

**DOKU KÜLTÜRÜNDE YETİŞTİRİLEN *ALYSSUM CORSICUM*
(*BRASSICACEAE*) BİTKİSİNDE NİKEL BİRİKİMİNİN
BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER ANALİZİ**

Seniha Selcen BABAOĞLU AYDAŞ

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMMUZ 2008
ANKARA**

**DOKU KÜLTÜRÜNDE YETİŞTİRİLEN *ALYSSUM CORSICUM*
(*BRASSICACEAE*) BİTKİSİNDE NİKEL BİRİKİMİNİN
BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER ANALİZİ**

Seniha Selcen BABAOĞLU AYDAŞ

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMMUZ 2008
ANKARA**

Seniha Selcen BABAOĞLU AYDAŞ tarafından hazırlanan DOKU KÜLTÜRÜNDE YETİŞTİRİLEN *ALYSSUM CORSICUM (BRASSICACEAE)* BİTKİSİNDE NİKEL BİRİKİMİNİN BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER ANALİZİ adlı bu tezin Doktora tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Leyla AÇIK

.....

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU

.....

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, A.Ü.

Prof. Dr. Leyla AÇIK

.....

Biyoloji Anabilim Dalı , G.Ü.

Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

.....

Biyoloji Anabilim Dalı , G.Ü.

Prof. Dr. Mecit VURAL

.....

Biyoloji Anabilim Dalı , G.Ü.

Prof. Dr. Rukiye TIPIRDAMAZ

.....

Biyoloji Anabilim Dalı, H.Ü.

Tarih : 16/07/2008

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Doktora derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Nermin ERTAN

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Seniha Selcen BABAOĞLU AYDAŞ

**DOKU KÜLTÜRÜNDE YETİŞTİRİLEN *ALYSSUM CORSICUM*
(*BRASSICACEAE*) BİTKİSİNDE NİKEL BİRİKİMİNİN
BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER ANALİZİ
(Doktora Tezi)**

Seniha Selcen BABAOĞLU AYDAŞ

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Temmuz 2008

ÖZET

A. corsicum, yeni bir teknoloji olan bitkisel arıtım çalışmalarında ağır metallere özellikle nikelin çevreden temizliği ve geri kazanılmasında kullanılmaya aday bir bitki olarak önem kazanmaktadır. Bu çalışmada *A. corsicum* bitkisi doku kültürü şartlarında 0,01 mM, 0,04 mM, 0,2 mM nikel derişimleri varlığında yetiştirilmiştir. Bitkinin nikel biriktirme potansiyeli ve metal içeriğindeki değişim X ışını floresans spektroskopisi (XRF) ile belirlenmiştir. Ayrıca bitkinin gövde alt ve üst yaprak yüzeylerinde Fe, Mg, Ca, Ni metallerinin oranları ve oluşan morfolojik değişimler taramalı elektron mikroskobu-enerji dağılımlı X ışını analizi (SEM-EDX) ile belirlenmiştir. Bitkinin nikel metalini köklerden (499,7 µg/g) çok gövdesinde (932,5 µg/g) biriktirdiği ve nikel metalinin artan derişimleri ile birlikte yaprak tüyü yoğunluğu ve yapısında değişiklikler olduğu gözlenmiştir. Değişiklikler yaprak tüy uçlarında kıvrılmalar, yer yer yaprak tüylerinin dinamik ve çıkıntılı yapısını kaybetmesi olarak ortaya çıkmıştır. Ayrıca yaprak tüy merkezlerinin değişik şekiller oluşturduğu ve bunların üzerlerinde düzensiz çıkıntıların olduğu gözlenmiştir. Bitki gövde ve köklerinde yapılan antioksidant enzim analizinde gövde ve köklerdeki katalaz ve glutatyon reduktaz enzim aktivitesinin 0.01 mM nikel derişiminde belirgin bir artış gösterdiği daha sonra

düştüğü, askorbat peroksidazın ise gövde ve kökteki aktivitesinin sadece 0.04 mM nikel derişiminde belirgin bir artış gösterdiği diğer derişimlerde ise aktivitenin değışken olduğu gözlenmiştir. Bitkinin toplam yaprak proteinlerinin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile incelenmesi sonucu RuBisCo proteinine ait 49 kDa ve 14 kDa ağırlığında iki temel bant ve 45 kDa ve 18,4 kDa arasında dağılan çok sayıda küçük bantlar tespit edilmiştir. Bitkilere ait protein bant desenlerinin tüm nikel derişimleri için aynı olduğu ve bantların yoğunluk ya da hareket bakımından kontrolden fark göstermediği görülmüştür. Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA-Polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PZR) işleminde denenen primerlerle 1000 bp-300bp arasında değışen bantlar elde edilmiştir. OPW10, OPB10, OPA17 primerleri ile yapılan çoğaltmalarda bant farklılıkları görülmezken, OPO04 ve B7 primerleri ile elde edilen RAPD profillerinde bazı farklılıklar ortaya çıkmıştır. 0,2 mM nikel derişimi uygulaması ile bitkide farklı ifade edilen genler bulunmuş ve bunların dizi analizleri yapılmıştır. 0,2 mM nikel uygulanan bitkide bulunmadığı gözlenen, farklı ifade edilen gen dizisilerinden birisi Arabidopsis thaliana 1. kromozom dizisinin BAC T24P13 kısmına ait genomik dizisi ile %93 benzerdir. Nikel uygulanan bitkide ortaya çıkan farklı ifade olmuş bir gen dizisi ise Arabidopsis thaliana Lhca2 protein (Lhca2) mRNA' sı ile %99 benzerdir. Nikel uygulanan bitkide ifadesi azalan bir gen dizisinin Lobularia maritima kloroplast DNA' sı, tamamlanmış dizisi ile %99 benzer olduğu görülmüştür.

Bilim Kodu : 203.1.104
Anahtar Kelimeler : Bitkisel arıtım, Alyssum, nikel birikimi, XRF, SEM-EDX, antioksidant enzimler, protein, RAPD-PZR, farklı ifade edilen genler
Sayfa Adedi : 122
Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Leyla AÇIK

**DETERMINATION AND MOLECULAR ANALYSIS OF NICKEL
ACCUMULATION AT *ALYSSUM CORSICUM* (BRASSICACEAE)
GROWN IN TISSUE CULTURE CONDITIONS**

(Ph. D. Thesis)

Seniha Selcen BABAOĞLU AYDAŞ

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

July 2008

ABSTRACT

***A. corsicum* is a candidate plant to be used in remediation and recovery of heavy metals especially nickel from the environment by a new technology phytoremediation. In this study *A. corsicum* plants were grown in tissue culture conditions supplied with 0,01 mM, 0,04 mM, 0,2 mM nickel concentrations. The nickel hyperaccumulation potential and the changes in plant's metal content were detected by X-ray florescence spectrometer (XRF). The density of the metals Fe, Mg, Ca, Ni and morphological changes were detected at upper and lower stem leaves by scanning electron microscope energy dispersive X-ray anaysis (SEM-EDX). The shoots (932,5 µg/g) of the plant hyperaccumulated significantly more nickel than the roots (499,7 µg/g). The density of the trichomes was reduced with the increasing concentrations of nickel and some changes at the structure of the trichomes were observed. The changes are the curved trichome tips and the loss of the dynamic and denticulated structure. At 0,04 mM and 0,2 mM concentrations the centre of the trichomes had some different structures and denticulates. The analysis of antioxidant enzyme activities were performed at root and shoot samples. Catalase and glutathione reductase enzyme activity increased at 0,01 mM at both shoot and roots and decreased with the 0,2 mM nickel concentration. Ascorbate peroxidase activity**

increased at just 0,04 mM nickel concentration and showed variable values at other concentrations. The total leaf proteins of the plant were examined by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Two major bands were determined with 49 and 14 kDa molecular weight. Other minor bands dispersed between 45 and 18,4 kDa. The protein banding patterns of all plants grown at different concentrations of nickel were the same with each other in the aspect of density and mobility. In random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction experiments (RAPD-PCR) bands took place between 1000 bp and 300 bp. The bands showed no difference at the amplifications performed with OPW10, OPB10, OPA17 while they showed differences at some aspects with the primers OPO04, B7 primers. Differentially expressed genes (DEG) at 0,2 mM nickel treated plants were detected by special primers. One of the genes absent at 0,2 mM nickel treated plants is %93 similar with *Arabidopsis thaliana* 1. chromosome BAC T24P13 part genomic sequence. A differentially expressed gene appearing at 0,2 mM nickel treated plants is %99 similar with *Arabidopsis thaliana* Lhca2 protein (Lhca2) mRNA sequence and another less expressed gene at 0,2 mM nickel treated plant is %99 similar with *Lobularia maritima* chloroplast DNA completed sequence.

Science Code	: 203.1.104
Key Words	: Phytoremediation, Alyssum, nickel, XRF, SEM-EDX antioksidant enzymes, protein, RAPD-PZR, differantially expressed genes
Page Number	: 122
Adviser	: Prof. Dr. Leyla AÇIK

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli bilgi ve yardımlarıyla beni yönlendiren, tecrübeleriyle bana her zaman yardımcı olan danışman hocam Prof. Dr. Leyla AÇIK' a teşekkür ederim.

Çalışmada kullanmış olduğum bitki tohumlarını koleksiyonundan temin ettiğim değerli hocam Prof. Dr. Nezaket ADIGÜZEL'e, doku kültürü üzerine kendisinin bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, ilk denemelerimde bana tüm laboratuvar imkanlarını sunan, aynı zamanda tez izleme komitelerimde bulunarak desteklerini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU' na,

SEM ve SEM-EDX çalışmalarında yardımlarını ve değerli tecrübelerini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Zekiye SULUDERE' ye ve XRF çalışmaları için büyük destek veren Doç. Dr. Yusuf Kağan KADIOĞLU' na,

Tez izleme komitelerinde bulunarak desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Yavuz BEYATLI' ya teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında dostluk ve sevgisi ile yanımda olan, hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Araş. Gör. Dr. Fatma ÖZTÜRK' e, manevi desteği için Yard. Doç. Dr. Ayten ÇELEBİ' ye ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Tüm tez çalışmalarım esnasında büyük sabır göstererek benim yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen eşim Selim AYDAŞ'a ve anlayışı için minnettar olduğum oğlum Oğuz' uma, maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu projenin gerçekleştirilmesinde maddi destek sağlayan Devlet Planlama Teşkilatına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiv
RESİMLERİN LİSTESİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Çevre Kirliliği ve Ağır Metaller	4
2.2. Bitkisel Arıtım	7
2.3. Bitkisel Arıtım Tipleri	8
2.4. Bitkisel Arıtımın Yararları ve Sınırlılıkları	12
2.5. Nikel Toksikliği	13
2.6. <i>Alyssum corsicum</i> Duby (<i>Brassicaceae</i>) ve Serpentin Topraklar	14
2.7. Bitkilerde Metal Birikimi İçin Geliştirilen Mekanizmalar	18
2.7.1. Bitkinin metalleri topraktan alışı	19
2.7.2. Metal iyonlarının şelatlanması ve tutulması	21
2.7.3. Antioksidant enzimler	22
2.8. Bitkilerde Metal Birikiminin Belirlenmesi	24

Sayfa

2.9. Organizmalarda Dış Etkenlerle Ortaya Çıkan Değişikliklerin Protein ve Gen Düzeyinde Belirlenmesine Yönelik Bazı Yöntemler	28
2.10. Bitkisel Arıtmada Genetik Mühendisliği Uygulamaları	30
3. MATERYAL VE METOT.....	33
3.1. Materyal	33
3.1.1. Bitki materyali	33
3.1.2. Kullanılan besiyeri, tampon ve çözeltiler	33
3.2. Metot	36
3.2.1. Metalden arındırma ve sterilizasyon.....	36
3.2.2. Tohumların yüzey sterilizasyonu	37
3.2.3. Doku kültüründe bitki gelişimi	37
3.2.4. Bitkilerin hasat edilmesi	37
3.2.5. XRF ile metal tayini	37
3.2.6. SEM-EDX ile morfolojik incelemeler ve metal tayini	38
3.2.7. Antioksidant enzim aktivitelerinin belirlenmesi	38
3.2.8. SDS-PAGE	39
3.2.9. RAPD-PZR	40
3.2.10. cDNA elde edilmesi	41
3.2.11. Agoraz jel elektroforezi ve jellerin görüntülenmesi	42
3.2.12. Farklı ifade olunan genlerin belirlenmesi (DEG) ve analizi	43
4. DENEYSEL BULGULAR	44
4.1. <i>A. corsicum</i> Türünde Metal Analizi ve Morfolojik İncelemeler	44
4.1.1. XRF ile metal tayini	44

Sayfa

4.1.2. SEM-EDX ile metal tayini ve morfolojik incelemeler	51
4.2. Antioksidant Enzim Aktivitelerinin belirlenmesi	76
4.3. Toplam Yaprak Protein Profillerinin Belirlenmesi	78
4.4. DNA' ların RAPD-PZR ile incelenmesi.....	79
4.5. cDNA' ların RAPD-PZR ile incelenmesi.....	82
4.6. Farklı İfade Olunan Genlerin Belirlenmesi	84
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	98
KAYNAKLAR	109
ÖZGEÇMİŞ	120

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Kritik olmayan ve toksik metaller	5
Çizelge 2.2. Bitkisel artım tipleri	8
Çizelge 2.3. Nikel biriktiren <i>Alyssum</i> türleri, biriktirme oranları ve dağılışı	17
Çizelge 2.4. Biyomoleküllerce metallerin toksik etkilerini gidermede kullanılan mekanizmalar.....	25
Çizelge 2.5. Yüksek seviyede metal biriktiren bitkilerde doku / hücre seviyesinde metal dağılımı.....	28
Çizelge 3.1. RAPD-PZR' da kullanılan primerler ve dizileri	35
Çizelge 4.1. <i>A.corsicum</i> ' un gövde ve kök kısımlarının XRF ile belirlenen metal içeriği	46
Çizelge 4.2. Farklı nikel derişimleri uygulanmış <i>A.corsicum</i> türü üst yapraklarının SEM-EDX metal analiz sonuçları	70
Çizelge 4.3. Farklı nikel derişimleri uygulanmış <i>A.corsicum</i> türü alt yapraklarının SEM-EDX metal analiz sonuçları	73
Çizelge 4.4. DEG 1; <i>Arabidopsis thaliana</i> 1. Kromozom dizisinin BAC T24P13 kısmına ait genomik dizisi %93 benzer.....	87
Çizelge 4.5. DEG 2; <i>Arabidopsis thaliana</i> kalmodulin-bağlayan protein (AT5G40190) mRNA' sı, %68 benzer	88
Çizelge 4.6. DEG 3; <i>Arabidopsis thaliana</i> hipotetikal protein mRNA' sı %72 benzer	89
Çizelge 4.7. DEG 4; <i>Arabidopsis thaliana</i> CKB3 (kazein kinaz II beta zincir 3) (CKB3) mRNA, %49 benzer	90
Çizelge 4.8. DEG 5; <i>Arabidopsis thaliana</i> Lhca2 protein (Lhca2) mRNA' sı, %99 benzer	91
Çizelge 4.9. DEG 6; <i>Arabidopsis thaliana</i> klon 30081 mRNA, %68 benzer	92

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.10. DEG 7; <i>Arabidopsis thaliana</i> proteaz inhibitor/tohum depo/lipit transfer protein (LTP) ailesi protein (AT4G22490) mRNA, %41 benzer.....	93
Çizelge 4.11. DEG 8; <i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i> WSCP1R mRNA suda çözünen klorofil proteini, %55 benzer.....	94
Çizelge 4.12. DEG 9; <i>Brassica rapa</i> subsp. <i>pekinensis</i> klon KBrB081M20, %60 benzer	95
Çizelge 4.13. DEG 10; <i>Arabidopsis thaliana</i> proteaz inhibitör/tohum depo/lipit transfer protein (LTP) ailesi protein (AT4G22490) mRNA, %31 benzer.....	96
Çizelge 4.14. DEG 11; <i>Lobularia maritima</i> kloroplast DNA' sı, tamamlanmış dizi, %99 benzer	97

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Bitkisel özütleme süreci	10
Şekil 2.2. Bitkilerin ağır metal biriktirmesinde rol oynayan temel süreçler	20
Şekil 2.3. Bitki hücrelerinde inorganik ve organik kirleticiler için tolerans mekanizmaları	23
Şekil 2.4. Bitkisel arıtımda genetik mühendisliği sürecinin uygulanması	32
Şekil 4.1. Farklı derişimlerde nikel uygulanan <i>A.corsicum</i> ' un kök ve gövdesinde bulunan nikel miktarı	47
Şekil 4.2. Farklı derişimlerde nikel uygulanan <i>A.corsicum</i> ' un kök ve gövdesinde bulunan magnezyum miktarı	48
Şekil 4.3. Farklı derişimlerde nikel uygulanan <i>A.corsicum</i> ' un kök ve gövdesinde bulunan kükürt miktarı	48
Şekil 4.4. Farklı derişimlerde nikel uygulanan <i>A.corsicum</i> ' un kök ve gövdesinde bulunan mangan miktarı	49
Şekil 4.5. Farklı derişimlerde nikel uygulanan <i>A.corsicum</i> ' un kök ve gövdesinde bulunan çinko miktarı	50
Şekil 4.6. Üst yaprak üst ve alt yüzeylerinin çeşitli kısımlarında SEM-EDX ile ölçülen Ni, Mg metallerinin oranları	71
Şekil 4.7. Üst yaprak üst ve alt yüzeylerinin çeşitli kısımlarında SEM-EDX ile ölçülen Ca, Fe metallerinin oranları	72
Şekil 4.8. Alt yaprak üst ve alt yüzeylerinin çeşitli kısımlarında SEM-EDX ile ölçülen Ni, Mg metallerinin oranları	74
Şekil 4.9. Alt yaprak üst ve alt yüzeylerinin çeşitli kısımlarında SEM-EDX ile ölçülen Ca, Fe metallerinin oranları.....	75
Şekil 4.10. Farklı derişimlerde nikel uygulanmış <i>A.corsicum</i> bitkisinin gövde ve köklerdeki katalaz enzim aktivitesi değişimi	76

Şekil	Sayfa
Şekil 4.11. Farklı derişimlerde nikel uygulanmış <i>A.corsicum</i> bitkisinin gövde ve köklerindeki glutatyon reduktaz enzim aktivitesi değışimi	77
Şekil 4.12. Farklı derişimlerde nikel uygulanmış <i>A.corsicum</i> bitkisinin gövde ve köklerindeki askorbat peroksidaz enzim aktivitesi değışimi	77
Şekil 4.13. Farklı nikel derişimlerinde geliştirilen <i>A.corsicum</i> ' un SDS-PAGE ile elde edilen toplam yaprak protein profilleri.....	78
Şekil 4.14. Farklı derişimlerde nikel uygulanan <i>A.corsicum</i> türünün OPW10 primeri ile elde edilen RAPD profili.....	79
Şekil 4.15. Farklı derişimlerde nikel uygulanan <i>A.corsicum</i> türünün OPB10 primeri ile elde edilen RAPD profili.....	80
Şekil 4.16. Farklı derişimlerde nikel uygulanan <i>A.corsicum</i> türünün OPA17 primeri ile elde edilen RAPD profili.....	81
Şekil 4.17. Farklı derişimlerde nikel uygulanan <i>A.corsicum</i> türünün B7 primeri ile elde edilen RAPD profili.....	81
Şekil 4.18. Farklı derişimlerde nikel uygulanan <i>A.corsicum</i> türünün OPO04 primeri ile elde edilen RAPD profili.....	82
Şekil 4.19. Farklı derişimlerde nikel uygulanan <i>A.corsicum</i> türüne ait cDNA' ların OPA02 primeri ile elde edilen RAPD profili.....	83
Şekil 4.20. Farklı derişimlerde nikel uygulanan <i>A.corsicum</i> türüne ait cDNA' ların OPB08 primeri ile elde edilen RAPD profili.....	83
Şekil 4.21. Kontrol ve 0,2 mM nikel uygulanmış <i>A.corsicum</i> ' da farklı ifade olan toplam 11 adet gen bölgesi	85

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. <i>Alyssum corsicum</i> Duby	16
Resim 2.2. XRF cihazı	26
Resim 2.3. SEM-EDX cihazı.....	27
Resim 4.1. Doku kültüründe farklı nikel derişimlerinde geliştirilen <i>A.corsicum</i>	44
Resim 4.2. İklim dolabında doku kültüründe farklı nikel derişimlerinde geliştirilen <i>A.corsicum</i>	45
Resim 4.3. <i>A.corsicum</i> kontrol bitkisinin üst yapraklarına ait elektron mikroskop görüntüleri	53
Resim 4.4. 0,01 mM nikel uygulanmış <i>A.corsicum</i> bitkisinin üst yapraklarına ait elektron mikroskop görüntüleri	54
Resim 4.5. 0,04 mM nikel uygulanmış <i>A.corsicum</i> bitkisinin üst yapraklarına ait elektron mikroskop görüntüleri	55
Resim 4.6. 0,2 mM nikel uygulanmış <i>A.corsicum</i> bitkisinin üst yapraklarına ait elektron mikroskop görüntüleri	56
Resim 4.7. Kontrol ve 0,01; 0,04; 0,2 mM nikel uygulanan <i>A. corsicum</i> bitkisinin üst yapraklarına ait elektron mikroskop görüntülerinin karşılaştırılması	57
Resim 4.8. <i>A.corsicum</i> kontrol bitkisinin alt yapraklarına ait elektron mikroskop görüntüleri	59
Resim 4.9. 0,01 mM nikel uygulanmış <i>A.corsicum</i> bitkisinin alt yapraklarına ait elektron mikroskop görüntüleri	60
Resim 4.10. 0,04 mM nikel uygulanmış <i>A.corsicum</i> bitkisinin alt yapraklarına ait elektron mikroskop görüntüleri	61
Resim 4.11. 0,2 mM nikel uygulanmış <i>A.corsicum</i> bitkisinin alt yapraklarına ait elektron mikroskop görüntüleri	62

Resim**Sayfa**

Resim 4.12. Kontrol ve 0,01; 0,04; 0,2 mM nikel uygulanan <i>A. corsicum</i> bitkisinin üst yapraklarına ait elektron mikroskop görüntülerini karşılaştırılması	64
---	----

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
bp	Baz çifti
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece
λ	Lambda
gr	Gram
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
mM	Milimolar
M	Molar
N	Normal
ml	Mililitre
μl	Mikrolitre
L	Litre
rpm	Devir sayısı
%	Yüzde

Kısaltmalar**Açıklama**

AP	Amonyum per sülfat
APX	Askorbat peroksidaz
CDF	Kasyon difüzyon kolaylaştırıcı
cDNA	Tamamlayıcı DNA
CPx-ATPaz	Sistein-Prolin-X ATPaz
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ES	Emisyon spektrometresi
EST	İfade edilen gen parçalarının DNA dizilerinin belirlenmesi
GSH	Glutatyon
ICP-MS	Endüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi
MALDI-TOF	Kütle spektrometresi
mRNA	Haberci ribonükleik asit
MT	Metal bağlayan protein
Nramp	Doğal dayanıklılıkla ilişkili makrofaj protein
PAGE	Poliakrilamit jel elektroforezi
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
PC	Fitoşelatin
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
RT	Ters transkripsiyon
SAGE	Seri gen ifadesi analizleri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SEM-EDX	Taramalı elektron mikroskobu-enerji dağılımlı X ışını analizi
TCA	Triklor asetik asit
TEMED	Tetra etilen diamin
TPH	Toplam petrol hidrokarbonları

Kısaltmalar**Açıklama****UV**

Ultraviyole

XRF

X ışını floresans spektroskopisi

ZIP

Çinko ve demirle düzenlenen taşıyıcı proteinler

1. GİRİŞ

Son yıllarda endüstrileşme, teknolojik ilerlemeler, savaşlar, düzensiz kentleşme, nüfustaki hızlı büyüme ve insanlardaki tüketim isteğinin artışı ile birlikte doğal kaynaklar hızla tükenmekte, iklim değişiklikleri olmakta ve bunun sonucunda insanoğlu başta besin ve su yetersizliği olmak üzere pek çok problemle karşı karşıya kalmaktadır. Tüm bu gelişmeler çevre kirliliği sorununun önemini çok daha fazla hissettirmiştir [1].

