzenleyicisi (Ichimia *et al.* 1997), hücreler arası sinyal molekülü ve moleküler şaperon (Jang *et al.* 2004) gibi farklı hücresel fonksiyonlara sahiptir. Bu proteinin ifadesindeki artış metal stresi altındaki birçok bitki türünde tespit edilmiştir (Labra *et al.* 2006; Wang *et al.* 2011b; Hossain *et al.* 2012a).

Birkaç proteomik çalışma sistein sentaz, γ -glutamilsistein sentaz, glioksalaz 1 ve glutasyon-S-transferaz (GST) gibi glutasyon biyosentezi veya döngüsü ile ilgili proteinlerin ağır metal stresinde farklı şekilde ifade olduğunu göstermiştir (Çizelge 2.2). Bitkiler çoklu gen ailesi tarafından kodlanan ve ağır metal detoksifikasyonunu da içeren birkaç hücresel fonksiyonda işlev gören çok sayıda GST izozimlerine sahiptir (Dixon *et al.* 2002). GST'ler normal bitki gelişiminin sürdürülmesinin yanı sıra çevresel stres koşullarında bitkileri koruyan GSH bağımlı detoksifiye edici enzimlerdir (Marrs 1996). GST'ler hidrofobik, elektrofilik bileşiklerin GSH ile birleşmesini kataliz ederek bu maddelerin detoksifiye edilmesini sağlamaktadır (Jwa *et al.* 2006). Hem mRNA hem de protein seviyesinde artan GST ifadesi metal stresine maruz bırakılan bitki türlerinde

belirlenmiştir (Herbette *et al.* 2006; Alvarez *et al.* 2009; Zhao *et al.* 2011). Bununla birlikte, Al stresi altındaki çeltik bitkilerinde iki GST proteininin sadece toleranslı çeşitte belirlendiği ve GST'lerin Al toleransında önemli bir rol oynayabileceği belirtilmiştir (Wang *et al.* 2013). Diğer taraftan, Ahsan vd. (2007) Cu stresine maruz bırakılan çimlenen çeltik tohumlarında GST proteininin azaldığını bildirmiştir. Çeltikte OsGST1 ve OsGST2'nin karakterizasyonu, bu proteinlerin savunma ve stres cevap yollarında rol oynadığını ileri sürmüştür (Jwa *et al.* 2006). Sonuç olarak, SOD, CAT, POD ve APX metal teşvikli oksidatif strese karşı ilk savunma hattını oluşturmaktadır. Diğer taraftan, MDHAR, DHAR, GR ve GST'ler gibi glutasyon biyosentezi ve döngüsü ile ilgili enzimler ikinci savunma hattı olarak değerlendirilen detoksifikasyonla ilişkili basamaklarda fonksiyon görebilmektedir (Ahsan *et al.* 2009).

Vakuolar alıkonmanın ağır metal detoksifikasyonunda önemli bir mekanizma olduğu bilinmektedir (Hall 2002). Vakuolar-H⁺-ATPaz (V-ATPaz) vakuol membranında elektrokimyasal pH derecelenmesinin oluşturulması için ATP hidrolizinden sağlanan enerjiyi kullanmakta (Sun-Wada *et al.* 2003) ve bu derecelenme toksik iyonların vakuolde birikimi için itici gücü sağlamaktadır (Hamilton *et al.* 2001). V-ATPaz'ların serbest veya tiyol bileşiklerine bağlı Cd iyonlarının vakuole taşınmasını sağlayan pH derecelenmesini oluşturduğu belirtilmiştir (Mendoza-Cózatlı and Moreno-Sánchez 2005). Bu nedenle, V-ATPazın Cd detoksifikasyonunda fonksiyon görebildiği belirtilmiştir (Wang *et al.* 2011b). Birkaç proteomik çalışmada Cd ve Cr stresinin V-ATPaz proteininin sentezinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Ge *et al.* 2009; Wang *et al.* 2011b; Sharmin *et al.* 2012).

Metallotiyoneinler (MT'ler) düşük moleküler ağırlıklı, sisteince zengin ve metal şelasyonu için tiyol gruplarına sahip bir grup metal bağlayıcı proteindir (Cobbett and Golsbrough 2002). ABC (ATP-binding cassette) taşıyıcılar metal iyonlarının vakuollerde veya hücre çeperinin dışında alıkonulmasında fonksiyon görmektedir (Sanchez-Fernandez *et al.* 2001; Martinoia *et al.* 2002). Her iki proteinin sentezindeki artış ağır metal stresine maruz bırakılmış bitki türlerinde belirlenmiştir (Alvarez *et al.* 2009;

Visioli *et al.* 2012). Bununla birlikte, ağır metal konsantrasyonu ve MT içerikleri arasında korelasyon kurulamamasına karşın, bu proteinin içeriği *Thlaspi caerulescens*, *Arabidopsis halleri*, *Silene paradoxa* ve *Silene vulgaris* gibi hiperakümülatör türlerde belirlenmiştir (van Hoof *et al.* 2001; Mengoni *et al.* 2003; Chiang *et al.* 2006; van de Mortel *et al.* 2006; Visioli *et al.* 2012).

2.7.1.6. Protein Metabolizması ile İlişkili Proteinler

Ağır metal stresi altındaki bitkilerde transkripsiyon ve translasyon ile ilgili birçok proteinin sentezinde farklılıklar tespit edilmiştir (Lee *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2011; Wang *et al.* 2013). Uzama faktörleri (EF) translasyonel uzamayı sağlayan bir protein setidir. Kloroplast translasyonel EF-Tu ve EF-P proteinlerinin miktarının Cd stresi altındaki *Arabidopsis thaliana* ve çeltik bitkilerinde arttığı belirtilmiştir (Ge *et al.* 2009; Lee *et al.* 2010; Semane *et al.* 2010; Cai *et al.* 2011). Kloroplastik EF-Tu'nun bitkilerde sıcaklık toleransına katkıda bulunduğu ve sıcaklığa hassas kloroplast proteinlerini termal çökmeden ve inaktivasyondan koruyan bir moleküler şaperon olarak işlev gördüğü bildirilmiştir (Ristic *et al.* 2007). Wang vd. (2013), EF-2 proteininin Al'a hassas çeltik çeşidinde arttığı ve EF-2'nin bir erken cevap geni olduğu ve Al stresine adaptasyonda bir negatif düzenleyici olarak fonksiyon görebileceğini belirtmiştir. Bununla birlikte, Cd hiperakümülatörü *Phytolacca americana* bitkilerinde EF-2'nin Cd stresine cevap olarak azaldığı bildirilmiştir (Zhao *et al.* 2011).

Sıcaklık şoku proteinleri (HSP) normal koşullar altında hücrelerde bulunmasına karşın, ağır metaller gibi birçok stres koşulunda sentezleri artış gösterebilmektedir. Protein-protein etkileşimleri, katlanma, parçalanma, hücre içi lokalizasyon, salgılama ve zarar görmüş proteinlerin yeniden aktivasyonu gibi birçok olayda HSP'ler önemli rol oynamaktadır (Parsell and Lindquist 1993). Sharmin vd. (2012), Cr(VI) stresine maruz kalan bitkilerde HSP70 ailesine ait üç proteinin ifadesinin arttığını belirtmiştir. Bununla birlikte, Cd stresi altındaki soya fasulyesinde HSP70 proteininin ifadesinde azalma belirlenmiştir (Hossain *et al.* 2012b). HSP70 hücrelerin her bölümünde olmasına karşın, şaperonin 60 mitokondri ve plastidlerde daha fazla bulunmaktadır (Nelson *et al.* 1992).

Şaperonin 60 proteininin çeltik yapraklarında Cd stresine cevap olarak azaldığı bildirilmiştir (Lee *et al.* 2010). Şaperonin 60, yeni sentezlenen proteinlerin katlanması ve oligomerizasyonunda, multimerik yapının kurulması ve bozulmasında ve birçok stres koşulunda koruyucu proteinlerin denatürasyonunda fonksiyon görmektedir (Nelson *et al.* 1992). *Arabidopsis*'te şaperonin 60 geninin delesyonunun, sistemik kazanılmış direnç gibi savunma cevaplarının oluşumuna neden olan hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir (Ishikawa *et al.* 2003). Bu nedenle, şaperonin 60 proteininin ifadesindeki azalmanın genel bir stres cevabı olarak bitki savunma sistemi ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Lee *et al.* 2010). Bununla birlikte, HSP90 protein ailesi protein katlanmasının yanı sıra sinyal iletim ağında ve stres adaptasyonunda önemli rol oynamaktadır (Wang *et al.* 2004). Çeltik bitkilerinde HSP90 proteininin ağır metal stresi, yüksek sıcaklık ve tuzluluk gibi çeşitli abiyotik stresler tarafından teşvik edildiği bildirilmiştir (Liu *et al.* 2006; Song *et al.* 2013).

Sıcaklık şoku proteinlerine ek olarak protein disülfid izomeraz (PDI) proteininin miktarındaki ağır metal teşvikli değişimler birçok proteomik çalışmada gösterilmiştir (Ahsan *et al.* 2008; Zeng *et al.* 2011; Chen *et al.* 2012). Bir endoplazmik retikulum proteini olan PDI, yanlış oluşmuş disülfid bağlarını düzelterek yeni sentezlenen proteinlerin olgunlaşmasında önemli rol oynamaktadır (Song and Wang 1995). Bu durum, ağır metal stresi altındaki bitkilerde moleküler şaperonların teşvikinin proteinlerde meydana gelebilecek zararı önleyebildiğini göstermektedir (Ahsan *et al.* 2009).

2.7.1.7. Sinyal İletim Mekanizması ve Sekonder Metabolizma ile İlişkili Proteinler

Bitkilerde Ca^{+2} ve kalmodulin mesaj sisteminin bitki-çevre etkileşimlerinde fonksiyon gördüğü bilinmektedir (Arazi *et al.* 2000). Kalmodulin bağımlı protein kinazlar (CPK) Ca^{+2} -kalmodulin kompleksleri tarafından düzenlenmektedir. Bu protein ailesinin bazı üyeleri metal taşıyıcıları olarak fonksiyon görebilmektedir. Tütün bitkilerinde kalmodulin bağlayıcı plazma membran proteininin (NtCBP4) halkasal-nükleotid kapılı seçici olmayan katyon kanallarının yapısına benzer olduğu tespit edilmiştir. Transgenik

bitkilerde aşırı NtCBP4 ifadesinin Pb alımını ve hassasiyetini arttırdığı buna karşın Ni alımını azaltarak Ni toleransında artışa neden olduğu bildirilmiştir (Arazi *et al.* 2000). Bununla birlikte, Cr(VI) stresinin CPK miktarında artışa neden olduğu bildirilmiştir (Sharmin *et al.* 2012).

Birçok proteomik çalışmada, antioksidan ve savunma ile ilişkili proteinlerin yanı sıra jasmonik asit (JA), etilen ve salisilik asit (SA) gibi sinyal yolları ile ilgili proteinlerin farklı şekilde ifade olduğu gösterilmiştir (Çizelge 2.2). Bitki hormonları ağır metal toleransının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bununla birlikte, ağır metal toleransının hormonal düzenlenme mekanizması ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Kadmiyumun Cd stres cevaplarının düzenlenmesinde, poliaminler ve etilen hormonlarının fonksiyon gördüğü bildirilmiştir (Groppa *et al.* 2001; Yakimova *et al.* 2008). Birçok proteomik çalışmada, etilen ve poliamin biyosentezinde rol alan S-adenozil-L-metiyonin (SAM) sentetaz proteininin miktarında önemli artış belirlenmiştir (Aloui *et al.* 2009; Sharmin *et al.* 2012; Wu *et al.* 2013). Bitkilerde SAM, 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit (ACC) ve ACC'de etilen biyosentezi için substrattır. SAM sentetaz ve ACC'den etilen biyosentezinde rol alan ACC oksidaz enzimlerinin ağır metallerce teşvik edilmesiyle etilen üretiminin arttığı ve dolayısıyla bu artışın ağır metal teşvikli hücre ölümü ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Yakimova *et al.* 2006). Bununla birlikte, Cr(VI) stresinin SAM sentetaz miktarını azaltarak SAM ve ACC biyosentezini azalttığı ve bu nedenle azalan etilen sentezinin Cr(VI) teşvikli senesensi geciktirdiği bildirilmiştir (Sharmin *et al.* 2012).

Jasmonik asit bitkilerde birçok gelişimsel süreçte fonksiyon görmekle birlikte birçok savunma ile ilişkili genin ifadesini tetikleyen bir sinyal molekülüdür (Turner *et al.* 2002). Bitkilerde 12-okso-fitodienoik asit redüktaz (OPR) jasmonik asidin öncülü olan 12-okso-fitodienoik asit (OPDA)'in siklopenton halkasının sentezini kataliz etmektedir. Ağır metal stresine maruz kalan bitkilerde OPR ifadesinin teşviki hem mRNA hem de protein seviyesinde gösterilmiştir (Agrawal *et al.* 2003; Ahsan *et al.* 2008). Bununla birlikte, ağır metal stresi altındaki bitkilerde JA seviyesinin artması (Rodriguez-Serrano *et al.* 2006),

JA biyosentezi veya sinyal yolunun ağır metal toleransında önemli olduğunu göstermektedir.

Bitkilerde karboksivinil-karboksifosfonat fosforilmutaz sekonder metabolit biyosentezinde sıra dışı C-P bağının oluşumunu kataliz etmektedir. Bu enzimin rolü mikroorganizmalarda iyi bilinmesine karşın (Hidaka *et al.* 1990), yüksek bitkilerdeki rolü hakkında nispeten daha az bilgi mevcuttur. Bununla birlikte, bu enzimin miktarının As stresine maruz bırakılan çeltik yapraklarında azaldığı rapor edilmiştir (Ahsan *et al.* 2010). Çeltik bitkilerinde Osr40c1 proteininin absisik asit (ABA) cevap proteini olduğu aşırı ozmotik koşullara adaptasyonda rol oynadığı gösterilmiştir (Moons *et al.* 1997). Bununla birlikte, Osr40c1 ifade seviyesinin ABA'ya cevap olarak artmasına karşın, JA ve SA tarafından negatif olarak düzenlendiği bildirilmiştir. Ayrıca Osr40c1 proteininin As stresi altındaki çeltik bitkilerinde azaldığı bildirilmiştir (Ahsan *et al.* 2008; 2010).

2.7.1.8. Patojenle İlişkili Proteinler

Bitkilerde çoklu stres cevap proteinleri olarak kabul edilen patojenle ilişkili (PR) proteinler yapısal ve fonksiyonel olarak β -1,3-glukanaz (PR-2), kitinaz (PR-3, PR-4, PR-8 ve PR-11), endoproteinaz (PR-7), peroksidaz (PR-9) ve ribonükleaz (PR-10) gibi 17 farklı aileye sınıflandırılmaktadır (Edreva 2005; van Loon *et al.* 2006). Glukanazlar bitkilerde bol miktarlarda bulunan hidrolitik enzimlerdir. Hwang vd. (2007), çeltik bitkilerinde 27 glukanaz geninin ifade seviyesini farklı gelişim evrelerinin yanı sıra biyotik ve abiyotik faktörlere cevap olarak karakterize etmiştir. Bununla birlikte, glukanaz ifadesinin ağır metaller tarafında da düzenlendiği proteomik yaklaşımla gösterilmiştir (Führs *et al.* 2008; Kieffer *et al.* 2008; Ahsan *et al.* 2010; Lee *et al.* 2010). Glukanazların ağır metal cevaplarındaki rolleri tam olarak açık olmamasına karşın, genel stres cevabı olarak düzenlendiği ileri sürülmüştür (Ahsan *et al.* 2009). Ayrıca, mRNA seviyesinde glukanaz ifadesinin çeltik yapraklarında JA ve etilen gibi bitki hormonları tarafından arttırıldığı bildirilmiştir (Akiyama *et al.* 2009). Bitkilerde metal toksisitesine cevap olarak JA ve etilen seviyesinin artmasının (Rodriguez-Serrano *et al.* 2006) artan glukanaz aktivitesi ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Ahsan *et al.* 2010).

Kitinaz, fungal hücre çeperinin önemli bir bileşeni olan kitini parçalayan proteindir. Bununla birlikte, patojen saldırısı ve ağır metal stresine karşı bitki savunma sisteminin bir bileşenidir (Graham and Sticklen 1994). Birkaç proteomik çalışmada kitinaz izoformlarının ağır metal stresine maruz kalan bitkilerde arttığı rapor edilmiştir (Cai *et al.* 2011; Sharmin *et al.* 2012). Ayrıca, kitinaz proteininin Cd'a hassas çeltik çeşidine göre toleranslı çeşitte daha fazla oranda arttığı bildirilmiştir (Cai *et al.* 2011). Abiyotik streslere maruz bırakılan bitkilerde kitinaz aktivitesindeki artışın sinyal iletim yolları ile çapraz toleransın teşvikinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Sharmin *et al.* 2012). Fungal kitinaz genini ifade eden transgenik tütün bitkilerinin hem fungal enfeksiyona hem de metal ve tuz stresine daha toleranslı olduğu gösterilmiştir (Dana *et al.* 2006). Metal toleransı ve kitinaz izoformları arasındaki ilişki açıklanmaya çalışılsa da, metal spesifik kitinazlar ile yapılacak çalışmalar ağır metal detoksifikasyonu ile ilgili mekanizmaların aydınlatılmasına katkıda bulunacaktır.

Ağır metal stresi altındaki bitkilerde glukanaz ve kitinazların yanı sıra PR-4, PR-5, PR-10 ailelerine ait proteinler, PR-5 benzeri protein, taumatin benzeri protein, P69G gibi patojenle ilişkili proteinlerin farklı şekilde ifade olduğu gösterilmiştir (Führs *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2009; Rodriguez-Celma *et al.* 2010). Çeltik bitkilerinde, ağır metal stresi teşvikli reaktif oksijen birikiminin PR proteinlerinin ifadesini arttırdığı gösterilmiştir (Jwa *et al.* 2006). Sonuç olarak, birçok PR proteininin ağır metaller gibi stres faktörleri tarafından teşvik edilmesi bu proteinlerin sinyal yollarındaki muhtemel fonksiyonunu göstermektedir. Bununla birlikte, bitkilerin ağır metallere olan cevabında PR proteinlerinin kesin rolünü açıklamak için kapsamlı çalışmalara gerek duyulmaktadır.

Bu araştırmada, hidroponik kültür ortamında farklı Cr(VI) konsantrasyonlarına (0, 10, 50 ve 100 μ M) maruz bırakılmış 8 kanola çeşidinde (Champlain, Dante, Heros, Nelson, NK Petrol, Sary, Süzer ve Vactra) fide büyümesi, toprak üstü dokularda Cr birikimi ve yaprak dokularında klorofil içeriği, lipid peroksidasyonu, tiyol içeriği ve süperoksit dismutaz (SOD), guaiakol peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT) gibi bazı antioksidan

enzimlerin aktivitesindeki değişimlerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bununla birlikte, Cr(VI) toleransı ve Cr(VI) teşvikli proteom değişimleri üzerine sülfatın rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, nispeten Cr-toleranlı NK Petrol ve Cr-hassas Sary çeşitlerinde farklı sülfat konsantrasyonlarının [noksan (0 mM), normal (1 mM) ve aşırı (2 mM)] ve Cr(VI) stresinin (100 µM) fide büyümesi, Cr birikimi, lipid peroksidasyonu, klorofil, tiyol, sistein, askorbat ve glutatyon içerikleri, SOD, POD, CAT, askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon S-transferaz (GST) gibi enzimlerin aktivitesi ve metallothionein proteinini kodlayan *BnMP1* geninin (*Brassica napus* metallothionein protein 1) ifadesindeki değişimler üzerine etkileri belirlenmiştir. Bununla birlikte, proteomik yaklaşım kullanılarak sülfat metabolizması ve Cr(VI) stresi ile ilişkili proteinlerin belirlenmesi hedeflenmiştir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Kanola Çeşitlerinin Fitoremediasyon Potansiyellerine İlişkin Analizler

3.1.1. Bitki Materyali ve Bitki Yetiştirme Koşulları

Bu araştırmada, kanola (*Brassica napus* L.) çeşitlerine (Champlain, Dante, Heros, Nelson, NK Petrol, Say, Süzer ve Vectra) ait tohumlar ticari firmalardan ve Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden elde edilmiştir. Kanola çeşitlerine ait 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±1°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 (Diwan *et al.* 2008) transfer edilmiştir. Fideler kontrollü iklim kabininde (23±1°C, 260 µmol m⁻² s⁻¹ foton akış yoğunluğu, 16:8 saat fotoperiyot ve %60 nem) 14 gün boyunca büyütülmüştür. Besin çözeltisinin pH'sı 0.05 M KOH kullanılarak 6.0±0.1'e ayarlanmış ve gün aşırı değiştirilmiştir. Farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının (0-300 µM) kullanıldığı ön çalışmalar ile uygun test konsantrasyonları belirlenmiştir. Nominal Cr(VI) konsantrasyonları [0 (kontrol), 10, 50 ve 100 µM potasyum dikromat] büyüme inhibisyonu temelinde belirlenmiştir. Bununla birlikte, besin çözeltisi içerisindeki Cr konsantrasyonlarının belirlenmesi için çözeltiler nitrik asit ile muamele edilmiştir. Çözeltilerin krom konsantrasyonları ICP-OES (inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy, PerkinElmer Optimal 2100DV) cihazı ile belirlenmiştir. Analitik belirleme limiti Cr için 0.05 mg L⁻¹ olacak şekilde ayarlanmıştır. Besin çözeltilerinin nominal konsantrasyonları için ölçülen Cr konsantrasyonları ve nominal konsantrasyonun geri kazanım oranları (%) Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Farklı nominal Cr konsantrasyonlarına sahip besin çözeltilerinin ölçülen Cr konsantrasyonları ve nominal konsantrasyonların geri kazanım oranları

Nominal konsantrasyon (µM)	Ölçülen konsantrasyon (µM)	Nominal konsantrasyonun geri kazanım oranı (%)
10	9.3 ± 0.3*	93.0
50	47.5 ± 1.4	95.0
100	94.4 ± 2.3	94.4

* Ortalama ± standart sapma (n = 3)

Krom uygulamasının yedinci gününde fideler hasat edilmiş ve aşağıda belirtilen fizyolojik ve biyokimyasal analizlerde kullanılmıştır.

3.1.2. Toprak Üstü Organların Taze ve Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi

Farklı Cr(VI) konsantrasyonlarına maruz bırakılan kanola çeşitlerinin toprak üstü organları 80°C'lik etüvde 48 sa süreyle kurutulmuş ve bu süre sonunda kuru ağırlıkları (KA, mg fide⁻¹) belirlenmiştir. Bununla birlikte, tolerans indeksi (%) değerleri kuru ağırlık temelinde aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir.

$$\text{Tolerans indeksi (\%)} = \frac{KA_{\text{Kontrol}} - KA_{\text{Krom}}}{KA_{\text{Kontrol}}} \times 100$$

3.1.3. Krom Birikiminin Belirlenmesi

Toprak üstü organlarda Cr birikimi NMKL (1998)'ye göre belirlenmiştir. Kuru bitki örnekleri (0.5 g), 10 mL %65'lik HNO₃ kullanılarak mikrodalga fırında (Berghof Products + Instruments, Germany) yakılmıştır. Yakma işlemi sonucunda örnekler filtre edilmiş ve hacimleri bidistile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Stok Cr çözeltisinden (1000 ppm; Inorganic Ventures, Christiansburg, Virginia, USA; CGCR(3)1-1, Lot # A2-CR03007) hazırlanan farklı konsantrasyondaki çözeltilerle 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. Analitik belirleme limiti Cr için 0.05 mg L⁻¹ olacak şekilde ayarlanmıştır. Toprak üstü ve kök dokularında Cr birikimi µg g⁻¹ KA olarak hesaplanmıştır.

3.1.4. Malondialdehit İçeriğinin Belirlenmesi

Kanola fidelerinin yaprak dokularında lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi Heath ve Packer (1968)'in bildirdiği metoda göre yapılmıştır. Yaprak dokusu (250 mg) 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 tiyobarbütirik 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 $\mu\text{mol g}^{-1}$ TA olarak belirlenmiştir.

3.1.5. Klorofil İçeriğinin Belirlenmesi

Kanola fidelerinin yaprak dokularından toplam klorofil (Klo $a + b$) içeriği Wellburn (1994)'e göre belirlenmiştir. 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 ve Klo b absorbansları sırasıyla 666 ve 653 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):

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

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

* S: Seyreltme katsayısı

3.1.6. Tiyol İçeriklerinin Belirlenmesi

Kanola fidelerinin yaprak dokularında protein olmayan 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. Homojenatlar +4°C ve 12.000×g'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra 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×g'de santrifüj edilmiştir. Santrifügasyondan sonra 2 mL süpernatant 1.9 mL 400 mM Tris-HCl (pH 8.9) tamponu ve 0.1 mL 10 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asit (Ellman's ayırıcı) çözeltileri ile karıştırılmıştır. Karışım 5 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).

3.1.7. Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Kanola fidelerinin yaprak dokuları (500 mg) 1 mM EDTA, %1 (w/v) polivinilpirrolidon (PVP) 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), guaiakol peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Süpernatantlardaki protein miktarı Bradford (1976)'a göre belirlenmiştir.

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.

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 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein olarak belirlenmiştir.

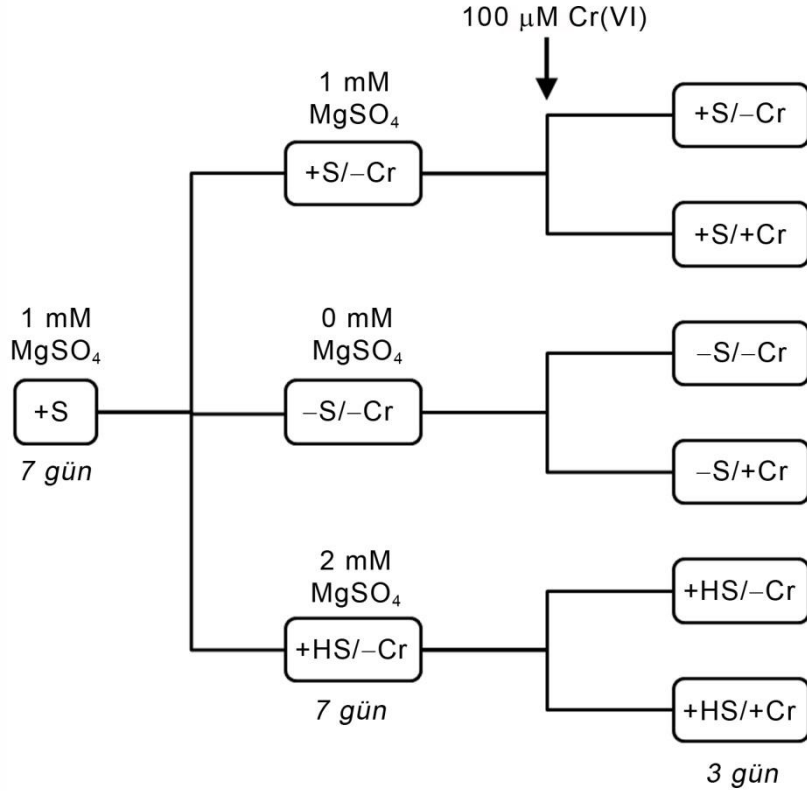
Toplam katalaz aktivitesi (CAT; EC 1.11.1.6) Aebi vd. (1984)'ne göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) ve 10.6 mM H₂O₂ içermektedir. Reaksiyon 25 μL enzim ekstraktının ilave edilmesi ile başlatılmıştır. CAT aktivitesi, H₂O₂'in 3 dakika için 240 nm'de ($\epsilon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

3.2. Sülfat Kullanılabilirliğine Bağlı Krom Toleransı Analizleri

3.2.1. Bitki Yetiştirme Koşulları, Sülfat ve Stres Uygulamaları

Bu araştırmada, tolerans indeksi (%) değerlerine göre nispeten Cr-toleranslı (NK Petrol) ve Cr-hassas (Sary) olarak belirlenen kanola çeşitlerine ait 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±1°C, karanlık, %60 nem) 24 saat çimlendirilmiştir. Çimlenen tohumlar içerisinde besin çözeltisi bulunan 1 L'lik kaplara transfer edilmiştir. Besin çözeltisi 200 μM KNO₃, 200 μM Ca(NO₃)₂, 40 μM KH₂PO₄, 1000 μM MgSO₄, 10 μM FeNaEDTA, 4.6 μM H₃BO₃, 0.16 μM CuCl₂, 0.9 μM MnCl₂·2H₂O, 0.09 μM ZnCl₂ ve 0.01 μM NaMoO₄·2H₂O bileşiklerini içermektedir (Schiavon *et al.* 2007). Fideler kontrollü iklim kabininde (23±1°C sabit sıcaklık, 260

$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğu, 16:8 saat fotoperiyot ve %60 nem) hidroponik olarak 7 gün boyunca S-yeterli (1 mM S) besin çözeltisinde büyütülmüştür. Sonrasında fideler farklı S konsantrasyonlarında [0 mM S (-S), 1 mM S (+S) ve 2 mM S (+HS)] 7 gün daha büyütülmüştür. On dört günlük fideler 3 gün süreyle 6 farklı uygulamaya maruz bırakılmıştır: (1) +S/-Cr; 1 mM sülfat, 0 μM Cr(VI) (kontrol), (2) +S/+Cr; 1 mM sülfat, 100 μM Cr(VI), (3) -S/-Cr; 0 mM sülfat, 0 μM Cr(VI) (kükürt eksikliği), (4) -S/+Cr; 0 mM sülfat, 100 μM Cr(VI) (kombine stres), (5) +HS/-Cr; 2 mM sülfat, 0 μM Cr(VI) (aşırı S uygulaması) ve (6) +HS/+Cr; 2 mM sülfat, 100 μM Cr(VI). Bu periyot sonunda fideler farklı sülfat konsantrasyonları içeren besin çözeltilerine transfer edilmiştir: eksik (0 mM S; -S), yeterli (1 mM S; +S) ve aşırı (2 mM S; +HS). Sülfat noksanlığı için MgSO_4 yerine eş konsantrasyonda MgCl_2 kullanılırken, +HS uygulaması için MgSO_4 konsantrasyonu iki katına çıkarılmıştır. Besin çözeltisinin pH'sı 6.0 ± 0.1 'e ayarlanmış ve çözelti gün aşırı değiştirilmiştir. Krom uygulamasının 3. gününde fideler hasat edilmiş ve bazı fizyolojik ve biyokimyasal analizlerde kullanılmıştır.



Şekil 3.1 Kanola fidelerinde kükürt (S) ve Cr(VI) uygulamalarının şematize gösterimi.

3.2.2. Büyüme Parametreleri ve Krom Birikiminin Belirlenmesi

Altı farklı uygulama grubundan elde edilen nispeten Cr-toleranslı NK Petrol ve Cr-hassas Sary çeşitlerine ait fidelerin toprak üstü organlarının (gövde+yaprak) taze ağırlıkları (TA, mg fide⁻¹) belirlendikten sonra 80°C'lik etüvde 48 sa süreyle kurutulmuş ve bu süre sonunda kuru ağırlıkları (KA, mg fide⁻¹) belirlenmiştir. Bununla birlikte, toprak üstü organlarda Cr birikimi NMKL (1998)'e göre belirlenmiştir. Krom birikimi ICP/OES (Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry, Perkin Elmer 2100 DV) cihazı ile kullanılarak belirlenmiştir. Toprak üstü ve kök dokularında Cr birikimi µg g⁻¹ KA olarak hesaplanmıştır.

3.2.3. Malondialdehit ve Klorofil İçeriğinin Belirlenmesi

Kanola fidelerinin yaprak dokularında lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) miktarı, detayları Başlık 3.1.4 altında verilen Heath ve Packer (1968)'in metoduna göre belirlenmiştir. Yaprak dokularından toplam klorofil (Klo *a* + *b*) içeriği, detayları Başlık 3.1.5 altında verilen Wellburn (1994)'ün metoduna göre belirlenmiştir.

3.2.4. Enzimatik ve Enzimatik Olmayan Antioksidanların Belirlenmesi

Kanola fidelerinin yaprak dokuları (500 mg) 1 mM EDTA, %1 (w/v) polivinilpirrolidon (PVP) içeren 5 mL potasyum fosfat tamponunda (50 mM, pH 7.0) homojenize edilmiştir. Homojenat +4°C ve 14.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar SOD, POD, CAT, askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon S-transferaz (GST) aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Süpernatantlardaki protein miktarı Bradford (1976)'a göre belirlenmiştir.

SOD, POD ve CAT aktiviteleri, detayları Başlık 3.1.7 altında verilen metotlar kullanılarak sırasıyla Beauchamp ve Fridovich (1971), Mika ve Lüthje (2003) ve Aebi vd. (1984)'ne göre belirlenmiştir.

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 H₂O₂ (5 mM) 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 hesaplanmıştır.

Glutasyon redüktaz (GR; EC 1.8.1.7) aktivitesi Carlberg ve Mannervik (1985)'e göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 0.1 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.2), 1 mM GSSG, 0.1 mM NADPH ve enzim ekstraktından oluşmaktadır. Reaksiyon 0.1 mL süpernatantın eklenmesiyle başlatılmış ve 340 nm'de absorbanstaki azalış gözlemlenmiştir. Enzim aktivitesi 1 µmol GSSG'un indirgenmesini katalizleyen enzim miktarı olarak belirlenmiştir.

Glutasyon S-transferaz (GST; EC 2.5.1.18) aktivitesi Habig ve Jacoby (1981)'e göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 0.1 M potasyum fosfat tamponu (pH 6.5), 1 mM EDTA, 1 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB), 1 mM GSH ve enzim ekstraktından oluşmaktadır. Reaksiyon, enzim ekstraktının eklenmesiyle başlatılmış ve 340 nm'de absorbanstaki artış belirlenmiştir. GST aktivitesi $9.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

Kanola fidelerinin yaprak dokularında toplam askorbat (AsA + DHA) ve indirgenmiş askorbat (AsA) içerikleri Hodges vd. (1996)'ne göre belirlenmiştir. Taze yaprak dokuları (300 mg) %5'lik ö-fosforik asit içerisinde homojenize edildikten sonra 12,000 g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Toplam askorbat içeriği süpernatant, 5 mM EDTA içeren 150 mM potasyum fosfat tamponu ve DHA'ı AsA'a indirgemek için 10 mM ditiyoteritol (DTT) içeren reaksiyon karışımı ile belirlenmiştir. Bu karışım 50 dakika laboratuvar koşullarında tutulduktan sonra fazla DTT'nin uzaklaştırılması için üzerine %0.5'lik N-etilmaleimid ilave edilmiştir. Daha sonra her bir tüpe 0.61 M trikloroasetik asit, 0.8 M

ortofosforik asit, α,α' -bipyridyl ve $30 \text{ g L}^{-1} \text{ FeCl}_3$ eklenmiş ve 1 saat 40°C 'de inkübe edilmiştir. AsA içeriği ise DTT ve N-etilmaleimid yerine distile su kullanılarak yukarı belirtilen metoda göre belirlenmiştir. Toplam askorbat ve indirgenmiş askorbat içerikleri L-askorbat ile hazırlanan standart eğri ile belirlenmiştir. DHA içeriği ise toplam AsA'dan indirgenmiş AsA'nın çıkarılması ile hesaplanmıştır.

Kanola fidelerinin yaprak dokularında indirgenmiş (GSH) ve yükseltgenmiş (GSSG) glutasyon içerikleri Griffith (1980)'in bildirdiği metoda göre belirlenmiştir. Yaprak dokusu (500 mg) %5'lik sülfosalisilik asit çözeltisinde homojenize edilmiş ve homojenant $+4^\circ\text{C}$ 'de 10 dakika $12.000 \times g$ 'de santrifüj edilmiştir. Santifügasyon sonrası 300 μL süpernatant 18 μL 7.5 M trietanolamin ile nötralize edilmiştir. Yalnızca GSSG'nin belirlenebilmesi için 150 μL nötralize edilmiş örnek 3 μL 2-vinilpiridin ile 60 dakika 20°C 'de inkübe edilmiştir. Diğer 150 μL 'lik örnek ise toplam glutasyonun (GSH+GSSG) içeriğinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Her iki tip örnekten 50 μL alınmış ve 0.3 mM NADPH, 10 mM ditiyobisnitro benzoik asit (DTNB) ve 6.3 mM EDTA içeren 125 mM sodyum fosfat tamponu (pH 6.5) ile karıştırılmıştır. Karışıma 10 μL glutasyon redüktaz (5 U mL^{-1}) ilavesiyle reaksiyon başlatılmış ve absorbanstaki değişim 421 nm'de izlenmiştir. GSH ve GSSG içeriklerinin belirlenmesi için GSH ve GSSG kullanılarak hazırlanan standart eğriler kullanılmıştır.

3.2.5. Sistein ve TiyoI İçeriklerinin Belirlenmesi

Kanola fidelerinin yaprak dokularında sistein içerikleri Gaitonde (1967)'nin bildirdiği standart protokole göre belirlenmiştir. Yaprak dokuları (500 mg) %5'lik perklorik asitte ekstrakte edilmiş ve homojenantlar $+4^\circ\text{C}$ ve $10.000 \times g$ 'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant eş hacimde ninhidrin ayırıcı ve glasiyal asetik asit ile muamele edilmiştir. Örnekler 95°C 'de 30 dakika inkübe edildikten sonra buz üzerinde soğutulularak reaksiyon durdurulmuştur. Oluşan renk 560 nm dalga boyunda okunmuş ve sistein içeriği L-sistein ile elde edilen standart eğriyle belirlenmiştir. Sistein içeriği $\text{nmol g}^{-1} \text{ TA}$ olarak ifade edilmiştir.

Kanola fidelerinin yaprak dokularında tiyol içerikleri, detayları Başlık 3.1.6 altında verilen Nagalakshmi ve Prasad (2001)'in bildirdiği metoda göre belirlenmiştir.

3.2.6. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Analizleri

Altı farklı uygulama grubundan elde edilen Cr-toleranslı NK Petrol ve Cr-hassas Sary çeşitlerine ait fidelerin yaprak dokularından total RNA izolasyonu RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 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.

Tek iplik cDNA (komplementer DNA=tamamlayıcı DNA) sentezi QuantiTect[®] Reverse Transcription kiti (Qiagen) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılmış 1 µg RNA içeren örnekler genomik DNA (gDNA)'nın etkin bir şekilde uzaklaştırılması için 2 dakika 42°C'de gDNA 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 Transkriptaz 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.

Brassica napus metalloiyonein 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 Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2 *BnMP1* ve *BnActin* genleri için tasarlanmış primer çiftleri

Gen		Primer
<i>BnMP1</i>	İleri (Forward)	5'-TACCACCACCCAGACTCTTG
	Geri (Reverse)	5'-GCAGACAGATCCGCACTTG
<i>BnActin</i>	İleri (Forward)	5'-CAGACCGTATGAGCAAAGAGAT
	Geri (Reverse)	5'-CTGAGGGAAGCAAGAATGGAA

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. 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.

3.2.7. Proteomik Analizler

3.2.7.1. Protein Ekstraksiyonu

Altı farklı uygulama grubundan elde edilen Cr-toleranslı NK Petrol ve Cr-hassas Sary çeşitlerine ait fidelerin taze yaprak dokularından proteinlerin ekstraksiyonu fenol ekstraksiyon metoduna göre gerçekleştirilmiştir (Hurkman and Tanaka 1986; Ahsan *et al.* 2008). Yaprak dokuları (1 g) havan ve tokmağı kullanılarak sıvı azot içerisinde toz haline getirilmiş ve 0.5 M Tris-HCl (pH 8.3), %2 v/v NP-40, 20 mM MgCl₂, %2 v/v β-merkaptoetanol, 1 mM fenilmetansülfonil florid ve 0.7 M sukroz içeren 5 mL Mg/NP-40 ekstraksiyon tamponunda homojenize edilmiştir (Kim *et al.* 2001). Her bir uygulama grubuna ait homojenatlar falkon tüplerine transfer edilmiş ve 10 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra homojenata eşit hacimde Tris-HCl ile doyurulmuş fenol çözeltisi eklenmiş ve 10 dakika boyunca laboratuvar koşullarında inkübe edildikten sonra 3.500 ×g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifügasyondan sonra üst kısımda kalan fenol faz ayrı bir tüpe alınmış ve eş hacimde ekstraksiyon tamponu ilave edildikten sonra 10 dakika laboratuvar koşullarında inkübe edilmiştir. Daha sonra tüpler 3.500 ×g'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve üst kısımda kalan fenol faz temiz bir falkon tüpüne transfer edilmiştir. Proteinlerin çöktürülmesi için tüplere 0.1 M amonyum asetat içeren 4 hacim soğuk metanol ilave edilmiş ve -20°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Bu periyot sonunda çöktürülmüş proteinler 10 dakika 3.500 ×g'de santrifüj edilmiş ve elde edilen protein peleti 3 kez 0.1 M amonyum asetat içeren soğuk metanol ve bir kez aseton ile yıkanmıştır. Her yıkama basamağında tüpler 10 dakika 3.500 ×g'de santrifüj edilmiştir. Son yıkama basamağından sonra tüpler santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüpte kalan peletler desikatörde kurutularak kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır. Peletler rehidrasyon tamponunda (7 M urea, 2 M thiourea, %4 (w/v) CHAPS, 40 mM DTT ve %0.2 Ampholyte pH 3-10) çözülmüş ve peletlerdeki protein miktarları Bradford (1976)'a göre belirlenmiştir. Protein standardı olarak Bovine Serum Albumin (BSA) kullanılmıştır.

3.2.7.2. İki-Yönlü (2-D) Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Protein profillerindeki polimorfizmler iki-yönlü (2-D) poliakrilamid jel elektroforezi (İzoelektrik Fokuslama/Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi, IEF/SDS-PAJE) tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Elektroforezin ilk yönü olan IEF'de, Protean® i12™ IEF Cell (Bio-Rad) sisteminde IPG (immobilized pH gradient) stripleri (pH 4-7, 17 cm) kullanılarak proteinler izoelektrik noktalarına göre ayrıştırılmıştır. Protein peletleri rehidrasyon tamponunda çözünmüş ve 1 saat laboratuvar koşullarında inkübe edildikten sonra 10 dakika 10.000 $\times g$ 'de santrifüj edilmiştir. Görüntü analizlerinde kullanılacak analitik jeller için 80 μg protein, kütle spektrometrisi analizlerinde kullanılacak preparatif jeller için ise 500 μg protein IPG striplere yüklenmiştir. Rehidrasyon işlemi laboratuvar koşullarında 16 saat olacak şekilde pasif olarak gerçekleştirilmiştir. Rehidrasyon işleminin ardından IPG stripler Protean IEF Cell sistemine transfer edilmiş ve toplamda 70.000 V olacak şekilde IEF işlemi gerçekleştirilmiştir.

IEF'den sonra stripler 15 dakika dengeleme çözeltisi I [6 M urea, 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, %2 (w/v) SDS, %20 (v/v) gliserol ve %2 (w/v) DTT] ve 15 dakika dengeleme çözeltisi II [6 M urea, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, %2 (w/v) SDS, %20 (v/v) gliserol ve %2.5 (w/v) iodoacetamide] ile muamele edilmiştir. Dengeleme basamağından sonra ikinci yön olan SDS-PAJE %12'lik akrilamid jelde (%30 akrilamid/bisakrilamid, 1.5 M Tris-HCl tamponu, pH 8.8, %10 SDS, %10 amonyum persülfat ve TEMED) Laemmli (1970)'ye göre gerçekleştirilmiştir. 2-D elektroforez için PROTEAN II XL Cell (Bio-Rad) kullanılmıştır. Protein standardı olarak 14.4-97.4 kDa aralığında SDS-PAGE standardı (Bio-Rad) kullanılmıştır. 2-D elektroforez işleminden sonra jeller boyama işlemlerine kadar fiksatif içerisinde saklanmıştır.

3.2.7.3. Jelleri Boyanması ve Görüntü Analizleri

Analitik jellerdeki protein benekleri gümüş boyama (Çizelge 3.3) kullanılarak görünür hale getirilmiştir (Sinha *et al.* 2001). Bununla birlikte, kütle spektrometrisi analizleri için

hazırlanan preparatif jellerdeki protein benekleri koloidal CBB (Coomassie Brilliant Blue) boyama yöntemi kullanılarak görünür hale getirilmiştir (Neuhoff *et al.* 1988). Perparatif jeller %2 fosforik asit içeren %50'lik etil alkol çözeltisinde gece boyunca fikse edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra jeller iki kez distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra jeller %0.12 CBB, %10 amoyum sülfat, %10 fosforik asit ve %20 metil alkol içeren çözeltide inkübe edilmiştir. Boyama işleminden sonra jel zeminindeki fazla boyanın uzaklaştırılması için jeller birkaç kez distile su ile yıkanmıştır.

Çizelge 3.3 Gümüş boyama yöntemi

Basamak	Çözelti	Süre
<i>Hassaslaştırma</i>	3 g/L potasyum tetratiyonat, 0.5 M potasyum asetat, %30 etanol	45 dk
<i>Yıkama</i>	Distile su	6 × 10 dk
<i>Boyama</i>	2 g/L gümüş nitrat	30 dk
<i>Yıkama</i>	Distile su	4 × 30 s
<i>Geliştirme</i>	30 g/L potasyum karbonat, 300 µL/L formaldehit (%40), 125 µL/L sodyum tiyosülfat (%10)	15-30 dk
<i>Durdurma</i>	40 g/L Tris, 20 mL/L asetik asit	30 dk

Gümüş ve CBB boyalı jeller ChemiDoc™ MP jel görüntüleme sistemi (Bio-Rad) ile görüntülenmiştir. Farklı şekilde ifade olan proteinler (sentezi artan ve/veya azalan) PDQuest yazılımı (versiyon 8.0.1, Bio-Rad) ile saptanmış ve nispi hacimleri temelinde miktarları belirlenmiştir. Bir protein beneğinin miktarı, jel görüntüsünde beneği oluşturan tüm piksellerin toplam yoğunluğu olarak tanımlanan protein hacmi olarak ifade edilmiştir. Bununla birlikte, her bir protein beneğinin hacmi protein miktar tayini, örnek yükleme veya jel boyama basamaklarında meydana gelebilecek olası hataları telafi etmek için jelde bulunan tüm protein beneklerinin toplam hacminin yüzdesi olacak şekilde normalize edilmiştir.

3.2.7.4. Jeldeki Proteinlerin Tripsin ile Kesimi

Seçilmiş protein benekleri CBB boyalı jellerden EXQuest Spot Cutter (Bio-Rad) cihazı kullanılarak kesilmiş ve 0.6 mL'lik steril tüplere alınmıştır. Protein beneklerinin triptik kesimi için In-Gel Tryptic Digestion Kiti (Thermo Scientific) kullanılmıştır. Fazla boyanın uzaklaştırılması için kesilen jel parçaları 2 g/L amonyum bikarbonat içeren %50'lik asetonitril çözeltisi ile 37°C'de 30 dakika muamele edilmiştir. Boya uzaklaştırma çözeltisi tüplerden uzaklaştırıldıktan sonra indirgenme ve alkilasyon basamaklarına geçilmiştir. İndirgenme basamağı için jel parçacıkları 50 mM Tris(2-karboksietil)fosfin çözeltisi içeren 2 g/L amonyum bikarbonat çözeltisi ile 60°C'de 10 dakika muamele edilmiştir. Bu periyot sonunda indirgenme çözeltisi uzaklaştırılmış ve alkilasyon için jel parçacıkları 100 mM iodoasetamid ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Alkilasyon tamponu uzaklaştırıldıktan sonra jel parçaları 2 g/L amonyum bikarbonat %50 asetonitril çözeltisi ile 37°C'de 15 dakika muamele edilmiştir. Jel parçalarını dehidrate etmek için örnekler konsantre asetonitril ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. Asetonitril çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra örnekler oda sıcaklığında kurutulmuştur. Daha sonra kurutulmuş jel parçacıkları üzerine aktive edilmiş tripsin (10 ng/ μ L) eklenmiş ve 30°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda tüpler içerisindeki çözelti yeni bir tüpe alınmış ve vakum konsantratör (Eppendorf, Germany) ile kurutulmuştur. Daha sonra kurutulmuş örnekler 10 μ L %0.1'lik trifloroasetik asit (TFA) ile yeniden süspansiyon edilmiş ve kütle spektrometrisi analizlerinde kullanılmaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.2.7.5. Kütle Spektrometrisi Analizleri

Kütle spektrometrisi analizleri için %0.1'lik TFA'da çözünmüş peptidler ZipTip C₁₈ (Millipore, Bedford, MA, USA) kullanılarak konsantre hale getirilmiştir. Peptid çözeltileri, %50 asetonitril ve %0.1 TFA ile doyurulmuş 10 mg L⁻¹ α -siyano-4-hidroksisinnamik asit (matriks) ile karıştırılmıştır. Daha sonra yaklaşık 1 μ L çözelti MALDI plakasına yerleştirilmiş ve kuruması sağlanmıştır. Kütle spektrometrisi analizleri AB Sciex TOF/TOF 5800 kütle spektrometrisi cihazı (Applied Biosystems, Framingham,

MA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kütle spektrumu (m/z 800–3000) pozitif iyon reflektör modunda elde edilmiştir. Bir protein beneği için MS modundan elde edilen 10 pik, MS/MS fragmentasyonu için seçilmiştir. MS/MS modu 1 kV'lık çarpışma (collision) enerjisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çarpışma teşvikli fragmentasyon için çarpışma gazı olarak hava kullanılmıştır. Öncü MS spektrumları için internal kalibrasyon olarak otolitik tripsin peptidleri kullanılmıştır. Glu-Fib fragmentleri ile elde edilen eksternal kalibrasyon ise MS/MS spektrumlarına uygulanmıştır. MS verileri GPS Explorer (Applied Biosystem) ve MASCOT (Matrix Science, London, UK) yazılımları kullanılarak veri tabanlarına karşı taranmıştır. Protein tanımlamada seçilen tarama parametreleri Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4 Protein tanımlamada seçilen tarama parametreleri

Parametre	
<i>Enzim</i>	Tripsin
<i>Değişken modifikasyonlar</i>	Metiyonin oksidasyonu
<i>Sabit modifikasyonlar</i>	Sistein karbamidometilasyonu
<i>Peptid toleransı</i>	50 ppm
<i>MS/MS toleransı</i>	0.4 dalton
<i>Taksonomi</i>	Viridiplantae (yeşil bitkiler)
<i>Cihaz</i>	MALDI-TOF/TOF

Veri tabanı araması SwissProt ve NCBI'nin protein veri tabanına karşı yapılmıştır. MS/MS verilerine göre önemli düzeyde yüksek MASCOT skorlarına (güven aralığı %95'den daha büyük) sahip protein, güvenilir şekilde tanımlanmış protein olarak kabul edilmiştir.

3.4. İstatistik Analizler

Denemeler, rastgele deneme deseninde düzenlenmiştir. Denemelerden elde edilen veriler en az üç tekrarlı olarak düzenlenmiş iki bağımsız denemeden elde edilmiştir. Analizlerden elde edilen veriler SPSS paket programı (SPSS ver. 16, Chicago, IL, USA) kullanılarak analiz edilmiştir. Proteomik analizler hariç, diğer tüm analizlerden elde edilen ortalamalar arasındaki önemli farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir ($P < 0.05$).

4. BULGULAR

4.1. Kanola Çeşitlerinin Fitoremediasyon Potansiyellerinin Belirlenmesi

4.1.1. Fide Büyümesi ve Krom Birikimi Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi

Varyans analizi (ANOVA) test edilen tüm parametreler üzerine çeşit, Cr(VI) stresi ve bu etmenlerin etkileşimlerinin önemli ($P<0.001$) etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.1). Bu çalışmada, sekiz kanola çeşidinin Cr(VI) stresine olan toleranslarındaki genotipik çeşitlilik değerlendirilmiştir. Tüm çeşitlerin kuru ağırlıkları kontrole göre Cr(VI) konsantrasyonlarında önemli düzeyde ($P<0.05$) azalmıştır (Çizelge 4.2). Kanola çeşitlerinin kuru ağırlıklarındaki azalmalar 10, 50 ve 100 μM Cr(VI) konsantrasyonlarında sırasıyla %18-35, %20-50 ve %26-59 olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, tolerans indeksi (%) değerleri NK Petrol çeşidinde en yüksek (%82.5-74.1), Sary çeşidinde ise en düşük (%65.7-40.8) bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Kanola çeşitlerinin toprak üstü dokularında Cr birikimi Cr(VI) konsantrasyonunun artışına bağlı olarak önemli düzeyde ($P<0.05$) artış göstermiştir (Çizelge 4.2). Kanola çeşitleri arasında en yüksek Cr birikimi $705.8 \mu\text{g g}^{-1}$ KA ile Sary çeşidinde belirlenirken, en düşük Cr birikimi $255.0 \mu\text{g g}^{-1}$ KA ile NK Petrol çeşidinde belirlenmiştir.

Çizelge 4.1 Cr(VI) stresine maruz kalan kanola çeşitlerinde kuru ağırlık (KA), tolerans indeksi (Tİ), Cr birikimi (Cr), malondialdehit (MDA), klorofil (Klo), protein olmayan tiyol (NPT), süperoksit dismutaz (SOD), guaiakol peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT) verilerinin varyans analizinden elde edilen ortalama kareler

Ana etmen	df	KA	Tİ	Cr	MDA	Klo	NPT	SOD	POD	CAT
Çeşit (Ç)*	7	1081.1	671.3	19.67	350.9	20.14	4.72	871.8	377.8	61.76
Cr(VI)*	3	4422.9	2312.8	1265.0	3594.2	54.89	14.26	1617.7	1932.4	20.53
Ç × Cr(VI)*	21	98.06	54.4	18.27	67.17	7.19	0.38	77.02	149.1	2.62
Hata	160	9.37	14.39	7.45	24.15	0.34	0.13	9.03	5.41	0.69

* 0.001 seviyesinde önemlidir.

Çizelge 4.2 Kanola çeşitlerinin kuru ağırlık, tolerans indeksi ve Cr birikimi üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının etkisi

Çeşit	Nominal Cr(VI) konsantrasyonu (μM)			
	0	10	50	100
Kuru ağırlık (mg fide^{-1})				
Champlain	$56.0 \pm 1.2^{\text{def}}$	$42.7 \pm 1.5^{\text{jk}}$	$32.0 \pm 0.6^{\text{mn}}$	$28.7 \pm 0.9^{\text{n}}$
Dante	$92.7 \pm 2.1^{\text{a}}$	$62.5 \pm 2.1^{\text{c}}$	$57.9 \pm 2.0^{\text{cde}}$	$43.4 \pm 1.8^{\text{ijk}}$
Heros	$72.8 \pm 4.8^{\text{b}}$	$53.0 \pm 1.3^{\text{efg}}$	$39.9 \pm 1.0^{\text{kl}}$	$30.4 \pm 1.9^{\text{n}}$
Nelson	$75.5 \pm 1.8^{\text{b}}$	$59.7 \pm 1.8^{\text{cd}}$	$51.8 \pm 1.4^{\text{fgh}}$	$47.8 \pm 1.9^{\text{ghij}}$
NK Petrol	$63.0 \pm 1.2^{\text{c}}$	$52.0 \pm 1.7^{\text{fgh}}$	$50.3 \pm 1.5^{\text{ghij}}$	$46.7 \pm 1.7^{\text{hij}}$
Sary	$77.7 \pm 2.8^{\text{b}}$	$51.0 \pm 1.7^{\text{fgh}}$	$39.3 \pm 1.2^{\text{kl}}$	$31.7 \pm 1.7^{\text{mn}}$
Süzer	$44.3 \pm 1.9^{\text{ijk}}$	$34.0 \pm 0.6^{\text{mn}}$	$31.7 \pm 0.3^{\text{mn}}$	$28.7 \pm 2.0^{\text{l}}$
Vectra	$62.8 \pm 1.1^{\text{c}}$	$48.6 \pm 1.2^{\text{ghij}}$	$40.8 \pm 0.7^{\text{kl}}$	$36.5 \pm 1.1^{\text{lm}}$
Tolerans indeksi (%)				
Champlain	-	$76.2 \pm 2.6^{\text{abc*}}$	$57.1 \pm 1.0^{\text{ijk}}$	$51.2 \pm 1.6^{\text{kl}}$
Dante	-	$67.4 \pm 2.2^{\text{defg}}$	$62.4 \pm 2.1^{\text{ghi}}$	$46.8 \pm 2.0^{\text{lm}}$
Heros	-	$72.8 \pm 1.8^{\text{cde}}$	$54.8 \pm 1.4^{\text{jk}}$	$41.8 \pm 2.7^{\text{m}}$
Nelson	-	$77.2 \pm 2.4^{\text{abc}}$	$66.9 \pm 1.9^{\text{efg}}$	$61.8 \pm 2.5^{\text{ghi}}$
NK Petrol	-	$82.5 \pm 2.7^{\text{a}}$	$79.9 \pm 2.3^{\text{ab}}$	$74.1 \pm 2.7^{\text{bcd}}$
Sary	-	$65.7 \pm 2.2^{\text{fg}}$	$50.6 \pm 1.6^{\text{kl}}$	$40.8 \pm 2.2^{\text{m}}$
Süzer	-	$76.7 \pm 1.3^{\text{abc}}$	$71.4 \pm 1.7^{\text{cdef}}$	$64.7 \pm 4.6^{\text{fgh}}$
Vectra	-	$77.4 \pm 1.9^{\text{abc}}$	$65.0 \pm 1.2^{\text{fgh}}$	$58.1 \pm 1.8^{\text{hij}}$
Cr birikimi ($\mu\text{g g}^{-1}$ KA)				
Champlain	ND	$25.9 \pm 0.23^{\text{bc}}$	$60.5 \pm 1.46^{\text{d}}$	$414.0 \pm 6.48^{\text{l}}$
Dante	ND	$22.9 \pm 0.65^{\text{b}}$	$89.6 \pm 1.49^{\text{h}}$	$508.9 \pm 5.58^{\text{m}}$
Heros	ND	$19.9 \pm 0.21^{\text{b}}$	$80.1 \pm 2.10^{\text{f}}$	$338.9 \pm 9.61^{\text{j}}$
Nelson	ND	$13.8 \pm 0.03^{\text{a}}$	$85.7 \pm 1.77^{\text{gh}}$	$384.3 \pm 8.90^{\text{k}}$
NK Petrol	ND	$18.0 \pm 0.07^{\text{ab}}$	$62.0 \pm 1.71^{\text{d}}$	$255.0 \pm 7.66^{\text{l}}$
Sary	ND	$18.8 \pm 0.17^{\text{b}}$	$72.5 \pm 3.13^{\text{e}}$	$705.8 \pm 8.44^{\text{o}}$
Süzer	ND	$20.3 \pm 0.31^{\text{b}}$	$61.6 \pm 1.06^{\text{d}}$	$412.5 \pm 6.68^{\text{l}}$
Vectra	ND	$19.6 \pm 0.12^{\text{b}}$	$82.4 \pm 1.04^{\text{fg}}$	$516.2 \pm 8.88^{\text{n}}$
Varyans analizi				
	Kuru ağırlık	Tolerans indeksi	Cr birikimi	
Çeşit	$F=115.4, P<0.05$	$F=46.65, P<0.05$	$F=2606, P<0.05$	
Uygulama	$F=472.2, P<0.05$	$F=160.7, P<0.05$	$F=1676, P<0.05$	
Çeşit \times Uygulama	$F=10.47, P<0.05$	$F=3.781, P<0.05$	$F=2421, P<0.05$	

* Her bir parametre için farklı harflere (a-o) sahip veriler Duncan çoklu karşılaştırma testine önemli düzeye farklıdır ($P<0.05$). Tüm veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edilmiştir ($n = 6$).

4.1.2. Lipid Peroksidasyonu, Klorofil ve NPT İçerikleri Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi

Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit içeriği Cr(VI) stresi altındaki kanola çeşitlerinde önemli düzeyde ($P<0.05$) artış göstermiştir (Çizelge 4.3). Kanola çeşitlerinin MDA içeriğindeki artış 10, 50 ve 100 μM Cr(VI)

konsantrasyonlarında sırasıyla 1.1-1.5, 1.4-2.0 ve 1.5-2.4 kat olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, en yüksek Cr(VI) konsantrasyonunda (100 µM) MDA içeriğindeki artış NK Petrol çeşidinde en düşük (1.4 kat), Sary çeşidinde ise en yüksek (2.5 kat) bulunmuştur.

Çizelge 4.3 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda malondialdehit (MDA), klorofil ve protein olmayan tiyol (NPT) içerikleri üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının etkisi

Çeşit	Nominal Cr(VI) konsantrasyonu (µM)			
	0	10	50	100
MDA içeriği (µmol g⁻¹ TA)				
Champlain	19.4 ± 0.7 ^{a*}	28.5 ± 2.3 ^{cde}	33.9 ± 2.2 ^{efg}	32.6 ± 1.1 ^{defg}
Dante	22.6 ± 1.9 ^{abc}	28.5 ± 2.4 ^{cde}	45.7 ± 4.7 ^{jk}	47.2 ± 2.5 ^k
Heros	20.7 ± 1.8 ^{ab}	30.2 ± 1.4 ^{def}	37.3 ± 3.6 ^{gh}	44.0 ± 4.0 ^{ijk}
Nelson	20.0 ± 0.9 ^{ab}	28.8 ± 1.1 ^{cde}	32.5 ± 1.8 ^{defg}	40.9 ± 2.0 ^{hij}
NK Petrol	19.9 ± 1.7 ^{ab}	22.5 ± 1.3 ^{abc}	28.0 ± 1.6 ^{cde}	30.5 ± 0.3 ^{def}
Sary	20.5 ± 1.9 ^{ab}	28.0 ± 0.7 ^{cde}	35.7 ± 0.7 ^{fgh}	48.7 ± 1.9 ^k
Süzer	18.7 ± 1.2 ^a	26.1 ± 1.0 ^{bcd}	33.8 ± 2.0 ^{efg}	33.7 ± 0.9 ^{efg}
Vectra	22.8 ± 1.9 ^{abc}	34.7 ± 2.0 ^{efgh}	38.9 ± 1.4 ^{ghi}	45.4 ± 2.1 ^{jk}
Klorofil içeriği (mg g⁻¹ TA)				
Champlain	9.21 ± 0.08 ^{ab}	8.39 ± 0.23 ^{cd}	8.24 ± 0.20 ^{cde}	7.46 ± 0.18 ^f
Dante	7.62 ± 0.17 ^{ef}	7.39 ± 0.24 ^{fg}	7.10 ± 0.17 ^{fghi}	5.40 ± 0.15 ^l
Heros	9.39 ± 0.34 ^a	7.43 ± 0.25 ^f	6.43 ± 0.14 ^{ijk}	5.12 ± 0.07 ^l
Nelson	6.16 ± 0.20 ^k	9.88 ± 0.25 ^a	8.41 ± 0.26 ^{cd}	6.60 ± 0.37 ^{hijk}
NK Petrol	7.01 ± 0.10 ^{fghij}	7.20 ± 0.41 ^{fgh}	7.38 ± 0.22 ^{fg}	7.73 ± 0.11 ^{def}
Sary	8.37 ± 0.35 ^{cd}	6.60 ± 0.38 ^{hijk}	5.26 ± 0.13 ^l	2.63 ± 0.12 ^m
Süzer	8.57 ± 0.25 ^{bc}	9.22 ± 0.38 ^{ab}	7.32 ± 0.07 ^{fgh}	6.33 ± 0.18 ^{jk}
Vectra	9.87 ± 0.20 ^a	9.66 ± 0.26 ^a	8.27 ± 0.20 ^{cde}	6.66 ± 0.31 ^{ghijk}
NPT içeriği (µmol g⁻¹ TA)				
Champlain	2.85 ± 0.10 ^{ab}	3.18 ± 0.07 ^{bcd}	4.34 ± 0.10 ^{klmn}	3.66 ± 0.08 ^{rfg}
Dante	3.62 ± 0.05 ^{defg}	3.87 ± 0.14 ^{ghij}	4.38 ± 0.11 ^{klmn}	4.99 ± 0.17 ^o
Heros	2.87 ± 0.08 ^{ab}	3.20 ± 0.07 ^{bcd}	3.81 ± 0.12 ^{fghi}	3.77 ± 0.06 ^{fghi}
Nelson	2.69 ± 0.17 ^a	3.52 ± 0.12 ^{cdefg}	3.50 ± 0.15 ^{cdefg}	4.09 ± 0.08 ^{hijk}
NK Petrol	3.07 ± 0.21 ^{abc}	4.36 ± 0.08 ^{klmn}	4.60 ± 0.13 ^{lmno}	4.72 ± 0.16 ^{no}
Sary	3.24 ± 0.18 ^{bcde}	4.27 ± 0.15 ^{ijklmn}	4.30 ± 0.08 ^{ijklmn}	4.56 ± 0.12 ^{klmno}
Süzer	3.36 ± 0.09 ^{cdef}	4.13 ± 0.20 ^{ijkl}	4.62 ± 0.24 ^{mno}	4.17 ± 0.36 ^{ijklm}
Vectra	3.85 ± 0.23 ^{ghij}	4.68 ± 0.11 ^{no}	4.92 ± 0.33 ^o	5.12 ± 0.19 ^o
Varyans analizi				
	MDA	Chl	NPT	
Çeşit	F=14.53, P<0.05	F=59.81, P<0.05	F=150.5, P<0.05	
Uygulama	F=148.8, P<0.05	F=163.1, P<0.05	F=265.5, P<0.05	
Çeşit × Uygulama	F=2.782, P<0.05	F=21.37, P<0.05	F=24.57, P<0.05	

* Her bir parametre için farklı harflere (a-o) sahip veriler Duncan çoklu karşılaştırma testine önemli düzeye farklıdır (P<0.05). Tüm veriler ortalama ± standart hata olarak ifade edilmiştir (n = 6)

Çizelge 4.4 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda SOD, POD ve CAT aktivitesi üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının etkisi

Cultivars	Nominal Cr(VI) konsantrasyonu (μM)			
	0	10	50	100
SOD aktivitesi (U mg^{-1} protein)				
Champlain	18.3 \pm 1.2 ^{ab*}	19.0 \pm 0.7 ^{ab}	21.5 \pm 0.6 ^{bcd}	26.2 \pm 0.5 ^{fg}
Dante	21.6 \pm 0.8 ^{bcd}	21.3 \pm 1.0 ^{bcd}	26.0 \pm 1.5 ^{fg}	40.1 \pm 1.6 ⁱ
Heros	20.0 \pm 0.9 ^{abc}	21.8 \pm 1.5 ^{bcde}	25.8 \pm 1.3 ^{fg}	26.0 \pm 0.8 ^{fg}
Nelson	18.9 \pm 1.2 ^{ab}	16.4 \pm 0.7 ^a	18.2 \pm 1.5 ^{ab}	21.6 \pm 1.0 ^{bcd}
NK Petrol	21.3 \pm 1.4 ^{bcd}	25.5 \pm 1.8 ^{efg}	27.2 \pm 0.5 ^{fg}	40.6 \pm 1.1 ⁱ
Sary	27.5 \pm 2.0 ^g	30.9 \pm 0.8 ^h	41.7 \pm 2.1 ⁱ	51.8 \pm 1.2 ^j
Süzer	17.9 \pm 1.2 ^{ab}	18.3 \pm 0.8 ^{ab}	23.3 \pm 0.4 ^{cdef}	32.4 \pm 1.2 ^h
Vectra	25.0 \pm 1.7 ^{defg}	27.0 \pm 1.3 ^{fg}	31.4 \pm 1.5 ^h	34.6 \pm 1.2 ^h
POD aktivitesi ($\mu\text{mol min}^{-1}$ mg^{-1} protein)				
Champlain	4.31 \pm 0.3 ^a	5.06 \pm 0.3 ^a	13.9 \pm 2.2 ^{abcdef}	22.0 \pm 1.5 ^{fgh}
Dante	10.9 \pm 0.5 ^{abcde}	20.8 \pm 2.4 ^{efgh}	27.9 \pm 5.4 ^h	99.1 \pm 6.8 ⁿ
Heros	7.05 \pm 0.9 ^{abc}	11.9 \pm 1.0 ^{abcdef}	17.6 \pm 0.8 ^{defg}	22.0 \pm 1.6 ^{fgh}
Nelson	5.99 \pm 0.2 ^{ab}	12.6 \pm 0.9 ^{abcdef}	17.1 \pm 1.6 ^{cdefg}	23.0 \pm 1.6 ^{gh}
NK Petrol	12.9 \pm 1.1 ^{abcdef}	29.5 \pm 2.0 ^{hi}	40.3 \pm 3.3 ^j	92.1 \pm 5.7 ^m
Sary	6.52 \pm 1.5 ^{ab}	7.88 \pm 1.5 ^{abcd}	37.7 \pm 3.1 ^{ij}	75.9 \pm 6.1 ^l
Süzer	5.96 \pm 0.8 ^{ab}	12.8 \pm 0.5 ^{abcdef}	15.3 \pm 1.1 ^{bcdefg}	59.4 \pm 4.9 ^k
Vectra	7.12 \pm 0.8 ^{bcdefg}	15.4 \pm 2.0 ^{bcdefg}	20.8 \pm 1.8 ^{efgh}	29.4 \pm 3.0 ^{hi}
CAT aktivitesi ($\mu\text{mol min}^{-1}$ mg^{-1} protein)				
Champlain	5.55 \pm 0.23 ^{bcde}	3.56 \pm 0.10 ^a	3.56 \pm 0.35 ^a	4.88 \pm 0.09 ^b
Dante	9.65 \pm 0.23 ^m	8.37 \pm 0.20 ^{jkl}	7.39 \pm 0.37 ^{hij}	7.07 \pm 0.51 ^{ghi}
Heros	7.93 \pm 0.64 ^{ij}	6.20 \pm 0.20 ^{defg}	6.18 \pm 0.47 ^{defg}	5.06 \pm 0.23 ^{bc}
Nelson	6.64 \pm 0.13 ^{efgh}	4.84 \pm 0.25 ^b	5.44 \pm 0.28 ^{bcd}	4.96 \pm 0.21 ^{bc}
NK Petrol	9.35 \pm 0.15 ^{lm}	9.15 \pm 0.32 ^{klm}	8.43 \pm 0.24 ^{jkl}	10.3 \pm 0.67 ⁿ
Sary	6.49 \pm 0.38 ^{defgh}	5.64 \pm 0.51 ^{bcdef}	5.52 \pm 0.40 ^{bcde}	4.68 \pm 0.25 ^b
Süzer	6.92 \pm 0.36 ^{ghi}	6.03 \pm 0.29 ^{cdefg}	5.73 \pm 0.31 ^{bcdef}	6.36 \pm 0.32 ^{defgh}
Vectra	8.16 \pm 0.47 ^{jk}	8.40 \pm 0.29 ^{jkl}	7.10 \pm 0.28 ^{ghi}	6.72 \pm 0.09 ^{fgh}
Varyans analizi				
	SOD	POD	CAT	
Çeşit	$F=96.56, P<0.05$	$F=126.6, P<0.05$	$F=89.89, P<0.05$	
Uygulama	$F=179.2, P<0.05$	$F=611.8, P<0.05$	$F=29.87, P<0.05$	
Çeşit \times Uygulama	$F=8.530, P<0.05$	$F=78.96, P<0.05$	$F=3.820, P<0.05$	

* Her bir parametre için farklı harflere (a-n) sahip veriler Duncan çoklu karşılaştırma testine önemli düzeye farklıdır ($P<0.05$). Tüm veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edilmiştir ($n = 6$).

Kanola çeşitlerinin klorofil içeriği genellikle Cr(VI) konsantrasyonunun artışına bağlı olarak önemli düzeyde ($P<0.05$) azalmıştır (Çizelge 4.3). Bununla birlikte, Nelson çeşidinin klorofil içeriği 10 ve 50 μM Cr(VI) konsantrasyonlarında artış gösterirken, NK Petrol çeşidinin klorofil içeriğinde tüm Cr(VI) konsantrasyonlarında önemli bir değişiklik

belirlenmemiştir. Kontrol fidelerine göre klorofil içeriğindeki en fazla azalma %21-69'luk oranla Sary çeşidinde belirlenmiştir.

Protein olmayan tiyol (NPT) içeriği Cr(VI) stresi altındaki kanola çeşitlerinde kontrol uygulamasına göre önemli düzeyde ($P<0.05$) artış göstermiştir (Çizelge 4.3). Kanola çeşitlerinin MDA içeriğindeki artış 10, 50 ve 100 μM Cr(VI) konsantrasyonlarında sırasıyla %6.7-41.7, %20.8-52.1 ve %28.9-53.9 olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, NPT içeriğinde en yüksek artış %42-54 oranla NK Petrol çeşidinde belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

4.1.3. Bazı Antioksidan Enzimleri Aktivitesi Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi

Bu çalışmada, Cr(VI) stresi 8 kanola çeşidinin yaprak dokularında SOD ve POD aktivitelerinde önemli düzeyde ($P<0.05$) artışa neden olurken, CAT aktivitesinde önemli düzeyde azalışa neden olmuştur (Çizelge 4.4.). En düşük Cr(VI) konsantrasyonunun (10 μM) SOD aktivitesi üzerine olan etkisi genellikle önemsiz bulunmuştur. Bununla birlikte, en yüksek Cr(VI) konsantrasyonunda (100 μM) SOD aktivitesindeki en yüksek artış %90.4 ve %88.5 oranla sırasıyla NK Petrol ve Sary çeşitlerinde belirlenmiştir. Tüm çeşitlerin POD aktiviteleri karşılaştırıldığında, kontrole göre Cr(VI) stresindeki en yüksek artış 11.7 kat artışla Sary çeşidinde belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Bununla birlikte, Cr(VI) stresi kanola çeşitlerinin CAT aktivitesinde önemli düzeyde azalmaya neden olmasına karşın, NK Petrol çeşidinin CAT aktivitesinde önemli bir etkiye neden olmamıştır.

4.2. Sülfat Kullanılabilirliğinin Cr(VI) Toleransı Üzerine Etkisi

Bu çalışmada, Cr(VI) stresi altındaki Cr-toleranslı (NK Petrol) ve Cr-hassas (Sary) kanola çeşitlerinde sülfat kullanılabilirliğinin önemi belirlenmiştir. Bu amaçla, farklı sülfat konsantrasyonları (0, 1 ve 2 mM MgSO_4) ve 100 μM Cr(VI) stresine maruz bırakılan kanola çeşitlerinde fide büyümesi, Cr birikimi, klorofil içeriği, tiyol içeriği, lipid peroksidasyonu, antioksidan enzimlerin aktivitesi, AsA-GSH döngüsünün önemli bileşiklerin içerikleri ve *BnMP1* geninin ifade seviyesindeki değişimler belirlenmiştir.

4.2.1. Fide Büyümesi ve Krom Birikimi Üzerine Sülfat Kullanılabilirliği ve Cr(VI) Stresinin Etkisi

Kanola çeşitlerinin toprak üstü organlarının taze ve kuru ağırlıkları üzerine farklı sülfat konsantrasyonları ve Cr(VI) stresinin etkisi Çizelge 4.5’de gösterilmiştir. Kontrol uygulaması (+S/–Cr) ile karşılaştırıldığında sülfat eksikliği (–S/–Cr) kanola çeşitlerinin taze ve kuru ağırlıklarında önemli düzeyde ($P<0.05$) azalmaya neden olmuş; fakat bu azalmalar Sary çeşidinde daha belirgin bulunmuştur. Bununla birlikte, +HS/–Cr uygulaması büyüme parametrelerinde kontrole göre önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Cr(VI) stresi tüm sülfat uygulamalarında büyüme parametrelerini önemli düzeyde azaltırken bu azalma Sary çeşidinde daha belirgin bulunmuştur. Bununla birlikte, taze ve kuru ağırlıklardaki en yüksek azalma kombine stres (–S/+Cr) altındaki bitkilerde belirlenmiştir.

Çizelge 4.5 Cr-toleranslı ve Cr-hassas kanola çeşitlerinin toprak üstü organlarının taze ve kuru ağırlıkları ve Cr birikimi üzerine farklı sülfat konsantrasyonları ve Cr(VI) stresinin etkisi

Çeşit	Uygulamalar	Taze ağırlık	Kuru ağırlık	Cr birikimi
		<i>Kontrolün yüzdesi (%)</i>		$\mu\text{g g}^{-1} \text{KA}$
NK Petrol (Cr-toleranslı)	+S/–Cr	100.0 ± 0.0 ^{ab*}	100.0 ± 0.0 ^{ab}	ND
	+S/+Cr	91.1 ± 1.8 ^{cd}	94.0 ± 3.3 ^{bc}	31.5 ± 5.4 ^a
	–S/–Cr	98.8 ± 2.5 ^{ab}	90.6 ± 2.1 ^{cd}	ND
	–S/+Cr	83.6 ± 1.8 ^d	83.1 ± 1.6 ^{de}	241.6 ± 22.9 ^c
	+HS/–Cr	103.1 ± 2.7 ^a	103.4 ± 1.8 ^a	ND
	+HS/+Cr	94.5 ± 3.3 ^{dc}	97.5 ± 3.2 ^{ab}	33.2 ± 7.0 ^a
Sary (Cr-hassas)	+S/–Cr	100.0 ± 0.0 ^{ab}	100.0 ± 0.0 ^{ab}	ND
	+S/+Cr	66.1 ± 2.5 ^e	82.4 ± 1.2 ^{de}	47.9 ± 3.9 ^b
	–S/–Cr	89.2 ± 1.4 ^{cd}	79.8 ± 2.7 ^e	ND
	–S/+Cr	54.7 ± 1.7 ^f	62.7 ± 4.5 ^f	343.4 ± 27.5 ^d
	+HS/–Cr	100.0 ± 2.1 ^{ab}	99.9 ± 5.1 ^{ab}	ND
	+HS/+Cr	66.9 ± 2.4 ^e	80.8 ± 2.9 ^e	46.5 ± 4.7 ^b

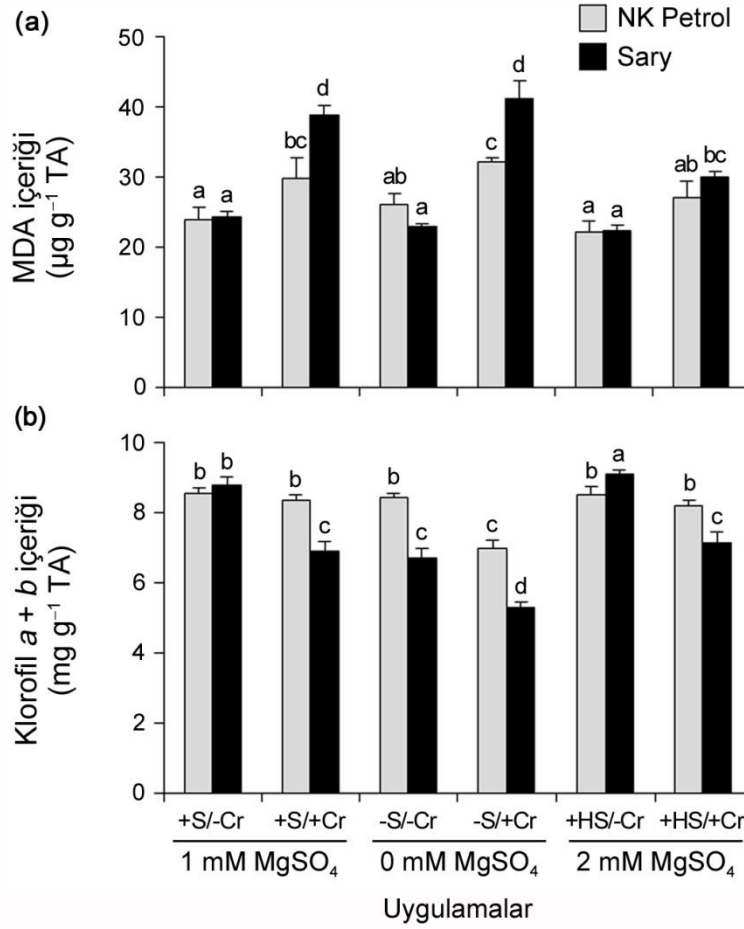
* Her bir parametre için farklı harflere (a-f) sahip veriler Duncan çoklu karşılaştırma testine önemli düzeye farklıdır ($P<0.05$). Tüm veriler ortalama ± standart hata olarak ifade edilmiştir ($n = 6$).

Kanola çeşitlerinin toprak üstü dokularında Cr birikimi üzerine sülfat konsantrasyonları ve Cr(VI) stresinin etkileri Çizelge 4.5’de verilmiştir. Her iki çeşidin Cr birikimleri +S/+Cr ve +HS/+Cr sülfat uygulamalarında benzerlik göstermiştir. Bununla birlikte, –S/+Cr uygulaması her iki çeşidin Cr birikiminde önemli düzeye artışa neden olmuştur ($P<0.05$). Diğer taraftan, Cr(VI) stresi altındaki Sary çeşidi tüm sülfat uygulamalarında NK Petrol çeşidine göre önemli düzeyde daha fazla Cr biriktirmiştir (Çizelge 4.5).

4.2.2. Lipid Peroksidasyonu ve Klorofil İçeriği Üzerine Sülfat Kullanılabilirliği ve Cr(VI) Stresinin Etkisi

Lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) içeriği Cr(VI) stresine maruz bırakılan kanola çeşitlerinin yaprak dokularında önemli düzeyde ($P<0.05$) artış göstermiştir (Şekil 4.1a). Kombine stres (–S/+Cr) her iki çeşidin MDA içeriğinde diğer stres uygulamalarına göre daha fazla artışa neden olmuştur. Bununla birlikte, +HS uygulaması MDA içeriği üzerine Cr(VI) stresinin arttırıcı etkisini sadece NK Petrol çeşidinde ortadan kaldırmıştır. Ayrıca Cr(VI) stresi altındaki NK Petrol çeşidine göre Sary çeşidinin tüm sülfat uygulamalarında daha fazla MDA içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada, iki kanola çeşidinin klorofil içeriği üzerine farklı sülfat konsantrasyonları ve Cr(VI) stresinin etkisi Şekil 4.1b’de gösterilmiştir. Kontrole göre –S/–Cr uygulaması sadece Sary çeşidinin klorofil içeriğinde önemli bir azalmaya (%23.6) neden olmuştur ($P<0.05$). Bununla birlikte, Cr(VI) stresi Sary çeşidinin klorofil içeriğini tüm sülfat uygulamalarında azaltırken, NK petrol çeşidinin klorofil içeriği sadece –S/+Cr uygulamasında azalmıştır. Ayrıca klorofil içeriğindeki en fazla azalma –S/+Cr uygulamasına maruz kalan fidelerde belirlenmiştir.