Toprak kirleticileri arasında ağır metaller önemli bir yer tutmaktadır. Toprakların ağır metallerle kirlenmesi, endüstriyel ve tarımsal faaliyetler sonucu olabildiği gibi, ağır metal içeren kayaçların çeşitli nedenlerle çözünerek su ve toprak ortamına taşınması ile de ortaya çıkabilmektedir. Başta nikel, kurşun, kadmiyum, civa, arsenik, krom gibi ağır metallerin artan oranları topraktaki mikrobiyal aktivitenin bozulmasına, toprak verimliliğinin düşmesine, biyolojik çeşitliliğin azalmasına neden olmakta, bunun yanında besin zinciri yoluyla insan ve hayvanlara geçerek büyük sağlık problemlerini de beraberinde getirmektedir [2].

Ülkemizde de sanayileşme ve hızlı kentleşme nedeniyle tarım arazileri amaçları dışında kullanılarak hızla kalitesini kaybetmeye ve ağır metallerce kirletilmeye başlanmıştır. Kentsel atıklar ve sanayi atıkları yeterli arıtım tesisleri olmadığından doğrudan toprak, su ve denizlerimize karışmaktadır. Ayrıca tarımsal faaliyetlerde ürün miktar ve kalitesini arttırmak için toprağa karıştırılan gübre, pestisid, hormon gibi maddeler kirlenme oranını arttırmaktadır. Kirletilmiş suların tarımsal sulamada kullanılması ağır metal gibi kirleticilerin toprağa geçmesine neden olmakta hatta bu yolla kirleticiler besinlerimize karışmaktadırlar. Maden atıkları, otoyol inşaatları, araçların yaydığı ağır metaller de atmosfer ve topraktaki ağır metal oranlarının artmasına neden olmaktadır. Ülkemizde özellikle Gediz ve Çukurova havzası, Karadeniz sahil şeridi ve Marmara bölgesi ağır metal kirliliği bakımından risk taşıyan bölgelerdir [3].

Ağır metallerin topraktan temizlenmesi için geliştirilen yöntemler kısa vadede iyi birer çözüm gibi görünseler bile kirliliği tam olarak yok edememekte, söz konusu bölgeyi temizlerken kirliliğin başka bölgelere yayılmasına, ya da ağır metalleri uzaklaştırırken başka bazı kimyasal maddelerin toprağa karışmasına neden olabilmektedirler. Bu yöntemlerin maliyeti de oldukça fazladır [4].

Son yıllarda “bitkisel arıtım”, başta ağır metaller olmak üzere pek çok inorganik ve organik kirleticinin çevreden uzaklaştırılmasına yönelik umut vaad eden bir teknoloji olarak ön plana çıkmaktadır. Başta Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada olmak üzere pek çok ülkede arazi denemelerinden başlamak suretiyle uygulama bulmuştur. Bitkisel arıtım; kirletilmiş durumdaki toprak, su ve havanın, kirleticileri bulundukları ortamdan tutma, indirgeme veya giderme özelliğine sahip bitkilerce arındırılmasını izah etmektedir ve bu kirleticiler arasında metaller, pestisidler, çözücüler, patlayıcılar, ham petrol ve türevleri ile çeşitli diğer maddeler bulunmaktadır [5].

Bitkisel arıtım, geleneksel teknolojilerle karşılaştırıldığında en az çevresel tahribata neden olan, maliyeti düşük, estetik açıdan halkın kabulünü gören bir yöntemdir. Kirliliğin henüz düşük derişimlerde olduğu, süre sıkıntısı olmayan bölgelerin temizlenmesinde kullanılır. Ayrıca biyolojik olarak elde edilen metaller, geri dönüşümleri sağlanarak ekonomik açıdan değerlendirilebilir hale getirilmektedir. Bu da yöntemin sağladığı diğer bir kazançtır [6].

Bitkisel özütleme; bitkisel arıtım tiplerindendir ve ağır metallerin topraklardan temizlenmesine yöneliktir. *Brassicaceae* familyası üyelerinden pek çoğunun bu süreci başarıyla gerçekleştirdiği görülmüştür. *Alyssum* cinsine ait pek çok türün nikel metalini biriktirmesi ve bazı türlerde bu oranın kuru yaprak ağırlığının %3’ üne tırmanması bu alanda elde edilmiş önemli bulgulardandır [7].

Dünyanın çeşitli yerlerinde bitkisel arıtım yöntemi üzerine elde edilen bilgiler değerlendirildiğinde bu süreçlerin anlaşılmasında sadece bitki sistematigi, jeoloji bilimi ve klasik ıslah yöntemlerinin yeterli olmayacağı, bitkilerin metal tolerans ve

metal biriktirme mekanizmalarının anlaşılmasında modern moleküler yöntemlere de ihtiyaç duyulduğu görülmektedir.

Bitkisel artım yöntemlerinde sınırlayıcı faktörlerin başında özellikle biriktirici türlerin biyokütlesinin istenen büyüklükte olmaması, bitki köklenmesinin yeterli olmaması ve mevsimsel koşullar gelmektedir. Bitkilerin tohum aşamasından itibaren toprakta yetiştirmeye başlamaları ve büyüme süreçleri esnasında metal alımlarını arttırabilmek için çalışmalar yapılmaktadır. Metalleri bitki tarafından daha alınabilir konuma getirebilmek amacıyla toprağa çeşitli ıslah maddeleri ilave edilmekte ve bitki-mikroorganizma ilişkilerinden faydalanılmaktadır [8].

Metallerin bitki kök ve gövdesinde hızlı iletiminin sağlanması ve hücrel bölmelerde etkili tutulumu için pek çok gen, protein ve enzim devreye girmektedir. Tüm bu süreçlerin ve gerçekleştirmelerinde temel rolü oynayan genlerin bilinmesi bitkisel artımda yeni çözümlerin üretilmesine destek sağlayacaktır.

Bitkilere gen aktarımı üzerine kaydedilen hızlı gelişmeler bitkisel artım alanında da uygulama alanı bulmuştur. Çeşitli organizmalarda tespit edilen metale dayanıklılık genleri izole edilerek aday bitkilere aktarılmakta ve bu bitkilerin uygun arazi koşullarında metal biriktirme potansiyelleri incelenmektedir [9].

Bu çalışmamızda nikel biriktirici türlerden *Alyssum corsicum*' un doku kültürü şartlarında farklı nikel derişimleri varlığında yetiştirilerek nikel biriktirme potansiyeli ve metal içeriğindeki değışimin belirlenmesi, bitkiye nikelin değışen oranları uygulandıktan sonra; yaprak morfolojisinde, antioksidant enzim aktivitesinde, toplam yaprak proteinlerinde ve DNA profilindeki değışimlerin tespiti ayrıca farklı nikel derişimlerinde bitkide farklı ifade olunan genlerin ortaya çıkartılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Çevre Kirliliği ve Ağır Metaller

Günümüzde endüstrileşme ile birlikte insanoğlunun hayat standardı da gün geçtikçe artmaktadır. Ancak endüstrileşme sonucunda ortaya çıkan tehlikelerin göz ardı edilmesi ya da elde edilecek olan faydaların oluşacak zararları arka planda bırakması nedeniyle dünyamızda oldukça büyük boyutlarda kirlilik problemleri meydana gelmiştir. Bu problemlerden bir tanesi de yüzey, yer altı suyu ve toprağın ağır metallerle kirlenmesidir [10].

Topraktaki ağır metal kirliliği; endüstrinin ve madencilik aktivitelerinin gelişmesiyle, atık suyla yapılan sulamaların ve arıtma çamuru uygulamalarının yaygınlaşmasıyla küresel bir problem halini almaktadır. Kirlenmiş toprağın karmaşık fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler taşıması, ayrıca kirleticilerin toprak ortamındaki davranış ve ilişkilerine ait bilgilerin sınırlı olması gibi faktörler, temizleme faaliyetlerinin maliyetinin yükselmesine bunun yanı sıra klasik atık bertaraf teknolojilerinin uygulanmasının da sınırlı boyutlarda kalmasına sebep olmuştur [11].

“Ağır metal” terimi, metal toksikliği veya metal kirliliği üzerine yazılan bilimsel yayınlarda yaygın olarak kullanılan terimlerden birisidir ve aslında bu terim çevre kirliliği literatürüne yerleşmiştir. Ansiklopedilerde ve sözlüklerde verilen tanımından yola çıkılırsa ağır metal; 4, 5 ya da bunlardan daha fazla özgül ağırlığa sahip tüm metallere verilen addır. Böyle düşününce ağır metal tanımı periyodik cetvelin tüm aşağı üyelerini kapsamaktadır. Ancak bu metallerden asıl nispeten yer kabuğunda bulunan, dikkate değer miktarlarda çıkartılıp, kullanılan, halkın temasa geçebileceği yerlerde bulunan ve insanlara toksik etkileri olanlarından ağır metaller olarak bahsedilir.

Rodyum, titanyum, manganez, galyum, indiyum gibi elementler nadir olarak çevresel tehlike oluşturduklarından ağır metal olarak adlandırılmazlar. Yine lantanid ve aktinid serisinden metallerle zirkonyum, niyobyum, tektenyum, tungsten, renyum,

osmiyum gibi elementler de 5' ten büyük özgül ağırlığa sahip oldukları halde ağır metal kategorisinden çıkartılmışlardır (Çizelge 2.1) [12].

Çizelge 2.1. Kritik olmayan ve toksik metaller [12].

Kritik olmayan metaller	Toksik fakat ender metaller	Toksik ve kolay rastlanan metaller
Na, K, Mg, Ca, Fe, Li, Sr ve Al	Ti, Hf, Zr, W, Nb, Ta, Re, Ga, La, Os, Rh, Ir, Ru, Ba	Be, Co, Ni, Cu, Zn, Sn, As, Se, Te, Pd, Ag, Cd, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Sb, Bi

Ağır metal kirliliği diğer kirlenme tiplerinden farklıdır. Ağır metallerin çevredeki ilk kaynağı, doğal olarak var olan jeokimyasal materyallerdir. Ağır metaller çevrenin tüm bileşenleri içinde değişen oranlarda mevcuttur. Bu bulunuş insan aktivitesi ile artabilir. Ağır metaller asıl kayaçlarındaki derişimlerine bağlı olarak tüm dünyada farklı bölgelerde değişen seviyelerde bulunurlar, örneğin Ni, Cr, Co serpentin topraklarda bulunurken Zn, Pb ve Cd kalamın topraklarda yüksek seviyededir. Ağır metaller çevrede kalıcıdır ve temizlenmeleri güçtür [13].

As, B, Cd, Cr, Cu, Hg, N, Pb, Se, U, V, Zn gibi elementler toprakta düşük derişimlerde bulunurlar ancak askeri operasyonlar, elektro kaplama, fosil yakıtlarının yanması, madencilik, maden tasfiyesi, toprağa çamur ilavesi, gübre ve kimyevi tarım uygulamaları gibi insan aktiviteleri nedeniyle derişimleri artabilir.

Düşük derişimlerde Cu, Cr, Mo, Ni, Se ve Zn gibi bazı iz elementler mikroorganizmaların, bitkilerin ve insan da dahil olmak üzere hayvanların sağlıklı işlev görmeleri ve üremeleri için gereklidir. Ancak yüksek derişimlerde aynı temel elementler toksiklik taşıyabilir. As, Cd, Pb, Hg gibi bazı iz elementler ise temel olmadıkları gibi çevredeki çok düşük derişimleri bile hem bitkilerde hem de hayvanlarda toksikliğe neden olabilir [14].

Ağır metallerin artmasına neden olan insan aktiviteleri bunların çevreye hava, su veya maden yatakları ile iletildiği şehir dışlarına ve çöplüklere kadar devam etmektedir. Mesela maden yataklarındaki sızıntılar nedeniyle nehir sularındaki metal derişiminin birkaç bin kat arttığı görülmüştür. Çevreye karışan metaller su ve hava ile taşınır ve sonunda artık tutuklanmış hale geçtikleri toprak ve sedimentlere ulaşırlar. Yine de bunun olması için geçen zaman çok uzun olabilir.

Metallerin topraktaki biyolojik olarak elde edilebilir kısmının toprağa bağlanma peryodunun başında yüksek olduğu fakat bunun zamanla azaldığı görülmüştür. Bu yüzden fazla miktarda biyolojik olarak elde edilebilir metal içermesi bakımından, insan aktivitesi ile ortaya çıkan metaller, yataklarından kaynaklanan temelde yüksek seviyede ancak düşük akıntı kabiliyetine sahip metallere daha büyük bir problem oluşturmaktadır [15].

Ağır metal kirliliğinin giderilmesi toprak, su ve sedimentlerden gidermek üzere pek çok teknik geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları kimyasal muamele, toprağın yıkanması, ısı ile ya da çözeltilerle camlaştırma, elektrokinetik arıtım, yakma, arazi doldurma, bitkisel arıttırma. Su için ise; iyon değişimi, elektrokimyasal indirgeme, adsorbsiyon, membranla ayrıştırma ve filtrasyon, kimyasal tutulum, ters ozmoz, aktif karbon, biyosorbsiyon gibi yöntemlerdir [5].

Ağır metal kirliliğinin giderilmesi için geliştirilen teknikler bazı özel durumlarda başarılı olabildiği halde istenmeyen metabolik ürünlerin oluşumuna neden olmaları, alan tahribatı veya uzun süreli destabilizasyona yol açmaları ve potansiyel olarak artış gösterme kabiliyetindeki kirlenici hareketliliğinin varolan teknikleri kısıtlama ihtimali taşıması bakımından uygulamaları kısıtlı tekniklerdir [16]. Daha da önemlisi çevrenin iyileştirilmesi için kullanılan bu tekniklerin parasal maliyeti de oldukça yüksek olabilmektedir. Buna bir çözüm bulmak amacıyla araştırmalar ağır metal temizliği için alternatif, düşük maliyetli metotlar bulmaya yönelmiştir [17].

2.2. Bitkisel Arıtım

Bitkisel arıtım; kirletilmiş durumdaki toprak, su ve havanın; metaller, pestisidler, çözücüler, patlayıcılar, ham petrol ve türevleri ile çeşitli diğer kirleticileri bulundukları ortamdan tutma, indirgeme veya giderme özelliğine sahip bitkilerce arındırılmasını izah etmektedir [5].

Vejetasyonun varlığı; toprakta ve sudaki kirleticiler üzerine farklı etkiler yaratabilmektedir. Çalışmalar vejetasyon bulunan toprakların, toplam petrol hidrokarbonlarını (TPH), polisiklik aromatik hidrokarbonları (PAH), pestisitleri, klorlu çözücüler ve surfektanları, vejetasyonu olmayan topraklara göre daha etkili bir şekilde indirgeyebildiğini, ortadan kaldırabildiğini ve mineralleştirebildiğini göstermektedir.

Belli bazı bitki kökleri kadmiyum, bakır, nikel, çinko, kurşun ve kromu da içeren metal kirleticileri absorblama ya da immobilize etme özelliğindeyken bazı bitki türleri organik ve besleyici kirleticileri metabolize etme ya da biriktirme özelliğindedir. Bitkiler, mikroblar, toprak ve kirleticiler arasındaki girift ve karmaşık ilişkiler dizisi bu çeşitli bitkisel arıtım süreçlerini mümkün kılmaktadır [18].

Toksik elementlerin varlığında gelişebilen bitkileri tanımlarken tolerant, indikatör ve hiperakümülatör (yüksek seviyede metal biriktiren) gibi terimler kullanılmaktadır. Tolerant bir tür diğer tüm bitkiler için toksik olan özel bir elementin derişimlerinin bulunduğu toprakta gelişebilmekte olan türdür. Hem indikatör hem de hiperakümülatör türler aynı zamanda tolerant iken çalışmalar mekanizmalardaki genetik farklılıkları da ortaya koymaktadır [19, 20, 21].

Tolerant türler aynı zamanda indikatör veya hiperakümülatör olmak zorunda değildir çünkü tolerant olup metal biriktirmeyen türler, metallerin sadece kök dokusuna girmesini engellemektedir [22]. Ancak bazı çalışmalar ise metallere tolerans mekanizmalarından birisinin engelleme mekanizması değil metal alımı olduğunu göstermektedir. Bu ise metal tolerant genotiplerin aynı zamanda metal biriktirici

olduğu anlamına gelmektedir. Toleransın uç noktasındaki bitkiler hipertolerans göstermektedir ve dokularında yüksek derişimlerde metal biriktirmektedirler [23].

2.3. Bitkisel Arıtım Tipleri

Bitkisel arıtım tipleri, bitkide arıtım gerçekleştirilirken kullanılan mekanizmalara göre farklılıklar göstermektedir. Farklı kaynaklarda bu mekanizmalar çok çeşitli verilmesine rağmen temelde indirgeme, bitki tarafından özütleme, bitki tarafından tutulum, ve bu mekanizmaların birleşiminden ibarettirler (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2 Bitkisel arıtım tipleri [6].

Mekanizma	Sürecin Amacı	Ortam	Kirleticiler	Bitkiler	Günümüzdeki durum
Bitkisel özütleme	Kirleticinin özütlenmesi ve tutulması	Toprak, sediment ve çamurlar	Metaller:Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn; Radyonukleidler: ⁹⁰ Sr, ¹³⁷ Cs, ²³⁹ Pu, ^{233,234} U	Hint hardalı, <i>Thlaspi</i> türleri, <i>Alyssum</i> türleri, Ayçiçeği, hibrid kavaklar	Laboratuvar, pilot ve arazi uygulamaları
Kökte süzülüm	Kirleticinin özütlenmesi ve tutulması	Yer altı suyu, yüzey suları	Metaller, Radyonukleidler	Ayçiçeği, hint hardalı, su sümbülü	Laboratuvar ve pilot ölçekli
Bitkisel tutulum	Kirleticilerin yıkımı	Toprak, sediment ve çamurlar	As, Cd, Cr, Cu, Hs, Pb, Zn	Hint hardalı, hibrid kavaklar, otlar	Arazi uygulaması
Kökte indirgeme	Kirleticilerin yıkımı	Toprak, sediment çamur ve yer altı suyu	Organik bileşikler, (TPH, PAHlar, pestisidler, klorlu çözücüler, PCBler)	Kırmızı dut, otlar, hibrid kavak, su kamışı, pirinç	Arazi uygulaması
Bitkisel indirgeme	Kirleticilerin yıkımı	Toprak, sediment çamur, yer altı suyu ve yüzey suları	Organik bileşikler, klorlu çözücüler, fenoller, herbisidler, savaş atıkları	Algler, su avizesi, hibrid kavak, kara söğüt, bataklık servisi	Arazi denemesi
Bitkisel buharlaştırma	Kirleticilerin ortamdan alınarak havaya bırakılması	Yer altı suyu, toprak, sediment, çamurlar	Klorlu çözücüler, bazı inorganikler (Se, Hg ve As)	Kavaklar, kaba yonca, top akasya, hint hardalı	Laboratuvar ve arazi uygulaması

Bitkisel özütleme özellikle de ağır metaller ve metaloidlerin bitki köklerince hemen bitkinin toprak üstü organlarına iletilmesi suretiyle yok edilmesini içerir [24, 25]. Kirleticiler gövdede ve yapraklarda biriktirilir, daha sonra biriktirici bitkiler ile birlikte hasat edilerek bölgeden uzaklaştırılırlar.