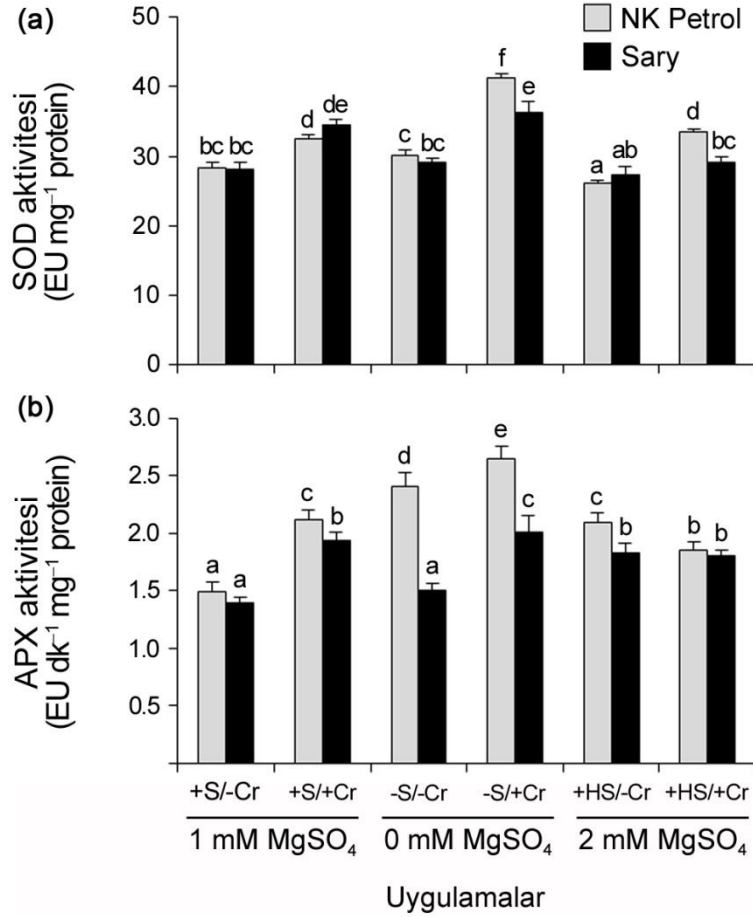


Şekil 4.1 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda (a) MDA ve (b) klorofil içerikleri üzerine farklı sülfat konsantrasyonları (0, 1 ve 2 mM MgSO₄) ve Cr(VI) stresinin (100 µM) etkisi. Farklı harfler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki farklılıkları göstermektedir ($P < 0.05$).

4.2.3. Antioksidan Savunma Sistemi Üzerine Sülfat Kullanılabilirliği ve Cr(VI) Stresinin Etkisi

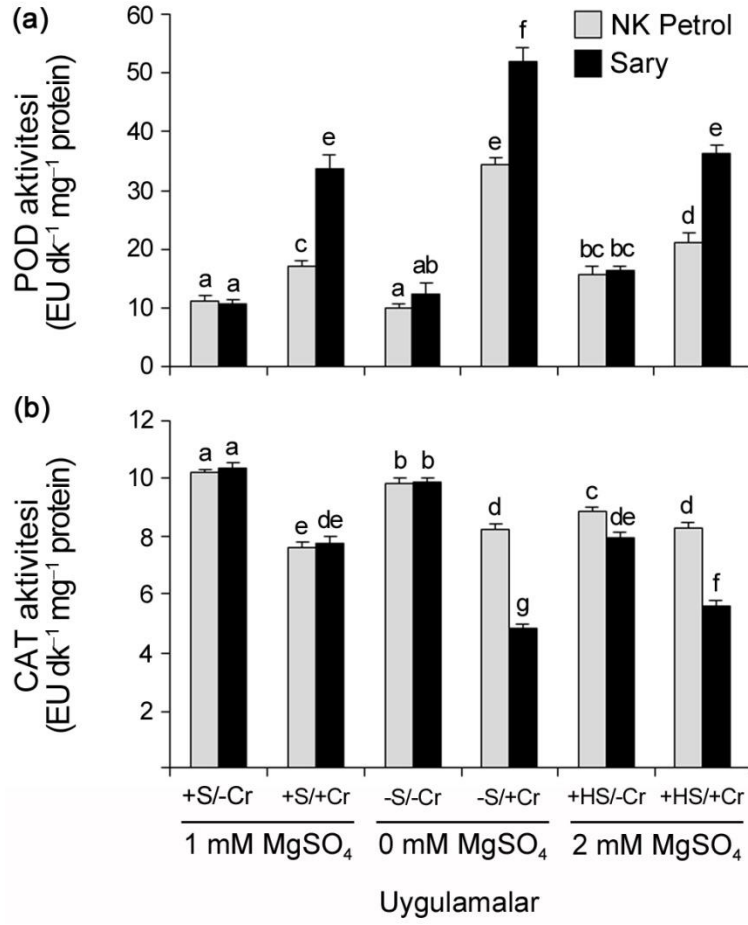
Kanola çeşitlerinin yaprak dokularında SOD, POD, APX, CAT, GR ve GST gibi antioksidan enzimlerin aktivitesi üzerine farklı sülfat konsantrasyonları ve Cr(VI) stresinin etkisi Şekil 4.2, 4.3 ve 4.4'de gösterilmiştir. Cr(VI) stresi her iki çeşidin SOD aktivitesini tüm sülfat uygulamalarında önemli düzeyde ($P < 0.05$) arttırmış olmasına karşın, bu artış NK Petrol çeşidinde daha fazla bulunmuştur (Şekil 4.2a). Bununla birlikte, diğer stres uygulamalarına göre -S/+Cr uygulaması SOD aktivitesinde daha fazla artışa neden olmuştur. Kontrole göre -S/-Cr uygulaması sadece NK Petrol çeşidinin APX aktivitesinde önemli düzeyde artışa neden olmuştur (Şekil 4.2b). -S/+Cr ve +S/+Cr uygulamaları APX aktivitesinde artışa neden olurken, bu artış NK Petrol çeşidinde

önemli düzeyde daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte, +HS/-Cr uygulaması her iki çeşidin APX aktivitesinde kontrole göre bir artışa neden olmuştur.



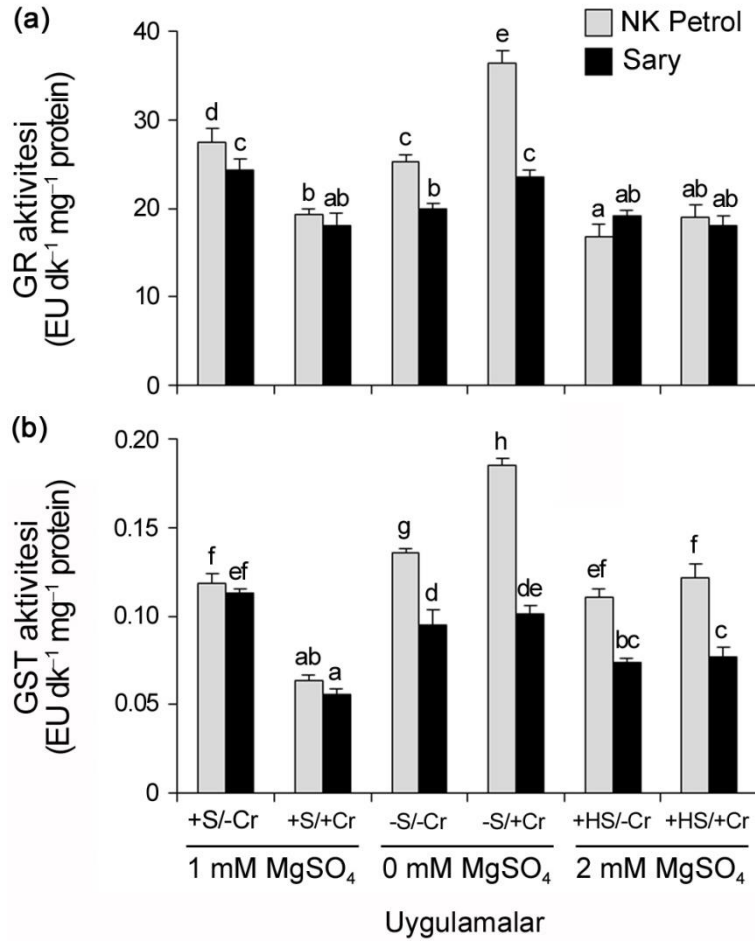
Şekil 4.2 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda (a) SOD ve (b) APX aktiviteleri üzerine farklı sülfat konsantrasyonları (0, 1 ve 2 mM MgSO₄) ve Cr(VI) stresinin (100 µM) etkisi. Farklı harfler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki farklılıkları göstermektedir (P<0.05).

Kontrole göre tüm sülfat uygulamalarında Cr(VI) stresi POD aktivitesinde önemli (P<0.05) artışa neden olmuştur (Şekil 4.3a). Bununla birlikte, kontrole göre +HS/-Cr uygulaması POD aktivitesinde önemli bir artış sağlamıştır. Ayrıca tüm sülfat uygulamalarında Cr(VI) stresi NK Petrol çeşidine göre Sary çeşidinin POD aktivitesinde önemli düzeyde daha fazla artışa neden olmuştur. Sülfat eksikliği ve +HS/-Cr uygulamaları her iki çeşidin CAT aktivitesinde kontrole göre bir azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.3b). Bununla birlikte, Cr(VI) stresi CAT aktivitelerinde önemli düzeyde azalmaya neden olurken bu azalış Sary çeşidinde daha fazla bulunmuştur.



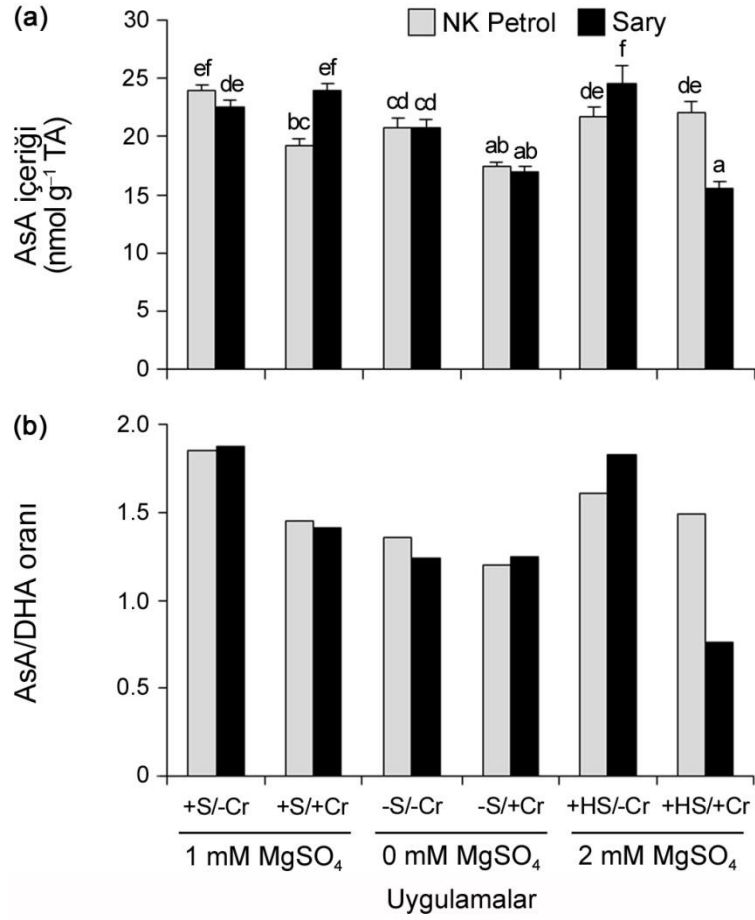
Şekil 4.3 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda (a) POD ve (b) CAT aktiviteleri üzerine farklı sülfat konsantrasyonları (0, 1 ve 2 mM MgSO₄) ve Cr(VI) stresinin (100 µM) etkisi. Farklı harfler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki farklılıkları göstermektedir ($P < 0.05$).

Sülfat eksikliği ve +HS/-Cr uygulamaları her iki çeşidin GR aktivitesinde kontrole göre bir azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.4a). Kombine stres GR aktivitesinde artışa neden olurken bu artış NK Petrol çeşidinde daha fazla bulunmuştur. Bununla birlikte, +S/+Cr uygulaması her iki çeşidin GR aktivitesini azaltırken, +HS/+Cr uygulaması önemli bir etkiye neden olmamıştır. -S/-Cr uygulaması NK petrol çeşidinin GST aktivitesinde kontrole göre önemli bir artışa neden olurken Sary çeşidinin GST aktivitesine azalışa neden olmuştur (Şekil 4.4b). Kombine stres NK Petrol çeşidinin GST aktivitesinde ilave artışa neden olmuştur. +S/+Cr uygulaması her iki çeşidin GST aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. Bununla birlikte, +HS/-Cr uygulaması Sary çeşidinin GST aktivitesini azaltmıştır.



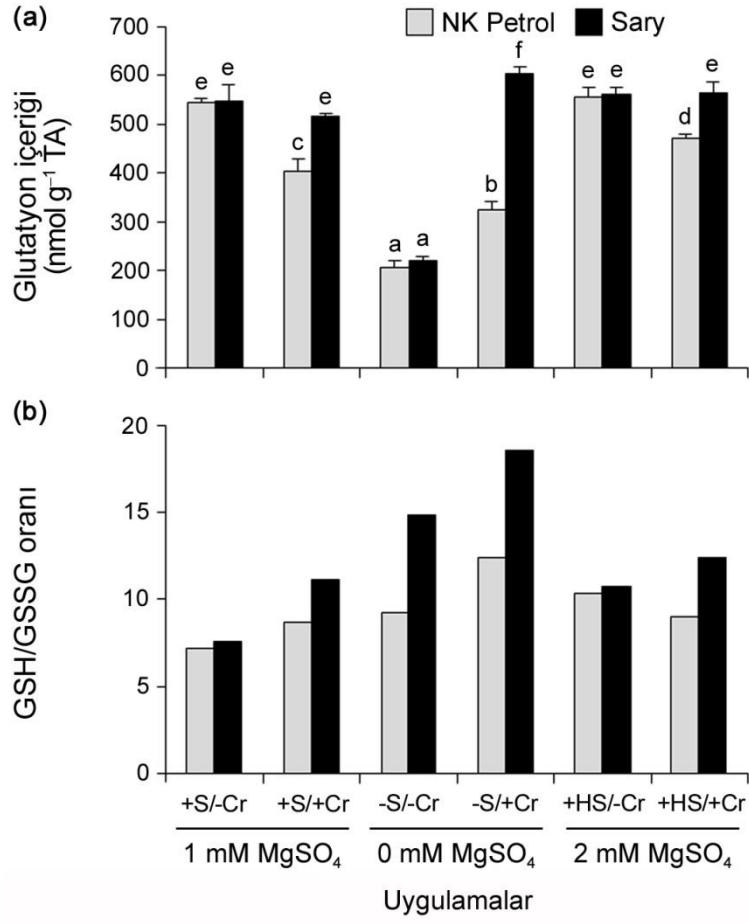
Şekil 4.4 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda (a) GR ve (b) GST aktiviteleri üzerine farklı sülfat konsantrasyonları (0, 1 ve 2 mM MgSO₄) ve Cr(VI) stresinin (100 µM) etkisi. Farklı harfler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki farklılıkları göstermektedir ($P < 0.05$).

Kontrole göre -S/-Cr uygulaması her iki çeşidin AsA içeriğinde önemli düzeyde ($P < 0.05$) azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.5a). Bununla birlikte, -S/+Cr uygulaması AsA içeriklerinde daha fazla azalmaya neden olmuştur. +S/+Cr uygulaması sadece NK Petrol çeşidinin AsA içeriğini önemli düzeyde azaltmıştır. +HS/+Cr uygulaması Sary çeşidinin AsA içeriğinde azalmaya neden olurken NK Petrol çeşidinin AsA içeriğinde önemli etki göstermemiştir. Bununla birlikte, Cr(VI) stresinin yanı sıra sülfat eksikliği AsA/DHA oranında azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.5b).



Şekil 4.5 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda (a) AsA içeriği ve (b) AsA/DHA oranı üzerine farklı sülfat konsantrasyonları (0, 1 ve 2 mM MgSO₄) ve Cr(VI) stresinin (100 µM) etkisi. Farklı harfler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki farklılıkları göstermektedir ($P < 0.05$).

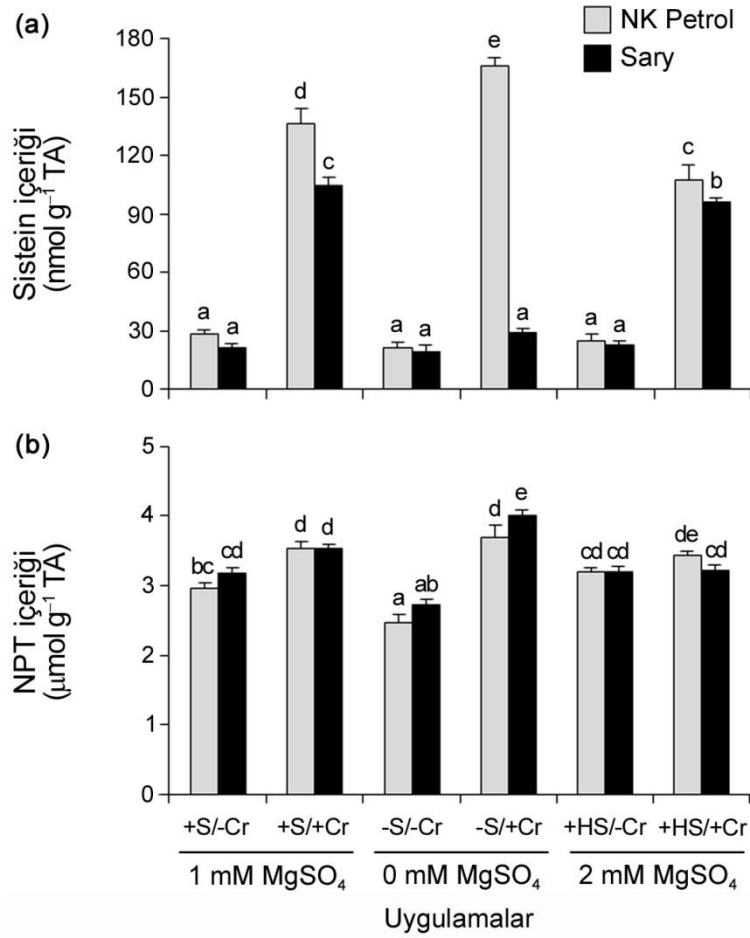
Kontrolde göre -S/-Cr uygulaması her iki çeşidin GSH içeriğini önemli düzeyde ($P < 0.05$) azaltmıştır (Şekil 4.6a). +S/+Cr ve +HS/+Cr uygulamaları NK Petrol çeşidinin GSH içeriğinde azalmaya neden olurken Sary çeşidinde önemli bir etki göstermemiştir. Bununla birlikte, -S/+Cr uygulaması GSH içeriklerini artırırken bu artış Sary çeşidinde daha fazla bulunmuştur. Ayrıca sülfat eksikliği ve aşırı sülfat uygulamalarının yanı sıra Cr(VI) stresi GSH/GSSG oranlarında artışa neden olurken bu artış Sary çeşidinde daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.6b).



Şekil 4.6 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda (a) GSH içeriği ve (b) GSH/GSSG oranı üzerine farklı sülfat konsantrasyonları (0, 1 ve 2 mM MgSO₄) ve Cr(VI) stresinin (100 µM) etkisi. Farklı harfler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki farklılıkları göstermektedir ($P < 0.05$).

4.2.4. Sistein ve Tiyoil İçerikleri Üzerine Sülfat Kullanılabilirliği ve Cr(VI) Stresinin Etkisi

Kontrolle mukayese edildiğinde, -S/-Cr veya +HS/-Cr uygulamaları her iki çeşidin sistein içeriklerinde önemli bir değişime neden olmamıştır (Şekil 4.7a). Bununla birlikte, tüm sülfat uygulamalarında Cr(VI) stresi sistein içeriklerini önemli düzeyde ($P < 0.05$) arttırmış ve bu artış NK Petrol çeşidinde daha fazla bulunmuştur. Ayrıca kombine stres NK Petrol çeşidinin sistein içeriğini yaklaşık 8 kat arttırırken, Sary çeşidinde önemli bir etki göstermemiştir. Kontrolle göre -S/-Cr uygulaması her iki çeşidin NPT içeriğini önemli düzeyde ($P < 0.05$) azaltmıştır (Şekil 4.7b). Bununla birlikte, -S/+Cr ve +S/+Cr uygulamaları NPT içeriklerine artışa neden olurken bu artış Sary çeşidinde daha fazla bulunmuştur.

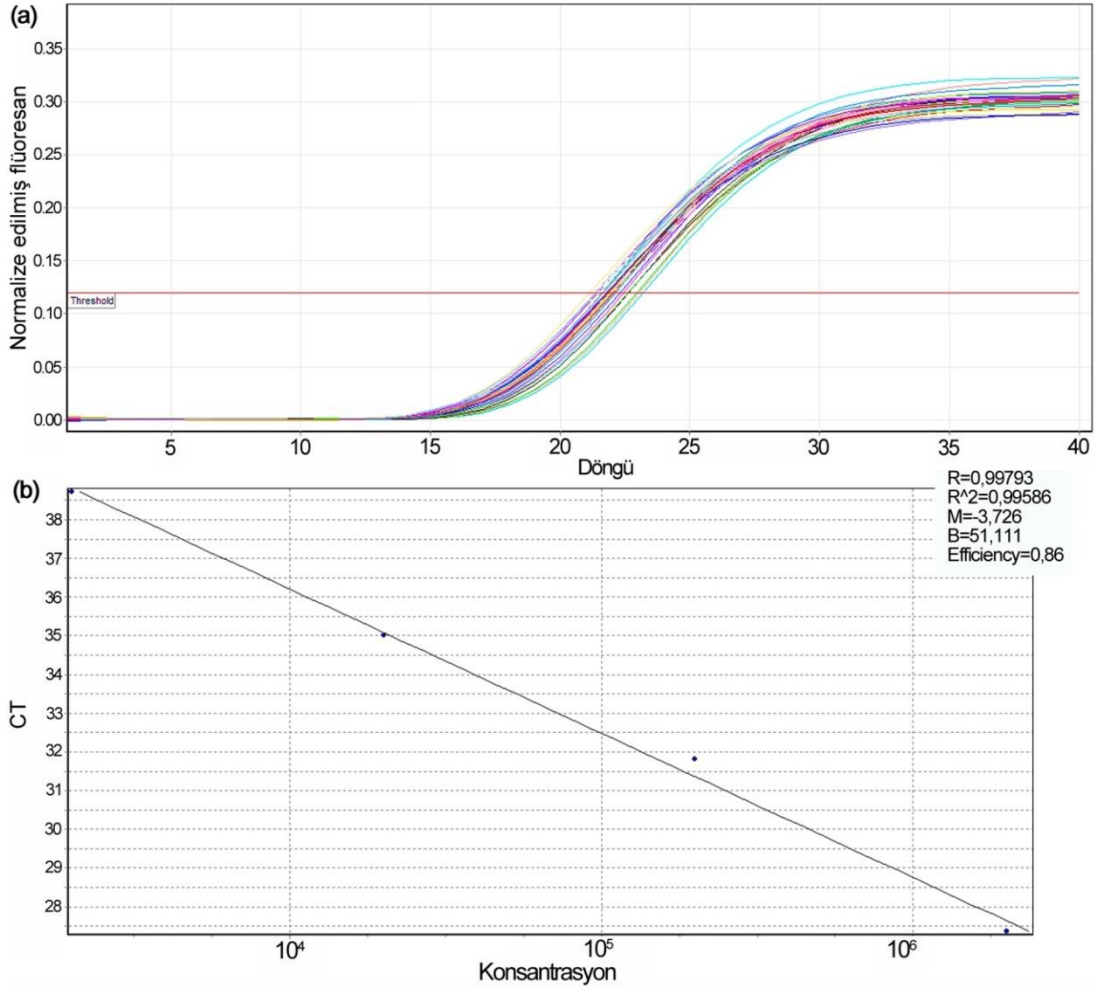


Şekil 4.7 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda (a) sistein ve (b) NPT içerikleri üzerine farklı sülfat konsantrasyonları (0, 1 ve 2 mM MgSO₄) ve Cr(VI) stresinin (100 µM) etkisi. Farklı harfler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki farklılıkları göstermektedir (P<0.05).

4.2.5. *Brassica napus* Metalloprotein 1 (*BnMP1*) Geninin İfadesi Üzerine Sülfat Kullanılabilirliği ve Cr(VI) Stresinin Etkisi

Bu araştırmada, kanola çeşitlerinin yaprak dokularında metalloprotein proteinini kodlayan genin (*BnMP1*) ifade seviyesi üzerine farklı sülfat konsantrasyonları (0, 1 ve 2 mM MgSO₄) ve Cr(VI) stresinin (100 µM) etkisi incelenmiştir. *BnMP1* geninin ifade profilini belirlemek için, yaprak dokularından total RNA izole edilmiş ve gerçek-zamanlı kantitatif PCR (qPCR) analizlerine maruz bırakılmıştır. Kanola *BnMP1* ve β -aktin genleri

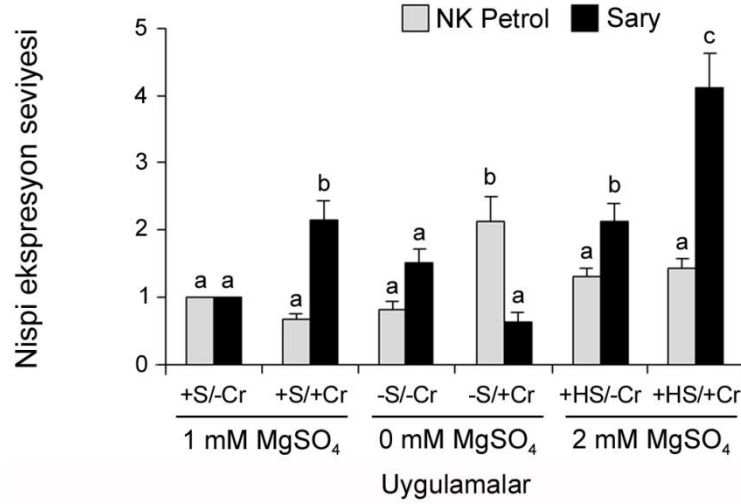
için gerçekleştirilen qPCR analizleri her iki gen için de başarılı bir amplifikasyonun olduğunu göstermiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 Farklı sülfat konsantrasyonları ve Cr(VI) stresine maruz bırakılan kanola çeşitlerinde RT-Q-PCR ile belirlenmiş (a) *BnMP1* geninin transkript birikimleri ve (b) bu örneklere ait standart eğri.

Kanola fidelerinin yaprak dokularında *BnMP1* geni üzerine farklı sülfat konsantrasyonları ve Cr(VI) stresinin etkisini Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Kontrolle mukayese edildiğinde -S/-Cr uygulaması her iki çeşidin ifade seviyelerinde önemli bir değişime neden olmamıştır. Kombine stres sadece NK Petrol çeşidinde *BnMP1* geninin ifade seviyesinde bir artışla sonuçlanmıştır. +HS/-Cr uygulaması Sary çeşidinin ifade seviyesinde kontrole göre bir artışa neden olurken, NK Petrol çeşidinde önemli bir etki göstermemiştir. Bununla birlikte, +HS/+Cr uygulaması hassas Sary çeşidinin ifade

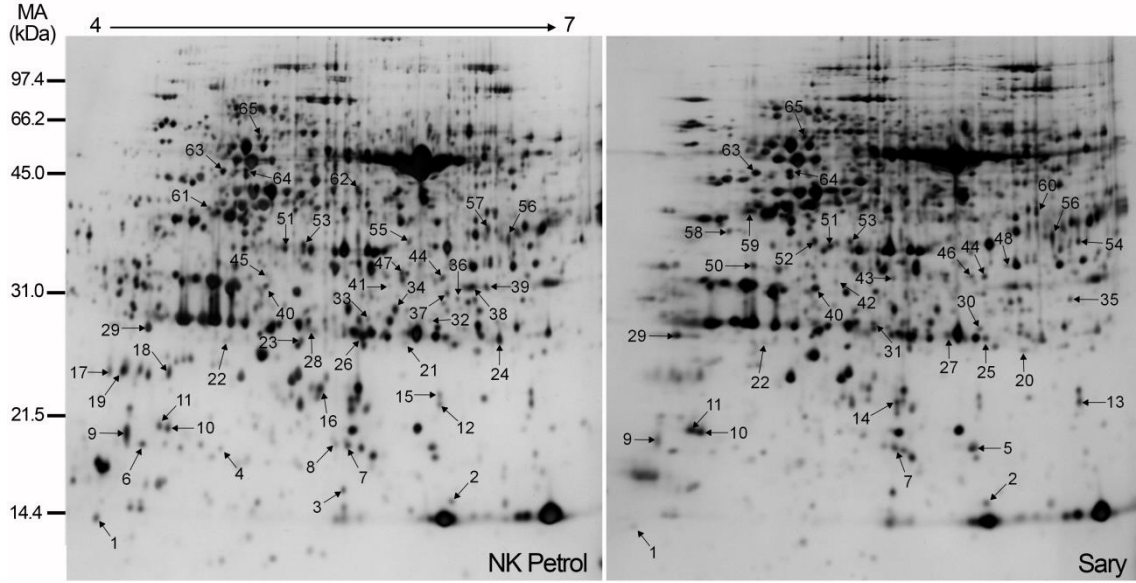
seviyesinde 4 kat artışa neden olurken, NK Petrol çeşidinde önemli bir etkiye neden olmamıştır. Ayrıca +S/+Cr uygulaması sadece Sary çeşidinin gen ifadesinde önemli bir artışa neden olmuştur (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda *BnMP1* mRNA'sının ifade seviyesi üzerine farklı sülfat konsantrasyonları (0, 1 ve 2 mM MgSO₄) ve Cr(VI) stresinin (100 µM) etkisi. Nispi *BnMP1* gen ifade seviyesi 2^{-ΔΔCT} metodu ile belirlenmiş ve β-aktin mRNA seviyesi ile normalize edilmiştir. Kontrol grubu (+S/-Cr) kalibrasyon için kullanılmıştır. Farklı harfler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre önemli düzeydeki farklılıkları göstermektedir (P<0.05).

4.2.6. Proteom Değişimleri Üzerine Sülfat Kullanılabilirliği ve Cr(VI) Stresinin Etkisi

Bu araştırmada, nispeten Cr-toleranslı NK Petrol ve Cr-hassas Sary çeşitlerinin yaprak dokularında Cr(VI)-teşvikli proteom değişimleri üzerine farklı sülfat konsantrasyonlarının etkisi değerlendirilmiştir. Bu amaçla, +S/-Cr (kontrol), +S/+Cr, -S/-Cr (kükürt eksikliği), -S/+Cr (kombine stres), +HS/-Cr (aşırı S uygulaması) ve +HS/+Cr uygulamalarına ait fidelerin yaprak dokularından elde edilen proteinler 2-D elektroforez (IEF/SDS PAJE) yöntemi ile analiz edilmiştir. Uygulamalar arasında kontrole (+S/-Cr) göre ifade seviyesi 2 kat veya daha fazla değişim gösteren protein benekleri farklı şekilde ifade olan protein olarak tanımlanmıştır. Jeller PDQuest yazılımıyla analiz edildiğinde, azalan yönde düzenlenen 23 ve artan yönde düzenlenen 42 protein beneği belirlenmiştir (Şekil 4.10). Farklı şekilde ifade olan 65 proteinden 46'sı MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi analizleri ve veri tabanı (NCBI nr ve Swiss-Prot) taraması ile başarılı bir şekilde tanımlanmıştır (Çizelge 4.6).



Şekil 4.10 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda Cr(VI) stresi ve farklı sülfat uygulamalarında farklı şekilde ifade olan 65 proteinin 2-D elektroforetik jellerdeki gösterimi. Birinci boyut 80 µg protein yüklenmiş IPG stripleri (17 cm, pH 4-7) ve ikinci boyut olan SDS-PAJE ise %12'lik jelde gerçekleştirilmiştir. Bu analitik jellerdeki proteinler gümüş boyama ile görünür hale getirilmiştir.

Tanımlanan 46 protein fonksiyonlarına göre fotosentez, enerji metabolizması, stres savunma, sinyal iletimi ve şaperon olmak üzere farklı kategorilere ayrılmıştır (Çizelge 4.7; Şekil 4.11). Bununla birlikte, 2-D jellerdeki bazı protein beneklerinin özdeş olduğu belirlenmiştir. Cr(VI) stresi ve farklı sülfat konsantrasyonları kanola fidelerinin yaprak dokularında fotosentez ile ilişkili 18 proteinin (5, 7, 8, 9, 16, 26, 27, 28, 29, 34, 37, 38, 39, 44, 46, 59, 61 ve 64 nolu benekler) ifadesinde farklılığa neden olmuştur (Çizelge 4.6 ve 4.7). Kontrolde göre $-S/-Cr$ uygulaması, sitokrom b_6-f kompleksi demir-kükürt alt biriminin (benek 7) toleranslı NK petrol çeşidinde 2.4 kat, hassas Sary çeşidinde ise 2.0 kat artmasına neden olmuştur. Bu proteinin $-S/+Cr$ uygulamasında her iki çeşitte de azalan yönde düzenlendiği belirlenmiştir. Bir diğer sitokrom b_6-f kompleksi demir-kükürt alt biriminin (benek 8) NK Petrol çeşidinde $-S/-Cr$ uygulaması ile 9.2 kat arttığı, buna karşın $-S/+Cr$ uygulaması ile azaldığı bulunmuştur. Sitokrom b_6-f kompleksi demir-kükürt alt biriminin üçüncü formunun (benek 5) ise Sary çeşidinde $-S/+Cr$ uygulamasında azalan yönde düzenlendiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.6 Cr(VI) stresi ve farklı sülfat konsantrasyonlarına maruz bırakılan kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ile tanımlanan 46 protein

Benek ^a	Aksesyon numarası ^b	Protein ^c	Organizma ^d	Skor ^e	Deneysel pI/MA ^f	Teorik pI/MA ^g	EPS ^h	İfade profili ⁱ
2	ATPE_ARATH	ATP sentaz epsilon zinciri	<i>Arabidopsis thaliana</i>	525	6.3/14.9	5.0/14.5	14	
3	ATPE_ARATH	ATP sentaz epsilon zinciri	<i>Arabidopsis thaliana</i>	414	5.8/15.6	5.0/14.5	10	
4	PRX2E_ARATH	Peroksiredoksin-2E	<i>Arabidopsis thaliana</i>	107	5.1/19.0	9.12/24.7	4	
5	UCRIA_ARATH	Sitokrom b ₆ -f kompleksi demir-kükürt alt birimi	<i>Arabidopsis thaliana</i>	265	6.2/19.1	8.8/24.4	10	
6	TRXM4_ARATH	Tiyoredoksin M-tip 4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	108	4.7/18.7	9.6/21.2	8	
7	UCRIA_ARATH	Sitokrom b ₆ -f kompleksi demir-kükürt alt birimi	<i>Arabidopsis thaliana</i>	172	5.8/19.2	8.8/24.4	7	

Çizelge 4.6 Devamı

Benek ^a	Aksesyon numarası ^b	Protein ^c	Organizma ^d	Skor ^e	Deneysel pI/MA ^f	Teorik pI/MA ^g	EPS ^h	İfade profili ⁱ
8	UCRIA_ARATH	Sitokrom b ₆ -f kompleksi demir-kükürt alt birimi	<i>Arabidopsis thaliana</i>	113	5.7/19.2	8.8/24.4	5	
9	RK123_ARATH	50S ribozomal protein L12-3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	223	4.6/19.0	5.5/19.7	7	
14	GLP1_SINAL	Germin-benzeri protein 1	<i>Sinapis alba</i>	250	5.8/22.8	6.3/21.9	4	
16	CB11_SOLLC	Klorofil a-b bağlayıcı protein 6A	<i>Solanum lycopersicum</i>	147	5.6/23.7	5.8/26.6	6	
17	BAS1A_ARATH	2-Cys peroksiredoksin BAS1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	257	4.5/24.2	6.9/29.1	6	
18	BAS1A_ARATH	2-Cys peroksiredoksin BAS1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	266	4.9/24.2	6.9/29.1	5	

Çizelge 4.6 Devamı

Benek ^a	Aksesyon numarası ^b	Protein ^c	Organizma ^d	Skor ^e	Deneysel pI/MA ^f	Teorik pI/MA ^g	EPS ^h	İfade profili ⁱ
19	BAS1A_ARATH	2-Cys peroksiredoksin BAS1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	248	4.6/24.2	6.9/29.1	4	
21	GST16_ARATH	Glutatyon S-transferaz 16	<i>Arabidopsis thaliana</i>	69	6.1/27.4	6.3/24.1	5	
22	FRI1_BRANA	Ferritin-1	<i>Brassica napus</i>	405	5.2/27.5	5.5/28.2	13	
23	CH10C_ARATH	20 kDa şaperonin	<i>Arabidopsis thaliana</i>	175	5.5/27.5	8.9/26.8	7	
25	GSTXA_ARATH	Glutatyon S-transferaz 103-1A	<i>Arabidopsis thaliana</i>	92	6.3/28.1	5.4/25.9	2	
26	CB26_ARATH	Klorofil a-b bağlayıcı protein CP26	<i>Arabidopsis thaliana</i>	320	5.9/28.2	6.0/30.1	11	

Çizelge 4. 6 Devamı

Benek ^a	Aksesyon numarası ^b	Protein ^c	Organizma ^d	Skor ^e	Deneysel pI/MA ^f	Teorik pI/MA ^g	EPS ^h	İfade profili ⁱ
27	CAHC_ARATH	Karbonik anhidraz	<i>Arabidopsis thaliana</i>	184	6.1/28.2	5.7/37.4	8	
28	PAP6_ARATH	Muhtemel plastid-lipid-iliskili protein 6	<i>Arabidopsis thaliana</i>	187	5.6/28.5	5.8/30.4	8	
29	CB23_SOLLC	Klorofil a-b baglayici protein 13	<i>Solanum lycopersicum</i>	76	4.7/27.7	5.1/28.6	3	
30	TPIS_ARATH	Triozefosfat izomeraz	<i>Arabidopsis thaliana</i>	354	6.2/28.8	5.4/27.2	9	
33	APX1_ARATH	L-askorbat peroksidaz 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	173	5.8/29.4	5.7/27.5	12	
34	CAHC_ARATH	Karbonik anhidraz	<i>Arabidopsis thaliana</i>	109	6.0/30.4	5.7/37.4	2	

Çizelge 4.6 Devamı

Benek ^a	Aksesyon numarası ^b	Protein ^c	Organizma ^d	Skor ^e	Deneysel pI/MA ^f	Teorik pI/MA ^g	EPS ^h	İfade profili ⁱ
37	RBL_BRAOL	RuBisCO büyük zincir	<i>Brassica oleracea</i>	556	6.2/32.0	5.9/52.9	26	
38	RBL_MORRU	RuBisCO büyük zincir	<i>Morus rubra</i>	252	6.4/32.8	6.0/51.6	17	
39	RBL_ARAHI	RuBisCO büyük zincir	<i>Arabidopsis thaliana</i>	277	6.5/32.8	5.9/52.9	19	
40	LGUL_BRAOG	Laktoilglutatyon liyaz	<i>Brassica oleracea</i>	150	5.4/32.1	5.2/31.6	8	
42	THI4_ARATH	Tiazol biyosentetik enzim	<i>Arabidopsis thaliana</i>	113	5.5/32.8	5.8/36.6	4	
44	RCA2_LARTR	RuBisCO aktivaz 2	<i>Larrea tridentata</i>	294	6.2/33.5	6.8/48.0	14	

Çizelge 4.6 Devamı

Benek ^a	Aksesyon numarası ^b	Protein ^c	Organizma ^d	Skor ^e	Deneysel pI/MA ^f	Teorik pI/MA ^g	EPS ^h	İfade profili ⁱ
45	THI4_ARATH	Tiazol biyosentetik enzim	<i>Arabidopsis thaliana</i>	121	5.4/33.5	5.8/36.6	6	
46	RR30_SPIOL	30S ribozomal protein 1	<i>Spinacia oleracea</i>	61	6.2/33.6	6.7/33.7	5	
50	THI4_ARATH	Tiazol biyosentetik enzim	<i>Arabidopsis thaliana</i>	119	5.1/34.4	5.8/36.6	4	
51	ANXD1_ARATH	Anneksin D1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	521	5.4/36.3	5.2/36.2	20	
52	ANXD1_ARATH	Anneksin D1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	216	5.3/37.0	5.2/36.2	13	
53	ANXD1_ARATH	Anneksin D1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	507	5.5/37.0	5.2/36.2	20	

Çizelge 4.6 Devamı

Benek ^a	Aksesyon numarası ^b	Protein ^c	Organizma ^d	Skor ^e	Deneysel pI/MA ^f	Teorik pI/MA ^g	EPS ^h	İfade profili ⁱ
54	ALFC3_ARATH	Muhtemel fruktoz-bifosfat aldolaz 3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	106	6.7/37.1	8.2/42.3	6	
56	LONH1_ARATH	Lon proteaz homologu 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	46	6.6/37.8	6.9/97.8	1	
57	ALF2_PEA	Fruktoz-bifosfat aldolaz	<i>Pisum sativum</i>	76	6.5/38.5	6.8/38.5	5	
59	CHLI_ARATH	Magnezyum-şelataz alt birim chlI	<i>Arabidopsis thaliana</i>	173	5.1/40.1	6.1/46.2	15	
60	DCUP2_ARATH	Uroporfirinojen dekarboksilaz 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	169	6.5/40.3	8.3/43.6	4	
61	CHLI_ARATH	Magnezyum-şelataz alt birim chlI	<i>Arabidopsis thaliana</i>	188	5.1/40.5	6.1/46.2	10	

Çizelge 4.6 Devamı

Benek ^a	Aksesyon numarası ^b	Protein ^c	Organizma ^d	Skor ^e	Deneysel pI/MA ^f	Teorik pI/MA ^g	EPS ^h	İfade profili ⁱ
62	METK2_BRAJU	S-adenozilmetiyonin sentetaz 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	371	5.8/43.2	5.4/42.9	12	
63	MB31_ARATH	Mirosinaz-bağlayıcı protein-benzeri At3g16470	<i>Arabidopsis thaliana</i>	147	5.1/45.0	5.1/48.5	1	
64	PGKH_ARATH	Fosfogliserat kinaz	<i>Arabidopsis thaliana</i>	76	5.2/45.5	6.2/49.9	5	
65	ATPA_DIOEL	ATP sentaz alt birim alfa	<i>Dioscorea elephantipes</i>	152	5.3/58.6	5.4/55.1	13	

^a 2-D jellerde gösterilen benek numarasını ifade eder (Şekil 4.10).

^b SwissProt ve NCBI veri tabanlarına karşı yapılan MASCOT taramasının en iyi sonucuna göre belirlenen aksesyon numarasını ifade eder.

^c SwissProt ve NCBI veri tabanlarına karşı yapılan MASCOT taramasının en iyi sonucuna göre belirlenen proteini ifade eder.

^d SwissProt ve NCBI veri tabanlarına karşı yapılan MASCOT taramasının en iyi sonucuna göre belirlenen bitki türünü ifade eder.

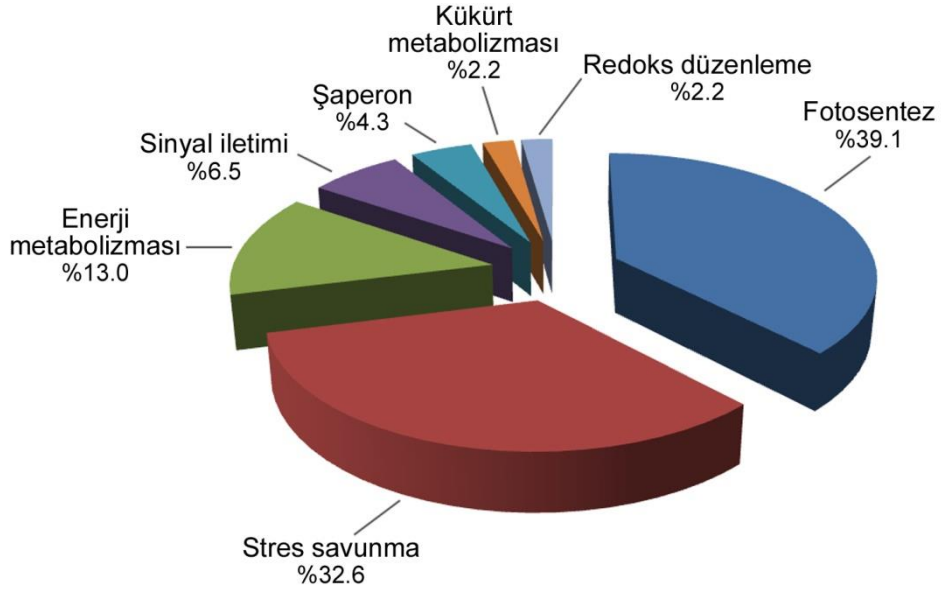
^e MS analizleri ve MASCOT taraması temelinde yapılan protein tanımlaması için olasılık skorunu ifade eder.

^f Tanımlanan protein için deneysel izoelektrik noktası (pI) ve moleküler ağırlığı (MA, kDa) ifade eder.

^g Tanımlanan protein için teorik izoelektrik noktası (pI) ve moleküler ağırlığı (MA, kDa) ifade eder.

^h Eşleşen peptid sayısını (EPS) ifade eder.

ⁱ NK Petrol (gri kolonlar) ve Sary (siyah kolonlar) çeşidinde protein bolluğundaki değişimleri ifade eder.



Şekil 4.11 Kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda Cr(VI) stresi ve farklı sülfat uygulamalarında tanımlanmış proteinlerin fonksiyonlarına göre sınıflandırılması.

Kontrole göre –S/–Cr uygulaması NK petrol çeşidinde klorofil a-b bağlayıcı protein 6A (benek 16)'nın ifadesini azalan yönde düzenlerken, –S/+Cr uygulaması bu proteinin ifadesinde 3.2 katlık bir artışa neden olmuştur. Kontrole göre –S/–Cr uygulaması NK Petrol çeşidinde klorofil a-b bağlayıcı protein CP26 (benek 26)'nın ifadesini azalan yönde düzenlemiştir. +S/+Cr uygulamasının NK Petrol çeşidinde klorofil a-b bağlayıcı protein 13 (benek 29)'ün ifade seviyesini 2.2 kat arttırdığı bulunmuştur. Kontrole göre +S/+Cr uygulaması Sary çeşidinde karbonik anhidraz proteininin (benek 27) ifade seviyesini azalan yönde düzenlemiştir. NK Petrol çeşidinde karbonik anhidraz proteininin (benek 34) ifade seviyesi –S/–Cr uygulamasında azalan yönde düzenlenmiştir. Ribuloz bifosfat karboksilaz/oksijenaz (RuBisCO)'ın büyük zincirinin (benek 37, 38 ve 39) kükürt eksikliği altındaki NK Petrol çeşidinde azalan yönde düzenlendiği belirlenmiştir. Krom stresine hassas Sary çeşidinde magnezyum-şelat azaltıcı birim chli'nin –S/+Cr uygulaması (benek 59) ve +S/+Cr uygulamasında (benek 61) azalan yönde düzenlendiği bulunmuştur. NK Petrol çeşidinde plastid-lipid-ilişkili protein 6 (benek 28)'nin kontrole göre –S/+Cr uygulamasında 2.6 kat arttığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, RuBisCO aktivaz (benek 44) proteininin –S/–Cr uygulamasına maruz kalan NK Petrol çeşidinde azalan yönde düzenlendiği, buna karşın +S/+Cr uygulaması

altındaki Sary çeşidinde 2.2 kat artış gösterdiği bulunmuştur. Fosfogliserat kinaz (benek 64) enziminin ifade seviyesi NK Petrol çeşidinde +S/+Cr uygulamasında 4.3 kat, Sary çeşidinde ise -S/+Cr uygulamasında 2.4 kat artış göstermiştir. Kombine stres (-S/+Cr) ve +HS/-Cr uygulaması 50S ribozomal protein L12-3 (benek 9)'ün ifade seviyesini NK Petrol çeşidinde sırasıyla 2.1 ve 2.3 kat arttırmıştır. Bununla birlikte, +HS/+Cr uygulaması 30S ribozomal protein 1 (benek 46)'in ifade seviyesini Sary çeşidinde azalan yönde düzenlemiştir (Çizelge 4.6).

Mevcut araştırmada, enerji metabolizması ile ilgili 5 proteinin (2, 3, 30, 54 ve 57 nolu benekler) ifadesi artan yönde düzenlenirken, 1 proteinin (benek 65) ifadesi azalan yönde düzenlenmiştir (Çizelge 4.6 ve 4.7). Krom stresine toleranslı NK Petrol çeşidinde -S/+Cr ve +HS/+Cr uygulamaları ATP sentaz epsilon zinciri (benek 2 ve 3) proteininin ifadesini artan yönde düzenlemiştir. Diğer taraftan, her iki çeşitte ATP sentazın alfa alt biriminin (benek 65) ifade seviyesinin -S/-Cr uygulaması tarafından azalan yönde düzenlendiği belirlenmiştir. Kombine stres (-S/+Cr), Sary çeşidinde triozfosfat izomeraz (benek 30) proteinini azalan yönde düzenlemiştir. Muhtemel fruktoz-bifosfat aldolaz 3 (benek 54) enziminin ifade seviyesi +S/+Cr uygulaması altındaki Sary çeşidinde 2.1 kat artış göstermiştir. Cr(VI) stresi ve tüm S konsantrasyonlarına ait uygulamalar NK Petrol çeşidinin fruktoz-bifosfat aldolaz (benek 57) enziminin ifade seviyesinde 2.1-3.1 kat artışa neden olmuştur (Çizelge 4.6).

Mevcut araştırmada, stres savunma ile ilgili 10 proteinin (6, 17, 18, 19, 21, 22, 25, 33, 45 ve 63 nolu benekler) ifadesi artan yönde düzenlenirken, 5 proteinin (4, 14, 42, 50 ve 60 nolu benekler) ifadesi azalan yönde düzenlenmiştir (Çizelge 4.6 ve 4.7). +S/+Cr uygulaması NK Petrol çeşidinde peroksiredoksin-2E proteininin (benek 4) ifade seviyesini azalan yönde düzenlemiştir. Kontrole göre +HS/-Cr uygulaması NK Petrol çeşidinde tiyoredoksin M-tip 4 (benek 6) proteininin ifade seviyesini 2.3 kat arttırmıştır.

Çizelge 4.7 MALDI-TOF/TOF kütle spektrometrisi ve MASCOT veri tabanı taraması ile tanımlanan proteinlerin hücrel lokalizasyonu ve fonksiyonları.

Benek	Protein	Lokalizasyon	Fonksiyon
2	ATP sentaz epsilon zinciri	Kloroplast	Enerji metabolizması
3	ATP sentaz epsilon zinciri	Kloroplast	Enerji metabolizması
4	Peroksiredoksin-2E	Kloroplast	Stres savunma
5	Sitokrom b ₆ -f kompleksi demir-kükürt alt birimi	Kloroplast	Fotosentez
6	Tiyoredoksin M-tip 4	Kloroplast	Stres savunma
7	Sitokrom b ₆ -f kompleksi demir-kükürt alt birimi	Kloroplast	Fotosentez
8	Sitokrom b ₆ -f kompleksi demir-kükürt alt birimi	Kloroplast	Fotosentez
9	50S ribozomal protein L12-3	Kloroplast	Fotosentez
14	Germin-benzeri protein 1		Stres savunma
16	Klorofil a-b bağlayıcı protein 6A	Kloroplast	Fotosentez
17	2-Cys peroksiredoksin BAS1	Kloroplast	Stres savunma
18	2-Cys peroksiredoksin BAS1	Kloroplast	Stres savunma
19	2-Cys peroksiredoksin BAS1	Kloroplast	Stres savunma
21	Glutatyon S-transferaz		Stres savunma
22	Ferritin-1	Kloroplast	Stres savunma
23	20 kDa şaperonin	Kloroplast	Şaperon
25	Glutatyon S-transferaz 103-1A		Stres savunma
26	Klorofil a-b bağlayıcı protein CP26	Kloroplast	Fotosentez
27	Karbonik anhidraz	Kloroplast	Fotosentez
28	Muhtemel plastid-lipid-ilişkili protein 6	Kloroplast	Fotosentez
29	Klorofil a-b bağlayıcı protein 13	Kloroplast	Fotosentez
30	Triozofosfat izomeraz	Sitozol	Enerji metabolizması
33	L-askorbat peroksidaz 1	Sitozol	Stres savunma
34	Karbonik anhidraz	Kloroplast	Fotosentez
37	RuBisCO büyük zincir	Kloroplast	Fotosentez
38	RuBisCO büyük zincir	Kloroplast	Fotosentez
39	RuBisCO büyük zincir	Kloroplast	Fotosentez
40	Laktoilglutatyon liyaz		Redoks düzenleme
42	Tiazol biyosentetik enzim	Kloroplast	Stres savunma
44	RuBisCO aktivaz 2	Kloroplast	Fotosentez
45	Tiazol biyosentetik enzim	Kloroplast	Stres savunma
46	30S ribozomal protein 1	Kloroplast	Fotosentez
50	Tiazol biyosentetik enzim	Kloroplast	Stres savunma
51	Anneksin D1		Sinyal iletimi
52	Anneksin D1		Sinyal iletimi
53	Anneksin D1		Sinyal iletimi

Çizelge 4.7 Devamı

Benek	Protein	Lokalizasyon	Fonksiyon
54	Muhtemel fruktoz-bifosfat aldolaz 3	Kloroplast	Enerji metabolizması
56	Lon proteaz homologu 1		Şaperon
57	Fruktoz-bifosfat aldolaz	Sitozol	Enerji metabolizması
59	Magnezyum-şelataz alt birim chlI	Kloroplast	Fotosentez
60	Uroporfirinojen dekarboksilaz 2	Kloroplast	Stres savunma
61	Magnezyum-şelataz alt birim chlI	Kloroplast	Fotosentez
62	S-adenozilmetiyonin sentetaz 2		Kükürt metabolizması
63	Mirosinaz-bağlayıcı protein-benzeri At3g16470		Stres savunma
64	Fosfogliserat kinaz	Kloroplast	Fotosentez
65	ATP sentaz alt birim alfa	Kloroplast	Enerji metabolizması

Germin-benzeri proteinin (benek 14) ifade seviyesi +HS/–Cr uygulamasında Sary çeşidinde azalan yönde düzenlenmiştir. NK Petrol çeşidinde +S/+Cr, –S/–Cr, –S/+Cr ve +HS/–Cr uygulamaları 2-Cys peroksiredoksin BAS1 proteininin (benek 17, 18 ve 19) ifade seviyesinde 2.1-3.2 kat artışa neden olmuştur. Kombine stres (–S/+Cr), NK Petrol çeşidinde glutatyon S-transferaz (benek 21) enziminin ifade seviyesini 4.3 kat arttırmıştır. Bir diğer glutatyon S-transferaz 103-1A (benek 25)'nin ifade seviyesi ise –S/–Cr uygulaması altındaki Sary çeşidinde 2.1 kat artış göstermiştir. Kombine stres NK Petrol çeşidinde ferritin-1 (benek 21) ifadesinde 4 kat artışa neden olurken, Sary çeşidinde 2.3 kat artışa neden olmuştur. Diğer bir önemli antioksidan enzim olan L-askorbat peroksidaz 1 proteininin (benek 33) ifade seviyesi –S/+Cr uygulaması altındaki NK Petrol çeşidinde 2.6 kat artış göstermiştir. Sary çeşidinde tiazol biyosentetik enziminin (benek 42 ve 50) ifade seviyesi kontrole göre +S/+Cr ve –S/–Cr uygulamalarında azalan yönde düzenlenirken, bu enzimin diğer bir formu (benek 45) +HS/+Cr uygulaması altındaki NK Petrol çeşidinde 2.4 kat artış göstermiştir. Uroporfirinojen dekarboksilaz 2 (benek 60) enziminin ifade seviyesi +HS/+Cr uygulaması altındaki Sary çeşidinde azalan yönde düzenlenmiştir. Bununla birlikte, tüm S konsantrasyonları ve Cr(VI) stresi uygulamalarında mirosinaz-bağlayıcı protein-benzeri At3g16470 (benek 63) proteininin ifade seviyesi NK Petrol çeşidinde 2.6-4.4 kat artarken, Sary çeşidinde 2.5-2.9 kat artış göstermiştir (Çizelge 4.6).

Mevcut araştırmada, şaperon aktivitesi gösteren 2 proteinin (23 ve 56 nolu benekler) ifadesi artan yönde düzenlenmiştir (izelge 4.6 ve 4.7). Kükürt eksikliği NK Petrol eşidinde 20 kDa şaperonin (benek 23) proteininin ifade seviyesini kontrole göre 2.1 kat arttırmıştır. Bununla birlikte, +S/+Cr uygulaması lon proteaz homologu 1 (benek 56) proteininin ifade seviyesini NK Petrol eşidinde 2.5 kat arttırırken, Sary eşidinde 4 kat arttırmıştır. Ayrıca +HS/+Cr uygulaması sadece NK Petrol eşidinde bu proteinin ifade seviyesinde 2.4 kat artışa neden olmuştur (izelge 4.6).

Kanola fidelerinde Cr(VI) stresi ve farklı sülfat uygulamaları sinyal iletimi ile ilişkili anneksin D1 (51, 52 ve 53 nolu benekler) proteininin ifadesini artan yönde düzenlemiştir (izelge 4.6 ve 4.7). +S/+Cr uygulaması, anneksin D1 (benek 51) proteininin ifadesini NK Petrol eşidinde 2.4 kat, Sary eşidinde ise 2.2 kat arttırmıştır. Ayrıca +HS/+Cr uygulaması sadece Sary eşidinde anneksin D1'in ifade seviyesinde 3.3 kat artışa neden olmuştur. Diğer anneksin D1 proteininin (benek 52) ifade seviyesi +S/+Cr uygulamasında sadece Sary eşidinde artarken, üçüncü anneksin D1 proteininin (benek 53) ifade seviyesi her iki kanola çeşidinde artmıştır (izelge 4.6). Redoks düzenlenmesi ile ilişkili protein olan laktoilglutasyon liyaz (benek 40)'ın ifade seviyesi NK Petrol eşidinde tüm Cr(VI) uygulamalarında 2.2-2.9 kat artış gösterirken, Sary eşidinde +S/+Cr ve -S/+Cr uygulamalarında sırasıyla 2.5 ve 6.9 kat artış göstermiştir. Bununla birlikte, -S/-Cr uygulaması kükürt metabolizması ile ilişkili S-adenozilmetiyonin sentetaz 2 (benek 62) proteininin ifade seviyesini NK Petrol eşidinde 2.5 kat arttırmıştır (izelge 4.6).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. Kanola Çeşitlerinin Fitoremediasyon Potansiyellerinin Belirlenmesi

Bitkilerde Cr(VI) toksisitesinin en yaygın etkisi büyüme inhibisyonu, yaprak klorozu ve çeşitli metabolik yollarda işlev gören birçok enzimin aktivitesindeki değişimleri kapsamaktadır (Tiwari *et al.* 2013). Cr(VI) stresi asimilatların üretimi ve translokasyonunu azaltarak büyüme ve gelişmeyi olumsuz etkilemektedir (Hayat *et al.* 2012). Mevcut araştırmada, sekiz 8 kanola (*Brassica napus* L.) çeşidinin (Champlain, Dante, Heros, Nelson, NK Petrol, Sary, Süzer ve Vectra) fide büyümesi üzerine Cr(VI) stresinin etkilerinin belirlenmesinin yanı sıra Cr(VI) stresine en toleranslı ve en hassas kanola çeşitlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, hidroponik kültür ortamında yetiştirilen 14 günlük kanola fideleri 0, 10, 50 ve 100 µM Cr(VI) konsantrasyonlarına 7 gün süreyle maruz bırakılmıştır. Cr(VI) stresi fidelerin kuru ağırlıklarında önemli azalmaya neden olmuştur. Kuru madde üretimi üzerine Cr(VI)'un olumsuz etkileri, fotosentetik ve mitokondriyal işlevlerde oksidatif zararlarla sonuçlanan Cr(VI)'un indirekt etkilerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Dixit *et al.* 2002; Subrahmanyam 2008). Bununla birlikte, Cr(VI)'un kök hücrelerinde bulunan taşıyıcılara bağlanmada S, P, Fe ve Mn gibi birçok besin elementi ile rekabet ettiği bilinmektedir. Birçok çalışmada, Cr(VI)'un normal büyüme için gerekli birçok besin elementinin alınımını ve translokasyonunu engelleyerek büyümede inhibisyona neden olduğu belirtilmiştir (Shanker *et al.* 2005; Zeng *et al.* 2010a, b).

Birçok mekanizmayı kapsayan ağır metal toleransı, potansiyel olarak toksik metallerin varlığında büyümenin sürdürülmesi olarak ifade edilmektedir (Clemens 2006). Mevcut araştırmada, 8 kanola çeşidi kuru ağırlıktaki inhibisyon temelinde Cr(VI) stresine toleransları bakımından sınıflandırılmıştır. Bu bağlamda, NK Petrol %82.5-74.1'lik tolerans indeksi değerleri ile Cr(VI) stresine en toleranslı çeşit olarak belirlenirken, Sary %65.7-40.8'lik tolerans indeksi değerleri ile en hassas çeşit olarak belirlenmiştir. Diwan vd. (2008), farklı Cr(VI) konsantrasyonlarına maruz bırakılan 10 Hint hardalı (*Brassica juncea* L.) genotipini kuru ağırlıklarındaki inhibisyonlar temel alınarak hesaplanan

tolerans indeksi değerlerine göre sınıflandırmış ve bu genotiplerin fitoremediasyon potansiyellerini değerlendirmiştir. Araştırıcılar, Pusa Jai Kisan genotipinin yüksek Cr(VI) konsantrasyonlarında yüksek büyüme oranlarını sürdürerek maksimum tolerans indeksi değerlerine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Fitoremediasyon, ağır metallerle kirlenmiş ekosistemlerin iyileştirilmesinde bitkilerin kullanıldığı bir teknolojidir. Mevcut araştırmada, hidroponik kültür ortamında yetiştirilen 8 kanola eşidinin Cr(VI) ağır metali için fitoremediasyon potansiyelleri değerlendirilmiştir. Toprak st dokularda Cr birikimi kanola eşitleri arasında önemli farklılıklar göstermiştir. En yüksek Cr(VI) konsantrasyonunda (100 μM), maksimum Cr birikimi hassas Sary (705.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ KA) eşidinde belirlenirken, minimum Cr birikimi toleranslı NK Petrol (255.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ KA) eşidinde belirlenmiştir. Araştırmamıza zıt olarak, *B. juncea*'nın toleranslı genotipinin en yüksek oranda Cr biriktirdiği, hassas genotipin ise en düşük oranda Cr biriktirdiği bildirilmiştir (Diwan *et al.* 2008). Bununla birlikte, hidroponik denemelerden elde edilen bulgular direkt olarak doğal koşullara uygulanamamaktadır (Hernndez-Allica *et al.* 2008). Bu bağlamda hassas Sary eşidinin toprakta büyümesi durumunda, topraktaki yüksek Cr konsantrasyonları tarafından olumsuz etkileneceği ve dolayısıyla olgunlaşmış bitkilerde Cr alımının sınırlanacağını söylemek mümkün olabilir. Hernndez-Allica vd. (2008), yüksek biyoktelli çeşitlerin fitoremediasyon potansiyelinin sadece toprak üstü organlarda metalleri biriktirebilme yeteneğine değil, aynı zamanda topraktaki yüksek konsantrasyonlardaki metalleri tolere edebilme kapasitesine bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak, NK Petrol eşidinin Sary çeşidine göre nispeten Cr metallerini dokularının dışında tutması nedeniyle daha fazla biyokütle üreterek Cr(VI) toksisitesine daha yüksek seviyede tolerans gösterdiği ve Cr ile kirlenmiş alanların temizlenmesinde fitoremediasyon potansiyeline sahip olduğu ileri sürülebilir. Bununla birlikte, fitoremediasyonda bitkiler kullanıldıktan sonra ağır metal içeren biyokütlenin imha edilmesi gerekmektedir. Son yıllarda, fitoremediasyondan elde edilen bitki materyallerinin özellikle enerji üretiminde kullanılabileceği ileri sürülmüştür (Zhang *et al.* 2013).

Ağır metaller direkt olarak veya reaktif oksijen türlerinin oluşumuyla dolaylı olarak membranlara zarar vermektedir (Pandey *et al.* 2009). Lipid peroksidasyonunun önemli bir sitotoksik ürünü olan malondialdehidin (MDA) oluşumu membran lipidlerinin peroksidasyonunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Singh *et al.* 2004). Mevcut araştırmada, kanola çeşitlerinin yaprak dokularında MDA içeriğinin artması artan lipid peroksidasyonunu göstermektedir. Kontrole göre 100 µM Cr(VI) konsantrasyonunda MDA içeriğindeki artış hassas Sary eşidinde en yüksekken (2.4 kat), toleranslı NK Petrol eşidinde en düşük (1.5 kat) bulunmuştur. Kanola fidelerinin yaprak dokularındaki MDA içeriğindeki artış Cr(VI) stresi koşullarında artan reaktif oksijen türlerinin üretiminin bir göstergesi olabilir. NK Petrol çeşidine göre Sary eşidinin daha fazla MDA içeriğine sahip olması, büyümedeki sınırlı inhibisyonla gösterildiği gibi NK Petrol eşidinin daha az oksidatif strese maruz kaldığı ve stresin olumsuz etkilerini azaltıcı bazı özelliklere sahip olabileceğini gösterebilir. Cr(VI) stresi altındaki birçok bitki türünde de lipid peroksidasyonu ve dolayısıyla oksidatif stresin bir göstergesi olan MDA içeriğindeki artış belirlenmiştir (Sharma *et al.* 2011; Rai *et al.* 2013; Tiwari *et al.* 2013). Bununla birlikte, *B. juncea*'nın toleranslı genotipine göre hassas genotipinde Cr(VI) stresinin çok daha fazla seviyede lipid peroksidasyonuna neden olduğu belirtilmiştir (Diwan *et al.* 2008).

Fotosentetik pigmentlerin seviyesi Cr(VI) teşvikli toksisitenin önemli bir göstergesidir (Shanker *et al.* 2005; Subrahmanyam 2008). Fotosentetik pigmentlerin içeriğindeki azalmanın fotosentetik kapasitede azalmaya ve dolayısıyla bitki büyümesinde inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir (Sharma and Sharma 2003). Mevcut araştırmada, Cr(VI) stresi kanola çeşitlerinin klorofil içeriğinde genellikle önemli azalmaya neden olmuştur. Krom stresine toleranslı NK Petrol eşidi tüm Cr(VI) konsantrasyonlarında klorofil içeriğini korurken, hassas Sary eşidinin klorofil içeriği kontrole göre Cr(VI) konsantrasyonlarında %21-69 oranında azalmıştır. Klorofil içeriğindeki azalma Cr(VI) stresi altındaki birçok bitki türünde de belirlenmiştir (Rai *et al.* 2013; Shardendu 2013; Yıldız *et al.* 2013). Krom stresi altındaki bitkilerde klorofil içeriğindeki azalmanın klorofil biyosentezinde fonksiyon gören δ-aminolevlinik asit

dehidrataz ve protoklorofillid redüktaz gibi enzimlerin aktivitesindeki azalmayla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Vajpayee *et al.* 2000; Ganesh *et al.* 2008). Shanker vd. (2005), yapraklardaki Cr birikimi ve fotosentetik pigment içerikleri arasında ters bir ilişki olduğunu belirtmiştir. Bu durum yüksek seviyede Cr biriktiren Sary çeşidinde düşük klorofil içeriğini ve en düşük seviyede Cr biriktiren NK Petrol çeşidinde yüksek klorofil içeriğini açıklayabilir.

Bitkilerde ağır metallerin detoksifikasyonunda sistein ve glutatyon gibi düşük moleküler ağırlıklı sülfidril içeren bileşiklerin önemli rol oynadıkları bildirilmiştir (Cobbet and Goldsbrough 2002). Sinha vd. (2005), tiyol gruplarının Cr(VI) teşvikli oksidatif strese karşı bitkileri koruyabileceğini belirtmiştir. Mevcut araştırmada, Cr(VI) stresi altındaki kanola fidelerinde protein olmayan tiyollerin (NPT) konsantrasyonundaki artış tiyollü bileşiklerin Cr(VI) toleransında fonksiyon gördüğünü göstermektedir. Bununla birlikte, NPT içeriğindeki artış %42-54'lük oranla NK Petrol çeşidinde en yüksek bulunmuştur. Tiyol içeriğindeki artış Cr(VI) stresi altındaki birçok bitki türünde de belirlenmiştir (Sinha *et al.* 2005, 2009; Yıldız *et al.* 2013). Zıt olarak, *Ocimum tenuiflorum* bitkilerinde Cr(VI) stresinin NPT içeriklerinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Rai *et al.* 2004). Mevcut araştırmada, düşük miktarda Cr biriktiren NK Petrol çeşidinde daha yüksek oranda tiyol birikimi, tiyol içeren bileşiklerin Cr'un içsel olarak alıkonulmasından ziyade toleransla ilişkili farklı metabolik yollarda önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Metal hiperakümüasyonu için ağır metallere tolerans gerekli bir özellik olup; bir bitkinin tolerans kapasitesi güçlü bir antioksidan savunma sistemine bağlıdır (Pandey *et al.* 2005). Ağır metal teşvikli oksidatif stresin üstesinden gelebilmek için bitkiler enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşan antioksidan savunma sistemine sahiptir. Süperoksit dismutaz (SOD), iki süperoksit anyonunun ($O_2^{\bullet-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve O_2 'e dönüşümünü katalizleyen anahtar bir enzimdir. Katalaz (CAT) ve guaiakol peroksidaz (POD) ise H_2O_2 'i temizler ve sırasıyla $O_2+H_2O_2$ 'e ve fenolik bileşiklere dönüştürür (Gajewska *et al.* 2006). Bu antioksidan enzimlerin birlikte

fonksiyonu reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde ve fizyolojik redoks durumunun sürdürülmesinde önemli rol oynamaktadır (Pandey *et al.* 2009). Mevcut araştırmada, Cr(VI) stresi altındaki kanola çeşitlerinin yaprak dokularında SOD aktivitesi kontrole göre önemli artış göstermiştir. Kanola çeşitlerinde SOD aktivitesinin artması Cr(VI)'un oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, SOD aktivitesindeki en fazla artış toleranslı NK Petrol ve hassas Sary çeşitlerinde belirlenmiş olması bu enziminin etkinliğinin Cr(VI) toleransı ile ilişkili olmayabileceğini göstermektedir. Cr(VI) stresi kanola çeşitlerinin yaprak dokusunda POD aktivitesinde önemli artışa neden olmuştur. Tüm çeşitlerin POD aktiviteleri karşılaştırıldığında, hassas Sary çeşidinin kontrole göre Cr(VI) stresi altında daha yüksek POD aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Ağır metallerin POD'un lokalize olduğu hücre duvarı ve vakuollerde alıkonulduğundan dolayı Sary çeşidinde daha fazla Cr birikiminin POD aktivitesinde daha fazla artışa neden olduğu ileri sürülebilir. SOD ve POD aktivitesindeki Cr(VI) stresi teşvikli artış birçok bitki türünde de belirlenmiştir (Subrahmanyam 2008; Rai *et al.* 2013; Shardendu 2013; Yıldız *et al.* 2013). Katalaz H₂O₂'in detoksifikasyonunda fonksiyon gören diğer bir önemli enzimdir. Mevcut araştırmada, Cr(VI) stresi altındaki kanola çeşitlerinin yaprak dokularında CAT aktivitesi kontrole göre önemli düzeyde azalmıştır. CAT aktivitesindeki Cr(VI) stresi teşvikli azalış birçok bitki türünde de belirlenmiştir (Liu *et al.* 2008; Gangwar *et al.* 2011; Yıldız *et al.* 2013). CAT aktivitesindeki azalmanın, Cr iyonlarının enzim sistemi üzerine inhibe edici etkisinden veya Cr iyonlarının tiyol bileşiklerine bağlanarak protein sentezini ve enzim aktivitesini bozmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir (MacRae and Fergusam 1985). Diğer taraftan, toleranslı NK Petrol çeşidinin Cr(VI) stresi koşullarında yüksek CAT aktivitesini sürdürebildiği belirlenmiştir. Krom stresi koşullarında yüksek CAT aktivitesinin sürdürülmesinin NK Petrol çeşidinin toleransına katkıda bulunduğu ileri sürülebilir.

Sonuç olarak, kanola çeşitlerinin fitoremediasyon potansiyelleri incelenen parametrelere bağlı olarak farklılık göstermiştir. NK Petrol çeşidi en düşük seviyede Cr biriktirmiş ve Cr iyonlarının toksik etkilerinden uzak kalarak Cr(VI) stresini tolere edebilmiştir. Buna karşın, toprak üstü dokularında yüksek seviyede Cr biriktiren Sary

çeşidi Cr(VI) stresine karşı büyümede aşırı hassasiyet göstermiştir. Bu bağlamda, doğal koşullar altında fitoremediasyondaki başarı hem bitkilerin toprak üstü dokularında metalleri biriktirebilme kapasitesine hem de bitkinin nispeten yüksek metal konsantrasyonlarını tolere edebilme kapasitesine bağlı olduğu ifade edilebilir. Bu nedenle, NK Petrol çeşidinin toprak üstü dokularında diğer çeşitlere göre nispeten daha düşük miktarda Cr biriktirebilmesine karşın, Cr(VI) toksisitesini tolere edebilmesi nedeniyle kromla kirlenmiş alanların fitoremediasyonunda kullanılabilme potansiyelinin daha yüksek olduğu söylenebilir.

5.2. Sülfat Kullanılabilirliğinin Cr(VI) Toleransı Üzerine Etkisi

Bu araştırmada, kükürt (S) kullanılabilirliğinin Cr(VI) stresi altındaki nispeten Cr-toleranslı NK Petrol ve Cr-hassas Sary kanola çeşitlerinde önemini belirlemek için fide büyümesi, Cr birikimi, klorofil içeriği, tiyol içeriği, lipid peroksidasyonu, antioksidan enzimlerin aktivitesi, AsA-GSH döngüsünün önemli bileşenlerinin içerikleri ve *BnMP1* geninin ifade seviyesindeki değişimler belirlenmiştir. Bu amaçla, 7 günlük kanola fideleri farklı S konsantrasyonlarını (-S: 0 mM sülfat, +S: 1 mM sülfat ve +HS: 2 mM sülfat) içeren besin çözeltilerinde 7 gün daha büyütüldükten sonra 3 gün süreyle 100 µM Cr(VI) stresine maruz bırakılmıştır.

Kükürt sistein ve metiyonin gibi amino asitler, glutatyon (GSH), proteinler ve sülfolipidler gibi bileşiklerin yapısında bulunmasından dolayı bitki büyüme ve gelişimi için önemli bir elementtir. Diğer tarımsal bitkilere göre kanola yüksek kükürt gereksinimine sahiptir. Bu nedenle, kanola bitkileri kükürt eksikliğine oldukça hassastır (De Pascale *et al.* 2008). Kükürt eksikliği tarımsal alanlarda yaygın olarak oluşmakta (Astolfi *et al.* 2010) ve bitki metabolizmasında değişimlere neden olmaktadır (Honsel *et al.* 2012). Mevcut araştırmada, kontrole (+S/-Cr) göre kükürt eksikliği (-S/-Cr) NK Petrol ve Sary kanola çeşitlerinin taze ve kuru ağırlıklarını azaltırken, bu azalma Sary çeşidinde daha fazla bulunmuştur. Sülfat eksikliğinin fide büyümesi üzerine olumsuz etkisi *A. thaliana* bitkilerinde de belirlenmiştir (Bashir *et al.* 2013). Mevcut araştırmada, Cr(VI) stresi tüm sülfat konsantrasyonlarında her iki çeşidin taze ağırlıklarında azalmaya

neden olurken, kuru ağırlıktaki azalma sadece Sary çeşidinde belirlenmiştir. Keza Sary çeşidinde taze ve kuru ağırlıklardaki maksimum azalma kombine strese (-S/+Cr) maruz bırakılan fidelerde belirlenmiştir. Kükürt eksikliği koşullarında fide büyümesindeki inhibisyonun klorofil biyosentezinin bozulmasından ve fotosentetik enzimlerin azalmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Nikiforova *et al.* 2003; Lunde *et al.* 2008; Bashir *et al.* 2013). Ayrıca Cr iyonları spesifik taşıyıcılarına bağlamada sülfat ile rekabet ettiği ve azalan sülfat alınımının fide büyümesini azalttığı belirtilmiştir (Shanker *et al.* 2005). Bununla birlikte, düşük afiniteli sülfat taşıyıcılarının transkript birikimindeki ve buna bağlı olarak sülfat alınımındaki azalma Cr(VI) stresi altındaki *B. juncea* bitkilerinde belirlenmiştir (Schiavon *et al.* 2008).

Krom kökler tarafından absorbe edildikten sonra çok düşük oranda toprak üstü organlara taşınmaktadır. Krom hem trivalent hem de hekzavalent formda alınmasına karşın Cr alınımı için spesifik bir mekanizma bulunmamaktadır (Singh *et al.* 2013). Bununla birlikte, bitkilerde Cr(VI) alınımının muhtemelen sülfat veya fosfat taşıyıcıları aracılığıyla aktif bir mekanizmayla oluştuğu belirtilmiştir (Shanker *et al.* 2005). Sıvı besin ortamından Cr alınımı pH, oksidasyon durumu ve büyüme ortamındaki konsantrasyonu tarafından belirlenmektedir (Babula *et al.* 2008). *Brassicaceae* ailesinin birçok üyesi kükürt seven bitkiler olarak tanımlanmakta ve yüksek oranlarda Cr'u dokularında biriktirebilmesi nedeniyle (Zayed *et al.* 1998), Cr taşınımının sülfat alınım mekanizması ile gerçekleştiği ileri sürülmüştür (Barcelo and Poschenrieder 1997). Bununla birlikte, besin ortamındaki kükürdün Cr alınımını azalttığı bildirilmiştir (Schiavon *et al.* 2008). Mevcut araştırmada, Cr(VI) stresi NK Petrol ve Sary kanola çeşitlerinin toprak üstü dokularında Cr birikimine neden olmuştur. +S/+Cr ve +HS/+Cr uygulamalarında Cr birikimi benzerken, -S/+Cr uygulamasında oldukça yüksek seviyede Cr birikimi gözlemlenmiştir. Bu sonuç, S ve Cr(VI)'un taşıyıcılar ile alınımında birbirleri ile rekabet ettiğini göstermektedir. Benzer sonuçlar, Cr(VI) stresi altındaki *B. juncea* bitkilerinde de belirlenmiştir (Schiavon *et al.* 2008, 2012). Bununla birlikte, tüm S konsantrasyonlarında hassas Sary çeşidi daha yüksek seviyede Cr biriktirmiştir. Hassas

Sary çeşidinde fide büyümesindeki daha fazla azalma toprak üstü organlarda daha fazla Cr birikiminden kaynaklanabileceği ileri sürülebilir.

Membranlardaki Cr(VI)-teşvikli oksidatif zararın değerlendirilmesi için NK Petrol ve Sary kanola çeşitlerinin yaprak dokularında malondialdehit (MDA) içerikleri belirlenmiştir. Tüm S konsantrasyonlarında Cr(VI) stresi her iki çeşidin MDA içeriklerinde artışa neden olurken, bu artış toleranslı NK Petrol çeşidinde 1.2-1.3 kat, hassas Sary çeşidinde ise 1.3-1.8 kat olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, Sary çeşidinde yüksek seviyede biriken Cr iyonlarının reaktif oksijen türlerinin üretimini arttırarak daha fazla lipid peroksidasyonuna neden olduğunu göstermektedir. *Brassica campestris* (Anjum *et al.* 2008) ve *A. thaliana*'da (Bashir *et al.* 2013) yapılan çalışmalara zıt olarak, araştırmamızda kükürt eksikliği her iki çeşidin MDA içeriğinde önemli değişikliğe neden olmamıştır. Bununla birlikte, Cr(VI) stresi altındaki bitkilerde yüksek S konsantrasyonu ve düşük MDA içeriği arasındaki ilişki Cr(VI)-teşvikli oksidatif stresin hafifletilmesinde kükürdün rolünü göstermektedir. Yaprak klorozu bitkilerde Cr(VI) stresinin yanı sıra S eksikliğinin de en erken ve en belirgin semptomlarından biridir (Lunde *et al.* 2008; Schiavon *et al.* 2012). Bununla birlikte, fotosentetik pigmentlerin seviyesinin Cr(VI)-teşvikli toksisitenin önemli bir göstergesi olduğu bildirilmiştir (Shanker *et al.* 2005; Subrahmanyam 2008). Mevcut araştırmada, kontrole göre -S/-Cr uygulaması sadece hassas Sary çeşidinin klorofil içeriğinde bir azalmaya neden olmuştur. Bununla birlikte, Cr(VI) stresi Sary çeşidinin klorofil içeriğini tüm S konsantrasyonlarında azaltırken, NK Petrol çeşidinin klorofil içeriği sadece kombine stres uygulamasında azalmıştır. Kükürt eksikliği çeken bitkilerde S-adenozil-metiyoninin miktarındaki azalmanın klorofil içeriğinde azalmaya ve fotorespirasyonda artışa neden olduğu belirtilmiştir (Hoefgen and Nikiforova 2008). Aynı araştırmacılar, bu azalma ve artışların fotosentezin azalmasına ve enerji asimilasyonunun sınırlanmasına ve metabolizmada genel bir düşüşe neden olduğunu bildirmiştir (Hoefgen and Nikiforova 2008). Bu sonuçlar, kükürt eksikliği ve Cr(VI) stresine maruz bırakılan kanola fidelerinde biyokütle üretimindeki azalmanın MDA içeriğindeki artışın yanı sıra klorofil içeriğindeki azalma ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Bitkiler reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimini engelleyen ve ağır metal teşvikli oksidatif stresten hücreleri koruyan iyi organize olmuş ve karmaşık antioksidan savunma sistemi geliştirmiştir (Mittler 2002). Bu savunma sistemi süperoksit dismutaz (SOD), guaiakol peroksidaz (POD), katalaz (CAT), glutatyon S-transferaz (GST), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimleri ve askorbat (AsA) ve glutatyon (GSH) gibi enzimatik olmayan antioksidanları içermektedir (Apel and Hirt 2004). Mevcut araştırmada, Cr(VI) toleransı üzerine sülfat kullanılabilirliğinin daha iyi anlaşılabilmesi için antioksidan savunma sistemi çalışılmıştır. Bu araştırmada farklı kükürt konsantrasyonları ve Cr(VI) stresinin SOD, POD, CAT ve GST enzimlerinin yanı sıra AsA-GSH döngüsünün enzimatik bileşenleri olan APX ve GR aktivitesini etkilediği bulunmuştur. SOD oksidatif strese karşı bitkileri koruyan anahtar bir enzimdir ve $O_2^{\bullet-}$ 'in H_2O_2 ve O_2 'e dismutasyonunu kataliz etmektedir. Farklı S konsantrasyonları her iki çeşidin SOD aktivitesinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Bununla birlikte, Cr(VI) stresi tüm S konsantrasyonlarında SOD aktivitesini arttırırken bu etki toleranslı NK Petrol çeşidinde daha belirgin bulunmuştur. Kombine stres SOD aktivitesinde daha fazla artışa neden olmuştur. Bu durumun toprak üstü dokularda daha fazla Cr birikiminden kaynaklandığı ileri sürülebilir. Ayrıca kükürt eksikliği ve Cr(VI) stresi koşullarında NK Petrol çeşidinin $O_2^{\bullet-}$ 'i temizleme kapasitesinin daha yüksek olması lipid peroksidasyonu ile gösterildiği gibi daha düşük orandaki oksidatif stresi açıklayabilir. Tüm S konsantrasyonlarında Cr(VI) stresi POD aktivitesinde artışa neden olmuştur. Bununla birlikte, NK Petrol ile mukayese edildiğinde Sary çeşidinin daha yüksek POD aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. SOD aktivitesine benzer olarak, -S/+Cr uygulaması POD aktivitesinde daha fazla artışa neden olmuştur. Bu durum, POD enziminin lokalize olduğu hücre çeperi ve vakuolde (Asada 1992) yüksek oranlarda alıkonulan Cr iyonlarından kaynaklanmış olabilir.