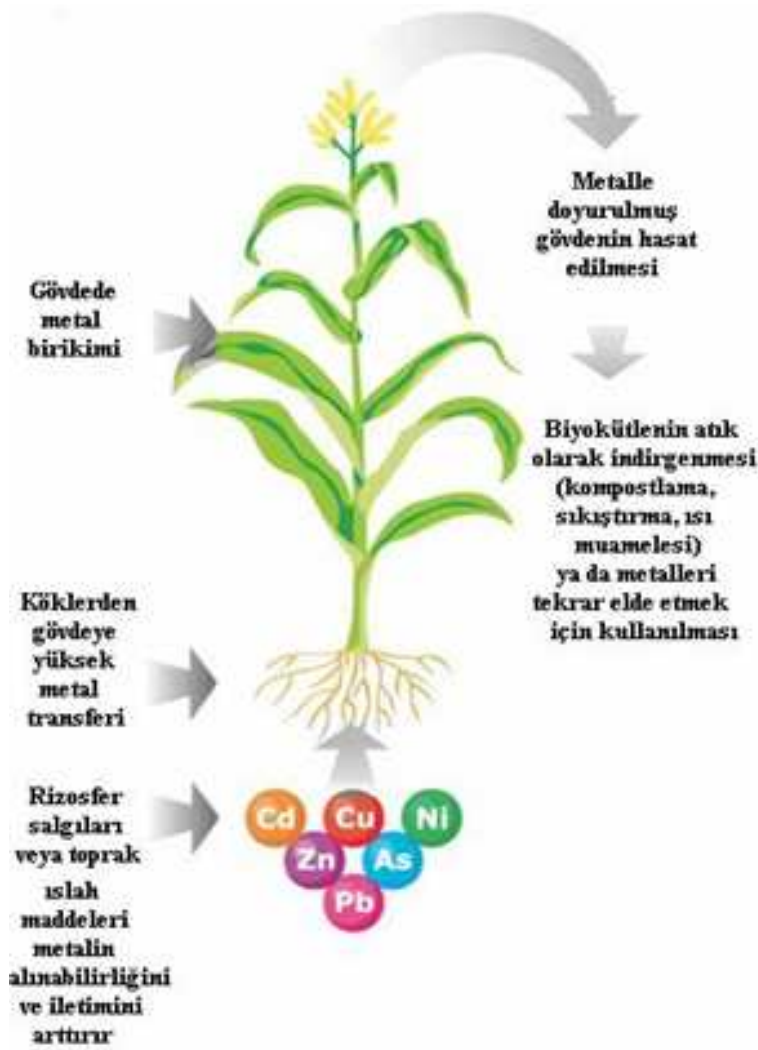
Bitkisel özütleme iki şekilde olabilir; sürekli veya uyarılmış. Sürekli özütleme; yaşam süreleri boyunca toksik kirleticilerin yüksek seviyelerini biriktiren bitkileri gerektirir ki bunlara hiperakümülatör bitki denmektedir. Uyarılmış özütlemeye ise toprağa katalizörler veya şelatlayıcılar ilave edilmek suretiyle bitkide belli bir zaman aralığında toksin biriktirme düzeyi artırılır [26, 27].

Bitkisel özütleme metallere (Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Zn vb), radyonukleidlere (^{90}Sr , ^{137}Cs , $^{233,234,238}\text{U}$) ve metal olmayan (B)'lara uygulanabilmektedir çünkü bunların bitki içinde daha ileri bir parçalamaya uğraması ya da yapılarında bir değişiklik olması söz konusu değildir [28, 29].

Bitkisel özütleme genel olarak bitki tarafından alınan organik ve besleyici kirleticiler için geçerli değildir çünkü bunlar metabolize edilmekte, değiştirilmekte veya bitki tarafından atmosfere verilmekte, böylece de kirleticinin birikmesi önlenmektedir. Sediment ve çamurlardaki kirleticiler de bitkilerce özütlenebilmelerine rağmen bu yöntemde hedef ortam genelde topraktır. Yüzey sularındaki çözünebilir metaller veya yer altı suları da belki kökte süzülüm tekniği ile birleştirilerek bitkisel özütleme yoluyla temizlenebilir [6].

Bitki, yüksek derişimlerde metal biriktirirken kayda değer bir biyokütleye ulaşıyorsa önemli bir miktarda metal topraktan uzaklaştırılabilir. Metalce zengin bitki materyali toplanır ve gelişmiş tarımsal teknikler kullanılarak bölgeden uzaklaştırılabilir. Bu esnada geleneksel arıtım yöntemlerinde olduğu gibi yüzey toprağı kaybı önlenir. Biyokütle ekonomik öneme sahip metalleri geri kazanmak için geri dönüşüme uğratılabilir [30]. Bitkisel madencilik olarak adlandırılan bu çevresel uygulama henüz başlangıç aşamasındadır ve özellikle de geleneksel madencilik yöntemlerinin uygulanmasının ekonomik olmayacağı doğal bölgelerde denenebilir (Şekil 2.1) [14].

Bitkisel tutulum toprağın kimyasal, biyolojik ve fiziksel durumunun değiştirilerek toprak kirleticilerinin doğal bir şekilde tutulumu amacıyla vejetasyonun kullanılmasıdır [6]. Böylelikle çözünmeyen kirleticiler tiplerinin sayısı artırılır. Metal kirleticilerin daha az çözünmesi demek toprak profilinden daha az süzülmesi demektir, böylelikle de insanlar, hayvanlar veya bitkilerle biyolojik olarak etkileşime geçme şansları da daha az olacaktır [31].



Şekil 2.1. Bitkisel özütleme süreci [32].

Bitkisel tutulumda bitkiler aynı zamanda erozyonu önlemek için yüzeyi kaplamak ve suyun sızmasını önlemek amacıyla kullanılırlar ayrıca toprakla doğrudan teması önlemek için bir engel olarak iş görürler. Bitkisel tutulum kirleticileri topraktan uzaklaştırmaz fakat insan sağlığına ve çevreye olan zararlarını farklı, koruyucu bir strateji ile azaltır [31].

Genelde bitkisel tutulum çalışmaları Pb, Cr, Hg gibi metaller üzerine yoğunlaşmıştır [6]. Etkili bir bitkisel tutulum süreci kirletici çözünürlüğünün ve sızıntısının istenmeyen etkilerini önlemek amacıyla kök bölgesinin, kök salgılarının, kirleticilerin, gübre ya da toprak ıslahında kullanılan maddelerin kimyasının çok iyi anlaşılmasını gerektirir [17].

Bitkisel süzülüm zararlı bileşiklerin özellikle de ağır metaller veya radyonukleidlerin su çözeltilerinden absorblanması, derişik hale getirilmesi ve/veya tutulması için bitki köklerinin kullanılması olarak tarif edilebilir [33].

Bitkisel süzülüm, yüzey sularına, atık sulara ya da yüzeye çıkartılmış yer altı sularına uygulanabilir. Kirletici; tipine, derişimine ve bitki türüne göre kök yüzeyinde, kök içinde kalabilir ya da bitkinin diğer kısımlarına iletilebilir. Bitkisel süzülümün, bitkisel özütlemekten farkı kirleticinin başlangıçta topraktan çok suda yer almasıdır. Ayrıca etkili bir bitkisel özütleme için biriktirmenin bitkinin toprak üstü kısımlarında gerçekleşmesi gerekmektedir. Bitkisel süzülüm düşük kirletici oranlarına sahip, büyük hacimlerde suları muamele için uygundur. Temel olarak metaller (Pb, Cd, Cu, Fe, Ni, Mn, Zn, Cr⁺⁵) ve radyonukleidlere uygulanmaktadır (⁹⁰Sr, ¹³⁷Cs, ²³⁸U, ²³⁶U) [18].

Bitkisel indirgeme kirleticilerin alımı, bitki içinde metabolize edilmesi ve indirgenmesi ya da toprak, sediment, çamur, yer altı suyu veya yüzey sularındaki kirleticilerin bitki tarafından üretilen ve serbest bırakılan enzimlerce indirgenmesidir. Bitkisel indirgeme rizosferle bağlantılı mikroorganizmalara dayalı değildir. Bitkisel indirgemeye maruz kalan kirleticiler organik bileşikler, savaş atıkları gibi organik

bileşikler, klorlu çözücüler, herbisidler ve insektisidler ve inorganik besleyicilerdir [6].

Kökte indirgeme toprakta doğal olarak gerçekleşmekte olan biyolojik parçalanmanın bitki kökleri yoluyla arttırılmasıdır ve bu sayede organik kirletici yok edilmekte ya da zehirsiz hale getirilmektedir [18]. Bitkisel indirmede olduğu gibi bu süreçte de organik kirleticilerin enzimatik parçalanması vardır fakat aynı zamanda mikrop enzim aktivitesi de devreye girmektedir. Kirilenmiş bölgelerdeki bitki tipleri mikrop popülasyonların miktarını, çeşitliliğini ve aktivitesini etkiler [34]. Bazı bitkiler toprakta daha aerobik bir ortam yaratarak mikrobial aktiviteyi uyarır bu da organik kimyasal kalıntıların oksidasyonunu arttırır [35].

Bitkisel buharlaştırma sürecinde çözünebilen kirleticiler su ile köklere alındıktan sonra yapraklara iletilir ve stomalar yoluyla atmosfere buharlaştırılır. Etkili bir bitkisel arıtım için indirgenme ürünü ya da değiştirilmiş yapının başlangıçtaki kirleticiden daha az zehirli olması gerekir [36]. En belirgin uygulama ise Hg ve Se' da görülmektedir [37].

2.4. Bitkisel Arıtımın Yararları ve Sınırlılıkları

Bitkisel arıtımın en avantajlı yönlerinden birisi maliyetidir. Bölgeyi gözlemleme ile ilgili maliyet sayılmazsa temel harcamalar; toprağın hazırlanması, tohumların ekimi, yabani ot ve zararlıların kontrolü, bitkilerin hasat edilmesi ve biyokütlenin imha edilmesidir [38]. Ayrıca metallerin geri dönüşümü de ileri bir ekonomik avantaj sağlamaktadır [39].

Toprak, doğal yollarla muamele edildiğinden toprak dinamikleri bozulmamaktadır. Bitkiler aynı zamanda toprak besleyicilerini de sağlamakta ve rüzgarla ya da su ile erozyonu önlemektedirler. Bu yöntem çalışanların kirleticilerle muamele süresini en aza indirmektedir [40]. Ayrıca zehirli bir atık bölgesinin bitkilerle iyileştirilmesi halk açısından estetik olarak memnun edici ve daha kabul edilebilir olacaktır [38].

Bitkisel arıtımın en önemli dezavantajı bitki köklerinin sığ yayılımından dolayı kirleticilerin temizlenmesinde derinlik sınırlamasının olmasıdır. Toprak ve suyun etkili bir bitkisel arıtımı için kirleticilerin bitki köklerinin etki alanı içinde olması gerekmektedir [18]. Mevsim engelleri ve pek çok biriktirici bitkinin yavaş büyüyen türler olduğu göz önüne alınırsa zamanın en önemli sınırlayıcı etkenlerden olduğu görülür. Doğal bir biriktirici türün tipik bir bölgeyi temizlemesi için geçmesi gereken zaman 13-16 yıl olarak belirlenmiştir [41].

Yüksek ağır metal derişimleri bitkilere zehir etkisi yapabilmektedir bu nedenle bitkisel arıtım uygulaması esnasında da kirleticiler çevre biyotik kominitesi için risk faktörleri taşıyabilir. Başta radyonuklidlerin bitkisel arıtımı olmak üzere tüm tekniklerde bitkilerin bir şekilde besin zincirine katılabılme imkanının olması bu dezavantajı ön plana çıkartmaktadır. Bu yüzden mutlaka atıkların nasıl muamele edileceği ile ilgili politika geliştirilmelidir [42].

Bitkisel arıtımda kullanılabilecek ideal bir bitkinin sahip olması gereken özellikler şöyle özetlenebilir;

- Özütlenecek metalleri tercihen toprak üstü kısımlarında biriktirme
- Biriktirilen metallere tolerans gösterme
- Hızlı büyüebilme
- Kolay hasat edilebilme
- Kök uzunluğunun fazla olması
- Tüm yıl boyunca ya da birkaç mevsim devamlılık gösterebilmesi
- Çeşitli stres koşullarına dayanıklılık [43].

2.5. Nikel Toksikliği

Çevrede parçalanamayan, kalıcı, biyolojik olarak biriktirilen ve toksik etkiler gösteren kimyasallar kolay metabolize edilemezler. Çevreye çok az miktarlarda dahi salınsalar insanda veya ekolojik besin zincirlerinde birikebilirler ve insan sağlığına ya da çevreye zararlı olabilirler. Nikel metali bu kimyasal maddelerden birisidir.

Metallere sertlik, güç ve korozyona dayanıklılık vermek için ilave edilir. Nikel bileşikleri; nikel kaplama, seramikleri renklendirme, batarya yapımı gibi işlerde ve kimyasal reaksiyonların hızını arttıran katalistler olarak kullanılırlar [44].

Nikel, diğer metallerle birleşerek yerkabuğunda ve toprakta doğal olarak bulunur ve volkanlardan püskürtülür. Çevrede oksijen ya da sülfür ile birleşerek oksitler veya sülfidler olarak bulunur. Nikel atmosfere nikel madenciliği esnasında ya da alaşımlar veya nikel bileşikleri yapan endüstrilerin faaliyetleriyle salınır. Bu endüstriler nikeli aynı zamanda atık sularla da verebilirler.

Çevreye salınan nikelin çoğunluğu demir ya da manganez içeren parçacıklara güçlü bir şekilde bağlanarak toprak ya da sedimentlere karışır. Asidik şartlarda nikel toprakta daha hareketlidir ve yer altı suyuna sızabilir. İnsanlar nikel hava, içme suyu, yiyecekler yoluyla veya sigara içerek maruz kalabilirler. Nikel maruziyetin bir yolu da nikel içeren toprak, su ve metallerle ya da nikel kaplanmış metallerle deri temasıdır.

Paslanmaz çelik ve bozuk paralar, mücevherler, nikel kaplanmakta ya da nikel alaşımlarından yapılmaktadırlar. İnsanda nikel zararlarının görülebileceği hedef bölgeler nefes alma ile maruziyet sonucu soluk borusu, yine nefes alma ve ağız yoluyla maruz kalma sonucu üreme sistemi ve gelişmekte olan organizma, nefes alma, ağız ve deri teması sonucu bağışıklık sistemidir [45].

2.6. *Alyssum corsicum* Duby (*Brassicaceae*) ve Serpentin Topraklar

Nikel metalinin yüksek derişimlerine (%9,21) İlk defa Minguzzi ve Vergnano [46] tarafından, Floransa bölgesinde yayılış gösteren *Alyssum bertolonii* bitkisinin kuru yapraklarında rastlanmıştır. Başta herbaryum örnekleri üzerinden yürütülen daha sonraki çalışmalarla nikel biriktiren türlere yenileri eklenmiş ve kuru materyalinde >1000 µg/g (0,1 %) nikel bulunduran bitkiler yüksek seviyede metal biriktirici (hiperakümükatör) olarak adlandırılmıştır. Bu terim serpentinlerde yetişen biriktirici olmayan türlerde olması beklenen en yüksek değerden 100 kat daha fazla bir derişimi

temsil etmektedir . *Alyssum* türüne ait cinslerdeki Ni biriktirme oranı göz önüne alınarak 168 *Alyssum* türü incelenmiş ve 45 biriktirici tür belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 2.3.) [47].

Türkiye florasının önemi ise neredeyse tüm *Alyssum* türlerinin yarısından fazlasının ve yüksek seviyede metal biriktiren türlerin yarısından fazlasının Türkiye’ de yer almasından kaynaklanmaktadır. Türkiye’ de metal biriktirme özelliği *Brassicaceae*’ da sadece *Alyssum*’ da değil *Bornmulleria*, *Cochlearia*, *Thlaspi*, *Aethionema* ve *Centaurea* türlerinde de görülmektedir. Türkiye’ nin *Alyssum* türlerinden yüksek seviyede metal biriktirenler *A. callichroum* Boiss.& Bal., *A. caricum* T.R. Dudley & Hub.-Mor., *A. cassium* Boiss., *A. cypricum* Nyár., *A. dubertretii* Gomb., *A. floribundum* Boiss. & Bal., *A. murale* Waldst & Kit. subsp. *murale*’ ye ait iki varyete (var. *murale* ve var *haradjianii* (Rech) T.R. Dudley, *A. pterocarpum* T.R. Dudley ve *A. samariferum* Boiss & Hausskn. Aslında Türkiye’ nin batı ve ortasında en az bir nikel biriktiren *Alyssum* türünün olmadığı belli bir serpentin bölge bulmak çok zordur ve bunların pek çoğu da Türkiye’ ye endemiktir [48].

Alyssum corsicum 19. yüzyılın başlarında keşfedilmiş ve o zamanlarda Korsika’ya endemik olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte 1950’ lerde A. Huber-Morath bu bitkinin Türkiye’nin tahıl ve eski medeniyetlerce zenginlik gösteren batı Anadolu bölgesinde geniş yayılışlı olduğunu bulmuştur. *A. corsicum*’ un Korsika’ya gemilerle tahıl taşınması sırasında yabani ot tohumu olarak yanlışlıkla geldiği görülmektedir. Serpentin topraklara endemiktir, gelişimi ve tohum çimlenmesi için bu tip bir substrata ihtiyaç duyar [47].

A. corsicum’ un ülkemizde yayılış gösterdiği yerler İzmir, Kütahya, Burdur, Muğla, Denizli, Antalya civarıdır. Kayalık yerler ve stepelerde 0-1380 m arası yüksekliklerde yetişir. Çiçeklenme zamanı Mayıs, Temmuz ayları arasındadır. Yetiştigi topraklar genel olarak serpentin topraklardır (Resim 2.1) [49].



Resim 2.1. *Alyssum corsicum* Duby [50]

Serpentin [$\text{Mg}_3\text{Si}_2(\text{OH})_5$] öncelikle ultramafik (yüksek magnezyum ve demir içeren) kayalarda hakim bulunan kaya oluşturan yaygın bir mineraldir. Bu kayalardan kaynaklanan topraklarda gelişen farklı bodur tipteki vejetasyona serpentin vejetasyon denmektedir. Serpentin topraklar yüksek seviyede nikel (Ni), kobalt (Co) ve krom (Cr) ve düşük seviyede nitrojen (N), fosfor (P), potasyum (K), kalsiyum (Ca) ve yüksek Mg/Ca oranı ile karakterize edilirler. Bu uç kimyasal özellikler serpentin toprakları pek çok bitki türü için yaşanmaz kılar fakat endemik serpentin taksalarının evriminde de temel bir seçici güç oluşturur [51].

Nikel serpentin topraklarda toprak çözeltisindeki yüksek çözünürlüğüne bağlı olarak zehirliliğe sebep olabilmektedir. Serpentin kayalar kıraç olarak adlandırılırlar çünkü genelde seyrek bir vejetasyonu barındırırlar. temel elementlerce çok fakirdirler bu yüzden de tarımsal bir önemleri yoktur. Serpentinofitler kuraklık, besin stresi, yoğun ağır metaller ve yüksek yoğunlukta ışığa maruzdurlar. Serpentin habitatlar ve türler tüm dünyada tehdit altındadır. Habitat kaybına bağlı olarak pek çok serpentin endemik tür yok olma tehlikesi yaşamaktadır. Bu habitatlar biyoçeşitliliğin merkezidirler ve mutlaka korunmaları için stratejiler geliştirilmelidir [52].

Çizelge 2.3. Nikel biriktiren *Alyssum* türleri, biriktirme oranları ve dağılışları [53].

Nikel biriktirme oranları (kuru ağırlığında) (mg/kg)	Latince adı	Dağılımı
9090	<i>Alyssum akamasicum</i> B.L. Burt	Yayılış. Kıbrıs
4480	<i>Alyssum alpestre</i> L.	Yayılış. G. Avrupa
8170	<i>Alyssum anatolicum</i> Nyar.	Yayılış. Türkiye
29400	<i>Alyssum argenteum</i> All.	Yayılış. İtalya
10200	<i>Alyssum bertolonii</i> subsp. <i>Scutarium</i> Nyar.	Yayılış. Balkanlar
10900	<i>Alyssum callicrum</i> Boiss. and Balansa	Yayılış. Türkiye
16500	<i>Alyssum carcium</i> T.R. Dudley & Huber-Morath	Yayılış. Türkiye
20000	<i>Alyssum cassium</i> Boiss.	Yayılış. Türkiye
16300	<i>Alyssum chondrogynum</i> B.L. Blurt	Yayılış. Kıbrıs
13500	<i>Alyssum cilicium</i> Boiss. and Balansa	Yayılış. Türkiye
4900	<i>Alyssum condensatum</i> Boiss. And Hausskn.	Yayılış. Irak, Suriye
18100	<i>Alyssum constellatum</i> Boiss.	Yayılış. Türkiye
13500	<i>Alyssum corsicum</i> Duby	Yayılış. Korsika
10400	<i>Alyssum crenulatum</i> Boiss.	Yayılış. Türkiye
23600	<i>Alyssum cypricum</i> Nyar.	Yayılış. Kıbrıs
19600	<i>Alyssum davisianum</i> T.R. Dudley	Yayılış. Türkiye
11700	<i>Alyssum discolor</i> T.R. Dudley & Huber-Morah	Yayılış. Türkiye
16500	<i>Alyssum dubertretii</i> Gombault	Yayılış. Türkiye
4550	<i>Alyssum euboicum</i> Halacsy	Yayılış. Yunanistan
11500	<i>Alyssum eriophyllum</i> Boiss. and Hausskn.	Yayılış. Türkiye
3960	<i>Alyssum fallacinum</i> Boiss. and Balansa	Yayılış. Girit adası
7700	<i>Alyssum floribundum</i> Boiss. and Balansa	Yayılış. Türkiye
7390	<i>Alyssum giosnanum</i> Nyar.	Yayılış. Türkiye
12500	<i>Alyssum heldreichii</i> Hausskn.	Yayılış. Yunanistan.
13500	<i>Alyssum huber-morathii</i> T.R.Dudley	Yayılış. Türkiye
22400	<i>Alyssum lesbiacum</i> (P. candargi) Rech.f	Yayılış. Yunanistan
13700	<i>Alyssum markgrafii</i> O.E. Schulz	Yayılış. Arnavutluk
24300	<i>Alyssum masmenkaeum</i> Boiss.	Yayılış. Türkiye
7080	<i>Alyssum murale</i> Wealdst and Kit	Yayılış. Balkanlar
4590	<i>Alyssum obovatum</i> (C.A. Mey) Turez	Yayılış. Rusya
7290	<i>Alyssum oxycarpum</i> Boiss. And Balansa	Yayılış. Türkiye
7600	<i>Alyssum peltarioides</i> subsp. <i>Virgatifforme</i> Nyar. T.R. Dudley)	Yayılış. Türkiye
21100	<i>Alyssum pinifolium</i> (Nyar.) T.R. Dudley	Yayılış. Türkiye
22200	<i>Alyssum pterocarpum</i> T.R. Dudley	Yayılış. Türkiye
12500	<i>Alyssum robertianum</i> Bernard ex Godronand Gren	Yayılış. Korsika
7860	<i>Alyssum penjwinensis</i> T.R. Dudley	Yayılış. Irak
18900	<i>Alyssum samariferum</i> Boiss. & Hausskn.	Yayılış. Samar
10 000' e kadar (yapraklarda)	<i>Alyssum serpyllifolium</i>	Yayılış. Portekiz
1280	<i>Alyssum singarense</i> Boiss. And Hausskn.	Yayılış. Irak
10200	<i>Alyssum syriacum</i> Nyar.	Yayılış. Suriye
6600	<i>Alyssum smolikanum</i> Nyar.	Yayılış. Yunanistan
3420	<i>Alyssum tenium</i> Halacsy	Yayılış. Yunanistan
11900	<i>Alyssum trapeziforme</i> Nyar.	Yayılış. Türkiye
17100	<i>Alyssum trodii</i> Boiss.	Yayılış. Türkiye
6230	<i>Alyssum virgatum</i> Nyar.	Yayılış. Türkiye

2.7. Bitkilerde Metal Birikimi İçin Geliştirilen Mekanizmalar

Pek çok ağır metal yetiştirme ortamında düşük derişimlerde (mikrobesleyiciler: Cu, Zn, Fe, Mn, Mo, Ni, Co) bulundukları takdirde bitkiler ve hayvanlar için gereklidir. Sınır derişim geçildiği anda zehirli hale gelirler ve bu andan itibaren mikrobesleyici terimi yerine ağır metaller olarak adlandırılırlar [54].