Diğer bir H_2O_2 temizleyici enzim olan APX aktivitesi -S/-Cr uygulamasına maruz bırakılan NK Petrol çeşidinde artış göstermiştir. Ayrıca -S/+Cr ve +S/+Cr uygulamaları APX aktivitesinde artışa neden olurken bu artış NK Petrol çeşidinde daha yüksek

bulunmuştur. Bununla birlikte, kontrole göre mukayese edildiğinde aşırı +HS/-Cr uygulaması APX aktivitesinde artışa neden olmuştur. Enzimin sistein rezidüeleri için S gerekli olmasına karşın S eksikliği koşullarında APX aktivitesindeki artış, S eksikliği altındaki *A. thaliana* bitkilerinde APX aktivitesinde bir azalış belirleyen Bashir vd. (2013)'nin bulgularıyla çelişmektedir. Katalaz oksidatif strese karşı bitki savunma sisteminde önemli bir role sahiptir. Kontrole göre -S/-Cr uygulaması CAT aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. Benzer sonuçlar kükürt eksikliği altındaki *A. thaliana* bitkilerinde de belirlenmiştir (Bashir *et al.* 2013). Araştırmamızda +HS/-Cr uygulaması her iki çeşidin CAT aktivitesini azaltırken bu etki Srivastava ve D'Souza (2010)'nin bulgularıyla benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte, tüm S konsantrasyonlarında Cr(VI) stresi CAT aktivitesinde azalmaya neden olurken bu etki Sary çeşidinde daha fazla bulunmuştur.

Glutasyon redüktaz reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde fonksiyon gören antioksidan sistemin önemli bir bileşenidir. GR bir elektron vericisi olarak NADPH'ı kullanarak GSSG'ü GSH'a indirgenmesine aracılık etmekte ve böylelikle oksidatif stres koşullarında yüksek GSH/GSSG ve AsA/DHA oranlarını koruyarak hücrel redoks seviyelerinin sürdürülmesini sağlamaktadır (Anjum *et al.* 2012). Cr(VI) stresinin GR aktivitesini etkilediği birçok bitki türünde belirlenmiştir (Pandey *et al.* 2009; Diwan *et al.* 2010; Tiwari *et al.* 2013). Mevcut araştırmada, kükürt eksikliği her iki çeşidin GR aktivitesinde önemli bir azalmaya neden olmuştur. Kükürt eksikliği altındaki fidelerde Cr(VI) stresi GR aktivitesinde artışa neden olurken bu artış NK Petrol çeşidinde daha fazla bulunmuştur. Bununla birlikte, +S/+Cr uygulaması GR aktivitesini azaltırken +HS/+Cr uygulaması GR aktivitesinde önemli bir değişime neden olmamıştır. Cr(VI) stresi altındaki bitkilerde GR aktivitesindeki azalma sülfidril grupları ile Cr iyonlarının direkt reaksiyonundan kaynaklanabilir; çünkü Cr iyonlarının tiyol gruplarına bağlandığı ve GR gibi tiyol içeren enzimleri inaktive ettiği bilinmektedir. Bununla birlikte, kükürt eksikliği ve Cr(VI) stresi altındaki NK Petrol çeşidinde daha yüksek GR aktivitesi Cr(VI)-teşvikli oksidatif strese karşı bu çeşidin yüksek seviyedeki toleransı ile ilişkili olabilir.

Glutasyon S-transferazlar, daha düşük seviyede toksik veya toksik olmayan peptitler oluşturmak için elektrofilik ksenobiyotiklerin GSH'a bağlanmasını kataliz eden GSH-bağımlı enzimlerdir (Marrs 1996). GST aktivitesindeki artış Cr(VI) stresine maruz kalan *B. juncea* bitkilerinde belirlenmiştir (Pandey *et al.* 2005). Ayrıca çeltik GST geninin (*OsGSTL2*) *Arabidopsis* bitkilerinde aşırı ifadesinin ağır metalleri de içeren birçok strese karşı toleransı arttırdığı bildirilmiştir (Kumar *et al.* 2013). Mevcut araştırmada, kükürt eksikliği NK Petrol çeşidinin GST aktivitesinde artışa neden olurken Sary çeşidinde bir azalışa neden olmuştur. Bununla birlikte, kombine stres NK Petrol çeşidinin GST aktivitesinde ilave bir artışa neden olurken Sary çeşidinde önemli bir etkiye neden olmamıştır. +S/+Cr uygulaması her iki çeşidin GST aktivitesini azaltırken, +HS/+Cr uygulaması Sary çeşidinin GST aktivitesini azaltmıştır. Kükürt eksikliği koşullarında GST aktivitesindeki artış, kükürt eksikliği altındaki *Arabidopsis* bitkilerinde GST aktivitesinin azaldığını gösteren Bashir vd. (2013)'nin bulgularından farklılık göstermektedir. Sonuç olarak, kükürt eksikliği ve Cr(VI) stresi altındaki NK Petrol çeşidinde daha yüksek enzim aktivitelerinin reaktif oksijen türlerinin seviyesini düşürerek ve Cr(VI)-teşvikli lipid peroksidasyonunu hafifleterek tolerans sağladığı ileri sürülebilir.

Askorbat (AsA) apoplastta bulunan önemli bir antioksidan ve önemli hücre sel fonksiyonlarda görev alan bir metabolittir. AsA direkt olarak $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve $^1\text{O}_2$ radikalleri ile reaksiyona girebilen bir antioksidan moleküldür (Chen and Gallie 2004). AsA-GSH döngüsünde GSH ile birlikte reaktif oksijen türlerinin detoksifiye edilmesinde fonksiyon görerek toleransı arttırdığı belirtilmiştir (Anjum *et al.* 2008). Bitkilerde AsA seviyeleri ağır metalleri de içeren birçok faktör tarafından kontrol edilmektedir (Hancock and Viola 2005). Cr(VI) stresinin bitkilerde AsA içeriğinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Diwan *et al.* 2008; Pandey *et al.* 2009; Gangwar *et al.* 2011). Mevcut araştırmada, kontrole göre kükürt eksikliği AsA içeriklerinde önemli bir azalmaya neden olmuştur. Kombine stres AsA içeriklerinde daha fazla azalmaya neden olmuştur. +S/+Cr uygulaması sadece NK Petrol çeşidinin AsA içeriğini azaltmıştır. Bununla birlikte, +HS/+Cr uygulaması Sary çeşidinin AsA içeriğini azaltırken, NK Petrol çeşidinin AsA içeriğinde önemli bir etki göstermemiştir. Azalan AsA/DHA oranlarıyla gösterildiği gibi

kükürt eksikliği ve Cr(VI) stresi AsA havuzunun aşırı oksidasyonuna neden olmuştur. Bu sonuçlar, kükürt eksikliği altındaki *Hydrilla verticillata* bitkilerinde AsA içeriğinde artış belirleyen Srivastava ve D'Souza (2010)'nın bulgularına zıtlık göstermektedir.

AsA-GSH yolunun önemli bir bileşeni olarak GSH direkt veya dolaylı olarak reaktif oksijen türlerinin seviyesinin kontrol edilmesinde fonksiyon görmekte ve bu nedenle ağır metal teşvikli oksidatif zarardan bitkileri korumaktadır (Anjum *et al.* 2012). Bununla birlikte, enzimatik olmayan antioksidanlar arasında tripeptid GSH'un bitkilerde ağır metal teşvikli oksidatif strese karşı en önemli savunma noktası olduğu bildirilmiştir (Anjum *et al.* 2010, 2011; Gill and Tuteja 2010). Mevcut araştırmada, kontrole göre kükürt eksikliği her iki çeşidin GSH içeriğinde önemli bir azalmaya neden olmuştur. Birçok çalışmada kükürt eksikliğinin GSH içeriğinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Schiavon *et al.* 2007, 2008; Bashir *et al.* 2013). Araştırmamızda, normal ve aşırı sülfat uygulamalarında Cr(VI) stresi sadece NK Petrol çeşidinin GSH içeriğinde azalmaya neden olmuştur. Kombine stres her iki çeşidinin GSH içeriğinde bir artışa neden olurken bu artış Sary çeşidinde daha yüksek bulunmuştur. Bitkilerde GSH/GSSG oranının H₂O₂'in parçalanması sırasında hücrelerdeki redoks dengesinin sürdürülmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca yüksek GSH/GSSG oranının sürdürülmesinin ağır metal toleransında önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Anjum *et al.* 2012). Mevcut araştırmada, her iki çeşidin GSH/GSSG oranı kükürt eksikliği, aşırı kükürt ve Cr(VI) stresi tarafından arttırılırken bu artış Sary çeşidinde daha yüksek bulunmuştur. Toleranslı NK Petrol çeşidinde düşük GSH konsantrasyonu ve GSH/GSSG oranı, hücrel detoksifikasyonda GSH'u kullanan GST enziminin yüksek aktivitesinden veya GSH'dan sentezlenen fitoşelatinlerin aşırı üretiminden kaynaklanmış olabilir. Bu sonuçlar kanola çeşitlerinde teşvik edilen GSH sentezinin Cr(VI) toleransından ziyade Cr birikiminden sorumlu olabileceğini göstermektedir.

Kükürt özümlemesi ve kükürt içeren bileşiklerin üretimi bitkilerde ağır metallerin homeostazisi ve detoksifikasyonu için mutlak gereklidir (Na and Salt 2011). Fitoşelatinler ve GSH'un öncüsü olarak sistein, protein yapısının sürdürülmesi ve redoks

kontrolü gibi çeşitli biyolojik proseslerde önemli rollere sahiptir (Droux 2004). Mevcut araştırmada, kontrole göre kükürt eksikliği ve aşırı kükürt uygulamaları her iki çeşidin sistein içeriğinde önemli bir değişime neden olmamıştır. Bununla birlikte, Cr(VI) stresi sistein içeriğinde önemli bir artışla sonuçlanmıştır. Kombine stres NK Petrol çeşidinin sistein içeriğinde yaklaşık 7.6 kat artışa neden olurken Sary çeşidinde önemli bir değişime neden olmamıştır. Bu sonuçlar kanola fidelerinde sistein biyosentez yollarının önemli bir metabolik proses olduğunu ve Cr(VI) toleransında bir rol oynadığını gösterebilir. Bitkilerde toksik metallerin homeostazisi ve detoksifikasyonunun, yüksek afiniteli tiyol gruplarına sahip peptidlerin veya proteinlerin metal bağlama kapasitesine bağlı olduğu bildirilmiştir (Ernst *et al.* 2008). Mevcut araştırmada, kontrole göre kükürt eksikliği her iki çeşidin protein bağlı olmayan tiyol (NPT) içeriğinde önemli bir azalmaya neden olmuştur. Kombine stres ve +S/+Cr uygulaması NPT içeriklerinde artışa neden olurken bu artış Sary çeşidinde daha yüksek bulunmuştur. Artan NPT içeriği ve Cr birikimi arasındaki korelasyon, kanola fidelerinde tiyol içeren şelatörlerin Cr'un içsel olarak alıkonulmasında önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Metallotiyoneinler (MT'ler) düşük moleküler ağırlıklı, yüksek sistein içeriği ve metal bağlayıcı özelliğe sahip proteinlerdir (Cobbett and Goldsbrough 2002). Bitkiler MT'lerin etkin şekilde metalleri bağlayabildiği (Huang *et al.* 2011) ve bazı MT genlerinin metaller tarafından düzenlendiği için MT'lerin metal homeostazisi ve tolerans mekanizmalarında fonksiyon gördüğü düşünülmektedir (Cobbett and Goldsbrough 2002). 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, farklı S konsantrasyonları (0, 1 ve 2 mM sülfat) ve Cr(VI) stresinin (100 µM) *BnMP1* geni üzerine etkilerini test etmek için *BnMP1* mRNA'sının ifade seviyesi kanola çeşitlerinin yapraklarında araştırılmıştır. *BnMP1* geninin ifade seviyesi farklı S konsantrasyonları ve Cr(VI) stresine maruz bırakılan iki kanola çeşidi arasında farklılık göstermiştir. Kontrole göre kükürt eksikliği her iki çeşidin ifade seviyesinde önemli bir değişime neden olmamıştır. Kombine stres sadece NK Petrol çeşidinin ifade seviyesinde önemli bir

artışa neden olmuştur. Kontrole göre +HS/-Cr uygulaması sadece Sary çeşidinin ifade seviyesini arttırmıştır. Bununla birlikte, +HS/+Cr uygulaması Sary çeşidinin ifade seviyesinde yaklaşık 4 kat artışa neden olurken NK Petrol çeşidinde önemli bir etki göstermemiştir. Ayrıca +S/+Cr uygulaması sadece Sary çeşidinin ifade seviyesinde artışa neden olmuştur. Şuana kadar, Cr(VI) stresine cevap olarak bitki türlerinde MT mRNA'ları ifade profilleri üzerine çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Yıldız vd. (2013), kanola fidelerinde 50 µM Cr(VI) uygulamasının *BnMP1* geninin ifade seviyesini 1. gün sonunda arttırdığı, 7. gün sonunda ise azalttığını bildirmiştir. Domates fidelerinde *LeMT2* geninin ifade seviyesinin 24 sa 80 µM Cr(VI) uygulaması tarafından teşvik edildiği, buna karşın 160 µM ve üzerindeki Cr(VI) uygulamalarının ifade seviyesini azalttığı bildirilmiştir (Goupil *et al.* 2009). Mevcut araştırmanın sonuçları muhtemelen BnMP1 proteininin sadece kükürt eksikliği koşullarında Cr(VI) toleransında fonksiyon görebildiğini göstermektedir. Ayrıca Cr(VI) stresi altındaki hassas Sary çeşidinde *BnMP1* ifadesinin teşviki be genin kodladığı proteinin S-bağımlı Cr(VI) toleransında fonksiyon görmediğini ileri sürebilir.

Bu araştırmanın sonuçları, kükürt eksikliği ve Cr(VI) stresinin membran bozulmasına neden olan ve antioksidan savunma sistemini etkileyen oksidatif stresle sonuçlandığını göstermiştir. Kükürt eksikliği ve Cr(VI) stresi koşullarında toleranslı NK Petrol çeşidinde daha yüksek SOD, APX, CAT, GR ve GST aktiviteleri muhtemelen reaktif oksijen türlerinin üretimini kontrol ederek tolerans sağlamıştır. Bununla birlikte, Cr(VI) stresi kükürt özümlemesinde fonksiyon gören genleri teşvik ettiği ve sistein birikimine neden olduğu için sonuçlarımız kükürt içeren bileşiklerin S eksikliği koşullarında Cr(VI) toleransında önemli rol oynadığını ileri sürmüştür. Kükürt eksikliği koşullarında toprak üstü kısımlarda Cr birikiminin fazla belirlenmesinden dolayı sülfat ve Cr(VI) alınımının rekabet ettiği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, Cr ile kirlenmiş alanların fitoremediasyonunda kanola bitkileri kullanılacağı zaman büyüme ortamındaki sülfat konsantrasyonunun değerlendirilmesi uygun olacaktır.

5.2. Sülfat Kullanılabilirliği ve Cr(VI) Stresinin Proteom Değişimleri Üzerine Etkisi

Proteomik yaklaşım biyotik veya abiyotik streslere maruz bırakılan bitkilerde proteom değişimlerinin çalışılmasında etkili bir teknik olarak kullanılmaktadır. Ağır metal stresi ile ilişkili olarak proteomik yaklaşımın kullanılması ağır metal cevabı ile ilişkili yeni aday proteinlerin teşhisini sağlayabilmektedir. Bitkilerde kükürt (S) metabolizması ve ağır metal stresi arasındaki ilişki transkriptomik yaklaşım kullanılarak değerlendirilmiş olmasına karşın (Schiavon *et al.* 2007, 2008, 2012), mevcut araştırma bitkilerde S metabolizması ve Cr(VI) stresi arasındaki ilişkiyi değerlendiren ilk proteomik çalışma niteliğindedir. Kanola bitkilerinde S kullanılabilirliği ve Cr(VI) stresi ile ilişkili moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılabilmesi için iki-yönlü (2-D) jel elektroforezi Cr-toleranslı NK Petrol ve hassas Sary çeşitlerinin yaprak dokularındaki proteom değişimlerini mukayese etmek için kullanılmıştır. Yapılan analizler ile gümüş boyama veya koloidal coomassie boyama ile görünür hale getirilmiş 2-D jellerde 500'den fazla protein benliği belirlenmiştir. Krom stresine toleranslı ve hassas kanola çeşitlerinin yaprak dokularından elde edilen proteinlerin karşılaştırmalı analizleri, farklı S konsantrasyonları ve Cr(VI) stresi uygulamalarında farklı şekilde ifade olan 65 proteinin belirlenmesini sağlamıştır. Bununla birlikte, MALDI-TOF/TOF analizlerini takiben yapılan MASCOT taraması ile bu proteinlerden 46'sı başarılı bir şekilde tanımlanabilmiştir. Tanımlanan proteinler biyolojik fonksiyonlarına göre fotosentez, enerji metabolizması, stres savunma, şaperon ve sinyal iletimi gibi gruplara ayrılmıştır. Bununla birlikte, Çizelge 4.6'da gösterildiği gibi tanımlanan proteinlerin deneysel ve teorik izoelektrik noktaları (pI) ve moleküler ağırlıkları (MA) arasında farklılıklar gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, 7 proteininin (benekler 5, 6, 7, 8, 23, 54 ve 60) teorik pI değerlerinin kullanılan IPG striplerinin pH aralığının üzerinde olduğu belirlenmiştir. Bu durumun tuz ve metal stresi altındaki bitkilerde de belirlendiği ve genomik bilginin noksanlığı, gen ifade ürünlerinin farklılığı, post-translasyonel modifikasyonlar ve degradasyon gibi faktörlerden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Ma *et al.* 2012; Wang *et al.* 2013).

Bitkilerde Cr(VI) stresi fotosentetik aygıtlara zarar vererek, redoks reaksiyonlarını inhibe ederek ve oksidatif zarara yol açarak fotosentez ve solunumu olumsuz

etkilemektedir (Liu *et al.* 2008; Pandey *et al.* 2009). Bununla birlikte, S kullanılabilirliği ve Cr(VI) stresine cevap ile ilişkili tanımlanan proteinlerinin çoğunun kloroplastlarda lokalize olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7). Kloroplastlarda lokalize olan bu proteinlerin fotosentetik elektron taşınımı (sitokrom *b₆f* kompleksi), ışık yakalama (klorofil a-b bağlayıcı protein), karbon fiksasyonu ve kullanımı (RuBisCO büyük alt birim, RuBisCO aktivaz ve karbonik anhidraz), kloroplast organizasyonu (muhtemel plastid-lipid-ilişkili protein 6), klorofil biyosentezi (magnezyum şelat azaltıcı alt birim chl) ve kloroplastik protein sentezi (50S ribozomal protein L12-1 ve 30S ribozomal protein 1) gibi kloroplast yapısı ve fonksiyonu ile ilişkili proteinleri içerdiği belirlenmiştir.

Sitokrom *b₆f* kompleksi fotosistem II (FSII) ve fotosistem I (FSI) arasındaki elektron transferine ve FSI etrafında döngüsel elektron akışına aracılık etmektedir. Bu kompleksin ışık enerjisinin termal dağılımına ve lümenin asitleşmesine katkıda bulunarak fotooksidatif zarara karşı direnç sağladığı bildirilmiştir (Munekage *et al.* 2001; Maiwald *et al.* 2003). Kükürt eksikliği (-S/-Cr) koşullarında sitokrom *b₆f* kompleksinin ifade seviyesi hassas Sary kanola çeşidine göre toleranslı NK Petrol kanola çeşidinde daha fazla artan yönde düzenlenmiştir. Bununla birlikte, kombine stres (-S/+Cr) koşulunda, diğer bir sitokrom *b₆f* kompleksi proteininin NK Petrol çeşidinde ifadesinin değişmediği, fakat Sary çeşidinde azalan yönde düzenlendiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, kükürt eksikliği ve Cr(VI) koşullarında bu proteinin NK Petrol çeşidinde elektron akışının sürdürülebilirliğini koruduğunu, kükürt eksikliği ve Cr(VI) varlığında bile bu çeşidin toleransına katkıda bulunabileceği ileri sürülebilir.

Bitkilerde ışık yakalayıcı kompleks (LHC), klorofil a, b ve klorofil a/b bağlayıcı proteinlerden oluşmaktadır. Bu kompleks eksitasyon enerjisini yakalayan ve FSI ve FSII'ye aktaran bir ışık reseptörü olarak fonksiyon görmektedir (Liu and Shen 2004). Mevcut araştırmada, NK Petrol çeşidinde kükürt eksikliği (-S/-Cr) klorofil a/b bağlayıcı proteinin ifade seviyesini azaltmış olmasına karşın, Cr(VI) stresi (-S/+Cr ve +S/+Cr) bu proteinin ifade seviyesini arttırmıştır. Klorofil a/b bağlayıcı proteininin ifade seviyesindeki artan yönde düzenleme Cd, Hg ve Zn stresi altındaki *Arabidopsis halleri*

(Farinati *et al.* 2009), *Arabis paniculata* (Zeng *et al.* 2011) ve buğday (Ge *et al.* 2012) bitkilerinde, As stresine maruz bırakılan *Pteris vittata* (Bona *et al.* 2010) ve *Agrostis tenuis* (Duquesnoy *et al.* 2009) bitkilerinde ve Pb stresi altındaki ayçiçeği (Walliwalagedara *et al.* 2010) bitkilerinde de bildirilmiştir. Bu proteinlerin ifade seviyesindeki artan yönde düzenlemenin tüm hücrel metabolizmanın artan enerji talebini karşılamak için gerekli olabileceği belirtilmiştir (Farinati *et al.* 2009; Bona *et al.* 2010). Toleranslı NK Petrol çeşidinde Cr(VI) stresine cevap olarak klorofil a/b bağlayıcı proteinin artan ifadesi, bu proteinin Cr(VI) toksisitesinde fonksiyonlarını sürdürdüğü ve çeşidin toleransına önemli katkı sağladığı ileri sürülebilir.

Fotosentezde karbon birikiminde önemli rol oynayan karbonik anhidraz çinko içeren ve karbondioksitin geri dönüşümlü olarak suda çözünmesinden sorumlu bir metalloenzimdir (Badger and Price 1994; Yan *et al.* 2006). Mevcut araştırmada, NK Petrol çeşidinde kükürt eksikliği (-S/-Cr), Sary çeşidinde ise +S/+Cr uygulaması karbonik anhidraz proteininin ifade seviyesini azalan yönde düzenlemiştir. Kanola fidelerinin yaprak dokularında karbonik anhidraz bolluğundaki bu azalmalar karbon fiksasyon etkinliğinin kükürt eksikliği ve Cr(VI) stresi koşullarında azaldığını ileri sürmektedir.

Fotosentezde karbon indirgeme reaksiyonlarının ilk enzimi olan ribuloz 1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz (RuBisCO), karbon metabolizmasının ilk basamağı olan karbondioksit fiksasyonunu kataliz etmektedir. Mevcut araştırmada, NK Petrol çeşidinde kükürt eksikliği (-S/-Cr), RuBisCO büyük alt birimi ve RuBisCO'nun aktive olmasında görev yapan RuBisCO aktivazın ifade seviyesini azalan yönde düzenlemiştir. RuBisCO alt birimlerinin azalan yönde düzenlendiği hiperakümülatör bitki türlerinde de belirlenmiştir (Tuomainen *et al.* 2006; Zhao *et al.* 2011). Toksik metal stresi altındaki birçok bitki türünde RuBisCO'nun degradasyonu ve/veya fragmentasyonunun (Führs *et al.* 2008; Kieffer *et al.* 2008, 2009; Ahsan *et al.* 2010) söz konusu olması çalışmamız açısından değerlendirildiğinde muhtemelen RuBisCO'nun azalan yönde ifade edilmesinin sonucu olabilir. Zıt olarak, Cr(VI) stresi altındaki *Typha angustifolia*

bitkilerinde RuBisCO'nun alt birimlerinin artan yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Bah *et al.* 2010).

Mg⁺² iyonunun protoporfirin IX'un yapısına katılımını katalize eden magnezyum-şelataz klorofil biyosentezinde fonksiyon gören üç alt birimden oluşan bir enzimdir (Rissler *et al.* 2002). Mevcut araştırmada, +S/+Cr ve -S/+Cr uygulamaları Sary kanola çeşidinin magnezyum-şelataz alt birim chli proteininin ifade seviyesini azalan yönde düzenlemiştir. Aksine bu proteinin ifade seviyesinin artan yönde düzenlenmesi Pb stresi altındaki *Typha angustifolia* bitkilerinde bildirilmiştir (Bah *et al.* 2010). Bu sonuçlar, kükürt eksikliği ve Cr(VI) stresi koşullarında NK Petrol çeşidine göre hassas Sary çeşidinde daha düşük klorofil içeriği ile açıklanabilir.

Fotosistem II ışık yakalayıcı kompleksin bir bileşeni olan plastid-lipid ilişkili protein 6 (fibrillin)'nin plastoglobül gelişimi ve birçok strese karşı direnç için gerekli olduğu bildirilmiştir (Galetskiy *et al.* 2008). Bununla birlikte, fibrillin proteininin lipofilik antioksidanların plastoglobüllere taşınımında fonksiyon gördüğü belirtilmiştir (Singh *et al.* 2010). Plastoglobül organizasyonunun tilakoid membranların lipid kompozisyonunu etkileyen ağır metaller gibi stres durumları ile sıkı bir şekilde ilişkili olduğu bildirilmiştir (Simkin *et al.* 2007; DalCorso *et al.* 2008). Ayrıca fibrillin proteininin plastoglobül oluşumu ve yapısını etkileyerek dolaylı bir membran koruyucu role sahip olacağı belirtilmiştir. Örneğin, plastidik-ATPaz'lar üzerine eşleşme engelleyicilerinin inhibe edici etkilerini fibrillinin ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (Simkin *et al.* 2007). Mevcut araştırmada, kombine stres (-S/+Cr) toleranslı NK Petrol çeşidinde plastid-lipid ilişkili protein 6'nın ifade seviyesini artan yönde düzenlemiştir. Bu proteinin artan yönde düzenlenmesi, muhtemelen plastoglobül oluşumlarına ve plastoglobüllere antioksidanların taşınımına neden olarak kükürt eksikliği ve Cr(VI) stresi koşullarında tilakoid membranlarını koruduğu ve dolayısıyla NK Petrol çeşidinin toleranslı olmasına katkı sağladığı ileri sürülebilir.

Kanola fidelerinin yaprak dokularında ATP sentaz epsilon ve alfa alt birimleri, triozfosfat izomeraz, fruktoz bifosfat aldolaz ve fosfogliserat kinaz proteinlerinin ifade seviyesindeki değişimler ile gösterildiği gibi enerji metabolizması S ve Cr(VI) uygulamalarından etkilenmiştir. Transmembran ATPaz'lar membranlardan protonların taşınımı için ATP hidrolizini kullanan membran bağlı enzim kompleksleridir (Morsomme and Boutry 2000). Bununla birlikte, bazı transmembran ATPaz'lar proton gradiyentindeki enerjiyi ATP sentezinde kullanmaktadır. Mitokondri ve kloroplastlarda bulunan F-ATPaz'lar, oksidatif fosforilasyon veya fotosentez ile oluşan proton gradiyentini kullanarak ATP sentezleyen önemli yapılardır. F-ATPaz'lar iki bağlantılı kompleksten oluşmaktadır: F1 ATPaz kompleksi katalitik özdür ve 5 alt birimden (alfa, beta, gama, delta ve epsilon) oluşmaktadır (Mellwing and Böttcher 2003). Mevcut araştırmada, ATP sentaz epsilon alt birimlerinin ifade seviyesi toleranslı NK Petrol çeşidinde –S/+Cr ve +HS/+Cr uygulamalarında artış göstermiştir. Labra vd. (2006), krom stresi altındaki mısır fidelerinde ATP sentaz alfa alt biriminin artış gösterdiğini bildirmiştir. Krom stresi altında bu proteinlerin sentezinde artışın muhtemelen indirgenmiş fotosentetik oran altında artan enerji gereksinimini karşılamak olabileceği ileri sürülebilir. Diğer taraftan, kükürt eksikliği (–S/–Cr) uygulamasında her iki kanola çeşidinde ATP sentaz alfa alt biriminin ifade seviyesinin azalan yönde düzenlenmesi, Cr stresinin olmadığı durumlarda ekstra enerji gereksinimine ihtiyaç olmadığının da bir göstergesi olabilir.

Bitkiler, stres koşullarında normal büyüme ve gelişimlerini sürdürebilmek için glikoliz ve trikarboksilik asit (TCA) döngüsü gibi solunumun metabolik yollarını düzenlemek zorundadırlar. Glikolizde dihidroksiaseton fosfat ve gliseraldehit 3-fosfat arasındaki geri dönüşümlü reaksiyonu katalize eden trioz fosfat izomeraz etkin bir enerji üretiminde rol oynamaktadır. Mevcut araştırmada, sadece kombine stres (–S/+Cr) uygulamasında ve hassas Sary kanola çeşidinde triozfosfat izomeraz proteininin ifade seviyesi azalan yönde düzenlenmiştir. Bu sonuç, kombine stres koşullarında hassas Sary çeşidinde glikolizde enerji üretiminin azalmış olabileceğini ve çeşidin Cr(VI)'a hassasiyetinde S eksikliğinin önemini ortaya koymada önemli bir kriter olduğunu gösterebilir.

Fruktoz-bifosfat aldolaz geri dönüşümlü olarak fruktoz-bifosfatı dihidroksiaseton fosfat ve gliseraldehit 3-fosfata dönüşümünü kataliz eden glikolitik bir enzimdir (Perham 1990). Mevcut araştırmada, tüm S konsantrasyonlarında Cr(VI) stresi sadece NK Petrol çeşidinde fruktoz-bifosfat aldolaz proteininin ifade seviyesinde artışa neden olmuştur. Glikolitik yollarda fonksiyon gören bu proteinlerin ifade seviyelerindeki artış Cd stresi altındaki buğday (Wang *et al.* 2010) ve çeltik (Lee *et al.* 2010) bitkilerinin yaprak dokularında da belirlenmiştir. Krom stresi altındaki toleranslı NK Petrol çeşidinde glikolitik yollardaki bu proteinlerin artan yönde düzenlenmesi muhtemelen indirgenmiş fotosentetik oran altında yeterli enerjinin sağlanması için bu metabolik yoldan şekerlerin akışının arttırıldığı bir göstergesi olabilir. Bununla birlikte, toleranslı NK Petrol çeşidinde fruktoz-bifosfat aldolaz proteininin artan yönde düzenlenmesi ile Cr(VI) stresi altında şekerlerin ve nişastanın seviyelerinin değişebildiği ve bu çeşidin fide büyümesine katkı sağlanabildiği ileri sürülebilir.

Solunumda fonksiyon gören glikolitik fosfogliserat kinaz, 1,3-bifosfogliseratın 3-fosfogliserata ADP-bağımlı defosforilasyonunu kataliz etmektedir. Kloroplastlardaki izoformu ise Calvin döngüsünde fonksiyon görmektedir (Anderson *et al.* 2004). Mevcut araştırmada, +S/+Cr uygulaması NK Petrol çeşidinde, kombine stres ise Sary çeşidinde kloroplastik fosfogliserat kinaz proteininin ifade seviyesini sırasıyla 4.3 ve 2.4 kat arttırmıştır. Cr(VI) stresi altındaki fidelerde fosfogliserat kinazın ifade seviyesindeki artış, bu proteinin Cr(VI) toleransında rol oynayabileceğini göstermektedir.

Bitkilerde ağır metal stresinin etkilerinden biri de oksidatif stresle ilişkili birkaç enzimin ifadesindeki değişimlerdir. Ağır metal stresi altındaki bitkilerde savunma mekanizmaları ile ilişkili birçok antioksidan enzimin arttığı proteomik çalışmalarla gösterilmiştir (Alvarez *et al.* 2009; Wang *et al.* 2010; Chen *et al.* 2012). Mevcut araştırmada, farklı S konsantrasyonları ve Cr(VI) stresine cevap olarak peroksiredoksin-2E, tiyoredoksin M-tip 4, germin-benzeri protein 1, 2-Cys peroksiredoksin BAS1, glutatyon S-transferaz, ferritin-1, L-askorbat peroksidaz 1, tiazol biyosentetik enzim, üroporfirinojen

dekarboksilaz 2 ve mirosinaz-bağlayıcı protein-benzeri At3g16470 gibi stres savunma ile ilişkili proteinlerin ifade seviyelerinde değişimler belirlenmiştir.

Peroksiredoksinler antioksidan savunma sisteminin önemli bileşenleridir ve redoks sinyalinde fonksiyon görmektedir. Tiyol spesifik peroksidazlar olan peroksiredoksinler, tiyoredoksin veya glutaredoksin sistemi aracılığıyla sağlanan indirgeyici güç ile hidrojen peroksit ve alkil hidroperoksitleri indirgemektedir (Dietz 2003; Villiers *et al.* 2011). Ayrıca peroksiredoksinlerin kloroplastlardaki redoks homeostazisinde fonksiyon görebileceği bildirilmiştir (Hall *et al.* 2011). Amino asit sekansları ve immünolojik özelliklerine göre peroksiredoksinler, bir veya iki korunmuş sistein (Cys) rezidüsü içeren altı farklı gruba ayrılmaktadır (Lyu *et al.* 1999). Ayrıca peroksitleri indirgemedeki peroksiredoksinlerin yeteneğinin sistein rezidüelerine bağlı olduğu belirtilmiştir. Peroksiredoksin proteininin artan yönde düzenlenmesi Cr(VI) stresi altındaki mısır (Labra *et al.* 2006) ve Cd stresi altındaki *Phytolacca americana* (Zhao *et al.* 2011), *Populus* (Durand *et al.* 2010) ve çeltik (Ahsan *et al.* 2007) bitkilerinde belirlenmiştir. Mevcut araştırmada, -S/-Cr ve +HS/-Cr uygulamalarının yanı sıra Cr(VI) stresi (+S/+Cr ve -S/+Cr) toleranslı NK Petrol kanola çeşidinde 2-Cys-peroksiredoksin proteininin ifade seviyelerinde artışa neden olmuştur. Bu proteinin kloroplastlarda lokalize olduğu ve reaktif oksijen türlerine karşı bitki hücrelerini korumadaki rolleri düşünüldüğünde, toleranslı NK Petrol çeşidinin S eksikliği ve Cr(VI) stresi koşullarında etkin bir hidrojen peroksit temizleme sistemine sahip olduğu ileri sürülebilir.

Tiyoredoksinlerin disülfid bağlarını indirgediği ve peroksiredoksinler gibi çeşitli enzimlere elektron verdiği bildirilmiştir (Dietz *et al.* 2006). Diğer bir savunma ile ilişkili protein olan germin-benzeri proteinlerin Mn-SOD aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir (Yamahara *et al.* 1999). Bununla birlikte, germin-benzeri proteinlerin muhtemelen metal iyonlarını bağlamada fonksiyon gören histidin içeren motiflere sahip olduğu belirtilmiştir (Membre *et al.* 2000). Mevcut araştırmada, +HS/-Cr uygulaması NK Petrol çeşidinde tiyoredoksin proteininin ifade seviyesinde artışa neden olurken, Sary çeşidinde germin-benzeri proteininin ifade seviyesini azalan yönde düzenlemiştir. Bu sonuçlar,

Cr(VI) stresinin olmadığı koşullarda aşırı S uygulamasının kanola fidelerinin stres savunma ile ilgili mekanizmaları düzenleyebileceğini göstermektedir.

Glutasyon S-transferazlar (GST), birçok sitotoksik bileşik ile glutasyonun konjügasyonunu kataliz eden enzimlerdir (Marrs 1996). GST'nin aktivitesi sonucu oluşan bileşiklerin tonoplastta lokalize olmuş GS-X pompalarının bir ailesi ile vakuole taşındığı belirtilmiştir (Rea *et al.* 1998). Bitkilerde bu konjüğe edici aktiviteye sahip bitkilere özgü *tau* ve *phi* GST ailelerini içeren yedi farklı GST sınıfı bulunmaktadır (Dixon *et al.* 2002). Mevcut araştırmada, kombine stres (-S/+Cr) toleranslı NK Petrol kanola çeşidinde *phi* ailesine ait GST 16 proteininin ifade seviyesini 4 kat arttırmıştır. Bununla birlikte, kükürt eksikliği Sary çeşidinde *tau* ailesine ait GST proteininin ifade seviyesinde artışa neden olmuştur. Kükürt eksikliği koşullarında Cr(VI) stresine cevap olarak GST proteininin ifade seviyesindeki artma, GSH'un artmasına bağlı Cr detoksifikasyonunu ileri sürebilir. Bununla birlikte, ağır metal stresine cevap olarak GST ifadesindeki artış Cd stresi altındaki çeltik (Lee *et al.* 2010), buğday (Wang *et al.* 2010), *Arabidopsis thaliana* (Semane *et al.* 2010) ve *Phytolacca americana* (Zhao *et al.* 2011) gibi bitki türlerinde de belirlenmiştir.

Ferritin bitkilerde önemli demir depolama proteinlerinden biridir (Theil 1987). Bir demir bağlayıcı protein olarak ferritin sadece demir homeostazisinde rol oynamadığı, aynı zamanda Cd gibi ağır metallere de bağlanabildiği gösterilmiştir (Kumar and Prasad 1999). Bununla birlikte, *Arabidopsis*'te ferritin proteininin önemli bir demir havuzu oluşturmadığı, buna karşın oksidatif strese karşı korumada fonksiyon gördüğü bildirilmiştir (Ravet *et al.* 2009). Mevcut araştırmada, kombine stres (-S/+Cr) uygulamasında ferritin D1 proteininin ifade seviyesinin hassas Sary kanola çeşidine göre toleranslı NK Petrol kanola çeşidinde daha fazla oranda arttığı belirlenmiştir. Bu sonuç, NK Petrol çeşidinde kükürt eksikliği ve Cr(VI) stresi koşullarında oluşan oksidatif strese karşı ferritin proteininin daha iyi bir koruma sağlayabildiği ileri sürülebilir.

Mevcut araştırmada, kombine stres (-S/+Cr) toleranslı NK Petrol kanola eşidinde L-askorbat peroksidaz 1 (APX1) proteininin ifade seviyesini arttırmıştır. Bu bulgulara zıt olarak, APX proteininin ifade seviyesinin Cr(VI) stresi altındaki *Miscanthus sinensis* bitkilerinin kök dokusunda azalan yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Sharmin *et al.* 2012). Bununla birlikte, Cu stresine hassas eltik çeşidine göre toleranslı çeşitte APX1 proteininin Cu stresine cevap olarak artan yönde düzenlendiği belirtilmiştir (Song *et al.* 2013). Bitkilerde APX izoenzimler olarak bulunmakta ve hidrojen peroksit metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır (Mittler 2002). Bununla birlikte, AsA-GSH döngüsünün bir bileşeni olarak APX'in fotosentetik organizmalarda toksik seviyede hidrojen peroksit birikimini engellediği belirtilmiştir (Asada 1992). Bu nedenle, kükürt eksikliği ile birlikte Cr(VI) stresi uygulamasında APX1 proteininin NK Petrol eşidinde artan yönde düzenlenmesi, fotosentez üzerinde etkili bir korumanın yanı sıra karbohidrat metabolizması ve antioksidan kapasitenin geliştirilmesi sayesinde Cr(VI) detoksifikasyonunda fonksiyon gördüğü ileri sürülebilir. Ayrıca krom toleranslı NK Petrol eşidinde APX ve GST enzimlerinin artan yönde düzenlenmesi, Cr(VI) stresi altında antioksidan enzimlerin önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir.

Mevcut araştırmada, kombine stres (-S/+Cr) Cr(VI)-hassas Sary kanola çeşidinde tiazol biyosentetik enzimin ifade seviyesini azalan yönde düzenlemiştir. Tiazol biyosentetik enzim oksidatif stresin azaltılmasında önemli rolü olan tiaminin öncüsü tiazoln oluşumunda fonksiyon gördüğü bildirilmiştir (Nandi *et al.* 2005). Antioksidan potansiyelinin yanı sıra tiaminde bulunan sülfidril gruplarının metallere kovalent olarak bağlanabildiği ve böylelikle toksisiteyi azaltabildiği ne sürülmüştür (Aloui *et al.* 2009). Bununla birlikte, tiazol biyosentetik enzimin birçok stres durumuna karşı adaptasyonda rollere sahip olduğu ve DNA zararına karşı tolerans sağladığı bildirilmiştir (Papini-Terzi *et al.* 2003). Mevcut araştırmanın sonuçları, Sary eşidinde tiazol biyosentetik enzimin ifade seviyesindeki azalmanın muhtemelen kükürt eksikliği ve Cr(VI) stresine hassasiyetle ilişkili olabileceğini göstermiştir.