Çeşitli enzimlerin ve bazı fizyolojik olarak aktif moleküllerin yapısında yer aldıklarından mikrobesleyiciler, gen ifadesi; protein, nükleik asit, büyüme maddeleri, klorofil ve sekonder metabolit biyosentezi; karbohidrat ve lipid metabolizması; stres toleransı gibi olaylar için gereklidir. Mikrobesleyiciler aynı zamanda çeşitli membran ve diğer hücrel bileşenlerin fonksiyonel bütünlüğünde de yer alırlar [55].

Ağır metallerin aşırı miktarlarının varlığında ortaya çıkan toksiklik belirtileri hücrel ve moleküler seviyede bir çok ilişkiye dayalı olarak ortaya çıkabilir. Toksiklik, metallerin proteinlerdeki sülfidril gruplarına bağlanması böylece bir aktivitenin önlenmesi, bir yapının bozulması ya da temel bir elementin yetersizlik etkilerine bağlı olarak yer değiştirmesi sonucu olabilir. Ayrıca ağır metal fazlalığı, serbest radikallerin ve reaktif oksijen türevlerinin ortaya çıkmasına da sebep olabilir [56].

Bitkiler diğer tüm organizmalar gibi farklı hücrel bölmelerinde temel metal iyonlarının sabit derişimlerini sürdürebilmek ve temel olmayan metal iyonlarına maruziyetten kaynaklanan hasarları en aza indirmek için homeostatik mekanizmalara sahiptirler. Metal taşınımı, şelatlama, değiş tokuş ve izolasyon aktivitelerinin oluşturduğu düzenli bir ağ, metal iyonlarının alımı, dağılımı ve toksikliğinin giderilmesi için iş görür [57].

Ağır metallerin yüksek bitkiler tarafından hiperakümüasyonu kompleks bir olgudur. Pek çok basamak içerir bunlardan en önemlileri metallerin kök hücrelerinin plazma membranından taşınımı, ksilem yüklemesi ve translokasyon ayrıca metallerin tüm

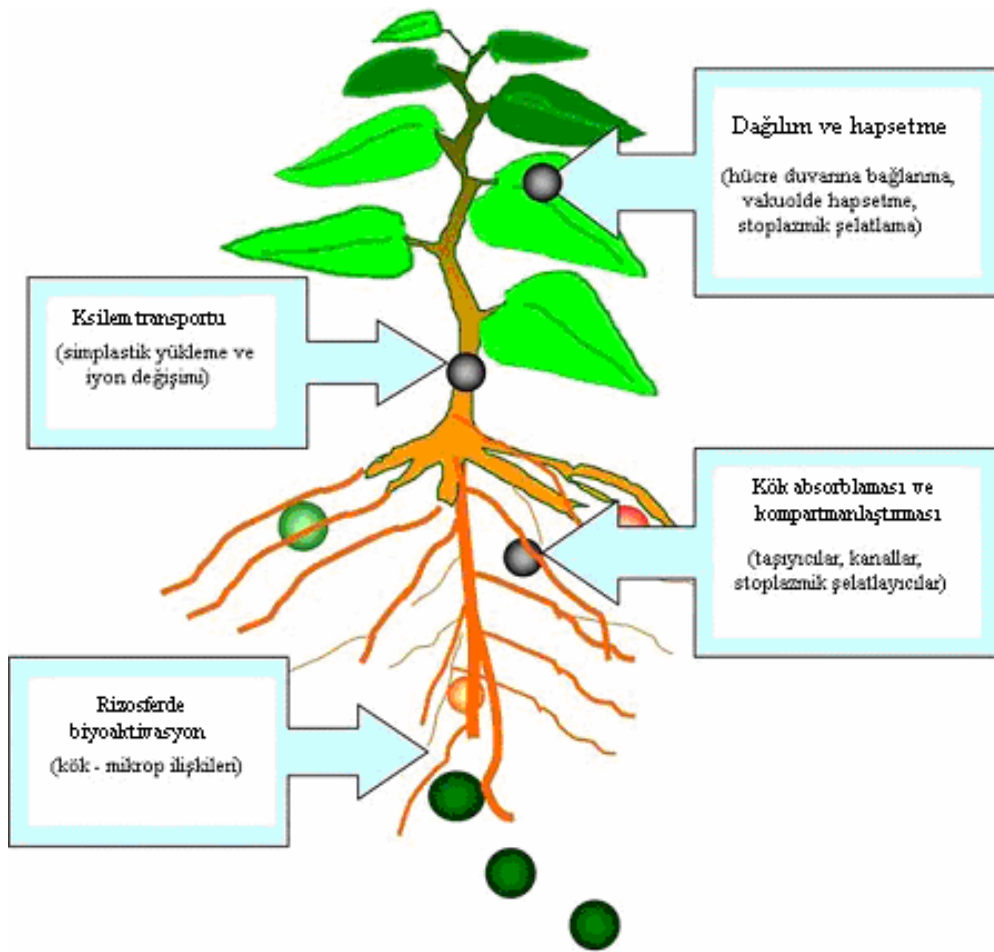
bitkide ve hücresel seviyelerde toksikliğinin giderilmesi ve tutulumudur (Şekil 2.2) [58].

Bitkilerde metal toleransı için geliştirilen hücresel mekanizmalar iki temel stratejide incelenebilir. Birincisi toksik metal iyonlarının stoplazmadaki derişimini metalin plazma membranından taşınmasını engellemek suretiyle düşük tutmaktır. Bu ya metal iyonlarının hücre duvarına daha fazla bağlanması ile, ya metalin değişmiş iyon kanallarından indirgenmiş alımı ile ya da metalin hücreden aktif akış pompaları ile dışarı pompalanması ile olur. İkincisi ise stoplazmaya giren ağır metal iyonlarının şelatlama ile aktifliği giderilerek ya da daha az toksik, daha rahat bölmelendirilebileceği bir şekle dönüştürülmesi suretiyle toksikliğinin giderilmesidir [59].

2.7.1. Bitkinin metalleri topraktan alışı

Metal iyonlarının bitkiler tarafından alınabilmesi için biyolojik olarak elde edilebilir olmaları gerekmektedir. Bitkiler mikrobeseleyici metalleri biyolojik olarak elde edilebilir hale getirmek için bazı mekanizmalar geliştirmişlerdir. Örneğin pek çok bitki, metal şelatlayıcı olarak davranan organik asitler salgılayarak (malat, sitrat vs) rizosfer pH' sını azaltmakta ve metal katyonlarını daha elde edilebilir hale getirmektedir [60]. Bitkiler rizosfer pH' sını kök hücre membranındaki proton pompaları yoluyla da etkileyebilir [61].

Metal iyon derişiminin dengelenmesinde diğer bir etken de taşıyıcı moleküllerdir. Çeşitli taşıyıcı moleküllerin varlığı, farklı ilgi ve kapasitelere sahip metal alım sistemlerinin oluşmasına sebep olmuştur. Buna ilave olarak taşıyıcı moleküller vakuoller gibi iç membranlarda yer alarak metallerin depolanmasını da düzenlerler. Belli bir hücre tipine özgü olabilirler ve bir taşıyıcı molekül birden fazla metal iyonunu da taşıyabilir [9].



Şekil 2.2. Bitkilerin ağır metal biriktirmesinde rol oynayan temel süreçler [62].

Membranlar, taşıyıcı moleküller sayesinde içinde metal derişimlerinin düzenlendiği bölmeleri ayırmak için hizmet ederler [63]. Bazı taşıyıcılara örnek olarak; Zn, Cu, Cd, Pb alımında etkili Sistein-Prolin-X ATPaz (CPx-ATPaz)' lar, Fe ve Cd alımında etkili doğal dayanıklılıkla ilişkili makrofaj protein (Nramp), Zn, Co, Cd alımında etkili katyon difuzyon kolaylaştırıcı (CDF) ve Fe, Zn, Mn, Cd alımında etkili çinko ve demirle düzenlenen taşıyıcı proteinler (ZIP ailesi) örnek gösterilebilir [56]. Doğal demir şelatlayıcılar olan fitosideroforların özellikle tahıllardan Fe yetersizliğinde salınarak topraktaki Cu, Mn Fe, Zn hareketliliğini arttırdığı görülmüştür [64]. Fitosideroforlar peptid olmayan bağlarla birleştirilmiş üç metioninden oluşan nikotinamin tarafından sentezlenir [65].

Bitki kökleri, toprak mikropları ve bunların birbirleriyle olan ilişkisi proton, organik asitler, fitoşelatinler ve enzimlerin salgılanmasını artırarak biyolojik metal alınabilirliğini arttırabilir. Herhangi bir yerdeki topraktan farklı olarak rizosferde büyük derişimlerde mikroorganizma populasyonları yer almaktadır. Bunlar daha çok bakteri ve mikorhizal fungilerdir. Kökte kolonileşen bu bakteriler ve mikorhizalar ilk aşamada topraktaki metalin alınabilirliğini değiştiren redoks değişimlerini katalizlerler [62].

2.7.2. Metal iyonlarının şelatlanması ve tutulması

Yaprak ksileminden yaprak hücrelerine iletim sırasında inorganikler özel membran taşıyıcı proteinlerce alınır. Organikler yaprak simplastına gövde ksileminden basit difüzyonla girer ve bunun oranı kirleticilerin kimyasal özellikleri ile ilgilidir. Yaprak simplastına girdikten sonra kirletici belli bitki dokularında veya hücresel kısımlarda bölmelenir. Genelde toksik kirleticiler önemli hücresel süreçlere en az zarar verecekleri kısımlarda tutulurlar. Hücresel seviyede kirleticiler genel olarak vakuol ya da hücre duvarında biriktirilmektedir [66] doku seviyesinde ise epidermis ve trikomlarda biriktirilebilirler [67].

Kirleticiler dokularda hapsedildiğinde şelatörlerce bağlanırlar veya konjugatlar oluştururlar. Metal tutulmasında görev alan temel şelatörler fitoşelatinler (PC) ve metalotioneinlerdir (MT) [68]. Bitkilerdeki MT' ler ve PC' ler yüksek oranda sistein sülfhidril grubu içerirler bunlar ağır metal iyonlarına bağlanıp onları hapsederek kararlı kompleksler oluştururlar [14].

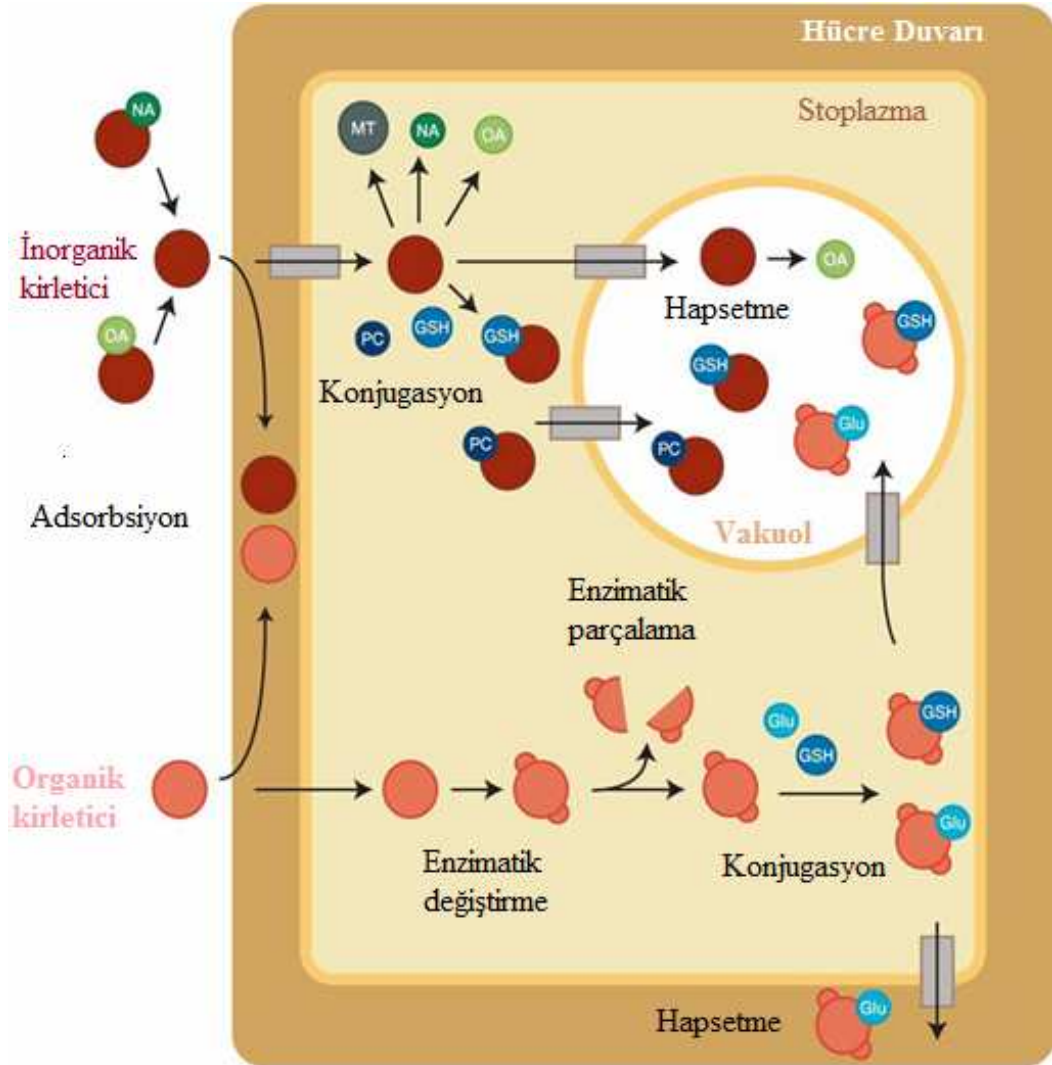
Bazı polipeptidler metal bağlayan böbrek proteinlerinin pek çok özelliğini gösterdiklerinden metalotionein olarak adlandırılırlar bu özellikler; yüksek metal içeriği, aromatik asitler ve histidin içermeyen yüksek sistein içeriği, x' in daha çok amino asit olduğu Cys-x-Cys dizilerinin bulunması, karakteristik metal tiolat ve metal tiolat kümelerinin spektroskopik özelliklerinin gösterilmesidir [69]. Metalotioneinlerin oluşumu Cd, Cu, Zn, Pb, Hg, Bi, Ag, Au gibi pek çok metal tarafından uyarılabilmektedir [70].

Metalotioneinler genler tarafından kodlanırken fitoşelatinler (PC) enzimatik olarak sentezlenmektedir. Fitoşelatinler monokotiledonlar, dikotiledonlar, gimnospermiler ve algler olmak üzere geniş çeşitlilikteki bitki türlerinde tespit edilmiştir [71]. Fitoşelatinler glutamat, sistein ve glisinden oluşan basit γ -glutamil peptidlerden oluşur. Bu peptidler ağır metallerin varlığında glutatyondan sentezlenmektedir. Bunu katalizleyen enzim ise γ -glutamil sistein dipeptidil transpeptidazdır. Fitoşelatinler pek çok metal ve çoklu-atomik anyon tarafından uyarılır ve farklı şekillerde adlandırılır [72].

Bitkilerin ağır metallere toleransında fitoşelatinler tarafından gerçekleştirilen diğer bir yöntem de metalin depolanmak üzere vakuollere etkili taşınmasıdır. Fitoşelatin sentezinde yer alan enzimler stoplazmada bulunurken fitoşelatinler aynı zamanda vakuolde de bulunabilmektedir. Bu da vakuollere etkili bir taşınmanın olduğunu göstermektedir [73]. Bitki hücreleri içinde fitoşelatin-metal kompleksleri glutatyon (GSH) veya fitoşelatinlerce bağlanır ve tonoplastta yer alan ABC tip taşıyıcı ile vakuole giriş çıkışları sağlanır (Şekil 2.3) [74].

2.7.3. Antioksidant enzimler

Reaktif oksijen türevleri; oksijen iyonları, serbest radikaller ve peroksitleri içerir. Genelde bunlar çok küçük moleküllerdir ve en dış kabuklarında eşleşmemiş elektron çifti bulundurlar bu yüzden de yüksek derecede reaktiftirler. Reaktif oksijen türevleri oksijenin normal metabolizmasının doğal bir yan ürünü olarak oluşurlar ve hücre sinyalinde önemli rolleri vardır. Bununla birlikte çevresel streslere maruziyet sırasında seviyeleri oldukça artabilir, bu da hücre yapılarında oksidatif stres olarak bilinen pozisyona götürecek önemli hasarlara neden olur [75].



Şekil 2.3. Bitki hücrelerinde inorganik ve organik kirleniciler için tolerans mekanizmaları [68].

Toksikliğin giderilmesi genelde konjugasyonla başlar, va kirlenicinin en az zarar verebileceği yer olan vakuol ve apoplastta aktif tutulumla devam eder. Burada belirtilen şelatörler;

GSH : glutatyon,

Glu : glukoz,

MT : metalotionein

NA : nikotinamin,

OA : organik asitler

PC : fitoşelatinler

Aktif taşıyıcılar oklu kutucuklar olarak gösterilmiştir.

Reaktif oksijen türevlerinin belirgin miktarları çeşitli hücresel bölmelerde ve organellerde normal koşullarda bile üretilmektedir ancak reaktif oksijen türevlerinin zehirli etkisi miktarlarıyla bağlantılı olarak artmaktadır. Bununla baş edebilmek için organizmalar çok etkili savunma mekanizmalarına sahiptir ve bunlara antioksidatif veya antiosidant sistemler adı verilmektedir. Bu sistemler enzimatik olmayan ve enzimatik yapı taşlarından oluşur.

Enzimatik olmayan antioksidantlar genel olarak tripeptidler; glutatyon, sistein, hidroksikuinoin, askorbat (C vitamini), lipofilik antiosidantları; α -tokoferol, karotenoid pigmentler, alkaloidler ve bazı diğer bileşiklerdir [76].

Enzimatik antioksidant bileşikler reaktif oksijen türevlerini temizleyen, nötralleştiren ya da yok eden katalaz, peroksidaz, askorbat peroksidaz, superoksit dismutaz, glutatyon reduktaz, monodehidroaskorbat reduktaz, dehidroaskorbat reduktaz gibi enzimleri içerir. Enzimatik olmayan ve enzimatik bileşikler reaktif oksijen türevlerinin etkili bir şekilde yok edilmesi için yakın koordinasyon içinde çalışırlar [13].

Metallerin toksik olmalarının bir nedeni de oksidatif strese neden olmalarıdır. Metal stresi; askorbat, glutatyon ve bunların biyosentezinde ve indirgenmesinde görevli enzimler gibi serbest radikal temizleyici moleküllerden oluşan antioksidatif sistemleri aktive eder. Ağır metaller solunum sistemine dahil olarak ve bitkilerde özel fotosentetik süreçleri bozarak reaktif oksijen türevlerinin oluşumuna sebep olabilmektedir [77]. Metallerin toksik etkilerini gidermede kullanılan biyomoleküller çizelge 2.4.'te özetlenmiştir.

2.8. Bitkilerde Metal Birikiminin Belirlenmesi

Yüksek seviyede metal biriktiren bitkilerde metallerce özellikle de nikelce zenginleşme büyük oranda yapraklarda görülmektedir bu yüzden son zamanlarda yapılan çalışmaların konusunu büyük oranda yaprak dokusu oluşturmaktadır. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile enerji dağılımlı X ışını analizini (EDX)

birleştiren mikroskop tekniklerinden hiperakümülatör bitkilerde metalin yerleştiği bölgeleri belirlemek için üst düzeyde yararlanılmaktadır [78].

Son zamanlardaki çalışmalar yüksek seviyede metal biriktiren bitkilerde metal bölmelendirilmesi için pek çok hücre tipi ve yapının yer aldığını ve bir tür için elde edilen yerleşim bilgisinin diğer bir türe uygulanamayacağını göstermektedir [78]. Tüm bitkide depolanan metal miktarı bu elementler için belirleyici ve kimyasal olarak kararlı havuzlar olarak iş gören dokuların metal tutma kapasitesine de bağlıdır [79].

Çizelge 2.4. Biyomoleküllerce metallerin toksik etkilerini gidermede kullanılan mekanizmalar [80].

Mekanizma	Biyomolekül
Proteinlerin uyarılması	Metalotionein Isı-şok proteinleri Fitoşelatinler Ferritin Transferrin
Antioksidant enzimlerin uyarılması ve aktivasyonu	Superoksit dismutaz Katalaz Glutasyon peroksidaz
Organik asitlerin yüksek çevrimi	Fitat, malat, sitrat, oksalat, suksinat, asonitat α -ketoglutarat

Bitkilerde metal birikim miktarının ve yerleşiminin belirlenebilmesi için kullanılmakta olan yöntemler yaklaşık 100 yıllık bir gelişim süreci geçirmiştir. 1930' lu yıllardan bu yana kullanılmakta olan ve sonradan geliştirilen tüm yöntemlere temel oluşturan Emisyon Spektrometresi (ES), 60 kimyasal elementin belirlenmesini yeterli duyarlılık ve kesinlikte yapabilmektedir. 1970 sonları ve 1980 başlarında Endüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS) geliştirilmiştir Bu yöntem

sayesinde elementler iyonlaştırılmış ve iyonlar kütlelerine göre ayrıştırılıp, sayılarak ölçülmüştür. Geliştirilen cihaz ng/g seviyesinde ölçüm yapabilmektedir [47].

Son yıllarda geliştirilmiş olan ve metal, cam, seramik gibi maddelerin elemental ve kimyasal analizlerinde kullanılan X ışını floresans spektroskopisi (XRF) yöntemi, jeokimya, adli tıp ve arkeoloji gibi sahalardaki araştırmalarda kullanılmaktadır. Elementel kompozisyonu belirlemede kullanılan önemli yöntemlerden biridir.

Yöntemin prensibinde atoma yüksek enerjili bir X-ışını fotonu düşürülerek atomdan fotoelektronlar kopartılması vardır. Bu koşulda atomun yörüngelerinde bir ya da daha fazla elektron boşlukları oluşacak ve kararsız olan atom dış yörüngelerdeki elektronların boşlukları doldurması ile kararlı duruma gelecektir. Fakat her bir elektron boşluğu doldurulurken atom orbital enerji farkı ile orantılı bir foton yayınlayacaktır. Bu karakteristik foton enerjileri algılanarak elementlerin kimyasal kompozisyonu nitel ve nicel olarak hesaplanabilir (Resim 2.2) [81].



Resim 2.2. XRF cihazı [81].

Taramalı elektron mikroskopları bir elektron demeti yaratabilmek için bir katod ve bunu odaklayabilmek için manyetik lenslerle donatılmıştır. Elektronlar, incelenen örneği oluşturan atomlarla ilişkiye girerken, örneğin bilgisini taşıyan sinyaller yayarlar ve bu sinyaller katot ışın tüpünde bir resme dönüştürülür, bu resimler dijital olarak çekilir ve bilgisayar ekranında görülür.

SEM' ler, 1960' lardan bu yana da elemental analiz yetenekleri ile desteklenmektedirler. SEM-EDX (Taramalı Elektron Mikroskobu-Enerji Dağılımlı X-ışını spektroskopisi) tekniğinde, X-ışını enerjisini voltaj sinyallerine dönüştüren bir dedektör bağlanır ve bu bilgi bir vuruş işlemcisine yollanır. Burada sinyaller ölçülür ve verilerin gösterilmesi ve sonuçlandırılması için analiz cihazına yollanır. (Resim 2.3) [82].



Resim 2.3. SEM-EDX cihazı

Bu metotlar kullanılarak çeşitli biriktirici türlerde bulunan metal çeşitleri ve yerleşiminin belirlenmesi için gerçekleştirilen çalışmaların sonuçları çizelge 2.5'te özetlenmiştir.

Çizelge 2.5. Yüksek seviyede metal biriktiren bitkilerde doku / hücre seviyesinde metal dağılımı [62].

Doku/organ	Element	Bitki türü
Trikom	Zn, Cd	<i>Arabidopsis halleri</i>
	Cd	<i>Brassica juncea</i>
	Ni	<i>Alyssum lesbiacum</i>
Epidermal	Zn	<i>Thlaspi caerulescens</i>
	Ni	<i>Alyssum</i>
Mezofil	Zn	<i>Arabidopsis halleri</i>
	Cd	<i>Sedum alfredii</i> H.
Hücre duvarı	Ni	<i>Thlaspi goesingense</i>
	Cu	<i>Elsholtzia splendens</i>
	Zn	<i>Sedum alfredii</i> H.
	Pb	<i>Sedum alfredii</i> H.
Vakuol	Zn	<i>Thlaspi caerulescens</i>
	Zn	<i>Thlaspi caerulescens</i>
	Cd	<i>Sedum alfredii</i> H.
	Zn	<i>Sedum alfredii</i> H.

2.9. Organizmalarda Dış Etkenlerle Ortaya Çıkan Değişikliklerin Protein ve Gen Düzeyinde Belirlenmesine Yönelik Bazı Yöntemler

Genom üzerine yapılan çalışmalar sayesinde organizmaların genetik bilgileri karşılaştırılmakta, aralarındaki benzerliklerin evrimsel temelleri araştırılmakta ve organizmaların ürettikleri proteinlerin çeşit, sayı ve işlevleri hakkında bilgi sahibi olunmaktadır. Bu amaçla geliştirilen yöntemler arasında; RNA (northern) blot, yarı niceliksel ve niceliksel ters yazılım (RT), rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PZR), polimeraz zincir reaksiyon (PZR) ve son yıllarda uygulanmaya başlayan çıkarımlı hibridizasyon, farkımsal gösterim, seri gen ifadesi analizleri (SAGE), ifade olan gen parçalarının DNA dizilerinin belirlenmesi (EST) ve mikroarray teknolojisi; protein seviyesinde ise sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE), iki boyutlu jel elektroforez, kütle spektrometresi (MALDI-TOF) ve protein arrayler vardır [83].

Son teknikler sayesinde birçok genin aynı anda farklı koşullarda ifadeleri hakkında bilgi edinilmiştir. Genom baz dizileri tamamlanan veya belirlenmekte olan organizmalara ait genetik bilgiler DNA baz dizisi düzeyinde gen bankaları gibi bir veri tabanında yer almaya başlamıştır. Üretilen bu bilgiler başta insan ve hayvan sağlığı olmak üzere bitki biyolojisi, yetiştirme ve ıslahı konularındaki gelişmelere de ışık tutmaktadır. İşlevsel genom çalışmaları sayesinde yüzlerce ve hatta binlerce genin hücrede hangi fonksiyonlara sahip oldukları hakkında bilgi sahibi olunabilecek ve bu bilgiler ışığında daha önceden aşılamayan biyolojik sorunlara çözümler üretilecektir [84].

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi biyokimya, genetik ve moleküler biyolojide proteinleri elektroforetik hareketliliklerine göre ayırmakta kullanılan bir tekniktir. Analizi yapılacak protein çözeltisi öncelikle iyonik olmayan deterjan SDS ile karıştırılır böylece ikincil ve disülfid bağı içermeyen üçüncül protein yapıları denatüre edilir ve her bir proteine moleküler ağırlığı ile orantılı olarak bir negatif yük yüklenir. SDS olmadan benzer moleküler ağırlıktaki farklı proteinler elektrik yüklerindeki farklılıktan dolayı elektroforezde farklı yönlerde hareket edeceklerdir çünkü her bir proteinin primer yapısına bağlı olarak farklı bir izoelektrik noktası ve moleküler ağırlığı vardır [85].

Rastgele çoğlatılmış polimorfik DNA ve buna dayalı DNA parmakizi metotları genom seviyesinde doğrudan genetik farklılıkları ortaya koyabilmektir. Diğer tekniklerle kıyaslandığında uygulanması daha kolay, daha az DNA gerektiren, ve genomik bilgiye ihtiyaç olmadan da gerçekleştirilebilen bir yöntemdir. Genel olarak RAPD reaksiyonları yaklaşık 10 bp uzunluğundaki rastgele tasarlanmış tek primerlerle gerçekleştirilir ve ortaya çıkan fragmentler agaroz jelde görüntülenir. Sonuç DNA profilleri bireyler arasında 1) bağlanma bölgelerinin varlığı veya yokluğuna göre 2) primerin tam olarak uyumluluk sağlayıp sağlamamasına göre 3) bağlanma bölgeleri arasındaki uzaklığa göre farklılıklar gösterebilmektedir. Bu yüzden mutasyonlar, inversiyonlar, delesyonlar, eklenmeler ya da kromozomal tekrar düzenlemeleri primer bağlanmasını etkileyen faktörlerdir. Farklı moleküler

ağırlıktaki RAPD bantları ayrı birer lokus olarak varlık ve yokluklarına göre değerlendirilir ayrıca bant yoğunluklarındaki farklılıklar da gözlenebilir [86].

Tüm yaşayan organizmalar genomlarında kodlanan, binlerceden onbinlerceye kadar değişen sayıda benzersiz genlere sahiptir ve bunların sadece küçük bir kısmı belki de %15'i herhangi bir hücrede ifade edilmektedir. Bu nedenle hayat sürecini tayin eden, genlerin ifadesindeki geçici ve sınırlı düzenlemelerdir. En önemli problem herhangi bir hastalık ya da stresin moleküler doğasını anlamak ve hemen ardından gerçekçi tedaviler planlamak için o anda farklı ifade edilen genleri belirlemek ve karakterize etmektir.

Farklılaştırıcı gen ifadesi gösterimi ilk olarak 1992' de Arthur Pardee ve Peng Liang tarafından bulunmuştur ve değişmiş gen ifadesinin hızlı, kesin ve duyarlı belirlenmesini sağlamaktadır. Basitliği, duyarlılığı ve üretkenliği sebebiyle mRNA farklılaştırıcı gösterim metodu; gelişim biyolojisi, kanser araştırmaları, sinirbilimi, patoloji, endokrinoloji, bitki fizyolojisi ve daha birçok sahada geniş ölçüde ve hızlı uygulamalar bulmaktadır [87].

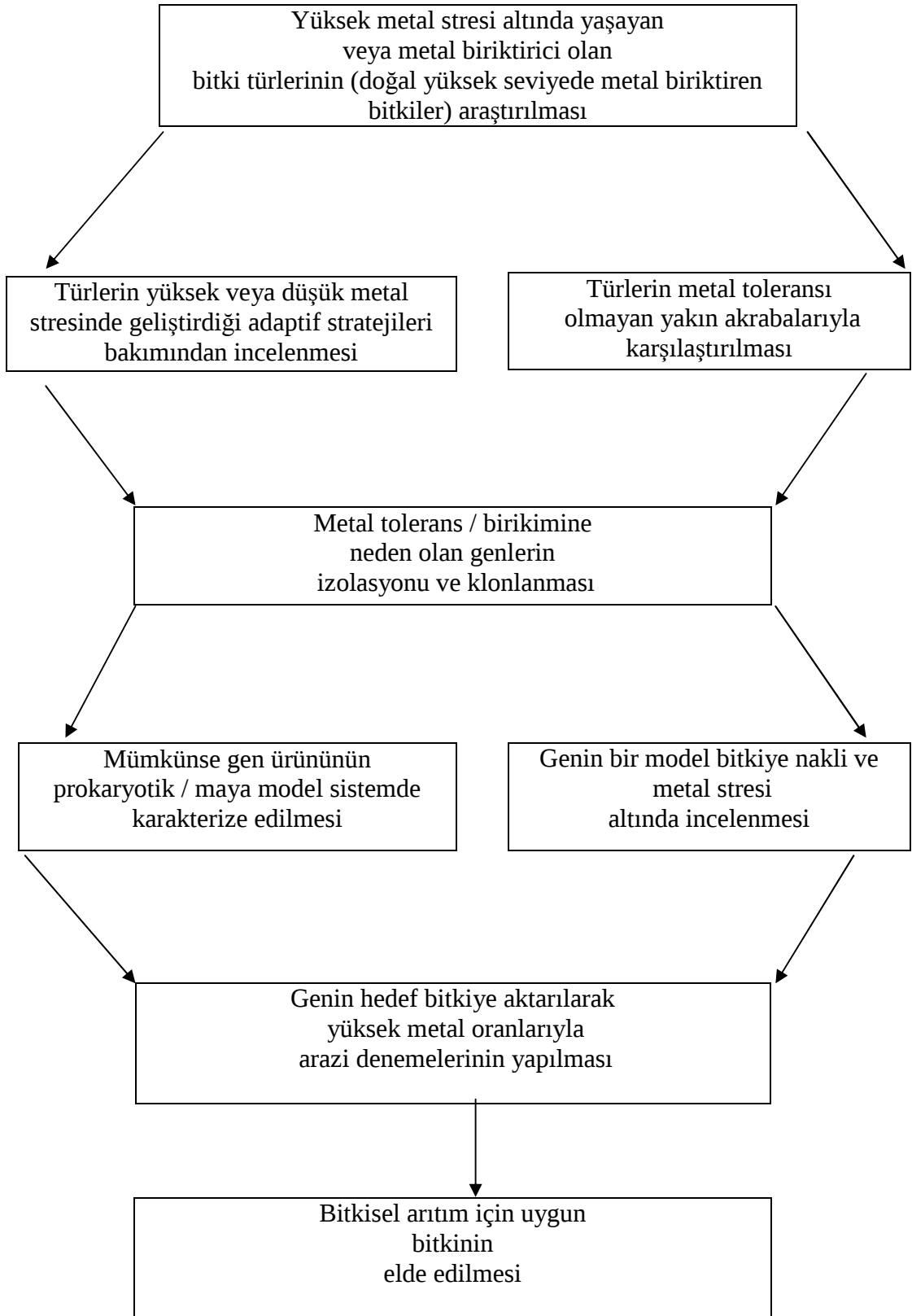
2.10. Bitkisel Arıtımda Genetik Mühendisiliği Uygulamaları

Yüksek seviyede metal biriktiren bitkiler küçük boyutları ve yavaş büyümeleri ile bilinirler. Bu özellikler gerçekleşecek metal özütleme üzerine ters etkiler yapmaktadır ve mekanik hasat gibi etkili tarımsal uygulamaların yer almasını sınırlandırmaktadır. Tüm bu problemlerin üstesinden gelmek ve bitkilerin metal özütlemeini geliştirmek için geleneksel ıslah yaklaşımları ileri sürülmüştür. Ancak bu yaklaşımların başarısı bitkiler arasındaki anatomik farklılıklardan kaynaklanan eşeysel uyumsuzluklar nedeniyle engellenmektedir [9]. Son yıllarda bu sınırlılıkları gidermek için biyoteknolojik yöntemler kullanılmaktadır. Bitkisel arıtımda genetik mühendisliği uygulamalarında temel olarak izlenen süreç şekil 2.4' te özetlenmektedir.

Metallerin bitkisel artımında önem kazanan bitki özellikleri metal toleransı ve metal biriktirilmesidir ve bu özellikler de metal alımı, kökten gövdeye iletim, hücre içi hapsedme, kimyasal değişiklikler ve genel strese dayanıklılık gibi süreçlere dayanmaktadır. Eğer bu tolerans ve biriktirme süreçlerinde hangi moleküler mekanizmaların yer aldığı ve bu mekanizmaları hangi genlerin kontrol ettiği bilinirse hepsi bir avantaj olarak kullanılabilir [88].

Genetik mühendisliği çalışmalarında insanda, farede, mayada ya da prokaryotlarda ifade edilmekte olan metal tolerans genleri belirlenerek bitkilere aktarılabildiği gibi, bitkilerde belirlenen bazı genler de biyokütle avantajına sahip başka bitkilere aktarılabilmektedir. Şimdiye kadar gerçekleştirilen bazı gen aktarım çalışmalarına örnek olarak insan *MT2* geninin Cd toleransını arttırmak üzere kolzaya, bezelye *MT* geninin Cu birikimini arttırmak üzere *Arabidopsis thaliana*' ya, mayada ifade edilen *CUP1* geninin Cd birikimini arttırmak için karnabahara aktarılması gösterilebilir. Bitkilerde demir alımını arttırmak için demir reduktaz genini kodlayan iki maya geni tütünde ifade edilmiş ve demir alımının 1,5 kat arttığı görülmüştür.

Başarılı gen aktarım çalışmalarından birisi de yüksek civa oranları bulunduran topraklarda bulunan nörotoksik metilciva bileşiğinin toksikliğini gidermek için bakterilerde bulunan *merA* ve *merB* genlerinin kavağa aktarılmasıdır. Bu sayede civanın toksik formu olan Hg^{+2} daha az toksik formu Hg^0 a dönüştürülerek atmosfere verilmektedir [9].



Şekil 2.4. Bitkisel artımda genetik mühendisliği sürecinin uygulanması [88].

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

Çalışmanın materyalini oluşturan *A.corsicum* (*Brassicaceae*) türünün tohumları Prof. Dr. Nezaket Adıgüzel' in koleksiyonundan elde edilmiştir. Tohumların elde edildiği bölge Kütahya: Tavşanlı-Harmancık mevki, yükseklik 1000 m' dir.

3.1.2. Kullanılan besiyeri, tampon ve çözeltiler

Doku kültüründe bitki gelişimi deneylerinde kullanılan maddeler

Nitrik asit çözeltisi: %10' luk hazırlanmıştır.

Hipoklorit (çamaşır suyu): % 20' lik hazırlanmıştır.

Murashige Skoog (MS) besiyeri (pH 5,8): 4,4 g/lt MS hazır besi yeri (Sigma), %30 sukroz (Sigma), %7 agar (Sigma) distile suda çözülerek otoklavda steril edilir.

NiCl₂.6H₂O: 100 mM stok hazırlanmıştır. MS besiyerine filtre sterilizasyonunun ardından 0,01 mM, 0,04 mM, 0,2 mM oranlarında karıştırılmıştır.

XRF ve SEM-EDX ölçümlerinde kullanılan maddeler

Vaks: Toz olarak kullanılmıştır.

Gluteraldehid: %2,5' luk hazırlanmıştır.

Antioksidant enzim aktivitesi ölçümü için kullanılan maddeler

Fosfat tamponu: 50mM KH₂PO₄ ve 50 mM K₂HPO₄ maddeleri pH 7,6 olacak şekilde birbirleri ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

Enzim ekstraksiyon tamponu (pH 7,6): 50 mM fosfat tamponu içinde 1 mM NaEDTA, 1 mM askorbik asit olacak şekilde hazırlanmış, otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır.

Bovin Serum Albumin (BSA): 10 mg/ml (Sigma) stok hazırlanmıştır.

Bradford reagent: Merck kullanılmıştır.

EDTA-H₂O₂: 12 mM H₂O₂ içine 10 mM olacak şekilde EDTA karıştırılarak hazırlanmıştır.

L (-) Askorbik asit: 0,25 mM hazırlanmıştır.

H₂O₂: 100 mM hazırlanmıştır

Glutasyon: 0,5 mM hazırlanmıştır.

NADPH: 0,12 mM hazırlanmıştır.

Yapraktan toplam protein izolasyonu için kullanılan maddeler

Tris- HCL (pH 7,8): 0,2 M hazırlanmıştır.

Bluejuice: %9 2-merkaptotanol, % 30 sukroz, %4,5 SDS, %0,01 bromfenol blue olacak şekilde distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi için kullanılan maddeler

%30 Akrilamid çözeltisi: %29,2 akrilamid ile %0,8 N,N' metilen-bis-akrilamid distile su içinde çözülerek hazırlanmış daha sonra çözelti kurutma kağıdı ile süzölmüştür.

Tris-HCL (pH 6,8): 1 M hazırlanmıştır.

SDS: %10' luk hazırlanmıştır.

Amonyum persulfat: %10' luk hazırlanmıştır.

Tris (pH 8,6): 1,5 M hazırlanmıştır.

Yürütme tamponu (5X): 25 mM Tris, 250 mM glisin, %1 SDS, distile su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

Jel yıkama çözeltisi: %10 oranında %100' lük TCA (trikloroasetik asit), %33 metanol distile suda karıştırılarak hazırlanmıştır.

Stok boya çözeltisi: % 0,1 gr comassie brilliant blue G-250, % 4,6 HCl distile suda karıştırılarak hazırlanmıştır.

Jel boyama çözeltisi: %83 boya stok çözeltisi, %9,7 10N KOH, %6,9 oranında %100' lük TCA karıştırılarak hazırlanır.

DNA izolasyonu için kullanılan maddeler

CTAB tamponu: 50 mM Tris-HCL, 10 mM EDTA, 0,7 M NaCl, %1 CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) distile su içinde çözülerek hazırlanır. Otoklavda steril edildikten sonra kullanılır.

Kloroform-izoamilalkol (24:1): 24 ml kloroform, 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlanır.

TE çözeltisi: 10 mM Tris, 1 mM EDTA distile suda karıştırılarak hazırlanır. Otoklavda steril edildikten sonra kullanılır.

RAPD-PZR' da kullanılan maddeler

Taq polimeraz tamponu (10X): 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCL, 1mg/ml jelatin, (Fermentas).

MgCl₂: 25 mM, (Fermentas).

*dNTP mix :*10 mM (dATP,dGTP, dCTP, dTTP) karışımı, (Fermentas).

Taq polimeraz enzimi: 5 u/ µl, (Fermentas).

Primerler: 0,2 µM primer. Çizelge 3.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. RAPD-PZR' da kullanılan primerler ve dizileri

Primerin Adı	Primerin Dizisi (5'.....3')	% G+C İçeriği
B7	GGTGACGCAG	70
OPA02:	TGCCGAGCTG	70
OPA17	GACCGCTTGT	60
OPB08	GTCCACACGG	70
OPB10	CTGCTGGGAC	70
OPO04	AAGTCCGCT	60
OPW10	TCGCATCCCT	60

RNA izolasyonu için kullanılan maddeler

PBS çözeltisi (pH 7,4): 0.02 mM sodyum fosfat tamponuna 0,15 M NaCl ilave edilerek hazırlanmıştır. Otoklavda steril edildikten sonra kullanılır.

GuCNS çözeltisi: % 50 guanidin tiosiyanat, %3 0,75 M sodyum sitrat, %2,6 oranında %10' luk sarkosil distile su içinde çözülerek hazırlanır. Otoklavda steril edildikten sonra kullanılır.

Sodyum asetat (pH 4): 2M hazırlanmıştır.

cDNA elde edilmesi için kullanılan maddeler

INTRON Ters Transkripsiyon kiti kullanılmıştır.

Agaroz jel elektroforezi

TAE tamponu (pH 8,0) 50X: %24,2 Tris, %5,71 glacial asetik asit, %10 0,5 M EDTA distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

Agaroz: Yüklenecek örneğe göre %0,8, %1,5 ve % 2 oranlarında hazırlanmıştır.

Yükleme tamponu: %40 sukroz, %0,025 bromfenol mavisi, %0,25 ksilen siyanol distile suda çözülerek hazırlanmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Metalden arındırma ve sterilizasyon

Kullanılan tüm malzemeler % 10 nitrik asit çözeltisi içinde bir gece bekletilerek metal kontaminasyonundan arındırılmıştır. Tüm sterilizasyon işlemleri 121 °C' de 15 dk otoklavda bekletilerek yapılmıştır. Metal çözeltisi filtre sterilizasyonundan sonra steril besiyerine ilave edilmiştir.

3.2.2. Tohumların yüzey sterilizasyonu

A. corsicum tohumları %20 lik hipoklorit (çamaşır suyu) çözeltisi içinde, 110 rpm' de 20 dk tutulmuş sonra da üç defa 5' er dk steril distile su içinde çalkalanmış ve tohumların ekimleri yapılmıştır.

3.2.3. Doku kültüründe bitki gelişimi

A. corsicum türüne ait tohumlar yüzey sterilizasyonuna tabi tutulduktan sonra kontrol ve 0,01 mM, 0,04 mM, 0,2 mM derişimlerde Ni^{+2} içeren 80 ml katı MS besi yeri [89] bulunduran magentalara steril şartlarda, her bir magentaya 10-16 tohum olacak şekilde ekilmişlerdir. Daha sonra magentalar; 22 °C, 16 saat ışık – 19 °C, 8 saat karanlık, %50 nem koşullarında Sanyo MLR-351H iklim dolabına yerleştirilmişler ve gelişimlerini tamamladıktan sonra hasat edilmişlerdir [90].