Üroporfirinojen dekarboksilaz üroporfirinojen III'ün koproporfirinojen III'e dönüştürüldüğü heme biyosentetik yolun beşinci basamağını kataliz etmektedir (Whitby *et al.* 1998). Bu reaksiyondan sonra heme ve klorofillerin ortak öncüsü olan protoporfirin IX oluşmaktadır. Bununla birlikte, üroporfirinojen dekarboksilaz katalaz ve peroksidazların öncüsü olan protohemenin üretiminde fonksiyon gören önemli bir enzimdir. Cd stresi altındaki *Arabidopsis* yapraklarında üroporfirinojen dekarboksilaz proteininin ifadesinin artan yönde düzenlendiği bildirilmiştir (Semane *et al.* 2010). Mevcut araştırmada, +HS/+Cr uygulaması Sary çeşidinde üroporfirinojen dekarboksilaz proteininin ifadesini azalan yönde düzenlemiştir. Bu sonuç, aşırı S uygulamasındaki hassas Sary çeşidinde heme biyosentetik yolun Cr(VI) stresinden olumsuz etkilendiğini ve bu durumun Sary çeşidinin hassasiyeti ile ilişkili olabileceğini ileri sürebilir.

Mirosinazlar, glukozinolatların böcek ve patojenlere karşı biyolojik aktivitelere sahip bileşiklere parçalanmasını kataliz etmekte (Bones and Rossiter 1996) ve glukozinolatlarda bulunan azot ve kükürte gereksinim duyulduğunda bu enzim aktivite göstermektedir. Mevcut araştırmada, kükürt eksikliğinin yanı sıra Cr(VI) stresi mirosinaz-bağlayıcı protein-benzeri proteinin ifade seviyesinde artışa neden olmuştur. Bu sonuçlar, kükürt eksikliği ve Cr(VI) stresinin kanola çeşitlerinde bu enzimi aktivite ederek mevcut stres durumlarını tolere etmeye çalıştığı ileri sürülebilir.

Bitkilerde ağır metal stresi protein fonksiyonlarında bozulmalara neden olabilmektedir. Mevcut araştırmada, 20 kDa şaperonin ve lon proteaz homologu 1 proteinlerinin ifade seviyeleri sülfat uygulamaları ve Cr(VI) stresine cevap olarak farklı şekilde düzenlenmiştir. Moleküler şaperonlar düzgün protein katlanması ve translokasyonundan sorumlu proteinlerdir (Wang *et al.* 2004). ATP-bağımlı serin proteazlar (lon proteaz homologu) peroksizom matriksinde yanlış katlanmış proteinlerin parçalanmasına aracılık etmektedir (Lingard and Bartel 2009). Mevcut araştırmada, 20 kDa şaperonin proteininin ifade seviyesi kükürt eksikliği altındaki NK Petrol kanola çeşidinde artan yönde düzenlenmiştir. +S/+Cr uygulaması her iki çeşitte, +HS/+Cr uygulaması ise sadece NK Petrol çeşidinde lon proteaz homologu proteininin

ifade seviyesini artan yönde düzenlemiştir. Protein yapısını ve fonksiyonunu stabilize eden moleküler şaperonların artan ifade seviyesinin, kanola çeşitlerinde hücrel homeostazinin sürdürülmesi için önemli savunma mekanizmalarından biri olduğu ileri sürülebilir.

Anneksinler, vakuol oluşumu ve yeni sentezlenen plazma membranı ve hücre çeperi materyallerinin golgi aracılığıyla salgılanmasını içeren bir dizi fonksiyona sahip kalsiyum bağımlı membran bağlayıcı proteinlerin bir ailesidir (Delmer and Potikha 1997). Ağır metaller membran proteinlerini ciddi şekilde etkilediği ve vakuollerde metal iyonları biriktirildiği için anneksinler ağır metal stresine karşı bitki hücrelerini korumaya yardımcı olabilirler. Bununla birlikte, *A. thaliana*'da anneksinlerin peroksidaz benzeri aktivite gösterdiği ve oksidatif stresin hafifletilmesinde rol oynayabileceği bildirilmiştir (Gorecka *et al.* 2005). Ayrıca anneksinlerin kalsiyum iyonları ile etkileşim halinde olduklarından, önemli bir sinyal molekülü olarak stres cevaplarında rol oynayabileceği bildirilmiştir (Mortimer *et al.* 2008). Mevcut araştırmada, +S/+Cr uygulaması her iki çeşitte anneksin D1 proteininin ifade seviyesinde artışa neden olduğu belirlenmiştir. Proteomik seviyede anneksin proteininin bolluğundaki artış Cd stresi altındaki bezelye ve *Medicago truncatula* bitkilerinin kök dokusunda da belirlenmiştir (Repetto *et al.* 2003; Aloui *et al.* 2009). Bu sonuçlar, anneksin proteininin kükürt varlığında Cr(VI) stres cevabı ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Sitozolik bir enzim olan laktoilglutatyon liyaz (glioksalaz I), Zn iyonlarına bağlanarak glioksal yolun ilk basamağını kataliz ettiği ve glutatyon homeostazisinin sürdürülmesinde öneme sahip olduğu bildirilmiştir (Kim *et al.* 1993). Tütün ve çeltik bitkilerinde glioksalaz genlerinin aşırı ifadesinin tuzluluk, kuraklık ve ağır metallere karşı tolerans sağladığı bildirilmiştir (Singla-Pareek *et al.* 2006). Mevcut araştırmada, tüm S konsantrasyonlarında uygulanan Cr(VI) stresi NK Petrol ve Sary kanola çeşitlerinde laktoilglutatyon liyaz proteininin ifade seviyesini artan yönde düzenlemiştir. Ayrıca kombine stres (-S/+Cr) NK Petrol çeşidinde yaklaşık 3 kat artışa neden olurken, Sary çeşidinde yaklaşık 7 kat artışa neden olmuştur. Glioksilaz I proteininin ifade seviyesinin bakır stresine hassas çeltik çeşide göre toleranslı çeşidin kök dokusunda daha fazla

oranda arttığı bildirilmiştir (Song *et al.* 2013). Glioksilaz I proteininin artan yönde düzenlenmesi Cr(VI) stresi altındaki mısır bitkilerinde de belirlenmiştir (Labra *et al.* 2006).

S-Adenozilmetiyonin sentaz (SAMS) enzimi metiyonin ve ATP'den S-adenozilmetiyonin (SAM) oluşumunu katalize eder. SAM etilen sentezi (Wang *et al.* 2002), poliamin sentezi (Bouchereau *et al.* 1999) ve glukozinolatlar gibi sekonder metabolitlerin sentezini (Grubb and Abel 2006) içeren birçok metabolik yol için öncüdür. SAM sentaz (SAMS) proteininin ifade seviyesi kükürt eksikliği altındaki NK Petrol çeşidinde artan yönde düzenlenmiştir. Bununla birlikte, Cd stresi ile oluşturulmuş oksidatif strese karşı SAM'in koruyucu etkileri soya fasulyesi yaprak disklerinde gösterilmiştir (Noriega *et al.* 2007). Ayrıca SAM'in, glutatyonun yeniden oluşturulması için metilazların substratı olduğu belirtilmiştir (Roth *et al.* 2006; Sarry *et al.* 2006). Bu sonuçlar, toleranslı NK Petrol çeşidinde artan yönde düzenlenen SAMS'ın kükürt eksikliğine karşı koruma sağlayabildiği ileri sürülebilir.

Sonuç olarak, Cr(VI) toleransında farklılık gösteren kanola çeşitlerinde karşılaştırmalı proteomik analizler kullanılarak farklı sülfat konsantrasyonları ve Cr(VI) stresine cevap ile ilişkili moleküler mekanizmaların değerlendirilmesi sağlanmıştır. Toleranslı NK Petrol çeşidinde 46, hassas Sary çeşidinde 35 proteinin ifade seviyelerinde farklılık belirlenmiş ve bu proteinlerden sırasıyla 32 ve 25 protein kütle spektrometrisi ile başarılı bir şekilde tanımlanmıştır. Kanola çeşitlerinin yaprak dokularında kükürt eksikliği ve Cr(VI) stresine cevap olarak farklı şekilde ifade olan proteinlerin çoğunlukla fotosentez, enerji metabolizması ve stres savunma ile ilgili olduğu ortaya konulmuştur. Kanola yapraklarında kükürt eksikliği ve Cr(VI) stresi antioksidan enzimlerin yanı sıra birkaç savunma ile ilgili proteinin ifadesini teşvik etmiştir. Bu proteinlerden, 2-Cys peroksiredoksin BAS1, glutatyon S-transferaz, ferritin-1, L-askorbat peroksidaz 1, tiazol biyosentetik enzim ve mirosinaz-bağlayıcı protein-benzeri proteinin Sary çeşidine göre NK Petrol çeşidinde daha fazla artış gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, stres koşullarında bitkiler tolerans mekanizmalarını güçlendirdikleri zaman ekstra enerji

kaynağı gerekmektedir. NK Petrol çeşidinde ATP sentaz epsilon zinciri, trioz fosfat izomeraz ve fruktoz-bifosfat aldolaz gibi enerji metabolizması ile ilgili proteinlerin ifade seviyesindeki artış bu proteinlerin kükürt eksikliği ve Cr(VI) stresini tolere etmedeki muhtemel fonksiyonlarını göstermektedir. Ek olarak, şaperon ve proteazların artan ifadeleri ile gösterildiği gibi daha yüksek orandaki protein degradasyonu ve sentezi için muhtemelen daha fazla enerji gerekebilir. İlginç olarak, NK Petrol çeşidinde sitokrom *b_{6-f}* kompleksi demir-kükürt alt birimi, 50S ribozomal protein L12-3, klorofil a-b bağlayıcı protein 6A, karbonik anhidraz, magnezyum-şelataz alt birim chlI ve fosfogliserat kinaz gibi fotosentezle ilişkili birçok proteinin ifade seviyesi kükürt eksikliği ve Cr(VI) stresi koşullarında artmış olması karşın RuBisCO büyük zincir ve RuBisCO aktivaz 2 proteinlerinin ifadesi bu çeşitte azalan yönde düzenlenmiştir. Bu proteomik bulgular, kükürt eksikliği ve Cr(VI) stresine cevap olarak yeni bir hücrel homeostazinin oluşturulması için metabolizma veya stres ile ilişkili proteinlerin birlikte fonksiyon gördüğünü ileri sürebilir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, kanola yapraklarında kükürt eksikliği ve Cr(VI) stresine karşı geliştirilen moleküler cevapların daha iyi anlaşılmasının yanı sıra fonksiyonel çalışmalar için temel sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, **105**: 121-126.
- Agrawal, G.K., Jwa, N.S., Shibato, J., Han, O., Iwahashi, H. and Rakwal, R. (2003). Diverse environmental cues transiently regulate OsOPR1 of the “octadecanoid pathway” revealing its importance in rice defense/stress and development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **310**: 1073–1082.
- Ahsan, N., Lee, D.G., Lee, S.H., Kang, K. Y., Lee, J.J., Kim, P.J., Yoon, H.S., Kim, J.S. and Lee, B.Y. (2007). Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere*, **67**: 1182–1193.
- Ahsan, N., Lee, D.G., Alam, I., Kim, P.J., Lee, J.J., Ahn, Y.O., Kwak, S.S., Lee, I.J., Bahk, J.D., Kang, K.Y., Renaut, J., Komatsu, S. and Lee, B.H. (2008). Comparative proteomic study of arsenic–induced differentially expressed proteins in rice roots reveals glutathione plays a central role during As stress. *Proteomics*, **8**: 3561–3576.
- Ahsan, N., Renaut, J. and Komatsu, S. (2009). Recent developments in the application of proteomics to the analysis of plant responses to heavy metals. *Proteomics*, **9**: 2602–2621.
- Ahsan, N. and Komatsu, S. (2009). Comparative analyses of the proteomes of leaves and flowers at various stages of development reveal organ–specific functional differentiation of proteins in soybean. *Proteomics*, **9**: 4889–4907.
- Ahsan, N., Lee, D.G., Kim, K.H., Alam, I., Lee, S.H., Lee, K.W., Lee, H. and Lee, B.H. (2010). Analysis of arsenic stress–induced differentially expressed proteins in rice leaves by two–dimensional gel electrophoresis coupled with mass spectrometry. *Chemosphere*, **78**: 224–231.
- Aina, R., Labra, M., Fumagalli, P., Vannini, C., Marsoni, M., Cucchi, U., Bracale, M., Sgorbati, S. and Citterio, S. (2007). Thiol–peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. *Environmental and Experimental Botany*, **59**: 381–392.
- Akashi, K., Nishimura, N., Ishida, Y. and Yokota, A. (2004). Potent hydroxyl radical scavenging activity of drought–induced type–2 metallothionein in wild watermelon. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **323**: 72–78.
- Akiyama, T., Jin, S., Yoshida, M., Hoshino, T., Opassiri, R. and Ketudat Cairns, J.R. (2009). Expression of an endo–(1,3;1,4)–beta–glucanase in response to wounding, methyl jasmonate, abscisic acid and ethephon in rice seedlings. *Journal of Plant Physiology*, **166**: 1814–1825.

- Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S. and Ecker, J.R. (1999). EIN2: a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science*, **284**: 2148–2152.
- Aloui, A., Recorbet, G., Gollotte, A., Robert, F., Valot, B., Gianinazzi–Pearson, V., Aschi–Smiti, S. And Dumas–Gaudot, E. (2009). On the mechanisms of cadmium stress alleviation in *Medicago truncatula* by arbuscular mycorrhizal symbiosis: a root proteomic study. *Proteomics*, **9**: 420–433.
- Alvarez, S., Berla, B. M., Sheffield, J., Cahoon, R. E., Jez, J. M. and Hicks, L. M. (2009). Comprehensive analysis of the *Brassica juncea* root proteome in response to cadmium exposure by complementary proteomic approaches. *Proteomics*, **9**: 2419–2431.
- Anderson, L.E., Bryant, J.A. and Carol, A.A. (2004). Both chloroplastic and cytosolic phosphoglycerate kinase isozymes are present in the pea leaf nucleus. *Protoplasma*, **223(2-4)**: 103–110.
- Anjum, N., Umar, S., Ahmad, A., Iqbal, M. and Khan, N. (2008). Sulphur protects mustard (*Brassica campestris* L.) from cadmium toxicity by improving leaf ascorbate and glutathione. *Plant Growth Regulation*, **54**: 271–279.
- Anjum, N.A., Umar, S. and Chan, M.-T. (2010). Ascorbate–Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Anjum, N.A., Umar, S., Iqbal, M. and Khan, N.A. (2011). Cadmium causes oxidative stress in mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] by affecting antioxidant enzyme systems and ascorbate–glutathione cycle metabolism. *Russian Journal of Plant Physiology*, **58**, 92–99.
- Anjum, N.A., Ahmad, I., Mohmooda, I., Pacheco, M., Duarte, A.C. and Pereira, E. (2012). Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids—a review. *Environmental and Experimental Botany*, **75**: 307–324.
- Apel, K. and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Reviews of Plant Biology*, **55**: 373–399.
- Arazi, T., Sunkar, R., Kaplan, B. and Fromm, H. (1999). A tobacco plasma membrane calmodulin–binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants. *Plant Journal*, **20**: 171–182.
- Arazi, T., Kaplan, B., Sunkar, R. and Fromm, H. (2000). Cyclic–nucleotide and Ca²⁺/calmodulin–regulated channels in plants: targets for manipulating heavy–metal tolerance, and possible physiological roles. *Biochemical Society Transactions*, **28**: 471–475.

- Arshad, M., Silvestre, J., Pinelli, E., Kallerhoff, J., Kaemmerer, M. and Tarigo, A. (2008). A field study of lead phytoextraction by various scented *Pelargonium* cultivars. *Chemosphere*, **71**: 2187–2192.
- Asada, K. (1992). Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, **85**: 235–241.
- Assunção, A.G.L., Martins, D., Folter, S., Vooijs, R., Schat, H. and Aarts, M.G.M. (2001). Elevated expression of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell and Environment*, **24**: 217–226.
- Assunção, A.G.L., ten Bookum, W.M., Nelissen, H.J.M., Vooijs, R., Schat, H. and Ernst, W.H.O. (2003). Differential metal-specific tolerance and accumulation patterns among *Thlaspi caerulescens* populations originating from different soil types. *New Phytologist*, **159**: 411–419.
- Astolfi, S., Zuchi, S., Hubberten, H-M., Pinton, R. and Hoefgen, R. (2010). Supply of sulphur to S-deficient young barley seedlings restores their capability to cope with iron shortage. *Journal of Experimental Botany*, **61**: 799–806.
- 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.
- Badger, M.R. and Price, G.D. (1994). The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **45**: 369–392.
- Bah, A.M., Sun, H., Chen, F., Zhou, J., Dai, H., Zhang, G. and Wu, F. (2010). Comparative proteomic analysis of *Typha angustifolia* leaf under chromium, cadmium and lead stress. *Journal of Hazardous Materials*, **184**: 191–203.
- Baker, A.J.M. and Brooks, R.R. (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements—a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, **1**: 81–126.
- Baker, A.J.M., Reeves, R.D. and Hajar, A.S.M. (1994). Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl. (Brassicaceae). *New Phytologist*, **127**: 61–68.
- Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Reeves, R.D. and Smith, J.A.C. (2000). Metal hyperaccumulator plants: A review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal polluted soils. In: Terry, N. and Banuelos, G., (eds.). *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Lewis, Boca, pp. 85–107.

- Banks, M.K., Kulakow, P., Schwab, A.P., Chen, Z. and Rathbone, K. (2003). Degradation of crude oil in the rhizosphere of *Sorghum bicolor*. *International Journal of Phytoremediation*, **5**: 225–234.
- Bantscheff, M., Lemeer, S., Savitski, M.M. and Kuster, B. (2012). Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **404**: 939–365.
- Banuelos, G. S. (2000). Phytoextraction of Se from soils irrigated with selenium–laden effluent. *Plant and Soil*, **224**: 251–258.
- Banuelos, G., LeDuc, D.L., Pilon–Smits, E.A.H. and Terry, N. (2007). Transgenic Indian mustard overexpressing selenocysteine lyase or selenocysteine methyltransferase exhibit enhanced potential for selenium phytoremediation under field conditions. *Environmental Science and Technology*, **41**: 599–605.
- Barceló, J. and Poschenrieder, C. (1997). Chromium in plants. In: Canali S. *et al.* (Eds.), Chromium environmental issues, Franco Angeli, Milan, Italy, p. 101–129.
- Bashir, H., Ahmad, J., Bagheri, R., Nauman, M. and Qureshi, M.I. (2013). Limited sulfur resource forces *Arabidopsis thaliana* to shift towards non–sulfur tolerance under cadmium stress. *Environmental and Experimental Botany*, **94**: 19–32.
- Baxter, I., Tchieu, J., Sussman, M.R., Boutry, M., Palmgren, M.G., Gribskov, M., Harper, J.F. and Axelsen, K.B. (2003). Genomic comparison of P–type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology*, **132**: 618–628.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, **44**: 276–287.
- Belouchi, A., Kwan, T. and Gros, P. (1997). Cloning and characterization of the *OsNramp* family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions. *Plant Molecular Biology*, **33**: 1085–1092.
- Bennett, L.E., Burkhead, J.L., Hale, K.L., Terry, N., Pilon, M. and Pilon–Smits, E.A.H. (2003). Analysis of transgenic Indian mustard plants for phytoremediation of metal–contaminated mine tailings. *Journal of Environmental Quality*, **32**: 432–440.
- Beranova–Giorgianni, S. (2003). Proteome analysis by two–dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. *Trends in Analytical Chemistry*, **22**: 273–281.
- Bert, V., Girondelot, B., Quatannens, V. and Laboudigue, A. (2005). A Phytostabilisation of a Metal polluted dredged sediment deposit—mesocosm experiment and field trial. In: Uhlmann, O., Annokée, G.J. and Arendt, F. (eds.), Proceedings of the 9th

International FZK/TNO Conference on Soil–Water Systems, Remediation Concepts and Technologies. Bordeaux, pp. 1544–1550.

- Berti, W.R. and Cunningham, S.D. (2000). Phytostabilization of metals. In: Raskin, I. and Ensley, B.D. (eds.), *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean-up the Environment*. Wiley, New York, pp. 71–88.
- Bhuiyan, M.S.U., Min, S.R., Jeong, W.J., Sultana, S., Choi, K.S., Song, W.Y., Lee, Y., Lim, Y.P. and Liu, J.R. (2011). Overexpression of a yeast cadmium factor 1 (*YCF1*) enhances heavy metal tolerance and accumulation in *Brassica juncea*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **105**: 85–91.
- Bick, J.A. and Leustek, T. (1998). Plant sulfur metabolism – the reduction of sulfate to sulfite. *Current Opinion in Plant Biology*, **1**: 240–244.
- Bick, J.A., Aslund, F., Chen, Y. and Leustek, T. (1998). Glutaredoxin function for the carboxyl-terminal domain of the plant-type 5'-adenylylsulfate reductase. *Proceedings of the National Academy of the Sciences USA*, **95**: 8404–8409.
- Bizily, S. P., Kim, T., Kandasamy, M.K. and Meagher, R.B. (2003). Subcellular targeting of methylmercury lyase enhances its specific activity for organic mercury detoxification in plants. *Plant Physiology*, **131**: 463–471.
- 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.
- Blaylock, M.J. and Huang, J.W. (2000). Phytoextraction of metals. In: Raskin, I. and Ensley, B.D. (eds.), *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean-up the Environment*. Wiley, New York, pp. 53–70.
- Bogeat-Triboulot, M.B., Brosché, M., Renaut, J., Jouve, L., Le Thiec, D., Fayyaz, P., Vinocur, B., Witters, E., Laukens, K., Teichmann, T., Altman, A., Hausman, J.F., Polle, A., Kangasjärvi, J. and Dreyer, E. (2007). Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. *Plant Physiology*, **143**: 876–892.
- Bona, E., Marsano, F., Cavaletto, M. and Berta, G. (2007). Proteomic characterization of copper stress response in *Cannabis sativa* roots. *Proteomics*, **7**: 1121–1130.
- Bona, E., Cattaneo, C., Cesaro, P., Marsano, F., Lingua, G., Cavaletto, M. and Berta, G. (2010). Proteomic analysis of *Pteris vittata* fronds: two arbuscular mycorrhizal fungi differentially modulate protein expression under arsenic contamination. *Proteomics*, **10**: 3811–3834.

- Bones, A. and Rossiter, J. (1996). The myrosinase-glucosinolate system, its organization and biochemistry. *Physiologia Plantarum*, **97**: 194–208.
- Boominathan, R. and Doran, P.M. (2003). Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnology and Bioengineering*, **83**: 158–167.
- Boston, R., Viitanen, P. and Vierling, E. (1996). Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology*, **32**: 191–222.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F. and Martin-Tanguy, J. (1999). Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science*, **140**: 103–125.
- Bovet, L., Eggmann, T., Meylan-Bettex, M., Polier, J., Kammer, P., Marin, E., Feller, U. and Martinoia, E. (2003). Transcript levels of *AtMRPs* after cadmium treatment: Induction of *AtMRP3*. *Plant Cell and Environment*, **26**: 371–381.
- 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.
- Brkljacic, J.M., Samardzic, J.T., Timotijevic, G.S. and Maksimovic, V.R. (2004). Expression analysis of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) metallothionein–like gene (*MT3*) under different stress and physiological conditions. *Journal of Plant Physiology*, **161**: 741–746.
- Brooks, R.R. (1998). General introduction. In: Brooks, R.R. (ed.). *Plants That Hyperaccumulate Heavy Metals: Their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining*. CAB International, New York, pp. 1–14.
- Brouwer, M., Hoexum–Brouwer, T. and Cashon, R.E. (1993). A putative glutathione binding site in CdZn–metallothionein identified by equilibrium binding and molecular–modelling studies. *Biochemical Journal*, **294**: 219–225.
- Bubb, J.M. and Lester, J.N. (1991). The impact of heavy metals on lowland rivers and the implications for man and the environment. *Science of The Total Environment*, **100**: 207–233.
- Buchner, P., Stuiver, C.E., Westerman, S., Wirtz, M., Hell, R., Hawkesford, M.J. and De Kok, L.J. (2004). Regulation of sulfate uptake and expression of sulfate transporter genes in *Brassica oleracea* as affected by atmospheric H₂S and pedospheric sulfate nutrition. *Plant Physiology*, **136**: 3396–3408.
- Cai, Y., Cao, F., Wei, K., Zhang, G. and Wu, F. (2011). Genotypic dependent effect of exogenous glutathione on Cd–induced changes in proteins, ultrastructure and

- antioxidant defense enzymes in rice seedlings. *Journal of Hazardous Materials*, **192**: 1056–1066.
- Cailliatte, R., Lapeyre, B., Briat, J.-F., Mari, S. and Curie, C. (2009). The NRAMP6 metal transporter contributes to cadmium toxicity. *Biochemical Journal*, **422**: 217–228.
- Cairns, N.G., Pasternak, M., Wachter, A., Cobbett, C.S. and Meyer, A.J. (2006). Maturation of *Arabidopsis* seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo. *Plant Physiology*, **141**: 446–455.
- Callahan, D.L., Baker, A.J.M., Kolev, S.D. and Wedd, A.G. (2006). Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **11**: 2–12.
- Cánovas, F.M., Dumas–Gaudot, E., Recorbet, G., Jorin, J., Mock, H.P. and Rossignol, M. (2004). Plant proteome analysis. *Proteomics*, **4**: 285–298.
- Carlberg, C. and Mannervik, B. (1985). Glutathione reductase. In: Meister, A. (Ed.), *Methods Enzymol.*, Vol 113, Academic Press, New York. Pp. 488–495.
- Carpentier, S.C., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R. and Panis, B. (2005). Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two–dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, **5**: 2497–2507.
- Casati, P., Drincovich, M.F., Edwards, G.E. and Andreo, C.S. (1999). Malate metabolism by NADP–malic enzyme in plant defense. *Photosynthesis Research*, **61**: 99–105.
- 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.
- Chakrabarty, D., Trivedi, P.K., Misra, P., Tiwari, M., Shri, M., Shukla, D., Kumar, S., Rai, A., Pandey, A., Nigam, D., Tripathi, R.D. and Tuli, R. (2009). Comparative transcriptome analysis of arsenate and arsenite stresses in rice seedlings. *Chemosphere*, **74**, 688–702.
- Chaney, R.L., Angle, J.S., McIntosh, M.S., Reeves, R.D., Li, Y.M., Brewer, E.P., Chen, K.Y., Roseberg, R.J., Perner, H. and Synkowski, E.C. (2005). Using hyperaccumulator plants to phytoextract soil Ni and Cd. *Zeitschrift Naturforschung*, **60**: 190–198.
- Chang, C.C., Slesak, I., Jorda, L., Sotnikov, A., Melzer, M., Miszalski, Z., Mullineaux, P.M., Parker, J.E., Karpinska, B. and Karpinski, S. (2009). *Arabidopsis* chloroplastic glutathione peroxidases play a role in cross talk between photooxidative stress and immune responses. *Plant Physiology*, **150**: 670–683.
- Chen, Z. and Gallie, D.R. (2004). The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell*, **16**: 1143–1162.

- Chen, Y.A., Chi, W.C., Huang, T.L., Lin, C.Y., Quynh Nguyeh, T.T., Hsiung, Y.C., Chia, L.C. and Huang, H.J. (2012). Mercury-induced biochemical and proteomic changes in rice roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, **55**: 23–32.
- Cheng, Y. and Long, M. (2007). A cytosolic NADP-malic enzyme gene from rice (*Oryza sativa* L.) confers salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Biotechnology Letters*, **29**: 1129–1134.
- Cherian, S. and Oliveira, M. (2005). Transgenic plants in phytoremediation: Recent advances and new Possibilities. *Environmental Science and Technology*, **39**: 9377–9390.
- 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.
- Chyan, C.L., Lee, T.T., Liu, C.P., Yang, Y.C., Tzen, J.T. and Chou, W.M. (2005). Cloning and expression of a seed-specific metallothionein-like protein from sesame. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **69**: 2319–2325.
- Clemens, S., Kim, E.J., Neumann, D. and Schroeder, J.L. (1999). Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO Journal*, **18**: 3325–3333.
- Clemens, S., Palmgren, M.G. and Kramer, U. (2002). A long way ahead: Understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science*, **7**: 309–315.
- Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, **88**: 1707–1719.
- Cobbett, C.S. (2000). Phytochelatins and their role in heavy metal detoxification. *Plant Physiology*, **123**: 825–832.
- Cobbett, C.S. and Golsbrough, P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metals detoxification and homeostasis. *Annual Reviews of Plant Biology*, **53**: 159–182.
- Connolly, E.L., Fett, J.P. and Guerinot, M.L. (2002). Expression of the *IRT1* metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell*, **14**: 1347–1357.
- Courbot, M., Willems, G., Motte, P., Arvidsson, S., Roosens, N., Saumitou-Laprade, P. and Verbruggen, N. (2007). A major quantitative trait locus for cadmium tolerance in *Arabidopsis halleri* Colocalizes with HMA4: A gene encoding a heavy metal ATPase. *Plant Physiology*, **144**: 1052–1065.

- Czakó, M., Feng, X., He, Y., Liang, D. and Márton, L. (2006). Transgenic *Spartina alterniflora* for phytoremediation. *Environmental Geochemistry and Health*, **28**: 103–110.
- DalCorso, G., Farinati, S., Maistri, S. and Furini, A. (2008). How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. *Journal of Integrative Plant Biology*, **50**: 1268–1280.
- D'Amici, G.M., Timperio, A.M. and Zolla, L. (2008). Coupling of native liquid phase isoelectro focusing and blue native polyacrylamide gel electrophoresis: a potent tool for native membrane multiprotein complex separation. *Journal of Proteome Research*, **7**: 1326–1340.
- Dana, M., Pintor–Toro, J.A. and Cubero, B. (2006). Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiology*, **142**: 722–730.
- Delhaize, E., Gruber, B.D. and Ryan, P.R. (2007). The roles of organic anion permeases in aluminium resistance and mineral nutrition. *FEBS Letters*, **581**: 2255–2262.
- Delmer, D.P. and Potikha, T.S. (1997). Structures and functions of annexins in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **53**: 546–553.
- De Pascale, S., Maggio, A., Orsini, F., Bottino, A. and Barbieri, G. (2008). Sulphur fertilization affects yield and quality of friarielli (*Brassica rapa* l. subs *sylvestris* L. Janch. Var. *esculenta* Hort.) grown on a floating system. *Journal of Horticultural Sciences and Biotechnology*, **83**: 743–748.
- Desbrosses–Fonrouge, A.G., Voigt, K., Schroder, A., Arrivault, S., Thomine, S. and Kramer, U. (2005). *Arabidopsis thaliana* MTP1 is a zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation. *FEBS Letters*, **579**: 4165–4174.
- Dhankher, O.P., Li, Y., Rosen, B.P., Shi, J. and Harden, P.N. (2002). Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and gamma–glutamylcysteine synthetase expression. *Nature Biotechnology*, **20**: 1094–1095.
- Dietz, K.J. (2003). Plant peroxiredoxins. *Annual Review of Plant Biology*, **54**: 93–107.
- Dietz, K.J., Jacob, S., Oelze, M.L., Laxa, M., Tognetti, V., de Miranda, S.M.N., Baier, M. and Finkemeier, I. (2006). The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *Journal of Experimental Botany*, **57**: 1697–1709.
- 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., 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.
- Dixit, V., Pandey, V. and Shyam, R. (2002). Chromium ions inactivate electron transport and enhance superoxide generation in vivo in pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) root mitochondria. *Plant Cell and Environment*, **25**: 687–690.
- Dixit, P., Mukherjee, P.K., Ramachandran, V. and Eapen, S. (2011). Glutathione transferase from *Trichoderma virens* enhances cadmium tolerance without enhancing its accumulation in transgenic *Nicotiana tabacum*. *PLoS ONE*, **6(1)**: e16360.
- Dixon, D.P., Davis, B.G. and Edwards, R. (2002). Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, **277**: 30859–30869.
- Dominguez–Solís, J.R., Gutierrez–Alcala, G., Vega, J.M., Romero, L.C. and Gotor, C. (2001). The cytosolic O–acetylserine(thiol)lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 9297–9302.
- Dominguez–Solís, J.R., López–Martín, M.C., Ager, F.J., Ynsa, M.D., Romero, L.C. and Gotor, C. (2004). Increased cysteine availability is essential for cadmium tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology Journal*, **2**: 469–476.
- Douillard, R. and de Mathan, O. (1994). Leaf proteins for food use: potential of RUBISCO. In: Hudson, B.J. (Ed.), *New and Developing Sources of Food Proteins*, Chapman & Hall, London.
- Dräger, D.B., Desbrosses–Fonrouge, A.G., Krach, C., Chardonnens, A.N., Meyer, R.C., Saumitou–Laprade, P. and Krämer, U. (2004). Two genes encoding *Arabidopsis halleri* MTP1 metal transport proteins co–segregate with zinc tolerance and account for high MTP1 transcript levels. *The Plant Journal*, **39**: 425–439.
- Droux, M. (2004). Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. *Photosynthesis Research*, **79(3)**: 331–348.
- Duquesnoy, I., Goupil, P., Nadaud, I., Branlard, G., Piquet–Pissaloux, A. and Ledoigt, G. (2009). Identification of *Agrostis tenuis* leaf proteins in response to As(V) and As(III) induced stress using a proteomics approach. *Plant Science*, **176**: 206–213.
- Durand, T.C., Sergeant, K., Planchon, S., Carpin, S., Label, P., Morabito, D., Hausman, J.F., Renaut, J., Durand, T.C., Sergeant, K., Planchon, S., Carpin, S., Label, P.,

- Morabito, D., Hausman, J.F. and Renaut, J. (2010). Acute metal stress in *Populus tremula* x *P. alba* (717-1B4 genotype): leaf and cambial proteome changes induced by cadmium²⁺. *Proteomics*, **10**: 349–368.
- Durrett, T.P., Gassmann, W. and Rogers, E.E. (2007). The FRD3-mediated efflux of citrate into the root vasculature is necessary for efficient iron translocation. *Plant Physiology*, **144**: 197–205.
- Dushenkov, V., Kumar, P.B.A.N., Motto, H. and Raskin, I. (1995). Rhizofiltration: The use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental Science and Technology*, **29**: 1239–1245.
- Dushenkov, V. and Kapulnik, Y. (2000). Phytoremediation of metals. In: Raskin, I. and Ensley, B.D. (eds.). *Phytoremediation of Toxic Metals – Using Plants to Clean-up The Environment*. Wiley, New York, pp. 89–106.
- Dushenkov, V., Skarzhinskaya, M., Glimelius, K., Gleba, D. and Raskin, I. (2002). Bioengineering of a phytoremediation plant by means of somatic hybridization. *International Journal of Phytoremediation*, **4**: 117–126.
- Dushenkov, D. (2003). Trends in phytoremediation of radionuclides. *Plant and Soil*, **249**: 167–175.
- Eapen, S. and Dsouza, S.F. (2005). Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnology Advances*, **23**: 97–114.
- Edreva, A. (2005). Pathogenesis-related proteins. Research progress in the last 15 years. *General and Applied Plant Physiology*, **31**: 105–124.
- Ellis, D.R. and Salt, D.E. (2003). Plants, selenium and human health. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**: 273–279.
- Ellis, D.R., Sors, T.G., Brunk, D.G., Albrecht, C., Orser, C., Lahner, B., Wood, K.V., Harris, H.H., Pickering I.J. and Salt, D.E. (2004). Production of semethylselenocysteine in transgenic plants expressing selenocysteine methyltransferase. *BMC Plant Biology*, **4**: 1–11.
- Eren, E. and Arguello, J.M. (2004). *Arabidopsis* HMA2: A divalent heavy metal-transporting PIB-type ATPase, is involved in cytoplasmic Zn²⁺ homeostasis. *Plant Physiology*, **136**: 3712–3723.
- Ernst, W., Krauss, G., Verkleij, J.A.C. and Wesenberg, D. (2008). Interaction of heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view. *Plant Cell and Environment*, **31**: 123–143.

- Evangelou, M.W.H., Ebel, M. and Schaeffer, A. (2007). Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil: Effect, mechanism, toxicity and fate of chelating agents. *Chemosphere*, **68**: 989–1003.
- Farinati, S., DalCorso, G., Bona, E., Corbella, M., Lampis, S., Cecconi, D., Polati, R., Berta, G., Vallini, G., and Furini, A. (2009). Proteomic analysis of *Arabidopsis halleri* shoots in response to the heavy metals cadmium and zinc and rhizosphere microorganisms. *Proteomics*, **9**: 4837–4850.
- Fässler, E., Plaza, S. and Pairraud, A. (2011). Expression of selected genes involved in cadmium detoxification in tobacco plants grown on a sulphur-amended metal-contaminated field. *Environmental and Experimental Botany*, **70**: 158–165.
- Fatima, R.A. and Ahmad, M. (2005). Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. *Science of Total Environment*, **346**: 256–273.
- Fecht-Christoffers, M.M., Braun, H., Lemaitre-Guillier, C., Vandorselaer, A. and Horst, W.J. (2003). Effect of manganese toxicity on the proteome of the leaf apoplast in cowpea. *Plant Physiology*, **133**: 1935–1946.
- Feldman-Salit, A., Wirtz, M., Hell, R. and Wade, R.C. (2009). A mechanistic model of the cysteine synthase complex. *Journal of Molecular Biology*, **386**: 37–59.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. and Whitehouse, C.M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **246**: 64–71.
- Foyer, C.H. and Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, **17**: 1866–1875.
- Foyer, C.H. and Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. *Plant Physiology*, **155**: 2–18.
- Freeman, J.L. and Salt, D.E. (2007). The metal tolerance profile of *Thlaspi goesingense* is mimicked in *Arabidopsis thaliana* heterologously expressing serine acetyltransferase. *BMC Plant Biology*, **7**: 63.
- Freeman, J.L., Persans, M.W., Nieman, K., Albrecht, C., Peer, W., Pickering, I.J. and Salt, D.E. (2004). Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *Plant Cell*, **16**: 2176–2191.
- Fukao, Y., Ferjani, A., Tomioka, R., Nagasaki, N., Kurata, R., Nishimori, Y., Fujiwara, M. and Maeshima, M. (2011). iTRAQ analysis reveals mechanisms of growth defects due to excess zinc in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **155**: 1893–1907.

- Fukuda, T., Saito, A., Wasaki, J., Shinano, T. and Osaki, M. (2007). Metabolic alterations proposed by proteome in rice roots grown under low P and high Al concentration under low pH. *Plant Science*, **172**: 1157–1165.
- Führs, H., Hartwig, M., Molina, L.E.B., Heintz, D., Van Dorsselaer, A., Braun, H.P. and Horst, W.J. (2008). Early manganese–toxicity response in *Vigna unguiculata* L. – a proteomic and transcriptomic study. *Proteomics*, **8**: 149–159.
- Gaitonde, M.K. (1967). A spectrophotometric method for the direct measurement of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Biochemical Journal*, **104**: 627–633.
- Galetskiy, D., Susnea, I., Reiser, V., Adamska, I. and Przybylski, M. (2008). Structure and dynamics of photosystem II light-harvesting complex revealed by high-resolution FTICR mass spectrometric proteome analysis. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **19**: 1004–1013
- Gajewska, E., Sklodowska, M., Slaba, M. and Mazur, J. (2006). Effect of nickel on antioxidant enzyme activities, praline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biologia Plantarum*, **50**: 653–659.
- Ganesh, K.S., Baskaran, L., Rajasekaran, S., Sumathi, K., Chidambaram, A.L.A. and Sundaramoorthy, P. (2008). Chromium stress induced alterations in biochemical and enzyme metabolism in aquatic and terrestrial plants. *Colloids and Surfaces B*, **63**: 159–163.
- Gangwar, S., Singh, V.P., Srivastava, P.K. and Maurya, J.N. (2011). Modification of chromium (VI) phytotoxicity by exogenous gibberellic acid application in *Pisum sativum* (L.) seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, **33**: 1385–1397.
- Gao, J., Sun, L., Yang, X. and Liu, J.X. (2013). Transcriptomic analysis of cadmium stress response in the heavy metal hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance. *PLoS ONE*, **8(6)**: e64643.
- Gasic, K. and Korban, S.S. (2007). Expression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase in Indian mustard (*Brassica juncea*) plants enhances tolerance for Cd and Zn. *Planta*, **25**: 1277–1285.
- Ge, C., Ding, Y., Wang, Z., Wan, D., Wang, Y., Shang, Q. and Luo, S. (2009). Responses of wheat seedlings to cadmium, mercury and trichlorobenzene stresses. *Journal of Environmental Sciences*, **21**: 806–813.
- Ghosh, M. and Singh, S.P. (2005). A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. *Applied Ecology and Environmental Research*, **3**: 1–18.

- Gianazza, E., Wait, R., Sozzi, A., Regondi, S., Saco, D., Labra, M. and Agradi, E. (2007). Growth and protein profile changes in *Lepidium sativum* L. plantlets exposed to cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, **59**: 179–187.
- Giegé, P., Heazlewood, J.L., Roessner–Tuanli, U., Millar, A.H., Fernie, A.R., Leaver, C.J. and Sweetlove, L.J. (2003). Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in *Arabidopsis* cells. *Plant Cell*, **15**: 2140–2151.
- Gill, S.S. and Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, **48**: 909–930.
- Gisbert, C., Ros, R., de Haro, A., Walker, D.J., Bernal, M.P., Serrano, R. and Navarro–Avino, J. (2003). A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **303**: 440–445.
- Glass, D.J. (2000). The 2000 Phytoremediation Industry. Glass Associates, Needham, MA.
- Gleba, D., Borisjuk, N.V., Borisjuk, L.G., Kneer, R., Poulev, A., Skarzhinskaya, M., Dushenkov, S., Logendra, S., Gleba, Y.Y. and Raskin, I. (1999). Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. *Proceedings of The National Academy of Science USA*, **96**: 5973–5977.
- Gong, J., Lee, D.A. and Schroeder, J.I. (2003). Long–distance root–to–shoot transport of phytochelatins and cadmium in *Arabidopsis*. *Proceedings of The National Academy of Science USA*, **100**: 10118–10123.
- Gorecka, K.M., Konopka-Postupolska, D., Hennig, J., Buchet, R. and Pikula, S. (2005). Peroxidase activity of annexin 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **336**: 868–875.
- Goupil, P., Souguir, D., Ferjani, E. and 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.
- Graham, L.S. and Sticklen, M.B. (1994). Plant chitinases. *Canadian Journal of Botany*, **72**: 1057–1083.
- Griffith, O.W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, **106**: 207–211.
- Grispen, V.M.J., Irtelli, B., Hakvoort, H.W.J., Vooijs, R., Bliet, T., ten Bookum, W.M., Verkleij, J.A.C. and Schat, H. (2009). Expression of the *Arabidopsis*

metallothionein 2b enhances arsenite sensitivity and root to shoot translocation in tobacco. *Environmental and Experimental Botany*, **66**: 69–73.