3.2.4. Bitkilerin hasat edilmesi

Nikelli ve nikelsiz ortamda gelişimlerini tamamlayan bitkiler hasat edilmiş, topraktan ya da dışarıdan gelebilecek nesnelerden arındırılmak amacıyla çeşme suyu ile iyice yıkandıktan sonra kök ve gövde olarak ayrılmıştır. Örneklerin bir kısmı enzim, protein, DNA ve RNA çalışmalarında kullanılmak üzere sıvı azotla dondurulup -80 °C' ye konurken bir kısmı metal analizi için kurutulmuş bir kısmı ise elektron mikroskop çalışması için deiyonize su ile yıkanıp tespit edilmiştir.

3.2.5. XRF ile metal tayini

Hasat edildikten sonra bir gece 80°C'ye ayarlanmış etüvde kurutmaya alınan bitki örnekleri kuartz havanda dövülerek toz haline getirilmiş, daha sonra körleyici olarak vaks kullanılarak 32 mm kalınlıkta pelletler halinde preslenmiştir. USGS standartları, GEOL, GBW 7109, K04-BCR-60 (Su bitkisi), K04-BCR-61 (Su yosunu), ve K04-BCR-62 (Oil Leavs) da örnekler gibi benzer metotla pellet haline getirilmiş ve kalite güvencesi olarak kullanılmıştır [91, 92].

Çoklu element derişimleri polarize enerji dağılımlı XRF ile belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan spektrometre Spectro XLAB 2000 PEDXRF' dir ve 0,5 mm Be kenar camlı Rh anot X-ray tüpü ile desteklenmiştir. Spektrometrenin dedektörü sıvı N₂ ile dondurulmuş Mn K α , 5000 cps'de < 150eV çözünürlükte Si (Li)' dir. Her ilave element için total analiz süresi 30 dk' dır [93].

3.2.6. SEM- EDX ile morfolojik incelemeler ve metal tayini

Gelişimini tamamlayan bitkilerin gövde alt ve üst yapraklarından alınan örnekler % 2,5 gluteraldehit çözeltisinde 4°C' de 12 saat tespit edilmiştir. Distile su ile yıkanan örnekler %70-100 alkol serileri ile dehidrasyondan sonra amil asetat içine alınmış ve çözelti 30 dk ara ile iki kez değiştirilmiştir. Örnekler POLARON CPD7501 cihazında kritik noktada kurutma ve POLARON SC502 Sputter Coater cihazında altın kaplama işlemlerine tabi tutulmuştur. Örneklerin JEOL JSM 6060 taramalı elektron mikroskobunda morfolojik incelemeleri ve belirlenen bölgelerinden EDX analizleri yapılmıştır.

3.2.7. Antioksidant enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Enzim ekstraksiyonu ve protein tayini

Hasat edildikten sonra -80 °C' ye alınan bitkilerden kök ve gövdeden ayrı ayrı olmak üzere alınan örnekler ekstraksiyon tamponu içinde Xiril Dispomix homojenizasyon cihazı ile 1000 rpm' de homojenize edilmiştir. 16 500 g' de 5 dk santrifüjlendikten sonra ekstrakt parçalara bölünerek -20 °C' de saklanmıştır [94]. Protein miktar tayini Bradford [95] yöntemine göre bovine serum albumin (BSA) standardı kullanılarak Merck Bradford Reagent kiti ile yapılmıştır. Bu yöntemle göre 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2; 1,4 mg/ml oranlarında BSA standardı hazırlanmış 595 nm' de verdikleri absorbansa dayalı olarak çıkartılan eğride protein örneklerinin absorbansları yerine koyularak protein miktarları hesaplanmıştır.

Enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Tüm enzim aktivitesi ölçümlerinde Çakmak [96]' ın kullandığı yöntem izlenmiş ve Shimadzu UV1700 spektrofotometresi kullanılmıştır. Ölçümler 30 µg protein ekstraktı ile yapılmıştır. Buna göre; askorbat peroksidaz aktivitesi 290 nm' de askorbat absorbansının azalması ile ve sönüm katsayısı olan (ϵ) 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ değeri kullanılarak hesaplanmıştır. Ölçümler 1 ml kuartz küvetler içinde, 50mM fosfat tamponu (pH 7,6), 10 mM EDTA içeren 12 mM H₂O₂ ve 0,25 mM L(-) askorbik asit ve enzim ekstraktı varlığında gerçekleştirilmiştir.

Katalaz aktivitesi 240 nm' de H₂O₂' nin azalması izlenerek ve sönüm katsayısı olan (ϵ) 39,4 mM⁻¹ cm⁻¹ değeri kullanılarak hesaplanmıştır. Ölçümler 1 ml kuartz küvetler içinde 50 mM fosfat tamponu (pH 7,6), 100 mM H₂O₂ ve enzim ekstraktı varlığında gerçekleştirilmiştir.

Glutatyon reduktaz aktivitesi 340 nm' de NADPH' nın glutatyona bağlı oksidasyonu izlenerek ve (ϵ) 6,2 mM⁻¹ cm⁻¹ değeri kullanılarak hesaplanmıştır. Ölçümler 1 ml kuartz küvetler içinde 50 mM fosfat tamponu (pH 7,6), 0,5 mM okside glutatyon, 0,12 mM NADPH ve enzim ekstraktı varlığında gerçekleştirilmiştir.

3.2.8. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Toplam yaprak proteini izolasyonu

0,1 gr taze yaprak örneği soğuk havan ve havan eli ile 0,2 M Tris- HCL tamponu (pH 7,8) ilave edilerek dövülmüş ve homojenat 18500 g' de 4 °C de 5 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant ilave 10 dk daha santrifüj edildikten sonra 100 µl' lik supernatant-bluejuice karışımı hazırlanmıştır. Örnekler kaynayan suda 30 sn bekletildikten sonra kullanıma hazır hale gelmiştir [97].

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE için Laemli [98]' nin kullandığı yönteme göre %5 (yığınlaştırıcı), %15 (ayırıştırıcı)' lik iki aşamalı jel hazırlanmıştır

%5' lik yığınlaştırıcı jel; 6,8 ml su, 1.7 ml akrilamid-bisakrilamid, 1,25 ml 1 M Tris-HCL (pH 6,8), 100 µl %10 SDS, 100 µl %10 amonyum persulfat, 10 µl temed karışımı 1 mm aralığa sahip jel camları arasına dökülmüş ve polarize olması beklenmiştir.

%15' lik ayırıştırıcı jel; 11,5 ml su, 25,0 akrilamid, 12,5 ml 1.5 M Tris (pH 8.6), 500 µl %10 SDS, 500 µl %10 amonyum persülfat, 20 µl temed karışımı yığınlaştırıcı jel üzerine dökülmüş ve polimerleştikten sonra jel tarağı çıkarılmıştır.

Jeller 20 mA sabit akımda BioRad elektroforez cihazında ortalama 8 saat yürütüldükten sonra bir gece yıkama çözeltisinde bekletilmiş ve ardından Comassie Brilliant Blue ile boyanmıştır. Birkaç kez distile su ile yıkandıktan sonra ışıklı beyaz tabla üzerinde fotoğrafları Sanyo Xacti fotoğraf makinası ile çekilmiştir.

3.2.9. RAPD-PZR

DNA izolasyonu

Örnekler sıvı azotla ezildikten sonra 65 °C' de ısıtılmış, 1 X CTAB ekstraksiyon tamponu içinde 65 °C' de 90 dk inkübe edilmiştir. Üzerine kloroform-izoamilalkol (24:1) ilave edildikten sonra karıştırılıp 5dk 10.000 rpm' de santrifüjlenmiştir. Üst faz temiz tüpe alındıktan sonra izopropanol ilave edilmiş ve tekrar karıştırılmıştır. 40 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 3 dk 5000 rpm de santrifüjlenmiş ve süpernatant dökülmüştür. Üzerine % 76' lık alkol ilave edildikten sonra 20 dak buzda bekletilmiş, daha sonra 3 dk 5000 rpm de santrifüjlenip tekrar süpernatant dökülmüştür. Pellete % 70 lik alkol ilave edilerek 3 dk 5000 rpm de tekrar

santrifüjlendikten sonra süpernatant dökülmüş ve DNA, TE tamponunda çözüldükten sonra -20 °C’de saklanmıştır [99].

DNA derişiminin belirlenmesi

DNA konsantrasyonu Nanodrop ND 1000 cihazında okunmuştur. OD_{260/280} oranı 1,75 veya daha büyük olduğunda DNA’ nın temiz olduğuna oran daha düşük ise protein kirliliği olduğuna karar verilmiştir. DNA konsantrasyonu; $\mu\text{g}/\mu\text{l} = 1/20 \times \text{OD}_{260} \times 250$ formülü ile hesaplanmıştır [100].

RAPD-PZR

RAPD-PZR denemelerinde Williams ve Kubelik [101]’ in önerdiği yöntem kullanılmıştır. Taq tamponu (10X), MgCl₂ (25 mM), dNTP (10 mM), 5 u/ μl Taq polimeraz enzimi, 0,2 μM primer ve DNA kullanılarak 50 μl ’ lik karışım hazırlanmıştır. 96 °C’ de 30 saniye, 30 °C’ de 30 saniye, 72 °C’ de 30 saniyeden oluşan 45 döngülük reaksiyona tabi tutulmuştur. Tüm PZR reaksiyonları Biometra thermal cyclers cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.2.10. cDNA elde edilmesi

RNA izolasyonu

RNA izolasyonu için taze yaprak dokusundan alınan örnek iki kez soğuk PBS ile yıkanmış sıvı azotla ezilmiş ve PBS içinde ependorf tüpe alınmıştır. -4 °C’de 1000 g’ de 10 dk santrifüjlendikten sonra hücre pelletine GuCNS çözeltisi ilave edilmiş ve vorteksle dağıtılmıştır. Hemen ardından 2M sodyum asetat (pH 4) ilave edilip karıştırılmış üzerine fenol ve kloroform ilave edilerek sertçe vortekslenmiştir. 15 dk buzda bekleme aşamasından sonra 10 dk, 4 °C de santrifüjlenip sıvı faz temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınmıştır. İzopropanol ilave edilip karıştırıldıktan sonra -20 °C de en az 1 saat bekletilmiştir

4 °C’ de 10 dk santrifüjlenen örneklerden etanol uzaklaştırılarak tekrar GuCNS ilave edilmiş ve çözülmüştür. İzopropanol ilavesi ardından tekrar en az 1 saat beklemeye alınmıştır.

4 °C’ de 10 dk santrifüjlenen örneklerden tekrar etanol uzaklaştırıldıktan sonra RNA pelleti sırayla %70, %100 alkolle yıkanarak kurutulmuştur 30 µl distile suda çözülmüştür [100].

RNA derişiminin belirlenmesi

RNA konsantrasyonu Nanodrop ND 1000 cihazında okunmuştur. OD₂₆₀ ölçüldükten sonra. RNA konsantrasyonu; $\mu\text{g}/\mu\text{l} = 1/25 \times \text{OD}_{260} \times 500$ formülü ile hesaplanmıştır [100].

cDNA elde edilmesi

cDNA elde etmek için İNTRON RT kiti kullanılmıştır. Buna göre 1-2 µg total RNA distile su ile 9,5 µl’ ye tamamlanmış ve Oligo (dT) ilavesinden sonra 5 dk ısıtılmıştır. Daha sonra karışım santrifüjde hızlı çevrilmiş ve RNase inhibitör (10 U/µl), 5X RT buffer, dNTP (10 mM), DTT ve AMV RT enzimi ilave edilmiştir. 60 dk 42 °C’ de ısıtıldıktan sonra 5 dk 70 °C’de ısıtılarak reaksiyon bitirilmiştir. Reaktant 50-80 µl distile su içinde çözülerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Daha sonra RAPD-PZR metodu yukarıda anlatılan koşullarda gerçekleştirilmiştir.

3.2.11. Agaroz jel elektroforezi ve jellerin görüntülenmesi

DNA ve RNA örneklerinin yürütülmesinde agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır. Jeller 1X TAE çözeltisinde total DNA örnekleri için %0,8, RNA örnekleri için %1,5 ve PZR ürünleri için %2 agaroz çözülerek hazırlanmıştır. Karışım eridikten sonra 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür ilave edilmiştir. Kullanılan elektroforez tankı (BioRad) yatay konumda olup jel plaklarının büyüklüğü 70x70 mm’ dir. Örnekler yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra 1X TAE tamponu içinde 70 V’ ta 20 dk yürütülmüştür. Yürütme işlemi sonunda jeller görüntüleme cihazında

(Biometra BioDoc Analyze, Goettingen, Germany) UV ışık altında görüntülenmiştir ve görüntüler bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

3.2.12. Farklı ifade olunan genlerin belirlenmesi (DEG) ve analizi

Ticari bir analiz şirketine gönderilen RNA örnekleri cDNA' ya çevrilmiş ve Gen Fishing TM kiti ile farklı ifade olan bantlar belirlenmiştir. Bu bantlar jelden GENCLEAN® II Kit (Q-BIO gene, Carlsbad, CA, USA), kullanılarak geri kazanılmış ve doğrudan TOPO TA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) klonlama vektörüne klonlanmıştır. Klonlanan plazmidler ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ile M13 forward primeri (5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA-3') veya M13 reverse primer (5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGGA-3') kullanılarak dizi analizi yapılmıştır [102-108]. Dizisi bilinen gen bölgelerinin benzer olduğu diziler NCBI gen bankasında BLAST tarama programı ile aranmıştır.

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. *A. corsicum* Türünde Metal Analizi ve Morfolojik İncelemeler

4.1.1. X ışını floresans spektroskopisi (XRF) ile metal tayini

A. corsicum; doku kültüründe, 0,01 mM, 0,04 mM ve 0,2 mM nikel derişimlerinde tohum aşamasından itibaren geliştirilmiştir (Resim 4.1, 4.2). Hasat edildikten sonra kurutmaya alınmış ve XRF cihazında bitkinin kök ve gövdesine ait örneklerde metal ölçümleri yapılmıştır.



1

2

3

4

Resim 4.1. Doku kültüründe farklı nikel derişimlerinde geliştirilen *A.corsicum*

- 1) Kontrol
- 2) 0,01 mM Ni⁺²
- 3) 0,04 mM Ni⁺²
- 4) 0,2 mM Ni⁺²



Resim 4.2. İklim dolabında doku kültüründe farklı nikel derişimlerinde geliştirilen *A.corsicum*

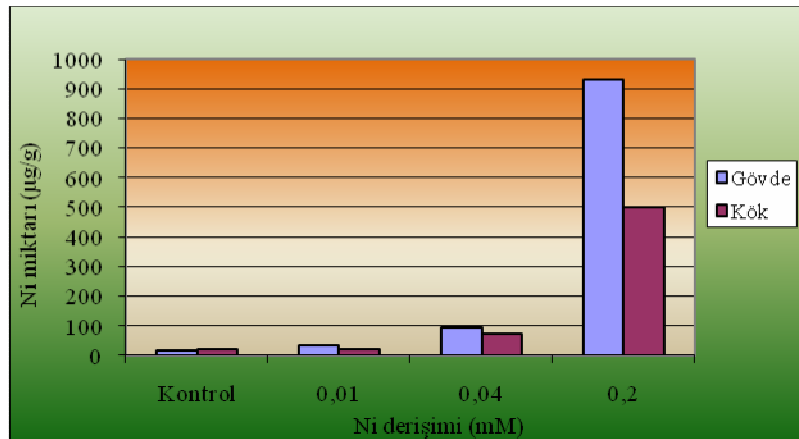
Çizelge 4.1’ de görüldüğü üzere kontrol bitkisinin gövdesindeki nikel oranı $19 \mu\text{g/g}$ iken, bu oranın $0,01 \text{ mM}$ nikel uygulanan bitki gövdesinde $34,5 \mu\text{g/g}$ a, $0,04 \text{ mM}$ nikel uygulanan bitki gövdesinde $93,7 \mu\text{g/g}$ a, $0,2 \text{ mM}$ nikel uygulanan bitki gövdesinde ise en yüksek değer olan $932,5 \mu\text{g/g}$ a ulaşmıştır. Bitkiye uygulanan artan nikel derişimleri ile birlikte gövdesinde biriktirdiği nikel miktarının da arttığı görülmektedir.

Çizelge 4.1. *A.corsicum*' un gövde ve kök kısımlarının XRF ile belirlenen metal içeriği

Element	Na	Mg	Al	Si	P	S	Cl	K	Ca	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn
Ölçüm	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	µg/g	µg/g	µg/g
Kontrol Gövde	0,205	0,246	0,0184	0,0685	0,4959	0,5367	1,161	4,638	0,9932	0,03541	0,01058	19	0,5	144,9
Kontrol Kök	0,351	0,0385	0,0477	0,1069	0,6816	0,675	0,2493	2,234	0,4374	0,0161	0,249	20,3	4,1	669,5
0,01 Ni ⁺² Gövde	0,259	0,188	0,0386	0,1269	0,4962	0,5793	1,163	4,524	0,8966	0,03548	0,01082	34,5	2,6	126,9
0,01 Ni ⁺² Kök	0,125	0,0378	0,0266	0,088	0,4135	0,3975	0,1941	1,529	0,2827	0,01221	0,1673	20,9	3,5	530,5
0,04 Ni ⁺² Gövde	0,211	0,278	0,04	0,1328	0,612	0,7271	1,258	4,862	1,083	0,04033	0,01642	93,7	1,7	247,9
0,04 Ni ⁺² Kök	0,253	0,0454	0,0487	0,1259	0,8094	0,7807	0,3135	2,89	0,4867	0,02229	0,3448	74,9	4,7	921,6
0,2 Ni ⁺² Gövde	0,337	0,268	0,0325	0,1801	0,5328	0,8167	1,073	3,747	1,129	0,04408	0,01045	932,5	3,7	268,1
0,2 Ni ⁺² Kök	0,181	0,07	0,0711	0,1631	0,4828	0,5806	0,2027	1,656	0,4636	0,01925	0,1263	499,7	9,5	559,3

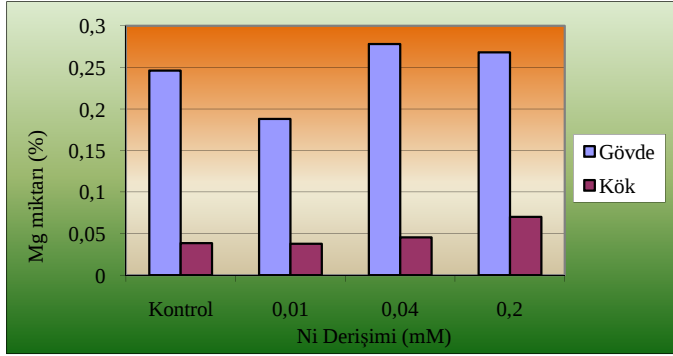
Kontrol bitkisinin köklerindeki nikel oranı 20,03 $\mu\text{g/g}$ iken, bu oranın 0,01 mM nikel uygulanan bitki köklerinde 20,9 $\mu\text{g/g}$ a, 0,04mM nikel uygulanan bitki kökünde 74,9 $\mu\text{g/g}$ a, 0,2 mM nikel uygulanan bitki kökünde ise en yüksek değer olan 499,7 $\mu\text{g/g}$ a ulaşmıştır. Bitkiye uygulanan artan nikel derişimleri ile birlikte köklerinde biriktirdiği nikel miktarının da arttığı görülmektedir (Şekil 4.1).

Kök ve gövdedeki nikel biriktirme oranı karşılaştırıldığında; 0,01 mM nikel derişiminde, gövdenin (34,5 $\mu\text{g/g}$) kökten (20,9 $\mu\text{g/g}$) yaklaşık 13,6 $\mu\text{g/g}$ daha fazla nikel biriktirdiği görülmektedir. 0,04 mM nikel derişiminde, gövdenin (93,7 $\mu\text{g/g}$) kökten (74,9 $\mu\text{g/g}$) yaklaşık 18,8 $\mu\text{g/g}$ daha fazla nikel biriktirdiği görülmektedir. 0,2 mM nikel derişiminde, gövdenin (932,5 $\mu\text{g/g}$) kökten (499,7 $\mu\text{g/g}$) yaklaşık 432,8 $\mu\text{g/g}$ daha fazla nikel biriktirdiği görülmektedir.



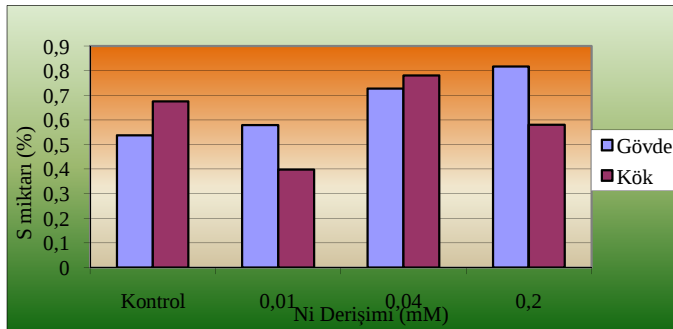
Şekil 4.1. Farklı derişimlerde nikel uygulanan *A. corsicum*'un kök ve gövdesinde bulunan Ni miktarı

Kontrol, 0,01 mM, 0,04 mM, 0,2 mM nikel içeren ortamlarda gelişen bitkinin köklerinde Mg miktarının sırasıyla %0,038, %0,038, %0,045, %0,07 olduğu ve uygulanan nikel derişimi ile uyumlu bir artış gösterdiği görülmektedir. Kontrol, 0,01 mM, 0,04 mM, 0,2 mM nikel içeren ortamlarda gelişen bitkinin gövdesindeki Mg miktarının sırasıyla %0,246, %0,188, %0,278, %0,268 olduğu ve uygulanan nikel derişimi ile uyumlu bir artış ya da azalma göstermediği görülmüştür. Ancak bitkinin gövdesindeki Mg miktarının köklerindeki orandan daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2).



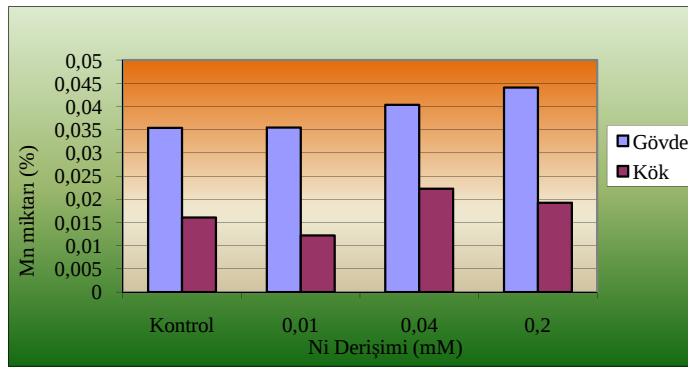
Şekil 4.2. Farklı derişimlerde nikel uygulanan *A. corsicum*' un kök ve gövdesinde bulunan Mg miktarı

Kontrol, 0,01 mM, 0,04 mM, 0,2 mM nikel içeren ortamlarda gelişen bitkinin köklerinde S miktarının sırasıyla %0,675, %0,398, %0,781, %0,581 olduğu ve uygulanan nikel derişimi ile uyumlu bir artış göstermediği görülmektedir (Bkz. Çizelge 4.1.). Kontrol, 0,01 mM, 0,04 mM, 0,2 mM nikel içeren ortamlarda gelişen bitkinin gövdesindeki S miktarının sırasıyla %0,537, %0,579, %0,727, %0,817 olduğu ve uygulanan nikel derişimi ile uyumlu bir artış gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Farklı derişimlerde nikel uygulanan *A. corsicum*' un kök ve gövdesinde bulunan S miktarı

Kontrol, 0,01 mM, 0,04 mM, 0,2 mM nikel içeren ortamlarda gelişen bitkinin köklerinde Mn miktarının sırasıyla %0,016, %0,012, %0,022, %0,019 $\mu\text{g/g}$ olduğu ve uygulanan nikel derişimi ile uyumlu bir artış göstermediği görülmektedir (Bkz. Çizelge 4.1.). Kontrol, 0,01 mM, 0,04 mM, 0,2 mM nikel içeren ortamlarda gelişen bitkinin gövdesindeki Mn miktarının sırasıyla %0,035, %0,036, %0,040, %0,044 $\mu\text{g/g}$ olduğu ve uygulanan nikel derişimi ile uyumlu bir artış gösterdiği görülmüştür. Ancak bitkinin gövdesindeki Mn miktarının köklerindeki orandan daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4).

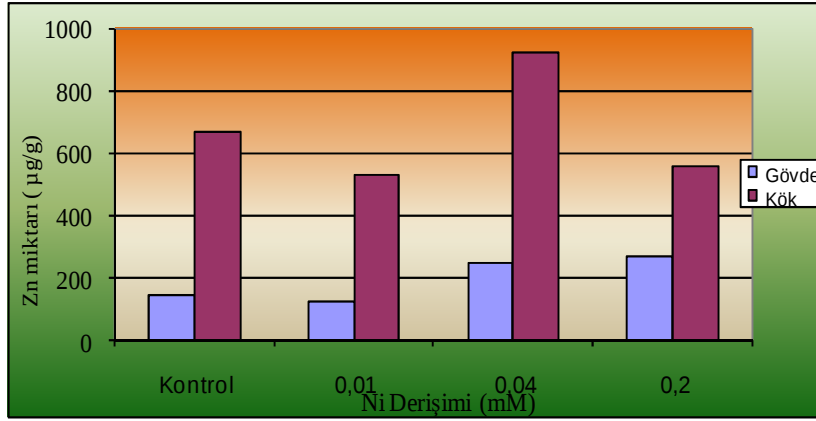


Şekil 4.4. Farklı derişimlerde nikel uygulanan *A. corsicum*' un kök ve gövdesinde bulunan Mn miktarı

Kontrol, 0,01 mM, 0,04 mM, 0,2 mM nikel içeren ortamlarda gelişen bitkinin köklerinde Zn miktarının sırasıyla 669,5; 530,5; 921,6; 559,3 $\mu\text{g/g}$ olduğu ve uygulanan nikel derişimi ile uyumlu bir artış göstermediği görülmektedir (Bkz. Çizelge 4.1.). Kontrol, 0,01 mM, 0,04 mM, 0,2 mM nikel içeren ortamlarda gelişen bitkinin gövdesindeki Zn miktarının sırasıyla 144,9; 126,9; 247,9; 268,1 $\mu\text{g/g}$ olduğu ve uygulanan nikel derişimi ile uyumlu bir artış gösterdiği görülmüştür. Ancak bitkinin köklerindeki Zn miktarının gövdesindeki orandan daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5).

Diğer metallerin kökteki miktarlarında ise nikel derişimleri ile uyumlu bir artma veya azalma gözlenmemiştir. Bu değerler uygulanan nikel derişimine göre sırasıyla kontrol, 0,01 mM, 0,04 mM, 0,2 mM' de kök için; Na (% 0,351; 0,125; 0,253;

0,181), Al (% 0,048; 0,027; 0,049; 0,071), Si (% 0,107; 0,088; 0,126; 0,163), P (% 0,682; 0,414; 0,809; 0,483), Cl (% 0,249; 0,194; 0,314; 0,203), K (% 2,234; 1,529; 2,89; 1,656) Ca (% 0,437; 0,283; 0,487; 0,464), Fe (% 0,249; 0,167; 0,345; 0,126), Cu için (4,1; 3,5; 4,7; 9,5 $\mu\text{g/g}$)' dır.



Şekil.4.5. Farklı derişimlerde nikel uygulanan *A. corsicum*' un kök ve gövdesinde bulunan Zn miktarı

Gövde için ise uygulanan nikel derişimine göre sırasıyla kontrol, 0,01 mM, 0,04 mM, 0,2 mM' de Na (% 0,205; 0,259; 0,211; 0,337), Al (% 0,018; 0,039; 0,04; 0,032), Si (% 0,068; 0,127; 0,133; 0,180), P (% 0,496; 0,496; 0,612; 0,533), Cl (% 1,161; 1,163; 1,258; 1,073), K (% 4,638; 4,524; 4,862; 3,747), Ca (% 0,993; 0,897; 1,083; 1,129), Fe (% 0,011; 0,011; 0,016; 0,010), Cu (0,5; 2,6; 1,7; 3,7 $\mu\text{g/g}$)' dır.

Bitkinin köklerindeki Fe miktarının gövdesindeki orandan daha fazla olduğu, bitkinin gövdesindeki Cl, Ca, K miktarlarının da köklerindeki orandan daha fazla olduğu belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.1).

4.1.2. Taramalı elektron mikroskobu-Enerji dağılımlı X ışıması analizi (SEM-EDX) ile metal tayini ve morfolojik incelemeler

Doku kültüründe, 0,01 mM, 0,04 mM ve 0,2 mM nikel derişimlerinde geliştirilen *A. corsicum* bitkilerinin gövdesinin alt ve üst kısımlarından yaprak örnekleri alınmıştır. Taramalı elektron mikroskopunda bu yaprakların hem üst hem de alt yüzeylerinin morfolojik incelemeleri ve EDX metal analizleri yapılmıştır (Bkz. Resim 4.3-4.12).

A. corsicum kontrol bitkisinin üst yapraklarının alt ve üst yüzeyinin genel görünümü ve tüy yapılarına ait elektron mikroskop görüntüleri incelendiğinde tüylerin tüm yaprak yüzeyini yoğun bir şekilde kaplamış olduğu, yıldızsı, dallanmış ve çıkıntılı bir yapıya sahip oldukları ve stomaların tüylerle kaplandığı gözlenmiştir (Bkz. Resim 4.3).

0,01 mM nikel uygulanmış *A. corsicum* bitkisinin üst yapraklarının alt ve üst yüzeyinin genel görünümü ve tüy yapılarına ait elektron mikroskop görüntüleri incelendiğinde tüylerin tüm yaprak yüzeyini kapladığı, yıldızsı, dallanmış ve çıkıntılı bir yapıya sahip olduğu, üst yüzeyde yer yer stomaların görülmeye başladığı gözlenmiştir (Bkz. Resim 4.4).

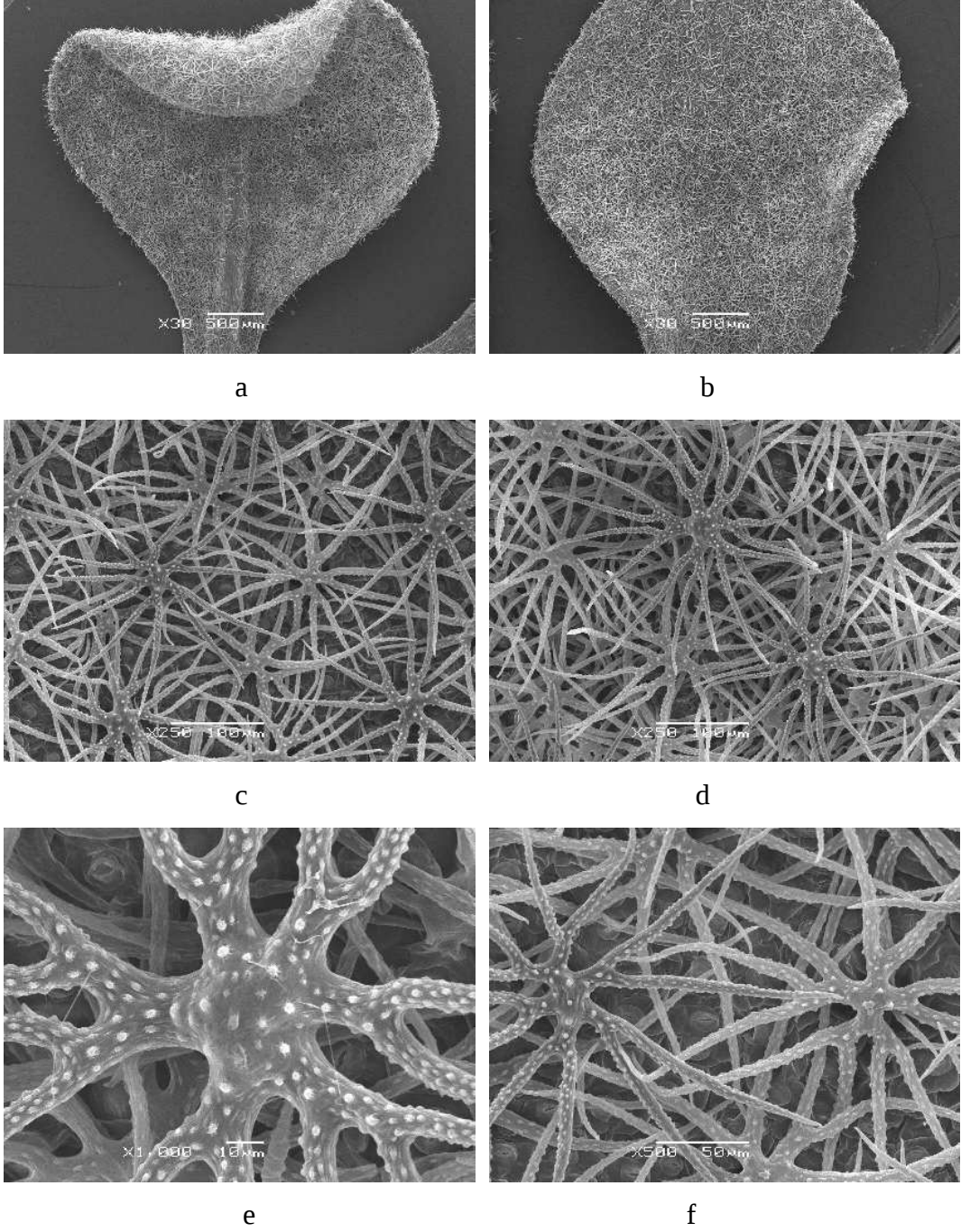
0,04 mM nikel uygulanmış *A. corsicum* bitkisinin üst yapraklarının alt ve üst yüzeyinin genel görünümü ve tüy yapılarına ait elektron mikroskop görüntüleri incelendiğinde tüylerin tüm yaprak yüzeyini kapladığı, yıldızsı, dallanmış ve çıkıntılı bir yapıya sahip olduğu, yaprak tüy uçlarında kıvrılmalar meydana geldiği ve yer yer yaprak tüylerinin dinamik ve çıkıntılı yapısını kaybettiği görülmektedir. Ayrıca yaprak tüy merkezlerinin değişik şekiller oluşturduğu ve üzerlerinde düzensiz çıkıntıların olduğu gözlenmiştir (Bkz. Resim 4.5).

0,2 mM nikel uygulanmış *A. corsicum* bitkisinin üst yapraklarının alt ve üst yüzeyinin genel görünümü ve tüy yapılarına ait elektron mikroskop görüntüleri incelendiğinde özellikle üst yüzeyde yaprak tüylerinin diğer derişimlere ve kontrol bitkisine göre daha seyrek yerleştiği, yaprak tüy uçlarında kıvrılmaların meydana

geldiği, yaprak tüy merkezlerinin değişik şekiller oluşturduğu ve üzerlerinde düzensiz çıkıntılarının oluştuğu gözlenmiştir (Bkz. Resim 4.6).

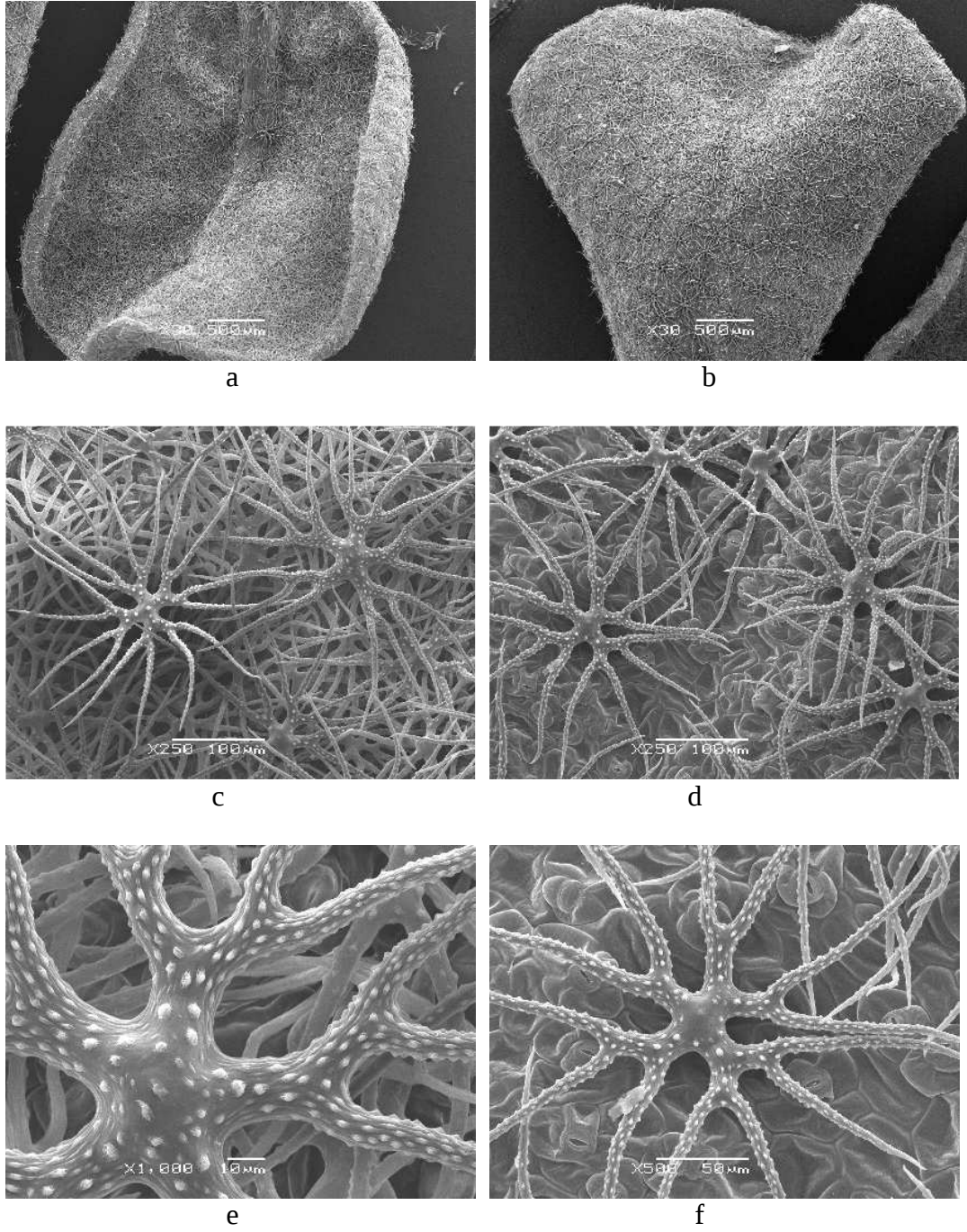
Yukarıda belirtilen verilere göre gövde üst yapraklarında yapılan morfolojik incelemelerde; artan nikel derişimleriyle birlikte kontrole göre üst yüzeyde daha belirgin olmak üzere yaprak tüylerinde sayı ve yoğunluk bakımından bir azalma olduğu gözlenmiştir. 0,04 mM ve 0,2 mM nikel derişimlerinde, yaprak tüy uçlarında kıvrılmaların meydana geldiği yer yer yaprak tüylerinin dinamik yapılarını ve dikensi çıkıntılarını kaybettiği ayrıca yaprak tüy merkezlerinin değişik şekiller oluşturduğu ve üzerlerinde düzensiz çıkıntılarının oluştuğu gözlenmiştir (Bkz. Resim 4.7.).

Üst yapraklar



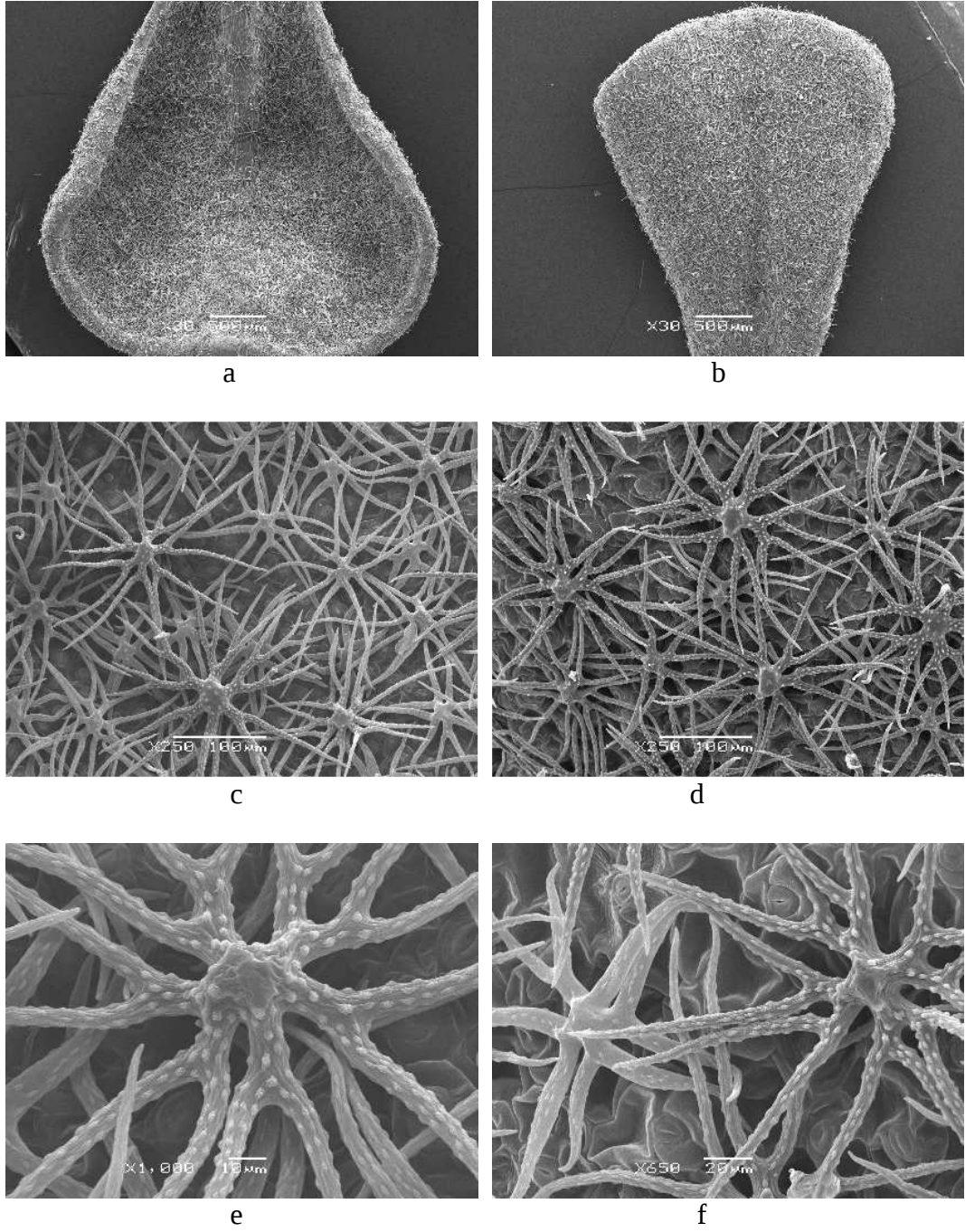
Resim 4.3. *A. corsicum* kontrol bitkisinin üst yapraklarına ait elektron mikroskop görüntüleri

- a) Üst yaprak alt yüz genel görünüm
- b) Üst yaprak üst yüz genel görünüm
- c) Üst yaprak alt yüz yaprak tüyleri
- d) Üst yaprak üst yüz yaprak tüyleri
- e) Üst yaprak alt yüz yaprak tüyleri ve stomalar
- f) Üst yaprak üst yüz yaprak tüyleri ve stomalar