- Grispen, V.M.J., Hakvoort, H.V.J., Bliet, T., Verkleij, J.A.C. and Schat, H. (2011). Combined expression of the *Arabidopsis* metallothionein *MT2b* and the heavy metal transporting ATPase HMA4 enhances cadmium tolerance and the root to shoot translocation of cadmium and zinc in tobacco. *Environmental and Experimental Botany*, **72**: 71–76.
- Groppa, M.D., Tomaro, M.L. and Benavides, M.P. (2001). Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. *Plant Science*, **161**: 481–488.
- Grubb, C.D. and Abel, S. (2006). Glucosinolate metabolism and its control. *Trends in Plant Science*, **11**: 89–100.
- Guerinot, M.L. (2000). The ZIP family of metal transporters. *Biochimica Et Biophysica Acta*, **1465**: 190–198.
- 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, J.B., Dai, X.J., Xu, W.Z. and Ma, M. (2008). Overexpression of *GSH1* and *AsPCS1* simultaneously increase the tolerance and accumulation of cadmium and arsenic in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere*, **72**: 1020–1026.
- Habig, W.H. and Jacoby, W.B. (1981). In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.), *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York.
- Hajdich, M., Rakwal, R., Agrawal, G.K., Yonekura, M. and Pretova, A. (2001). High-resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal-stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaves: drastic reductions/fragmentation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stress-related proteins. *Electrophoresis*, **22**: 2824–2831.
- Halim, M., Conte, P. and Piccolo, A. (2003). Potential availability of heavy metals to phytoextraction from contaminated soils by exogenous humic substances. *Chemosphere*, **52**: 265–275.
- Hall, J.L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, **53**: 1–11.
- Hall, A., Nelson, K., Poole, L.B. and Karplus, P.A. (2011). Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxidants and Redox Signaling*, **15**(3): 795–815.

- Hamilton, C.A., Good, A.G. and Taylor, G.J. (2001). Induction of vacuolar ATPase and mitochondrial ATP synthase by aluminium in aluminium-resistant cultivar of wheat. *Plant Physiology*, **125**: 2068–2077.
- Hancock, R.D. and Viola, R. (2005). Biosynthesis and catabolism of L-ascorbic acid in plants. *Critical Reviews in Plant Science*, **24**: 167–188.
- Hannink, N., Roser S.J., French, C.E., Basran, A., Murray, J.A.H. Nicklin, S. and Bruce, N.C. (2001). Phytoremediation of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase. *Nature Biotechnology*, **19**: 1108–1172.
- Harada, E., Choi, E.Y., Tsuchisaka, A., Obata, H. and Sano, H. (2001). Transgenic tobacco plants expressing a rice cysteine synthase gene are tolerant to toxic levels of cadmium. *Journal of Plant Physiology*, **158**: 655–661.
- Harada, E., Yamaguchi, Y., Koizumi, N. and Hiroshi, S. (2002). Cadmium stress induces production of thiol compounds and transcripts for enzymes involved in sulfur assimilation pathways in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*, **159**: 445–448.
- Hardulak L.A., Preuss M.L., Jez J.M. (2011). Sulfur Metabolism as a Support System for Plant Heavy Metal Tolerance, pp. 289–301, In: Detoxification of Heavy Metals (Eds.: Sherameti . & Varma A.), Soil Biology, vol. 30. Springer, Berlin.
- 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.
- Hasegawa, I., Terada, E., Sunairi, M., Wakita, H., Shinmachi, F., Noguchi, A., Nakajima, M. and Yazaki, J. (1997). Genetic improvement of heavy metal tolerance in plants by transfer of the yeast metallothionein gene (*CUP1*). *Plant and Soil*, **196**: 277–281.
- Hassinen, V.H., Tuomainen, M., Peraniemi, S., Schat, H., Karenlampi, S.O. and Tervahauta, A.I. (2009). Metallothioneins 2 and 3 contribute to the metal-adapted phenotype but are not directly linked to Zn accumulation in the metal hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany*, **60**: 187–196.
- 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.
- Hawkesford, M.J. and De Kok, L.J. (2006). Managing sulphur metabolism in plants. *Plant Cell and Environment*, **29**: 382–395.

- Hayat, S., Khaliq, 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.
- Heath, R.L. and Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **125**: 189–198.
- Heaton, A.C.P., Rugh, C.L., Kim, T., Wang, N.J. and Meagher, R.B. (2003). Toward detoxifying mercury-polluted aquatic sediments with rice genetically engineered for mercury resistance. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**: 2940–2947.
- Heiss, S., Schafer, H.J., Haag-Kerwer, A. and Rausch, T. (1999). Cloning sulfur assimilation genes of *Brassica juncea* L.: cadmium differentially affects the expression of a putative low-affinity sulfate transport and isoforms of ATP sulfurylase and APS reductase. *Plant Molecular Biology*, **39**: 847–857.
- Herbette, S., Taconnat, L., Hugouvieux, V., Piette, L., Magniette, M.L.M., Cuine, S., Auroy, P., Richaud, P., Forestier, C., Bourguignon, J., Renou, J.-P., Vavasseur, A. and Leonhardt, N. (2006). Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots. *Biochimie*, **88**: 1751–1765.
- Hernandez-Allica, J., Barrutia, O., Becerril, J.M. and Garbisu, C. (2003). EDTA reduces the physiological damage of lead on cardoon plants grown hydroponically. *Journal of Physics IV*, **107**: 613–616.
- Hernandez-Allica, J., Becerril, J.M. and Garbisu, C. (2008). Assessment of the phytoextraction potential of high biomass crop plants. *Environmental Pollution*, **152**: 32–40.
- Hidaka, T., Imai, S., Hara, O., Anzai, H., Murakami, T., Nagaoka, K. and Seto, H. (1990). Carboxy phosphoenol pyruvate phosphonmutase, a novel enzyme catalyzing C–P bond formation. *Journal of Bacteriology*, **172**: 3066–3072.
- Hirschi, K.D., Korenkov, V.D., Wilganowski, N.L. and Wagner, G.J. (2000). Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiology*, **124**: 125–133.
- Hodges, D.M., Andrews, C.J., Johnson, D.A. and Hamilton, R.I. (1996). Antioxidant compound responses to chilling stress in differentially sensitive inbred maize 23 lines. *Physiologia Plantarum*, **98**: 685–692.
- Hoefgen, R. and Nikiforova, V. (2008). Metabolomics integrated with transcriptomics: assessing systems response to sulfur-deficiency stress. *Physiologia Plantarum*, **132**: 190–198.

- Honsel, A., Kojima, M., Haas, R., Frank, W., Sakakibara, H., Herschbach, C. and Rennenberg, H. (2012). Sulphur limitation and early sulphur deficiency responses in poplar: significance of gene expression, metabolites, and plant hormones. *Journal of Experimental Botany*, **63**: 1873–1893.
- Hossain, Z., Hajika, M. and Komatsu, S. (2012a). Comparative proteome analysis of high and low cadmium accumulating soybeans under cadmium stress. *Amino Acids*, **43**: 2393–2416.
- Hossain, Z., Makino, T. and Komatsu, S. (2012b). Proteomic study of β -aminobutyric acid-mediated cadmium stress alleviation in soybean. *Journal of Proteomics*, **75**: 4151–4164.
- Howarth, J.R., Dominguez-Solis, J.R., Gutierrez-Alcala, G., Wray, J.L., Romero, L.C. and Gotor, C. (2003). The serine acetyltransferase gene family in *Arabidopsis thaliana* and the regulation of its expression by cadmium. *Plant Molecular Biology*, **51**: 589–598.
- Hsieh, H.M., Liu, W.K. and Huang, P.C. (1995). A novel stress-inducible metallothionein-like gene from rice. *Plant Molecular Biology*, **28**: 381–389.
- Hsieh, J.L., Chen, C.Y., Chiu, M.H., Chein, M.F., Chang, J.S., Endo, G. and Huang, C.C. (2009). Expressing a bacterial mercuric ion binding protein in plant for phytoremediation of heavy metals. *Journal of Hazardous Materials*, **161**: 920–925.
- Huang, J.W., Chen, J., Berti, W.R. and Cunningham, S.D. (1997). Phytoremediation of lead contaminated soil: role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environmental Science and Technology*, **31**: 800–805.
- Huang, G.Y., Wang, Y.S. and Ying, G.G. (2011). Cadmium-inducible BgMT2, a type 2 metallothionein gene from mangrove species (*Bruguiera gymnorrhiza*), its encoding protein shows metal-binding ability. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **405**: 128-132.
- Hudspeth, R.L., Hobbs, S.L., Anderson, D.M., Rajasekaran, K. and Grula, J.W. (1996). Characterization and expression of metallothionein-like genes in cotton. *Plant Molecular Biology*, **31**: 701–705.
- Hurkman, W.J. and Tanaka, C.K. (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis of two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology*, **81**: 802–806.
- Hussain, D., Haydon, M.J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S.M., Young, J., Camakaris, J., Harper, J.F. and Cobbett, C.S. (2004). P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**: 1327–1339.

- Hwang, D.H., Kim, S.T., Kim, S.G. and Kang, K.Y. (2007). Comprehensive analysis of the expression of twenty-seven β -1,3-glucanase genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecules and Cells*, **23**: 207–214.
- Iakimova, E.T., Woltering, E.J., Kapchina–Toteva, V.M., Harren, F.J.M. and Cristescu, S.M. (2008). Cadmium toxicity in cultured tomato cells – role of ethylene, proteases and oxidative stress in cell death signaling. *Cell Biology International*, **32**: 1521–1529.
- Ichimia, S., Davis, J.G., O’Rourke, D.M., Katsumata, M. and Greene, M.I. (1997). Murine thioredoxin peroxidase delays neuronal apoptosis and is expressed in areas of the brain most susceptible to hypoxic and ischemic injury. *DNA and Cell Biology*, **16**: 311–321.
- 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.
- Ingle, R.A., Mugford, S.T., Rees, J.D., Campbell, M.M. and Smith, J.A.C. (2005a). Constitutively high expression of the histidine biosynthetic pathway contributes to nickel tolerance in hyperaccumulator plants. *The Plant Cell*, **17**: 2089–2106.
- Ingle, R., Smith, J. and Sweetlove, L. (2005b). Responses to nickel in the proteome of the hyperaccumulator plant *Alyssum lesbiacum*. *Biometals*, **18**: 627–641.
- Inoue, K., Noji, M. and Saito, K. (1999). Determination of the sites required for the allosteric inhibition of serine acetyltransferase by L-cysteine in plants. *European Journal of Biochemistry*, **266**: 220–227.
- Ishida, H., Anzawa, D., Kokubun, N., Makino, A. and Mae, T. (2002). Direct evidence for nonenzymatic fragmentation of chloroplastic glutamine synthetase by reactive oxygen species. *Plant Cell and Environment*, **25**: 625–631.
- Ishikawa, A., Tanaka, H., Nakai, M. and Asahi, T. (2003). Deletion of a chaperonin 60 beta gene leads to cell death in the *Arabidopsis* lesion initiation 1 mutant. *Plant and Cell Physiology*, **44**: 255–261.
- Ivanova, L.A., Ronzhina, D.A., Ivanov, L.A., Stroukova, L.V., Peuke, A.D. and Rennenberg, H. (2011). Over-expression of *gsh1* in the cytosol affects the photosynthetic apparatus and improves the performance of transgenic poplars on heavy metal-contaminated soil. *Plant Biology*, **13**: 649–59.
- Jabeen, R., Ahmad, A. and Iqbal, M. (2009). Phytoremediation of heavy metals: Physiological and molecular mechanisms. *Botanical Reviews*, **75**: 339–364.

- 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 metallicolous and non-metallicolous populations of *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. *Environmental and Experimental Botany*, **59**: 84–91.
- Jang, H.H., Lee, K.O., Chi, Y.H., Jung, B.G., Park, S.K., Park, J.H., Lee, J.R., Lee, S.S., Moon, J.C., Yun, J.W., Choi, Y.O., Kim, W.Y., Kang, J.S., Cheong, G.W., Yun, D.J., Rhee, S.G., Cho, M.J. and Lee, S.Y. (2004). Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell*, **117**: 625–635.
- Joosen, R., Cordewener, J., Supena, E. D., Vorst, O., Lammers, M., Maliepaard, C., Zeilmaker, T., Miki, B., America, T., Custers, J. and Boutilier, K. (2007). Combined transcriptome and proteome analysis identifies pathways and markers associated with the establishment of rapeseed microspore-derived embryo development. *Plant Physiology*, **144**: 155–172.
- Jwa, N.S., Agrawal, G.K., Tamogami, S., Yonekura, M., Han, O., Iwahashi, H. and Rakwal, R. (2006). Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry*, **44**: 261–273.
- Karenlampi, S., Schat, H., Vangronsveld, J., Verkleij, J.A.C., van der Lelie, D., Mergeay, M. and Tervahauta, A.I. (2000). Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. *Environmental Pollution*, **107**: 225–231.
- Kassis, E., Cathala, N., Rouached, H. and Rouger, F. (2007). Characterization of a selenate-resistant *Arabidopsis* mutant. Root growth as a potential target for selenate toxicity. *Plant Physiology*, **143**: 1231–1241.
- Kataoka, T., Watanabe-Takahashi, A., Hayashi, N., Ohnishi, M., Mimura, T., Buchner, P., Hawkesford, M.J., Yamaya, T. and Takahashi, H. (2004). Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**: 2693–2704.
- Kataya, A.M.R. and Reumann, S. (2010). *Arabidopsis* glutathione reductase 1 is dually targeted to peroxisomes and the cytosol. *Plant Signaling and Behavior*, **5**: 171–175.
- Kawashima, C.G., Noji, M., Nakamura, M., Ogra, Y., Suzuki, K.T. and Saito, K. (2004). Heavy metal tolerance of transgenic tobacco plants over-expressing cysteine synthase. *Biotechnology Letters*, **26**: 153–157.

- Ke, Y., Han, G., He, H. and Li, J. (2009). Differential regulation of proteins and phosphoproteins in rice under drought stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **379**: 3–8.
- Kellermann, J. (2008). ICPL—*isotope-coded protein label*. *Methods in Molecular Biology*, **424**: 113–123.
- Kennedy, S. (2002). The role of proteomics in toxicology: Identification of biomarkers of toxicity by protein expression analysis. *Biomarkers*, **7**: 269–290.
- Kerkeb, L. and Krämer, U. (2003). The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*. *Plant Physiology*, **131**: 716–724.
- Khan, N.A., Anjum, N.A., Nazar, R. and Iqbal, N. (2009). Increased activity of ATP-sulfurylase and increased contents of cysteine and glutathione reduce high cadmium-induced oxidative stress in mustard cultivar with high photosynthetic potential. *Russian Journal of Plant Physiology*, **56**: 670–677.
- Khan, M.S., Haas, F.H., Samami, A.A., Gholami, A.M., Bauer, A., Fellenberg, K., Reichelt, M., Hansch, R., Mendel, R.R., Meyer, A.J., Wirtz, M. and Hell, R. (2010). Sulfite reductase defines a newly discovered bottleneck for assimilatory sulfate reduction and is essential for growth and development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **22**: 1216–1231.
- Kieffer, P., Dommès, J., Hoffmann, L., Hausman, J.F. and Renaut, J. (2008). Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. *Proteomics*, **8**: 2514–2530.
- Kieffer, P., Planchon, S., Oufir, M., Ziebel, J., Dommès, J., Hoffmann, L., Hausman, J.F. and Renaut, J. (2009). Combining proteomics and metabolite analyses to unravel cadmium stress-response in poplar leaves. *Journal of Proteome Research*, **8**: 400–417.
- Kim, N.-S., Umezawa, Y., Ohmura, S. and Kato, S. (1993). Human glyoxalase I: cDNA cloning, expression and sequence similarity to glyoxalase I from *Pseudomonas putida*. *Journal of Biological Chemistry*, **268**: 11217–11221.
- Kim, S.T., Cho, K.S., Jang, Y.S. and Kang, K.Y. (2001). Two-dimensional electrophoretic analysis of rice proteins by polyethylene glycol fractionation for protein arrays. *Electrophoresis*, **22**: 2103–2109.
- Kim, D.Y., Bovet, L., Kushnir, S., Noh, E.W., Martinoia, E. and Lee, Y. (2006). AtATM3 is involved in heavy metal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **140**: 922–932.

- Klein, M.A., Sekimoto, H., Milner, M.J. and Kochian, L.V. (2008). Investigation of heavy metal hyperaccumulation at the cellular level: Development and characterization of *Thlaspi caerulescens* suspension cell lines. *Plant Physiology*, **147**: 2006–2016.
- Kobae, Y., Uemura, T., Sato, M.H., Ohnishi, M., Mimura, T., Nakagawa, T. and Maeshima, M. (2004). Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis. *Plant Cell Physiology*, **45**: 1749–1758.
- Kopriva, S. and Koprivova, A. (2004). Plant adenosine 5′-phosphosulphate reductase: the past, the present, and the future. *Journal of Experimental Botany*, **55**: 1775–1783.
- Kopriva, S. (2006). Regulation of sulfate assimilation in *Arabidopsis* and beyond. *Annals of Botany*, **97**: 479–495.
- Koralewska, A., Buchner, P., Stuiver, C.E.E., Posthumus, F.S., Kopriva, S., Hawkesford, M.J. and De Kok, L.J. (2009). Expression and activity of sulfate transporters and APS reductase in curly kale in response to sulfate deprivation and re-supply. *Journal of Plant Physiology*, **166**: 168–179.
- Korenkov, V., Park, S.H., Cheng, N.H., Sreevidya, C., Lachmansingh, J., Morris, J., Hirschi, K. and Wagner G.J. (2007). Enhanced Cd²⁺ selective root-tonoplast-transport in tobaccos expressing *Arabidopsis* cation exchangers. *Planta*, **225**: 403–411.
- Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I.T. and Renaut, J. (2011). Plant proteome changes under abiotic stress—contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics*, **74**: 1301–1322.
- Krämer, U., Talke, I. and Hanikenne, M. (2007). Transition metal transport. *FEBS Letters*, **581**: 2263–2272.
- Kumar, T. and Prasad, M.N.V. (1999). Metal-binding properties of ferritin in *Vigna mungo* (L.) Hepper (Black gram): Possible role in heavy metal detoxification. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **62**: 502–507.
- Kumar, S., Asif, M.H., Chakrabarty, D., Tripathi, R.D., Dubey, R.S., Trivedi, P.K. (2013). Expression of a rice Lambda class of glutathione S-transferase, *OsGSTL2*, in *Arabidopsis* provides tolerance to heavy metal and other abiotic stresses. *Journal of Hazardous Materials*, **248–249**: 228–237.
- Küpper, H. and Kochian, L.V. (2010). Transcriptional regulation of metal transport genes and mineral nutrition during acclimatization to cadmium and zinc in the Cd/Zn Hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens* (Ganges Population). *New Phytologist*, **185**: 114–129.

- Labra, M., Regondi, S., Grassi, F. and Agradi, E. (2006). *Zea mays* L. protein changes in response to potassium dichromate treatments. *Chemosphere*, **62**: 1234–1244.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680–685.
- Lahner, B., Gong, J., Mahmoudian, M., Smith, E.L., Abid, K.B., Rogers, E.E., Guerinot, M.L., Harper, J.F., Ward, J.M., McIntyre, L., Schroeder, J.I. and Salt, D.E. (2003). Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*, **21**: 1215–1221.
- Lanquar, V., Lelievre, F., Barbier–Brygoo, H. and Thomine, S. (2004). Regulation and function of AtNRAMP4 metal transporter protein. *Soil Science and Plant Nutrition*, **50**: 1141–1150.
- Lebaudy, A., Vavasseur, A., Hosy, E. and Hecker, K. (2008). Plant adaptation to fluctuating environment and biomass production are strongly dependent on guard cell potassium channels. *Proceedings of The National Academy of Science USA*, **105**: 5271–5276.
- LeDuc, D.L., AbdelSamie, M., Montes–Bayon, M. and Wenton, L.M. (2006). Overexpressing both ATP sulfurylase and selenocysteine methyltransferase enhances selenium phytoremediation traits in Indian mustard. *Environmental Pollution*, **144**: 70–76.
- Lee, S., Moon, J.S., Ko, T.S., Petros, D., Goldsbrough, P.B. and Korban, S.S. (2003). Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress. *Plant Physiology*, **131**: 656–663.
- 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.
- Lee, M. and Yang, M. (2010). Rhizofiltration using sunflower (*Helianthus annuus* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. vulgaris) to remediate uranium contaminated groundwater. *Journal of Hazardous Materials*, **173**: 589–596.
- Lee, K., Bae, D. W., Kim, S. H., Han, H. J., Liu, X., Park, H. C., Lim, C. O., Lee, S.Y. and Chung, W.S. (2010). Comparative proteomic analysis of the short–term responses of rice roots and leaves to cadmium. *Journal of Plant Physiology*, **167**: 161–168.
- Leustek, T., Murillo, M. and Cervantes, M., (1994). Cloning of a cDNA encoding ATP sulfurylase from *Arabidopsis thaliana* by functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiology*, **105**: 897–902.

- Leustek, T., Martin, M.N., Bick, J.A. and Davies, J.P. (2000). Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **51**: 141–165.
- Li, T.Q., Yang, X.E. and Long, X.X. (2004). Potential of using *Sedum alfredii* Hance for phytoremediating multi-metal contaminated soils. *Journal of Soil and Water Conservation*, **18**: 79–83.
- Li, Y., Dhankher, O.P., Carreira, L., Balish, R.S. and Meagher, R.B. (2005). Arsenic and mercury tolerance and cadmium sensitivity in *Arabidopsis* plants expressing bacterial gamma-glutamylcysteine synthetase. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**: 1376–1386.
- Li, J., Guo, J., Xu, W. and Ma, M. (2006a). Enhanced cadmium accumulation in transgenic tobacco expressing the phytochelatin synthase gene of *Cynodon dactylon* L. *Journal of Integrative Plant Biology*, **48**: 928–937.
- Li, Y., Dankher, O.P., Carreira, L., Smith, A.P. and Meagher, R.B. (2006b). The shoot-specific expression of gamma-glutamylcysteine synthetase directs the long-distance transport of thiol-peptides to roots conferring tolerance to mercury and arsenic. *Plant Physiology*, **141**: 288–298.
- Li, Q., Wang, B.C., Xu, Y. and Zhu, Y.X. (2007). Systematic studies of 12S seed storage protein accumulation and degradation patterns during *Arabidopsis* seed maturation and early seedling germination stages. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **40**: 373–381.
- Li, F., Shi, J., Shen, C., Chen, G., Hu, S. and Chen, Y. (2009). Proteomic characterization of copper stress response in *Elsholtzia splendens* roots and leaves. *Plant Molecular Biology*, **71**: 251–263.
- Lin, C.Y., Trinh, N.N., Fu, S.F., Hsiung, Y.C., Chia, Y.C., Lin, C.W. and Huang, H.J. (2013). Comparison of early transcriptome responses to copper and cadmium in rice roots. *Plant Molecular Biology*, **81**: 507–522.
- Lindblom, S.D., Abdel-Ghany, S.E., Hanson, B.R., Hwang, S., Terry, N. and Pilon-Smits, E.A.H. (2006). Constitutive expression of a high-affinity sulfate transporter in *Brassica juncea* affects metal tolerance and accumulation. *Journal of Environmental Quality*, **35**: 726–733.
- Lingard, M.J. and Bartel, B. (2009). *Arabidopsis* LON2 is necessary for peroxisomal function and sustained matrix protein import. *Plant Physiology*, **151(3)**: 1354–1365.
- Liu, G.S., Sanchez-Fernandez, R., Li, Z.S. and Rea, P.A. (2001). Enhanced multispecificity of *Arabidopsis* vacuolar multidrug resistance-associated protein-type ATP-

- binding cassette transporter, AtMRP2. *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 8648–8656.
- Liu, X.D. and Shen, Y.G. (2004). NaCl-induced phosphorylation of light harvesting chlorophyll a/b proteins in thylakoid membranes from the halotolerant green alga, *Dunaliella salina*. *FEBS Letters*, **569**: 337–340
- Liu, D., Zhang, X., Cheng, Y., Takano, T. and Liu, S. (2006). *rHsp90* gene expression in response to several environmental stresses in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, **44**: 380–386.
- Liu, S., Cheng, Y., Zhang, X., Guan, Q., Nishiuchi, S., Hase, K. and Takano, T. (2007). Expression of an NADP–malic enzyme gene in rice (*Oryza sativa* L.) is induced by environmental stresses; over–expression of the gene in *Arabidopsis* confers salt and osmotic stress tolerance. *Plant Molecular Biology*, **64**: 49–58.
- Liu, D., Zou, J., Wang, M. and Jiang, W. (2008). Hexavalent chromium uptake and its effects on mineral uptake, antioxidant defence system and photosynthesis in *Amaranthus viridis* L. – *Bioresource Technology*, **99**: 2628–2636.
- Liu, T., Liu, S., Guan, H., Ma, L., Chen, Z., Gu, H. and Qu, L.J. (2009). Transcriptional profiling of *Arabidopsis* seedlings in response to heavy metal lead (Pb). *Environmental and Experimental Botany*, **67**: 377–386.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, **25**: 402–408.
- Lokhande, V.H., Srivastava, S., Patade, V.Y., Dwivedi, S., Tripathi, R.D., Nikam, T.D. and Suprasann, P. (2011). Investigation of arsenic accumulation and tolerance potential of *Sesuvium portulacastrum* (L.) L. *Chemosphere*, **82**: 529–534.
- Long, X.X., Yang, X.E. and Ni, W.Z. (2002). Current status and perspective on phytoremediation of heavy metal polluted soils. *Journal of Applied Ecology*, **13**: 757–762.
- Lotte, V.N., Jan, M., Koen, O. and Kris, V. (2007). Phytoextraction of metals from soils: How far from practice? *Environmental Pollution*, **150**: 34–40.
- Lovely, D.R. (1993). Dissimilatory metal reduction. *Annual Reviews of Microbiology*, **47**: 263–290.
- Lu, Y.P., Li, R.S. and Rea, P.A. (1997). AtMRP1 gene of *Arabidopsis* encodes a glutathione s–conjugate pump: isolation and functional definition of a plant ATP binding cassette transporter gene. *Proceedings of The National Academy of Science USA*, **94**: 8243–8248.

- Lunde, C., Zygadlo, A., Simonsen, H.T., Nielsen, P.L., Blennow, A. and Haldrup, A. (2008). Sulfur starvation in rice: the effect on photosynthesis, carbohydrate metabolism, and oxidative stress protective pathways. *Physiologia Plantarum*, **134**: 508–521.
- Luo, C.L., Shen, Z.G. and Li, X.D. (2008). Plant uptake and leaching of metals during the hot EDDS-enhanced phytoextraction process. *International Journal of Phytoremediation*, **9**: 181–196.
- Lyu, M.S., Rhee, S.G., Chae, H.Z., Lee, T.H., Adamson, M.C., Kang, S.W., Jin, D.Y., Jeang, K.T. and Kozak, C.A. (1999). Genetic mapping of six mouse peroxiredoxin genes and fourteen peroxiredoxin related sequences. *Mammalian Genome*, **10**: 1017–1019.
- Lyyra, S., Meagher, R.B., Kim, T., Heaton, A., Montello, P. and Balish, R.S. (2007). Coupling two mercury resistance genes in eastern cottonwood enhances the processing of organomercury. *Plant Biotechnology Journal*, **5**: 254–262.
- Ma, J.F., Yamaji, N., Mitani, N., Xu, X.Y., Su, Y.H., McGrath, S.P. and Zhao, F.J. (2008). Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **105**: 9931–9935.
- Ma, H., Song, L., Shu, Y., Wang, S., Niu, J. and Wang, Z. (2012). Comparative proteomic analysis of seedling leaves of different salt tolerant soybean genotypes. *Journal of Proteomics*, **75**: 1529–1546.
- Macek, T., Macková, M., Pavlíková, D., Száková, J., Truksa, M. and Cundy, A. (2002). Accumulation of cadmium by transgenic tobacco. *Acta Biotechnology*, **22**: 101–106.
- MacRae, E.A. and Fergusam, I.B. (1985). Changes in catalase activity and H₂O₂ concentration in plants in response to low temp. *Physiologia Plantarum*, **65**: 51–56.
- Maiwald, D., Dietzmann, A., Jahns, P., Pesaresi, P., Joliot, P., Joliot, A., Levin, J.Z., Salamini, F. and Leister, D. (2003). Knock-out of the genes coding for the Rieske protein and the ATP-synthase delta-subunit of *Arabidopsis*. Effects on photosynthesis, thylakoid protein composition, and nuclear chloroplast gene expression. *Plant Physiology*, **133(1)**: 191–202.
- Mann, M. (2006). Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **7**: 952–958.
- Marrs, K.A. (1996). The function and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **47**: 127–158.

- Martínez, M., Bernal, P., Almela, C., Vélez, D., García–Agustín, P. and Serrano, R. (2006). An engineered plant that accumulates higher levels of heavy metals than *Thlaspi caerulescens*, with yields of 100 times more biomass in mine soils. *Chemosphere*, **64**: 478–485.
- Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, U., Müller–Röber, B. and Schulz, B. (2002). Multifunctionality of plant ABC transporters—more than just detoxifiers. *Planta*, **214**: 345–355.
- Maruyama–Nakashita, A., Nakamura, Y., Yamaya, T. and Takahashi, H. (2004). Regulation of high–affinity sulfate transporters in plants: towards systematic analysis of sulfur signaling and regulation. *Journal of Experimental Botany*, **55**: 1843–1849.
- Meagher, R.B., Rugh, C.L., Kandasamy, M.K., Gragson, G. and Wang, G. (2000). Engineered Phytoremediation of Mercury Pollution in Soil and Water Using Bacterial Genes. In: Terry, N. and Banuelos, G. (eds.). *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Lewis, Boca Raton, pp. 201–219.
- Meers, E., Ruttens, A., Hopgood, M.J., Samson, D. and Tack, F.M. (2005). Comparison of EDTA and EDDS as potential soil amendments for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Chemosphere*, **58**: 1011–1022.
- Meers, E., Tack, F.M. and Verloo, M.G. (2008). Degradability of ethylenediaminedisuccinic acid (EDDS) in metal contaminated soils: Implications for its use soil remediation. *Chemosphere*, **70**: 358–363.
- Mellwig, C. and Böttcher, B. (2003). A unique resting position of the ATP-synthase from chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry*, **278**: 18544–18549.
- Mejare, M. and Bulow, L. (2001). Metal–binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends in Biotechnology*, **19**: 67–73.
- Membre, N., Bernier, F., Staiger, D. and Berna, A. (2000). *Arabidopsis thaliana* germin-like proteins: common and specific features point to a variety of functions. *Planta*, **211**: 345–354.
- Mendoza–Cózatl, D.G. and Moreno–Sánchez, R. (2005). Cd²⁺ transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1706**: 88–97.
- Mendoza–Cózatl, D.G., Butko, E., Springer, F. and Harper, L. (2008). Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol–peptides in the long–distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *Plant Journal*, **54**: 249–259.

- Mengoni, A., Gonnelli, C., Hakvoort, H.W.J., Galardi, F., Bazzicalupo, M., Gabbrielli, R. and Schat, H. (2003). Evolution of copper-tolerance and increased expression of a 2b-type metallothionein gene in *Silene paradoxa* L. Populations. *Plant and Soil*, **257**: 451–457.
- Merrifield, M.E., Ngu, T. and Stillman, M.J. (2004). Arsenic binding to *Fucus vesiculosus* metallothionein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **324**: 127–132.
- Meyer, A.J. and Hell, R. (2005). Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynthesis Research*, **86**: 435–457.
- Meyers, B., Zaitsman, A., Lacroix, B., Kozlovsky, S.V. and Krichevsky, A. (2010). Nuclear and plastid genetic engineering of plants: Comparison of opportunities and challenges. *Biotechnology Advances*, **6**: 747–756.
- Mhamdi, A., Hager, J., Chaouch, S., Queval, G., Han, Y., Taconnat, L., Saindrenan, P., Gouia, H., Issakidis-Bourguet, E., Renou, J.P. and Noctor, G. (2010). Arabidopsis GLUTATHIONE REDUCTASE 1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular H₂O₂ and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways. *Plant Physiology*, **153**: 1144–1160.
- Mika, A. and Lüthje, S. (2003). Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes. *Plant Physiology*, **132**: 1489–1498.
- Milla, M.A.R., Maurer, A., Rodriguez, H.A. and Gustafson, J.P. (2003). Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways. *The Plant Journal*, **36**: 602–615.
- 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.
- Mills, R.F., Francini, A., da Rocha, P.S.C.F., Baccharini, P.J., Aylett, M., Krijger, G.C. and Williams, L.E. (2005). The plant P-1B-Type ATPase AtHMA4 transports Zn and Cd and plays a role in detoxification of transition metals supplied at elevated levels. *FEBS Letters*, **579**: 783–791.
- Milner, M.J. and Kochian, L.V. (2008). Investigating heavy-metal hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a model system. *Annals of Botany*, **102**: 3–13.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, **7**: 405–410.
- Miziorko, H.M. (2000). Phosphoribulokinase: current perspectives on the structure/function basis for regulation and catalysis. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, **74**: 95–127.

- Montanini, B., Blaudez, D., Jeandroz, S., Sanders, D. and Chalot, M. (2007). Phylogenetic and functional analysis of the cation diffusion facilitator (CDF) family: Improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics*, **8**: 107–123.
- Moons, A., Gielen, J., Vandekerckhove, J., Van Der Straeten, D., Gheysen, G. and Van Montagu, M. (1997). An abscisic-acid- and salt-stress-responsive rice cDNA from a novel plant gene family. *Planta*, **202**: 443–454.
- Morsomme, P. and Boutry, M. (2000). The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1465**: 1–16.
- Mortimer, J.C., Laohavisit, A., Macpherson, N., Webb, A., Brownlee, C., Battey, N.H. and Davies, J.M. (2008). Annexins: multifunctional components of growth and adaptation. *Journal of Experimental Botany* **59**: 533–544.
- Mugford S.G., Matthewman C.A., Hill L. and Kopriva S. (2010). Adenosine-5'-phosphosulfate kinase is essential for *Arabidopsis* viability. *FEBS Letters*, **584**: 119–123.
- Munekage, Y., Takeda, S., Endo, T., Jahns, P., Hashimoto, T. and Shikanai, T. (2001). Cytochrome b6f mutation specifically affects thermal dissipation of absorbed light energy in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, **28**: 351–359.
- Na, G. and Salt, D.E. (2011). The role of sulfur assimilation and sulfur-containing compounds in trace element homeostasis in plants. *Environmental and Experimental Botany*, **72**: 18–25.
- 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.
- Nakayama, M., Akashi, T. and Hase, T. (2000). Plant sulfite reductase: molecular structure, catalytic function and interaction with ferredoxin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **82**: 27–32.
- Nandi, D., Patra, R.C. and Swarup, D. (2005). Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic-induced oxidative stress and biochemical alterations in rats. *Toxicology*, **211**: 26–35.
- Navari-Izzo, F. and Quartacci, M.F. (2001). Phytoremediation of metals. Tolerance mechanism against oxidative stress. *Mineral Biotechnology*, **13**: 73–83.

- Nelson, R.J., Ziegelhoffer, T., Nicolet, C., Wernerwashburne, M. and Craig, E.A. (1992). The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis. *Cell*, **71**: 97–105.
- Neuhoff, V., Arnold, N., Taube, D. and Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, **9**: 255–262.
- Newman, L.A. and Reynolds, C.M. (2004). Phytodegradation of organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, **15**: 225–230.
- Nikiforova, V., Freitag, J., Kempa, S., Adamik, M., Hesse, H. and Hoefgen, R. (2003). Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *Plant Journal*, **33**: 633–650.
- NMKL (1998). Metals: determination by atomic adsorption spectrophotometry after wet digestion in microwave oven. In: NMKL Method No. 161, Nordic Committee on Food Analysis, Norway, p. 8
- Nocito F.F., Lancilli C., Crema B., Fourcroy P., Davidian J. and Sacchi G.A. (2006). Heavy metal stress and sulfate uptake in maize roots. *Plant Physiology*, **141**: 1138–1148.
- Nocito, F.F., Lancilli, C., Giacomini, B. and Attilio–Sacchi, G. (2007). Sulfur metabolism and cadmium stress in higher plants. In *Plant Stress*. Global Science Books, UK.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H. and Foyer, C.H. (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *Journal of Experimental Botany*, **53**: 1283–1304.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez–Garcia, B., Queval, G. and Foyer, C.H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell and Environment*, **35**: 454–484.
- Noriega, G.O., Balestrasse, K.B., Batlle, A. and Tomaro, M.L. (2007). Cadmium induced oxidative stress in soybean plants also by the accumulation of delta–aminolevulinic acid. *Biometals*, **20**: 841–851.
- Nováková, M., Matějova, E. and Sofrová, D. (2004). Cd²⁺ effect on photosynthetic apparatus in *Synechococcus elongatus* and spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Photosynthetica*, **42**: 425–430.
- Oomen, R.J.F.J., Wu, J., Lelièvre, F., Blanchet, S., Richaud, P., Barbier–Brygoo, H., Aarts, M.G.M. and Thomine, S. (2008). Functional characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, **181**: 637–650.

- Ortiz, D.F., Kreppel, L., Speiser, D.M., Scheel, G., McDonald, G. and Ow, D.W. (1992). Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP binding cassette–type vacuolar membrane transporter. *EMBO Journal*, **11**: 3491–3499.
- Ortiz, D.F., Kreppel, L. and Spaser, D.M. (1995). Transport of metal binding peptides by HMT1: a fission yeast ABC–type vacuolar membrane protein. *Journal Biological Chemistry*, **270**: 4721–4727.
- Padmavathiamma, P. K. and Loretta, Y.L. (2007). Phytoremediation technology: Hyper–accumulation metals in plants. *Water Air Soil Pollution*, **184**: 105–126.
- Papoyan, A. and Kochian, L.V. (2004). Identification of *Thlaspi caerulescens* genes that may be involved in heavy metal hyperaccumulation and tolerance. Characterization of a novel heavy metal transporting ATPase. *Plant Physiology*, **136**: 3814–3823.
- Pal, R. and Rai, J.P.N. (2010). Phytochelatins: Peptides involved in heavy metal detoxification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **160**: 945–963.
- Pan, A., Yang, M., Tie, F., Li, L., Chen, Z. and Ru, B. (1994). Expression of mouse metallothionein–I–gene confers cadmium resistance in transgenic tobacco plants. *Plant Molecular Biology*, **24**: 341–351.
- Pandey, V., Dixit, V. and Shyam, R. (2005). Antioxidative responses in relation to growth of mustard (*Brassica juncea* cv. Pusa Jai Kisan) plants exposed to hexavalent chromium. *Chemosphere*, **61**: 40–47.
- Pandey, V., Dixit, V. and Shyam, R. (2009). Chromium effect on ROS generation and detoxification in pea (*Pisum sativum*) leaf chloroplasts. *Protoplasma*, **236**: 85–95.
- Papini-Terzi, F.S., Galhardo, R.S., Farias, L.P., Menck, C.F. and Van Sluys, M.A. (2003). Point mutation is responsible for *Arabidopsis* tz-201 mutant phenotype affecting thiamin biosynthesis. *Plant Cell Physiology*, **44**: 856–860.
- Parsell, D.A., and Lindquist, S. (1993). The function of heat–shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Reviews of Genetics*, **27**: 437–496.
- Pasternak, M., Lim, B., Wirtz, M., Hell, R., Cobbett, C.S. and Meyer, A.J. (2008). Restricting glutathione biosynthesis to the cytosol is sufficient for normal plant development. *The Plant Journal*, **53**: 999–1012.
- Patterson, J., Ford, K., Cassin, A., Natera, S., and Bacic, A. (2007). Increased abundance of proteins involved in phytosiderophore production in boron–tolerant Barley. *Plant Physiology*, **144**: 1612–1631.

- Pavlíková, D., Macek, T., MacKová, M., Száková, J., Balík, J. (2004). Cadmium tolerance and accumulation in transgenic tobacco plants with a yeast metallothionein combined with a polyhistidine tail. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **54**: 233–237.
- Pejchal, R. and Ludwig, M.L. (2005). Cobalamin-independent methionine synthase (MetE): a face-to-face double barrel that evolved by gene duplication. *PLoS Biology*, **3**: e31.
- Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Letham, D.B.L., Lasat, M.M., Garvin, D.F., Eide, D. and Kochian, L.V. (2000). The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **97**: 4956–4960.
- Perham, R.N. (1990). The fructose-1,6-bisphosphate aldolases: same reaction, different enzymes. *Biochemical Society Transactions*, **18(2)**: 185–187.
- Persans, M.W., Nieman, K. and Salt, D.E. (2001). Functional activity and role of cation-efflux family members in Ni hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **98**: 9995–10000.
- Peterson, A.G. and Oliver, D.J. (2006). Leaf-targeted phytochelatin synthase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **44**: 885–892.
- Petra, K., Juan, B., Pilar Bernal, M., Flavia, N., Charlotte, P., Stefan, S., Rafael, C. and Carmela, M. (2009). Trace element behavior at the root-soil interface. Implications in phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany*, **67**: 243–259.
- Picault, N., Cazale, A.C., Beyly, A., Cuine, S., Carrier, P., Luu, D.T., Forestier, C. and Peltier, G. (2006). Chloroplast targeting of phytochelatin synthase in *Arabidopsis*: Effects on heavy metal tolerance and accumulation. *Biochimie*, **88**: 1743–1750.
- Pilon-Smits, E. and Pilon, M. (2002). Phytoremediation of metals using transgenic plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **21**: 439–456.
- Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Annual Reviews of Plant Biology*, **56**: 15–39.
- Pomponi, M., Censi, V., Di Girolamo, V., De Paolis, A., di Toppi, L.S. and Aromolo, R. (2006). Overexpression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase in tobacco plants enhances Cd²⁺ tolerance and accumulation but not translocation to the shoot. *Planta*, **223**: 180–190.
- Portis, A.R. (2003). Rubisco activase – Rubisco's catalytic chaperone. *Photosynthesis Research*, **75**: 11–27.

- Prasad, M.N.V. (2003). Metal hyperaccumulators in plants–biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*, **6**: 276–312.
- Pulford, I.D. and Watson, C. (2003). Phytoremediation of heavy metal–contaminated land by trees: A Review. *Environment International*, **29**: 529–540.
- 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(5)**: 1159–1169.
- Rai, U.N., Singh, N.K., Upadhyay, K. and Verma, S. (2013). Chromate tolerance and accumulation in *Chlorella vulgaris* L.: role of antioxidant enzymes and biochemical changes in detoxification of metals. *Bioresource Technology*, **136**: 604–609.
- Ramos, J., Clemente, M.R., Naya, L. and Commer, P. (2007). Phytochelatin synthases of the model legume *Lotus japonicus*. A small multigene family with different responses to cadmium and alternatively spliced variants. *Plant Physiology*, **143**: 1110–1118.
- Rascio, N. and Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*, **180**: 169–181.
- Raskin, I., Smith, R.D. and Salt, D.E. (1997). Phytoremediation of metals: Using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology*, **8**: 221–226.
- Raskin, I. and Ensley, D.E. (2000). *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment*. Wiley, New York, pp. 352.
- Rausch, T. and Wachter, A. (2005). Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends in Plant Science*, **10**: 503–509.
- 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.
- Rauser, W.E. (1995). Phytochelatin and related peptides. Structure, biosynthesis and function. *Plant Physiology*, **109**: 1141–1149.
- Ravet, K., Touraine, B., Boucherez, J., Briat, J.F., Gaymard, F. and Cellier, F. (2009). Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, **57**: 400–412.

- Rea, P.A., Li, Y.-P., Drozdowicz, Y.M. and Martinoia, E. (1998). From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **49**: 727–760.
- Rea, P.A. (2007). Plant ATP-binding cassette transporters. *Annual Reviews of Plant Biology*, **58**: 347–375.
- Reeves, R.D. (2006). Hyperaccumulation of trace elements by plants. In: Morel, J.L., Echevarria, G. and Goncharova, N. (Eds.). *Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils*, NATO Science Series: IV: Earth and Environmental Sciences, Springer, NY, pp. 1–25.
- Reisinger, S., Schiavon, M., Terry, N. and Pilon-Smits, E.A.H. (2008). Heavy metal tolerance and accumulation in Indian mustard (*Brassica juncea* L.) expressing bacterial γ -glutamylcysteine synthetase or glutathione synthetase. *International Journal of Phytoremediation*, **10**: 440–454.
- Repetto, O., Bestel-Corre, G., Dumas-Gaudot, E., Berta, G., Gianinazzi-Pearson, V. and Gianinazzi, S. (2003). Targeted proteomics to identify cadmium-induced protein modifications in *Glomus mosseae*-inoculated pea roots. *New Phytologist*, **157**: 555–567.
- Requejo, R. and Tena, M. (2005). Proteome analysis of maize roots reveals that oxidative stress is a main contributing factor to plant arsenic toxicity. *Phytochemistry*, **66**: 1519–1528.
- Requejo, R. and Tena, M. (2006). Maize response to acute arsenic toxicity as revealed by proteome analysis of plant shoots. *Proteomics*, **6**: 156–162.
- Rissler, H.M., Collakova, E., DellaPenna, D., Whelan, J., Pogson, B.J. (2002). Chlorophyll biosynthesis: expression of a second chl I gene of magnesium chelatase in *Arabidopsis* supports only limited chlorophyll synthesis. *Plant Physiology*, **128**: 770–779.
- Ristic, Z., Momcilović, I., Fu, J., Callegari, E. and DeRidder, B.P. (2007). Chloroplast protein synthesis elongation factor, EF-Tu, reduces thermal aggregation of rubisco activase. *Journal of Plant Physiology*, **164**: 1564–1571.
- Rizzi, L., Petruzzelli, G., Poggio, G. and Vigna Guidi, G. (2004). Soil physical changes and plant availability of Zn and Pb in a treatability test of phytostabilization. *Chemosphere*, **57**: 1039–1046.
- Rodríguez-Celma, J., Rellán-Alvarez, R., Abadía, A., Abadía, J. and López-Millán, A.F. (2010). Changes induced by two levels of cadmium toxicity in the 2-DE protein profile of tomato roots. *Journal of Proteomics*, **73**: 1694–1706.

- Rodríguez–Serrano, M., Romero–Puertas, M.C., Zabalza, A., Corpas, F.J., Gómez, M., Del Río, L.A. and Sandalio, L.M. (2006). Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant Cell and Environment*, **29**: 1532–1544.
- Rose, J.C., Bashir, S., Giovannoni, J.J., Jahn, M.M. and Saravanan, R.S. (2004). Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant Journal*, **39**: 715–733.
- Roth, U., von Roepenack–Lahaye, E. and Clemens, S. (2006). Proteome changes in *Arabidopsis thaliana* roots upon exposure to Cd²⁺. *Journal of Experimental Botany*, **57**: 4003–4013.
- Rouached, H., Secco, D. and Arpat, A.B. (2009). Getting the most sulfate from soil: regulation of sulfate uptake transporters in *Arabidopsis*. *Journal of Plant Physiology*, **166**: 893–902.
- Rugh, C.L., Wilde, H.D., Stacks, N.M., Thompson, D.M., Summers, A.O. and Meagher, R.B. (1996). Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial *merA* gene. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA*, **93**: 3182–3187.
- Ruiz, O.N., Hussein, H.S., Terry, N. and Daniell, H. (2003). Phytoremediation of organomercurials via the chloroplast genetic engineering. *Plant Physiology*, **132**: 1344–1352.
- Ruiz, O.N., Alvarez, D., Torres, C., Roman, L. and Daniell, H. 2011. Metallothionein expression in chloroplasts enhances mercury accumulation and phytoremediation capability. *Plant Biotechnology Journal*, **9**: 609–617.
- Saito, K. (2004). Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant Physiology*, **136**: 2443–2450.
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar Nanda, P.B.A., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I. and Raskin, I. (1995). Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Nature Biotechnology*, **13**: 468–474.
- Salt, D.E. and Rauser, W.E. (1995). MgATP–dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiology*, **107**: 1293–1301.
- Salt, D.E. and Krämer, U. (2000). Mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. In: Raskin, I. and Ensley, B.D. (eds.). *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean–up the Environment*. Wiley, New York, pp. 231–246.
- Salt, D.E. (2004). Update on plant ionomics. *Plant Physiology*, **136**: 2451–2456.

- Samarghandi, M.R., Nouri, J., Mesdaghinia, A.R., Mahvi, A.H., Nasser, S. and Vaezi, F. (2007). Efficiency removal of phenol, lead and cadmium by means of UV/TiO₂/H₂O₂ processes. *International Journal of Environmental Science and Technology*, **4**: 19–25.
- Sanchez–Fernandez, R., Davies, T.G., Coleman, J.O. and Rea, P.A. (2001). The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *Journal of Biological Chemistry*, **276**: 30231–30244.
- Santoni, V., Kieffer, S., Desclaux, D., Masson, F. and Rabilloud, T. (2000). Membrane proteomics: use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties. *Electrophoresis*, **21**: 3329–3344.
- Saravanan, R.S. and Rose, J. K. (2004). A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics*, **4**: 2522–2532.
- Sarry, J.E., Kuhn, L., Ducruix, C., Lafaye, A., Junot, C., Hugouvieux, V., Jourdain, A., Bastien, O., Fievet, J.B., Vailhen, D., Amekraz, B., Moulin, C., Ezan, E., Garin J. and Bourguignon, J. (2006). The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics*, **6**: 2180–2198.
- Satarug, S., Baker, J.R., Urbenjapol, S., Haswell–Elkins, M., Reilly, E.B., Williams, D.J. and Moore, M.R. (2003). A global perspective on cadmium pollution and toxicity in nonoccupationally exposed population. *Toxicology Letters*, **137**: 65–83.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry*, **199**: 223–231.
- Schiavon, M., Wirtz, M., Borsa, P., Quaggiotti, S., Hell, R. and Malagoli, M. (2007). Chromate differentially affects the expression of a high–affinity sulfate transporter and isoforms of components of the sulfate assimilatory pathway in *Zea mays* (L.). *Plant Biology*, **9**: 662–671.
- Schiavon, M., Pilon–Smits, E.A.H., Wirtz, M., Hell, R. and Malagoli, M. (2008). Interactions between chromium and sulfur metabolism in *Brassica juncea*. *Journal of Environmental Quality*, **37**: 1536–1545.
- Schiavon, M., Galla, G., Wirtz, M., Pilon–Smits, E.A.H., Telatin, V., Quaggiotti, S., Hell, R., Barcaccia, G. and Malagoli, M. (2012). Transcriptome profiling of genes differentially modulated by sulfur and chromium identifies potential targets for

- phytoremediation and reveals a complex S–Cr interplay. *Journal of Hazardous Materials*, **239–240**: 191–205.
- Schneider, T., Schellenberg, M., Meyer, S., Keller, F., Gehrig, P., Riedel, K., Lee, Y., Eberl, L. and Martinoia, E. (2009). Quantitative detection of changes in the leaf–mesophyll tonoplast proteome in dependency of a cadmium exposure of barley (*Hordeum vulgare* L.) plants. *Proteomics*, **9**: 2668–2677.
- 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.
- Schützendübel, 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.
- Semane, B., Dupae, J., Cuypers, A., Noben, J.–P., Tuomainen, M., Tervahauta, A., Kärenlampi, S., Frank, V.B., Karen, S. and Jaco, V. (2010). Leaf proteome responses of *Arabidopsis thaliana* exposed to mild cadmium stress. *Journal of Plant Physiology*, **167**: 247–254.
- Shahbaz, M., Tseng, M.H., Stuiver, C.E.E., Koralewska, A., Posthumus, F.S., Venema, J.H., Parmar, S.P., Schat, H., Hawkesford, M.J. and De Kok, L.J. (2010). Copper exposure interferes with the regulation of the uptake, distribution and metabolism of sulfate in Chinese cabbage. *Journal of Plant Physiology*, **167**: 438–446.
- Shahbaz, M., Parmar, S., Stuiver, C.E.E., Hawkesford, M.J., De Kok, L.J. (2013). Copper toxicity and sulfur metabolism in Chinese cabbage are affected by UV radiation. *Environmental and Experimental Botany*, **88**: 60–70.
- Shams, K.M, Tichy, G., Fischer, A., Sager, M., Peer, T., Bashar, A. and Filip, K. (2010). Aspects of phytoremediation for chromium contaminated sites using common plants *Urtica dioica*, *Brassica napus* and *Zea mays*. *Plant and Soil*, **328**: 175–189.
- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H. and Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment International*, **31**: 739–753.
- Shardendu, S.D. (2013). Amendment in phosphorus levels moderate the chromium toxicity in *Raphanus sativus* L. as assayed by antioxidant enzymes activities. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **95**: 161–170.
- Sharma, D.C and C.P. Sharma. 2003. Chromium uptake and toxicity effects on growth and metabolic activities in wheat, *Triticum aestivum*. *Indian Journal of Experimental Biology*, **34**: 689–691.

- 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(4)**: 862–874.
- Sharmin, S. A., Alam, I., Kim, K.H., Kim, Y.G., Kim, P.J., Bahk, J.D. and Lee, B.H. (2012). Chromium–induced physiological and proteomic alterations in roots of *Miscanthus sinensis*. *Plant Science*, **187**: 113–126.
- Shen, Y., Zhang, Y., Chen, J., Lin, H., Zhao, M., Peng, H., Liu, L., Yuan, G., Zhang, S., Zhang, Z. and Pan, G. (2013). Genome expression profile analysis reveals important transcripts in maize roots responding to the stress of heavy metal Pb. *Physiologia Plantarum*, **147**: 270–282.
- Shi, W.Y., Shao, H.B., Li, H., Shao, M.A. and Du, S. (2009). Co–remediation of the lead polluted garden soil by exogenous natural zeolite and humic acids. *Journal of Hazardous Materials*, **167**: 136–140.
- Shinmachi, F., Buchner, P., Stroud, J.L., Parmar, S., Zhao, F.J., McGrath, S.P. and Hawkesford M.J. (2010). Influence of sulfur deficiency on the expression of specific sulfate transporters and the distribution of sulfur, selenium, and molybdenum in wheat. *Plant Physiology*, **153**: 327–336.
- Skorzynska–Polit, E., Drazkiewicz, M. and Krupa, Z. (2010). Lipid peroxidation and antioxidative response in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium and copper. *Acta Physiologiae Plantarum*, **32**: 169–175.
- Silver, S. and Phung, L. (2005). A bacterial view of the periodic table: Genes and proteins for toxic inorganic ions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **32**: 587–605.
- Simkin, A.J., Gaffe, J., Alcaraz, J.P., Carde, J.P., Bramley, P.M., Fraser, P.D. and Kuntz, M. (2007). Fibrillin influence on plastid ultrastructure and pigment content in tomato fruit. *Phytochemistry*, **68**: 1545–1556.
- Singh, O.V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R. and Jain, R.K. (2003). Phytoremediation: An overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **61**: 405–412.
- Singh, K.P., Mohan, D., Sinha, S. and Dalwani, R. (2004). Impact assessment of treated/untreated wastewater toxicants discharged by sewage treatment plants on health agricultural and environmental quality in the wastewater disposal area. *Chemosphere*, **55**: 227–255.
- Singh, D.K., Maximova, S.N., Jensen, P.J., Lehman, B.L., Ngugi, H.K. and McNellis, T.W. (2010). FIBRILLIN4 is required for plastoglobule development and stress resistance in apple and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **154**: 1281–1293.

- Singh, H.P., Mahajan, P., Kaur, S., Batish, D.R. and Kohli, R.K. (2013). Chromium toxicity and tolerance in plants. *Environmental Chemistry Letters*, **11(3)**: 229–254.
- Singla-Pareek, S.L., Yadav, S.K., Pareek, A., Reddy, M.K. and Sopory, S.K. (2006). Transgenic tobacco overexpressing glyoxalase pathway enzymes grow and set viable seeds in zinc- spiked soils. *Plant Physiology*, **140**: 613–623.
- Sinha, P., Poland, J., Schnölzer, M. and Rabilloud, T. (2001). A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics*, **1**: 835–840.
- 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(5)**: 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(5)**: 555–566.
- Sobkowiak, R. and Deckert, J. (2006). Proteins induced by cadmium in soybean cells. *Journal of Plant Physiology*, **163**: 1203–1206.
- Sobrino–Plata, J., Meyssen, D., Cuypers, A., Escobar, C. and Hernández, L.E. (2014). Glutathione is a key antioxidant metabolite to cope with mercury and cadmium stress. *Plant and Soil*, DOI 10.1007/s11104–013–2006–4.
- Song, J.I. and Wang, C.C. (1995). Chaperone–like activity of protein disulfide–isomerase in the refolding of rhodanese. *European Journal of Biochemistry*, **231**: 312–316.
- Song, W.–Y., Martinoia, E., Lee, J., Kim, D., Kim, D.–Y., Vogt, E., Shim, D., Choi, K.S., Hwang, I. and Lee, Y. (2004). A novel family of Cys–Rich membrane proteins mediates cadmium resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **135**: 1027–1039.
- Song, W.Y., Park, J., Mendoza–Cozatl, D.G., Suter–Grottemeyer, M., Shim, D., Hortensteiner, S., Geisler, M., Weder, B., Rea, P.A. and Rentsch, D. (2010). Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABCC–type phytochelatin transporters. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA*, **107**: 21187–21192.
- Song, Y., Cui, J., Zhang, H., Wang, G., Zhao, F.J. and Shen, Z. (2013). Proteomic analysis of copper stress responses in the roots of two rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in Cu tolerance. *Plant and Soil*, **366**: 647–658.
- Sors, T.G., Ellis, D.R., Na, G.N., Lahner, B., Lee, S., Leustek, T., Pickering, I.J. and Salt, D.E. (2005). Analysis of sulfur and selenium assimilation in *Astragalus* plants with varying capacities to accumulate selenium. *The Plant Journal*, **42**: 785–797.

- Srivastava, S. and D'Souza, S.F. (2010). Effect of variable sulfur supply on arsenic tolerance and antioxidant responses in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **73**: 1314–1322.
- Stuiver, C.E.E., Koralewska, A., Posthumus, F.S. and De Kok, L.J. (2009). Impact of sulfur deprivation on root formation and activity and expression of sulfate transporters in chinese cabbage, In: Sulfur Metabolism in Plants: Regulatory Aspects, Significance of Sulfur in the Food Chain, Agriculture and the Environment, (Eds.: Sirko A., De Kok L.J., Haneklaus S., Hawkesford M.J., Rennenberg H., Saito K., Schnug E. & Stulen I.), Margraf Publishers, Weikersheim. pp. 89–92.
- Subrahmanyam, D. (2008). Effects of chromium toxicity on leaf photosynthetic characteristics and oxidative changes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Photosynthetica*, **46**: 339–345.
- Sun, R.L. and Zhou, Q.X. (2005). Heavy metal tolerance and hyperaccumulation of higher plants and their molecular mechanisms. *Acta Phytoecologica Sinica*, **19**: 321–332.
- Sun, Q., Ye, Z.H., Wang, X.R. and Wong, M.H. (2007a). Cadmium hyperaccumulation leads to an increase of glutathione rather than phytochelatin in the cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Journal of Plant Physiology*, **164**: 1489–1498.
- Sun, X.M., Lu, B., Huang, S.Q., Mehta, S.K., Xu, L.L. and Min, Z. (2007b). Coordinated expression of sulfate transporters and its relation with sulfur metabolites in *Brassica napus* exposed to cadmium. *Botanical Studies*, **48**: 43–54.
- Sun–Wada, G.H., Wada, Y. and Futai, M. (2003). Vacuolar H⁺ pumping ATPases in luminal acidic organelles and extracellular compartments: common rotational mechanism and diverse physiological roles. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **35**: 347–358.
- Suter, M., von Ballmoos, P., Kopriva, S., den Camp, R.O., Schaller, J., Kuhlemeier, C., Schürmann, P. and Brunold C. (2000). Adenosine 5'–phosphosulfate sulfotransferase and adenosine 5'–phosphosulfate reductase are identical enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, **275**: 930–936.
- Szalai, G., Kellos, T., Galiba, G. and Kocsy G. (2009). Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, **28**: 66–80.
- Takahashi, H., Yamazaki, M., Sasakura, N., Watanabe, A., Leustek, T., Engler, J.A., Engler, G., Van Montagu, M. and Saito, K. (1997). Regulation of sulfur assimilation in higher plants: a sulfate transporter induced in sulfate starved

roots plays a central role in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of the Sciences USA*, **94**: 11102–11107.

- Takahashi, H. (2010). Regulation of sulfate transport and assimilation in plants. *International Review of Cell and Molecular Biology*, **281**: 129–159.
- Talke, I., Hanikenne, M. and Krämer, U. (2006). Zinc dependent global transcriptional control, transcriptional de-regulation and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology*, **142**: 148–167.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y. and Yoshida, T. (1988). Protein and polymer analyses of up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2**: 151–153.
- Tandy, S., Schulin, R. and Nowack, B. (2006). The influence of EDDS on the uptake of heavy metals in hydroponically grown sunflowers. *Chemosphere*, **62**: 1454–1463.
- Theil, E.C. (1987). Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annual Reviews of Biochemistry*, **56**: 289–315.
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M. and Schroeder, J.I. (2000). Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to *Nramp* genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **97**: 4991–4996.
- Timperio, A. M., Egidi, M. G. and Zolla, L. (2008). Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *Journal of Proteomics*, **71**: 391–411.
- Tiwari, K.K., Singh, N.K. and Rai, U.N. (2013). Chromium phytotoxicity in radish (*Raphanus sativus*): effects on metabolism and nutrient uptake. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **91(3)**: 339–344.
- Tong, Y.P., Kneer, R. and Zhu, Y.G. (2004). Vacuolar compartmentalization: A second-generation approach to engineering plants for phytoremediation. *Trends in Plant Science*, **9**: 7–9.
- Tonge, R., Shaw, J., Middleton, B., Rowlinson, R., Rayner, S., Young, J., Pognan, F., Hawkins, E., Currie, I. and Davison, M. (2001). Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics*, **1**: 377–396.
- Tuomainen, M.H., Nunan, N., Lehesranta, S.J., Tervahauta, A.I., Hassinen, V.H., Schat, H., Koistinen, K.M., Auriola, S., McNicol, J. and Kärenlampi, S.O. (2006). Multivariate analysis of protein profiles of metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* accessions. *Proteomics*, **6**: 3696–3706.

- Tuomainen, M., Tervahauta, A., Hassinen, V., Schat, H., Koistinen, K.M., Lehesranta, S., Rantalainen, K., Häyrinen, J., Auriola, S., Anttonen, M. and Kärenlampi, S.O. (2010). Proteomics of *Thlaspi caerulescens* accessions and an inter-accession cross segregating for zinc accumulation. *Journal of Experimental Botany*, **61**: 1075–1087.
- Turner, J.G., Ellis, C. and Devoto, A. (2002) The jasmonate signal pathway. *Plant Cell*, **14**: 153–164.
- Tzafrir, I., Pena–Muralla, R., Dickerman, A., Berg, M., Rogers, R., Hutchens, S., Sweeney, T.C., McElver, J., Aux, G., Patton, D. and Meinke, D. (2004). Identification of genes required for embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **135**: 1206–1220.
- Urano, K., Kurihara, Y., Seki, M. and Shinozaki, K. (2010). ‘Omics’ analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, **13**: 132–138.
- Vajpayee, P., Tripathi, R.D., Rai, U.N., Ali, M.B. and Singh, S.N. (2000). Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere*, **41**: 1075–1082.
- van de Mortel, J.E., Villanueva, L.A., Schat, H., Kwekkeboom, J., Coughlan, S., Moerland, P.D., Ver Loren van Themaat, E., Koornneef, M. and Aarts, M.G.M. (2006). Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response, and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and the related metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology*, **142**: 1127–1147.
- van de Mortel, J.E., Schat, H., Moerland, P.D., Ver Loren van Themaat, E., van der Ent, S., Blankestijn, H., Ghandilyan, A., Tsiatsiani, S., Aarts, M.G. (2008). Expression differences for genes involved in lignin, glutathione and sulphate metabolism in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana* and the related Zn/Cd–hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Cell and Environment*, **31**: 301–324.
- van der Zaal, B.J., Neuteboom, L.W., Pinas, J.E., Chardonens, A.N., Schat, H., Verkleij, J.A.C. and Hooykaas, P.J.J. (1999). Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc–transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiology*, **119**: 1047–1055.
- van Breusegem, F., Dekeyser, R., Gielen, J., Van Montagu, M. and Caplan, A. (1994). Characterization of a S–adenosylmethionine synthetase gene in rice. *Plant Physiology*, **105**: 1463–1464.

- van Hoof, N.A., Hassinen, V.H., Hakvoort, H.W., Ballintijn, K.F., Schat, H., Verkleij, J.A., Ernst, W.H., Kärenlampi, 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.
- van Keulen, H., Wei, R. and Cutright, T.J. (2008). Arsenate-induced expression of a class III chitinase in the dwarf sunflower *Helianthus annuus*. *Environmental and Experimental Botany*, **63**: 281–288.
- van Loon, L.C., Rep, M. and Pietersen, C.M.J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, **44**: 135–162.
- Verbruggen, N., Hermans, C. and Schat, H. (2009). Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*, **181**: 759–776.
- Verret, G.A., Briat, J.F. and Curie, C. (2003). Dual regulation of the *Arabidopsis* high-affinity root iron uptake system by long-distance signals. *Plant Physiology*, **132**: 796–804.
- Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Leohardt, N., David, P., Nussaume, L., Vavasseur, A. and Richaud, P. (2004). Overexpression of AtHMA4 enhances root-to-shoot translocation of zinc and cadmium and plant metal tolerance. *FEBS Letters*, **576**: 306–312.
- Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Preveral, S., Forestier, C., Vavasseur, A. and Richaud, P. (2005). Heavy metal transport by AtHMA4 involves the N-terminal degenerated metal binding domain and the C-terminal His(11) stretch. *FEBS Letters*, **579**: 1515–1522.
- Vert, G.A., Grotz, N., Dedaldechamp, F., Guerinot, M.L., Briat, J.F. and Curie, C. (2002). IRT1: an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell*, **14**: 1223–1233.
- Vestergaard, M., Matsumoto, S., Nishikori, S., Shiraki, K. and Hirata, K. (2008). Chelation of cadmium ions by phytochelatin synthase: Role of the cysteine-rich C-terminal. *Annals of Science*, **24**: 277–281.
- Villiers, F., Ducruix, C., Hugouvieux, V., Jarno, N., Ezan, E., Garin, J., Junot, C. and Bourguignon, J. (2011). Investigating the plant response to cadmium exposure by proteomic and metabolomic approaches. *Proteomics*, **11**: 1650–1663.
- Visioli, G., Vincenzi, S., Marmioli, M. and Marmioli, N. (2012). Correlation between phenotype and proteome in the Ni hyperaccumulator *Noccaea caerulea* subsp. *caerulea*. *Environmental and Experimental Botany*, **77**: 156–164.

- Walliwalagedara, C., Atkinson, I., Van Keulen, H., Cutright, T. and Wei, R. (2010). Differential expression of proteins induced by lead in the Dwarf Sunflower *Helianthus annuus*. *Phytochemistry*, **71**: 1460–1465.
- Wang, K.L., Li, H. and Ecker, J.R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*, **14**: S131–S151.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A. (2004). Role of plant heat shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science*, **9**: 244–252.
- Wang, W., Vignani, R., Scali, M. and Cresti, M. (2006). A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*, **27**: 2782–2786.
- Wang, Y., Hu, H., Xu, Y., Li, X. X. and Zhang, H.J. (2010). Differential proteomic analysis of cadmium–responsive proteins in wheat leaves. *Biologia Plantarum*, DOI: 10.1007/s10535-011-0074-y.
- Wang, X., Song, Y., Ma, Y., Zhuo, R. and Jin, L. (2011a). Screening of Cd tolerant genotypes and isolation of metallothionein genes in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environmental Pollution*, **159**: 3627–3633.
- Wang, Y., Qian, Y., Hu, H., Xu, Y. and Zhang, H. (2011b). Comparative proteomic analysis of Cd–responsive proteins in wheat roots. *Acta Physiologiae Plantarum*, **33**: 349–357.
- Wang, C.Y., Shen, R.F., Wang, C. and Wang, W. (2013). Root protein profile changes induced by Al exposure in two rice cultivars differing in Al tolerance. *Journal of Proteomics*, **78**: 281–293.
- Wangelin, A.L., Burkhead, J.L., Hale, K.L., Lindblom, S.D., Terry, N., Pilon, M., Pilon–Smits, E.A.H. (2004). Overexpression of ATP sulfurylase in Indian mustard: effects on tolerance and accumulation of twelve metals. *Journal Environmental of Quality*, **33**: 54–60.
- Wei, W., Chai, T., Zhang, Y., Han, L., Xu, J. and Guan, Z. (2009). The *Thlaspi caerulescens* NRAMP homologue TcNRAMP3 is capable of divalent cation transport. *Molecular Biotechnology*, **41**: 15–21.
- 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.
- Wenger, K., Gupta, S.K., Furrer, G. and Schulin, R. (2003). The role of nitrilotriacetate in copper uptake by tobacco. *Journal of Environmental Quality*, **32**: 1669–1676.

- Wenzel, W.W., Unterbrunner, R., Sommer, P. and Pasqualina, S. (2003). Chelate-assisted phytoextraction using canola (*Brassica napus* L.) in outdoors pot and lysimeter experiments. *Plant and Soil*, **249**: 83–96.
- Whitby, F.G., Phillips, J.D., Kushner, J.P. and Hill, C.P. (1998). Crystal structure of human uroporphyrinogen decarboxylase. *EMBO Journal*, **17**: 2463–2471.
- Williams, L.E., Pittman, J.K. and Hall, J.L. (2000). Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1465**: 104–126.
- Wojas, S., Clemens, S., Hennig, J., Skodowska, A., Kopera, E., Schat, H., Bal, W. and Antosiewicz, D.M. (2008). Overexpression of phytochelatin synthase in tobacco: Distinctive effects of *AtPCS1* and *CePCS* genes on plant response to cadmium. *Journal of Experimental Botany*, **59**: 2205–2219.
- 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.
- Wu, L.H., Luo, Y.M., Xing, X.R. and Christie, P. (2004). EDTA-enhanced phytoremediation of heavy metal contaminated soil with Indian mustard and associated potential leaching risk. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **102**: 307–318.
- Wu, L., Ge, Q., Zhang, J., Zhou, J. and Xu, J. (2013). Proteomic analysis of Cd-responsive proteins in *Solanum torvum*. *Plant Molecular Biology Reporter*, **31**: 485–491.
- 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.
- Yakimova, E.T., Kapchina-Toteva, V.M., Laarhoven, L.J., Harren, F.M. and Woltering, E.J. (2006). Involvement of ethylene and lipid signalling in cadmium-induced programmed cell death in tomato suspension cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, **44**: 581–589.
- Yamaguchi, H., Fukuoka, H., Arai, T., Ohyama, A., Nunome, T., Miyatake, K. and Negoro, S. (2010). Gene expression analysis in cadmium-stressed roots of a low cadmium-accumulating solanaceous plant, *Solanum torvum*. *Journal of Experimental Botany*, **61**: 423–437.
- Yamahara, T., Shiono, T., Suzuki, T., Tanaka, K., Takio, S., Sato, K., Yamazaki, S. and Satoh, T. (1999). Isolation of a germin-like protein with manganese superoxide dismutase activity from cells of a moss, *Barbula unguiculata*. *Journal of Biological Chemistry*, **274**: 33274–33278.

- Yan, S.-P., Zhang, Q.-Y., Tang, Z.-C., Su, W.-A. and Sun, W.-N. (2006). Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Molecular and Cellular Proteomics*, **5**: 484–496.
- Yang, H., Nairn, J. and Ozias-Akins, P. (2003). Transformation of peanut using a modified bacterial mercuric ion reductase gene driven by an actin promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, **160**: 945–952.
- Yang, X., Jin, X., Feng, Y. and Islam, E. (2005). Molecular mechanisms and genetic basis of heavy metal tolerance in plants. *Journal of Integrative Biology*, **47**: 1025–1035.
- Yang, Q., Wang, Y., Zhang, J., Shi, W., Qian, C., Peng, X. (2007). Identification of aluminum-responsive proteins in rice roots by a proteomic approach: cysteine synthase as a key player in Al response. *Proteomics*, **7**: 737–749.
- 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.
- Yates, J.R.I. (1998). Mass spectrometry and the age of the proteome. *Journal of Mass Spectrometry*, **33**: 1–19.
- 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*, **22**: 1303–1312.
- Yi, H., Galant, A., Ravilious, G.E., Preuss, M.L. and Jez, J.M. (2010). Sensing sulfur conditions: simple to complex biochemical regulatory mechanisms in plant thiol metabolism. *Molecular Plant*, **3**: 269–279.
- Yoshimoto, N., Takahashi, H., Smith, F.W., Yamaya, T. and Saito, K. (2002). Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate uptake of sulfate in *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal*, **29**: 465–473.
- Yu, L.J., Luo, Y.F., Liao, B., Xie, L.J., Chen, L. C.iao, S., Li, J.T., Hu, S.N. and Shu, W.S. (2012a). Comparative transcriptome analysis of transporters, phytohormone and lipid metabolism pathways in response to arsenic stress in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist*, **195**: 97–112.
- Yu, R., Ji, J., Yuan, X., Song, Y. and Wang, C. (2012). Accumulation and translocation of heavy metals in the canola (*Brassica napus* L.)–soil system in Yangtze River Delta China. *Plant and Soil*, **353**: 33–45.
- Zaier, H., Ghnaya, T., Rejeb, K.B., Lakhdar, A., Rejeb, S. and Jemal, F. (2010). Effects of EDTA on phytoextraction of heavy metals (Zn, Mn and Pb) from sludge-amended soil with *Brassica napus*. *Bioresource Technology*, **101**: 3978–3983.

- Zayed, A., Lytle, C.M., Qian, J.-H. and Terry, N. (1998). Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops. *Planta*, **206**: 293–299.
- Zeng, F., Ali, S., Qiu, B., Wu, F. and Zhang, G. (2010a). Effects of chromium stress on the subcellular distribution and chemical form of Ca, Mg, Fe, and Zn in two rice genotypes. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **173**: 135–148.
- Zeng, F.R., Qiu, B.Y., Ali, S. and Zhang, G.P. (2010b). Genotypic differences in nutrient uptake and accumulation in rice under chromium stress. *Journal of Plant Nutrition*, **33(4)**: 518–528.
- Zeng, X.W., Qiu, R.L., Ying, R.R., Tang, Y.T., Tang, L. and Fang, X.H. (2011). The differentially-expressed proteome in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabis paniculata* Franch. in response to Zn and Cd. *Chemosphere*, **82**: 321–328.
- Zhang, Z., Gao, X. and Qiu, B. (2008). Detection of phytochelatin in the hyperaccumulator *Sedum alfredii* exposed to cadmium and lead. *Phytochemistry*, **69**: 911–918.
- Zhang, H., Lian, C. and Shen, Z. (2009). Proteomic identification of small, copper-responsive proteins in germinating embryos of *Oryza sativa*. *Annals of Botany*, **103**: 923–930.
- Zhang, H., Tian, Y., Wang, L., Zhang, L. and Dai, L. (2013). Ecophysiological characteristics and biogas production of cadmium-contaminated crops. *Bioresource Technology*, **146**: 628–636.
- Zhao, L., Sun, Y.L., Cui, S.X., Chen, M., Yang, H.M., Liu, H.M., Chai, T.Y. and Huang, F. (2011). Cd-induced changes in leaf proteome of the hyperaccumulator plant *Phytolacca americana*. *Chemosphere*, **85**: 56–66.
- Zhen, Y., Qi, J.L., Wang, S.S., Su, J., Xu, G.H., Zhang, M.S., Miao, L., Peng, X.X., Tian, D. and Yang, Y.H. (2007). Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by Al toxicity in soybean. *Physiologia Plantarum*, **131**: 542–554.
- Zhou, J. M. and Goldsbrough, P.B. (1995). Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. *Molecular and General Genetics*, **248**: 318–328.
- Zhu, Y.L., Pilon-Smits, E.A.H., Tarun, A.S., Weber, S.U., Jouanin, L. and Terry, T. (1999). Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase. *Plant Physiology*, **121**: 1169–1177.
- Zieske, L.R. (2006). A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies. *Journal of Experimental Botany*, **57**: 1501–1508.

Zimeri, A.M., Dhankher, O.P., McCaig, B. and Meagher, R.B. (2005). The plant MT1 metallothioneins are stabilized by binding cadmiums and are required for cadmium tolerance and accumulation. *Plant Molecular Biology*, **58**: 839–855.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hakan TERZİ
Doğum Yeri ve Tarihi : Ordu, 27.07.1981
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (Telefon/e-posta) : 05054832266 / hakanterzi81@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Bursa Anadolu Lisesi, 1999
Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2003
Yüksek Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2006

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : --

Yayınları (SCI ve diğer) :

Uluslararası hakemli dergiler:

1. **Terzi, H.** and Yıldız, M. (2014). Variations in chromium tolerance and accumulation among canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **93**: 113-119 (Doktora tezinden).
2. 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*, **22**: 1303–1312.
3. Yıldız, M. and **Terzi, H.** (2013). Effect of NaCl stress on chlorophyll biosynthesis, proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in leaves of salt-tolerant and salt-sensitive barley cultivars. *Journal of Agricultural Science*, **19(2)**: 79-88.
4. Yıldız, M., **Terzi, H.**, Cenkcı, S. and Yıldız, B. (2012). Chromium(VI)-induced alterations in 2-D protein profiles and antioxidant defence systems of barley cultivars. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, **40(3)**: 257-265.

5. Yıldız, M. and **Terzi, H.** (2012). Effect of hexavalent chromium [Cr(VI)] stress in roots of Cr-tolerant and Cr-sensitive barley cultivars. *Acta Agronomica Hungarica*, **60(1)**: 29–36.
6. Yıldız, M. and **Terzi, H.** (2011). Determination of early seedling stage salinity tolerance of some barley cultivars grown in Turkey. *Journal of Agricultural Science*, **17(1)**: 1–9.
7. Cenkci, S., Yıldız, M., Ciğerci, İ.H., Bozdağ, A., **Terzi, H.** and Arıkan Terzi, E.S. (2010). Evaluation of 2,4-D and dicamba genotoxicity in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings using Comet and RAPD assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **73**: 1558–1564.
8. Cenkci, S., Ciğerci, İ.H., Yıldız, M., Özey, C., Bozdağ, A. and **Terzi, H.** (2010). Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa* L. *Environmental and Experimental Botany*, **67(3)**: 467-473.
9. Yıldız, M., Ciğerci, İ.H., Konuk, M., Fidan, A.F. and **Terzi, H.** (2009). Genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride: Investigation with the chromosome aberration and the comet assays. *Chemosphere*, **75(7)**: 934-938.
10. Yıldız, M. and **Terzi, H.** (2008). Small heat shock protein responses in leaf tissues of wheat cultivars with different heat susceptibility. *Biologia*, **63(4)**: 521-525.
11. Yıldız, M. and **Terzi, H.** (2008). Evaluation of acquired thermotolerance in wheat (*Triticum aestivum* and *T. durum*) cultivars grown in Turkey. *Pakistan Journal of Botany*, **40(1)**: 317-327.
12. Yıldız, M. and **Terzi, H.** (2008). Effects of NaCl on protein profiles of tetraploid and hexaploid wheat species and their diploid wild progenitors. *Plant, Soil and Environment*, **54(6)**: 227-233.
13. Yıldız, M., **Terzi, H.** and Arıkan, E.S. (2006). Seed germination of populations of wild wheat species, *Aegilops biuncialis* and *Aegilops triuncialis*: Effects of salinity, temperature and photoperiod. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, **9(7)**: 1299-1305.

Ulusal hakemli dergiler:

1. **Terzi, H.** ve Yıldız, M. (2014). Ağır metal toleransında kükürt metabolizmasının önemi. *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, Baskıda.

2. Yıldız, M., **Terzi, H.** ve Akçalı, N. (2014). Tuz stresi altındaki bitkilerin metabolik yollarındaki proteom değişimleri. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, **3(1)**: 81-93.
3. Yıldız, M., **Terzi, H.** ve Akçalı, N. (2014). Bitki tuz stresi toleransında salisilik asit ve poliaminler. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, Baskıda.
4. **Terzi, H.** ve Yıldız, M. (2013). Bitkilerde ağır metal toksisitesi: Proteomik yaklaşım. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, **13(2)**: 1-21.
5. Yıldız, M., Cenkci, S. ve **Terzi, H.** (2012). Fitoşelatinler ve metalloitiyoneinler: Moleküler yaklaşımlar. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, **12(1)**: 1-16.
6. Cenkci, S., Yıldız, M. ve **Terzi, H.** (2012). Afyonkarahisar endemiği *Thermopsis turcica*: Dünü, bugünü ve ekonomiye kazandırılması. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, **12(2)**: 23-26.
7. **Terzi, H.** ve Yıldız, M. (2011). Ağır metaller ve fitoremediasyon: Fizyolojik ve moleküler mekanizmalar. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, **11**: 1-22.
8. Yıldız, M., Uruşak, B. ve **Terzi, H.** (2011). Türkiye’de ekimi yapılan bazı arpa çeşitlerinin erken fide evresinde krom(VI) toleransı üzerine bir ön çalışma. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, **1**: 1-10.
9. Yıldız, M., **Terzi, H.**, ve Uruşak, B. (2011). Bitkilerde krom toksisitesi ve hücre sel cevaplar. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **27(2)**: 163-176.
10. Yıldız, M., **Terzi, H.**, Cenkci, S., Arıkan, E.S. ve Uruşak, B. (2011). Bitkilerde tuzluluğa toleransın fizyolojik ve biyokimyasal markörleri. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, **1(1)**: 1-33.
11. Yıldız, M., Cenkci, S., **Terzi, H.** and Konuk, M. (2007). Effects of salinity on germination and some growth parameters in three cultivars of *Zea mays* L. *Afyon Kocatepe University, Journal of Science*, **6(1-2)**: 193-205.
12. Yıldız, M. ve **Terzi, H.** (2007). Bitkilerin yüksek sıcaklık stresine toleransının hücre canlılığı ve fotosentetik pigmentasyon testleri ile belirlenmesi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **23(1-2)**: 47-60.