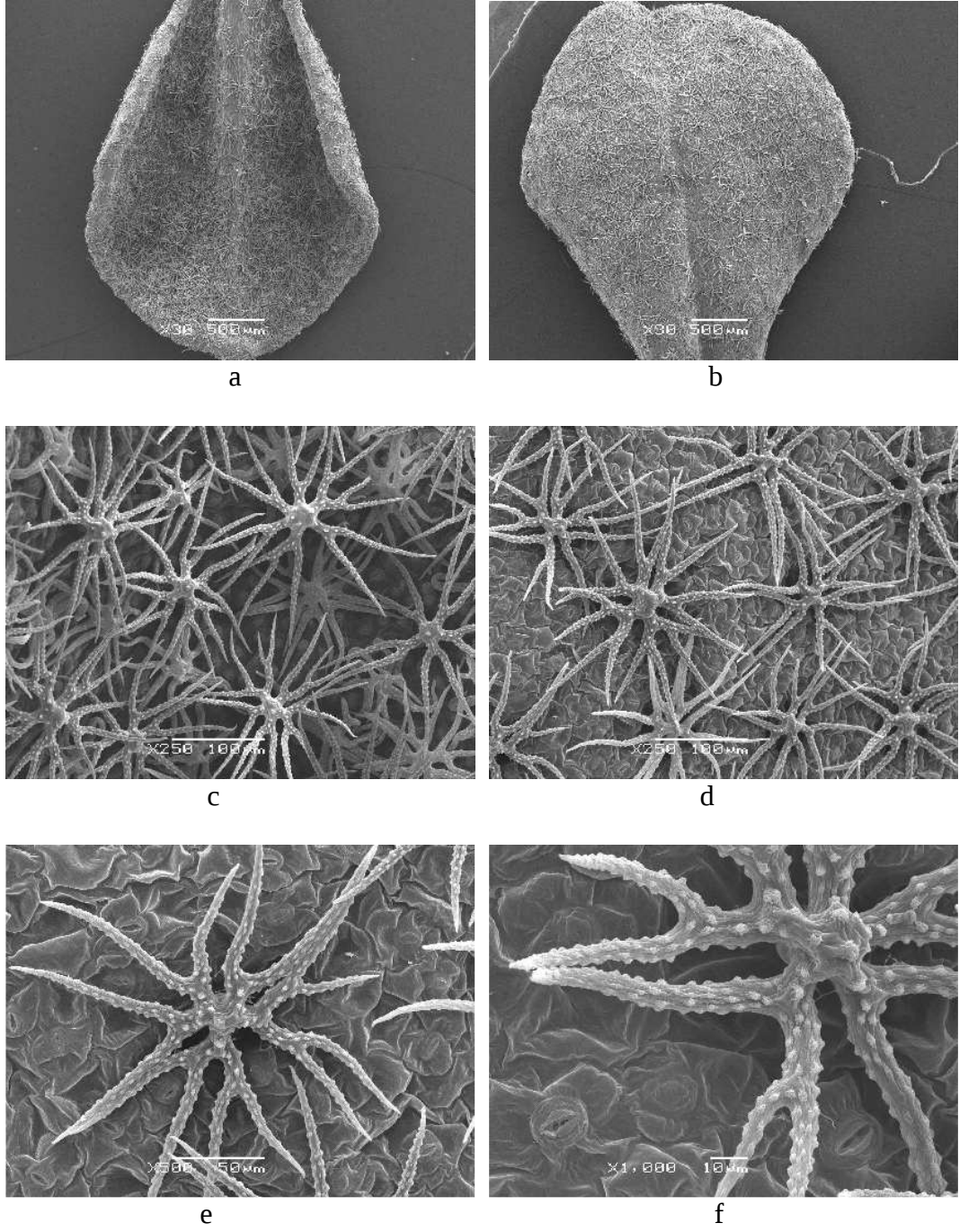
Resim 4.4. 0,01 mM nikel uygulanmış *A. corsicum* bitkisinin üst yapraklarına ait elektron mikroskop görüntüleri

- a) Üst yaprak alt yüz genel görünüm
- b) Üst yaprak üst yüz genel görünüm
- c) Üst yaprak alt yüz yaprak tüyleri
- d) Üst yaprak üst yüz yaprak tüyleri
- e) Üst yaprak alt yüz yaprak tüyleri
- f) Üst yaprak üst yüz yaprak tüyleri

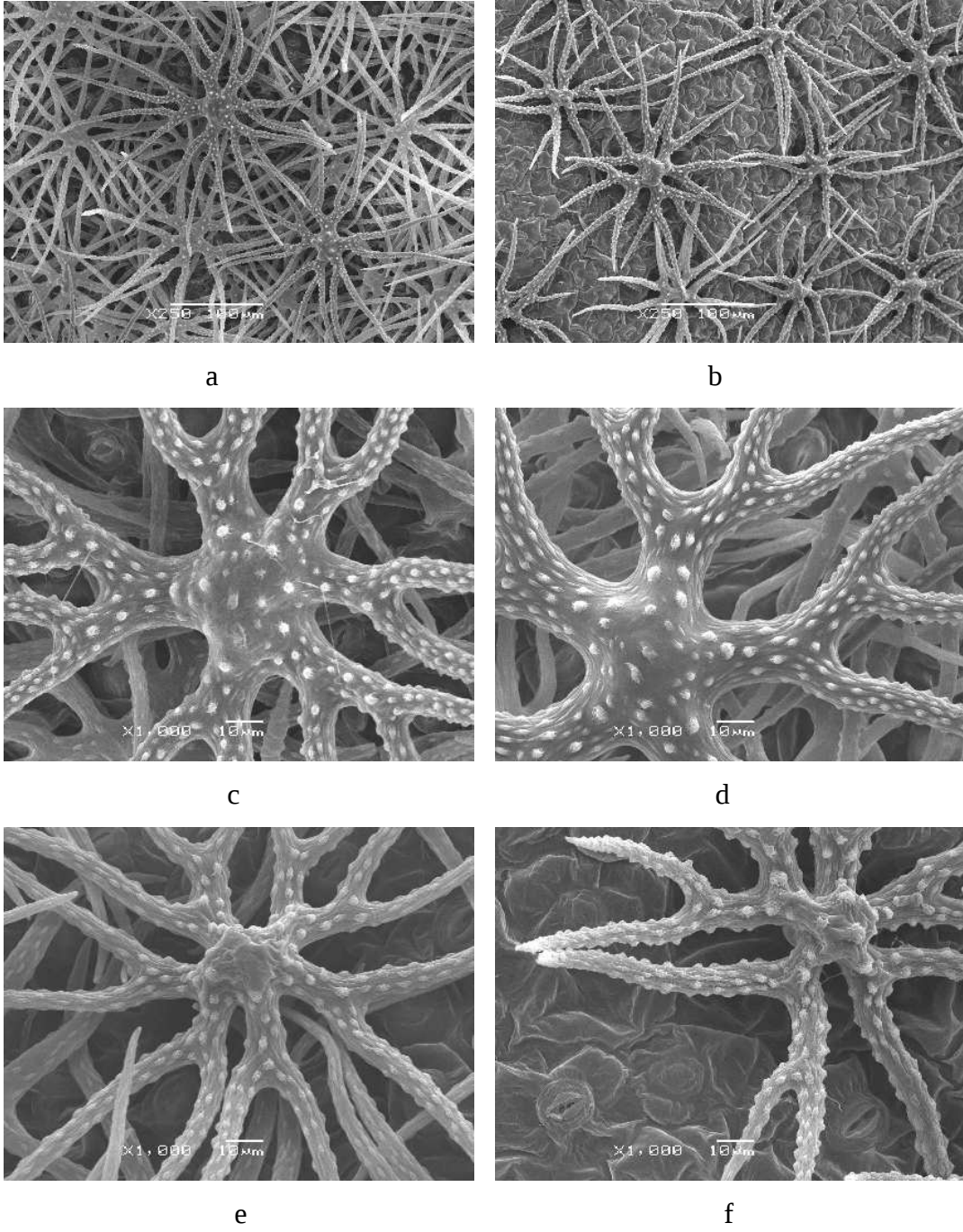


Resim 4.5. 0,04 mM nikel uygulanmış *A. corsicum* bitkisinin üst yapraklarına ait elektron mikroskop görüntüleri

- a) Üst yaprak alt yüz genel görünüm
- b) Üst yaprak üst yüz genel görünüm
- c) Üst yaprak alt yüz yaprak tüyleri
- d) Üst yaprak üst yüz yaprak tüyleri
- e) Üst yaprak alt yüz yaprak tüy
- f) Üst yaprak üst yüz yaprak tüyleri



Resim 4.6. 0,2 mM nikel uygulanmış *A. corsicum* bitkisinin üst yapraklarına ait elektron mikroskop görüntüleri
a) Üst yaprak alt yüz genel görünüm
b) Üst yaprak üst yüz genel görünüm
c) Üst yaprak alt yüz yaprak tüyleri
d) Üst yaprak üst yüz yaprak tüyleri
e) Üst yaprak üst yüz yaprak tüyü
f) Üst yaprak üst yüz yaprak tüyü



Resim 4.7. Kontrol ve 0,01; 0,04; 0,2 mM nikel uygulanan *A. corsicum* bitkisinin üst yapraklarına ait elektron mikroskop görüntülerinin karşılaştırılması

- a) Kontrol üst yaprak üst yüz yaprak tüyleri
- b) 0,2 mM nikelli üst yaprak üst yüz yaprak tüyleri
- c) Kontrol üst yaprak alt yüz yaprak tüyü
- d) 0,01 mM nikelli üst yaprak alt yüz yaprak tüyü
- e) 0,04 mM nikelli üst yaprak alt yüz yaprak tüyü
- f) 0,2 mM nikelli üst yaprak üst yüz yaprak tüyü

A. corsicum kontrol bitkisinin alt yapraklarının alt ve üst yüzeyinin genel görünümü ve tüy yapılarına ait elektron mikroskop görüntüleri incelendiğinde tüylerin alt ve üst yüzeyde seyrek bir şekilde yer aldığı, yıldızsı ve dallanmış bir yapıya sahip oldukları gözlenmektedir (Bkz. Resim 4.8).

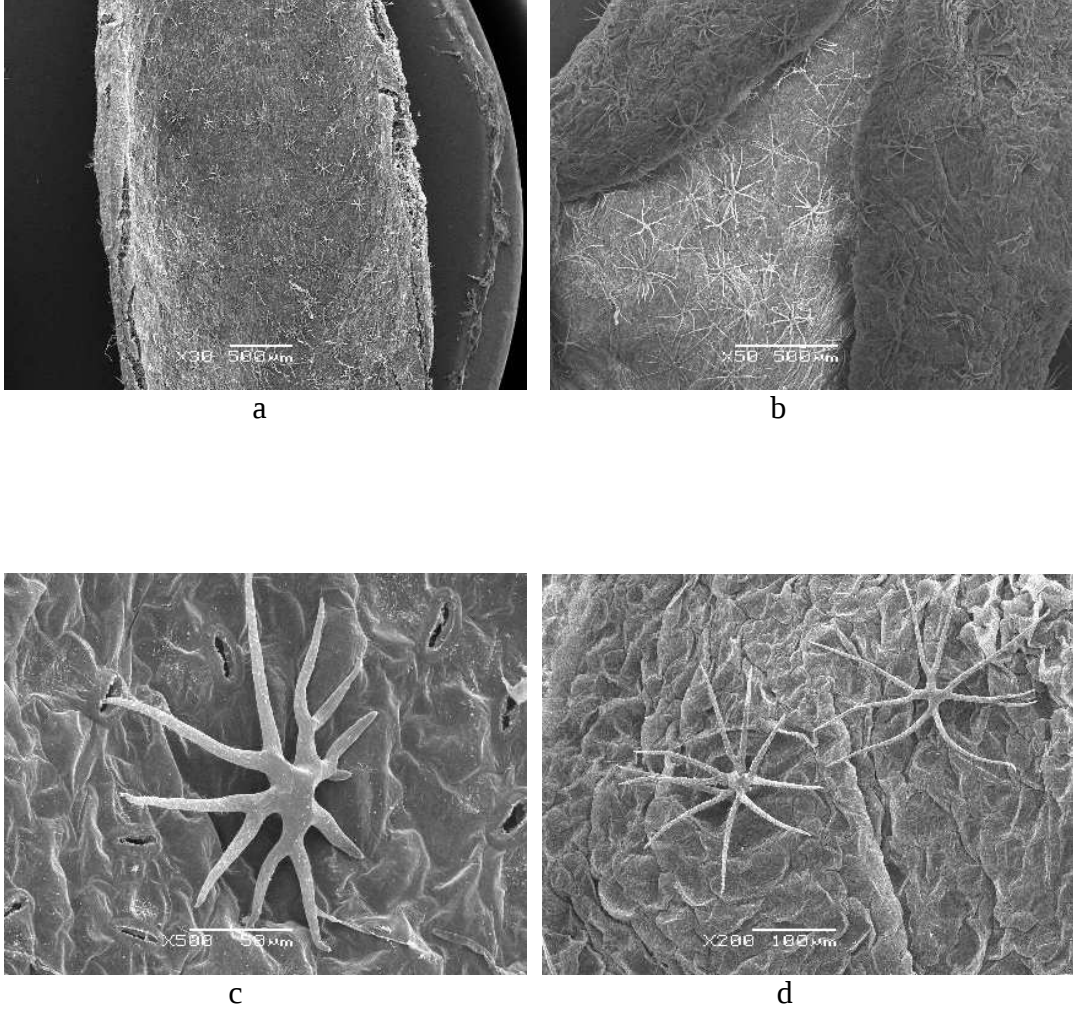
0,01 mM nikel uygulanmış *A. corsicum* bitkisinin alt yapraklarının alt ve üst yüzeyinin genel görünümü ve tüy yapılarına ait elektron mikroskop görüntüleri incelendiğinde alt yüzeye ait tüylerin tamamen dökülmüş olduğu gözlenmiştir. Üst yüzeydeki tüylerin ise oldukça seyrek yer aldıkları ve epiderm hücreleri arasına gömüldükleri gözlenmiştir (Bkz. Resim 4.9).

0,04 mM nikel uygulanmış *A. corsicum* bitkisinin alt yapraklarının alt ve üst yüzeyinin genel görünümü ve tüy yapılarına ait elektron mikroskop görüntüleri incelendiğinde tüylerin yine oldukça seyrek göründükleri, dallanmış yapılarının yer yer bozulduğu ve üst yüzeyde epiderm hücreleri arasına gömüldükleri gözlenmiştir (Bkz. Resim 4.10)

0,2 mM nikel uygulanmış *A. corsicum*'un alt yapraklarının alt ve üst yüzeyinin genel görünümü ve tüy yapılarına ait elektron mikroskop görüntüleri incelendiğinde yaprak tüylerinin dinamik yapılarını ve dikensi çıkıntılarını kaybettiği, tüylerde şekil bozukluklarının meydana geldiği ve üzerlerinde düzensiz çıkıntıların olduğu gözlenmiştir (Bkz. Resim 4.11).

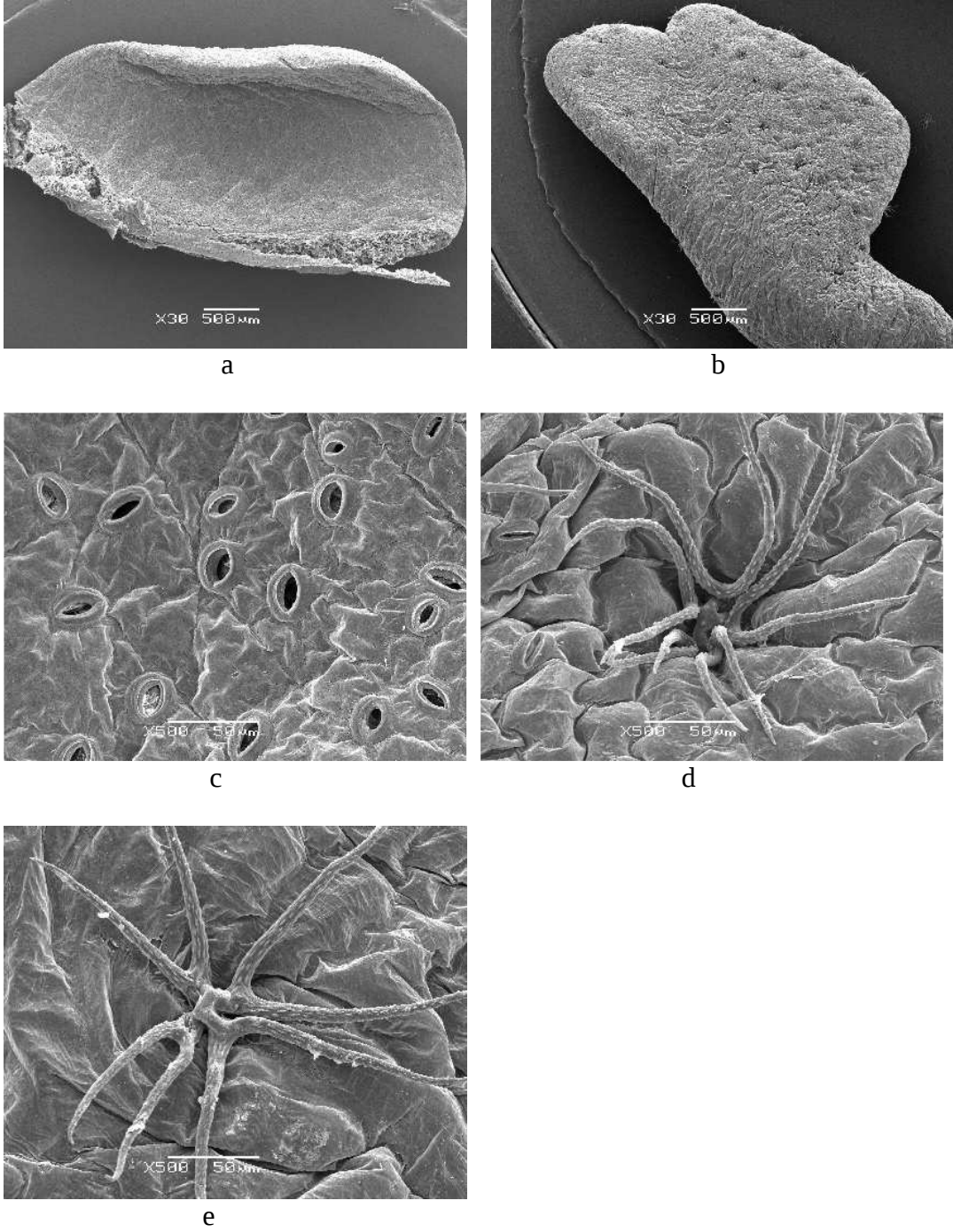
Yukarıda belirtilen verilere göre gövde alt yapraklarında yapılan tüm morfolojik incelemeler sonucunda ise; 0,01 mM nikel derişiminde alt yüzeydeki yaprak tüylerinin tamamen dökülmüş olduğu görülmüştür. 0,01 mM, 0,04 mM ve 0,2 mM nikel derişimlerinde yaprak tüylerinin yer yer yaprak epiderm hücreleri arasına gömüldüğü gözlenmiştir. 0,2 mM nikel derişiminde daha belirgin olmak üzere yine yaprak tüylerinin dinamik yapılarını ve dikensi çıkıntılarını kaybettiği, tüylerde şekil bozukluklarının meydana geldiği ve üzerlerinde düzensiz çıkıntıların olduğu gözlenmiştir (Bkz. Resim 4.12).

Alt yapraklar

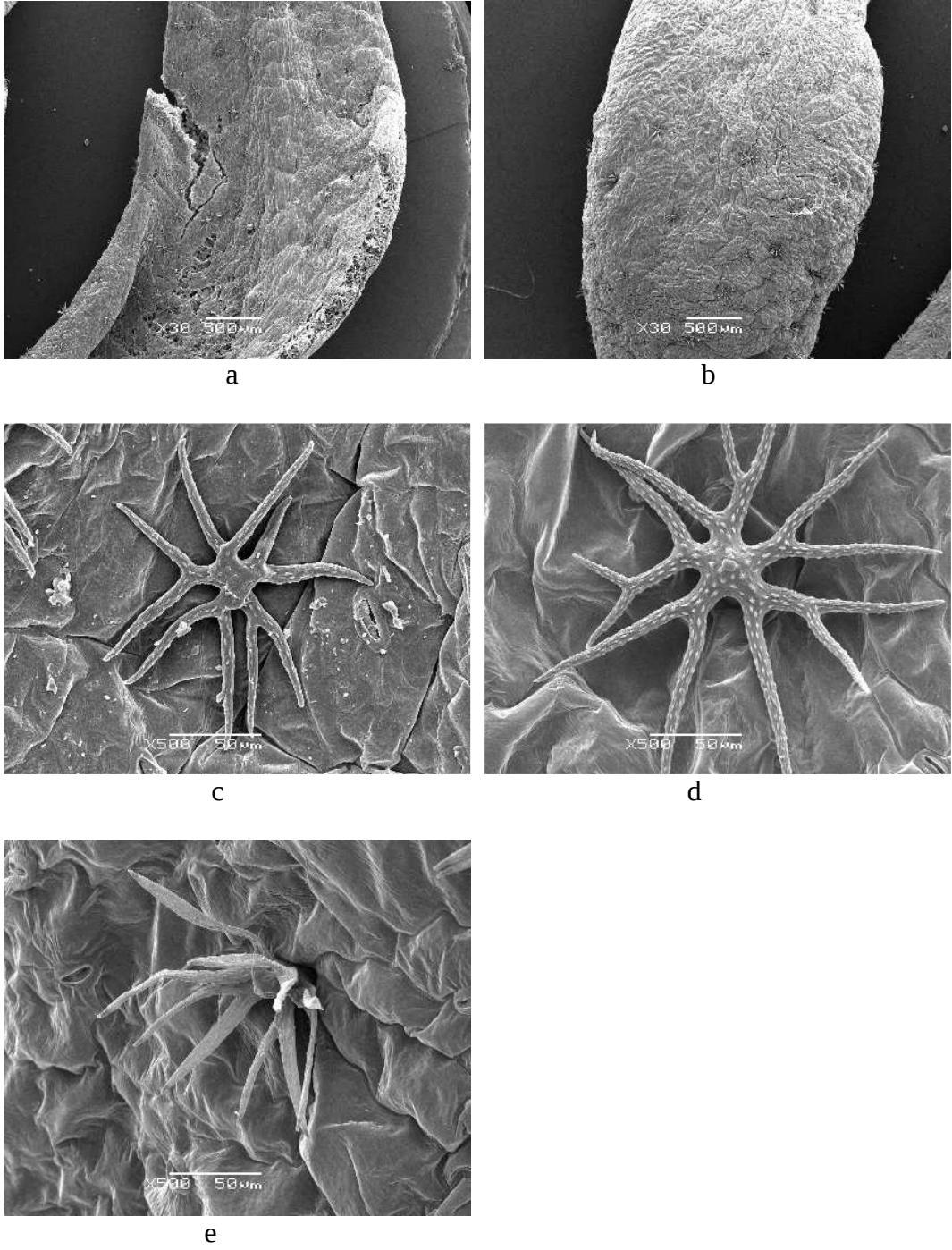


Resim 4.8. *A. corsicum* kontrol bitkisinin alt yapraklarına ait elektron mikroskop görüntüleri

- a) Alt yaprak alt yüz genel görünüm
- b) Alt yaprak üst yüz genel görünüm
- c) Alt yaprak alt yüz yaprak tüyü
- d) Alt yaprak üst yüz stoma

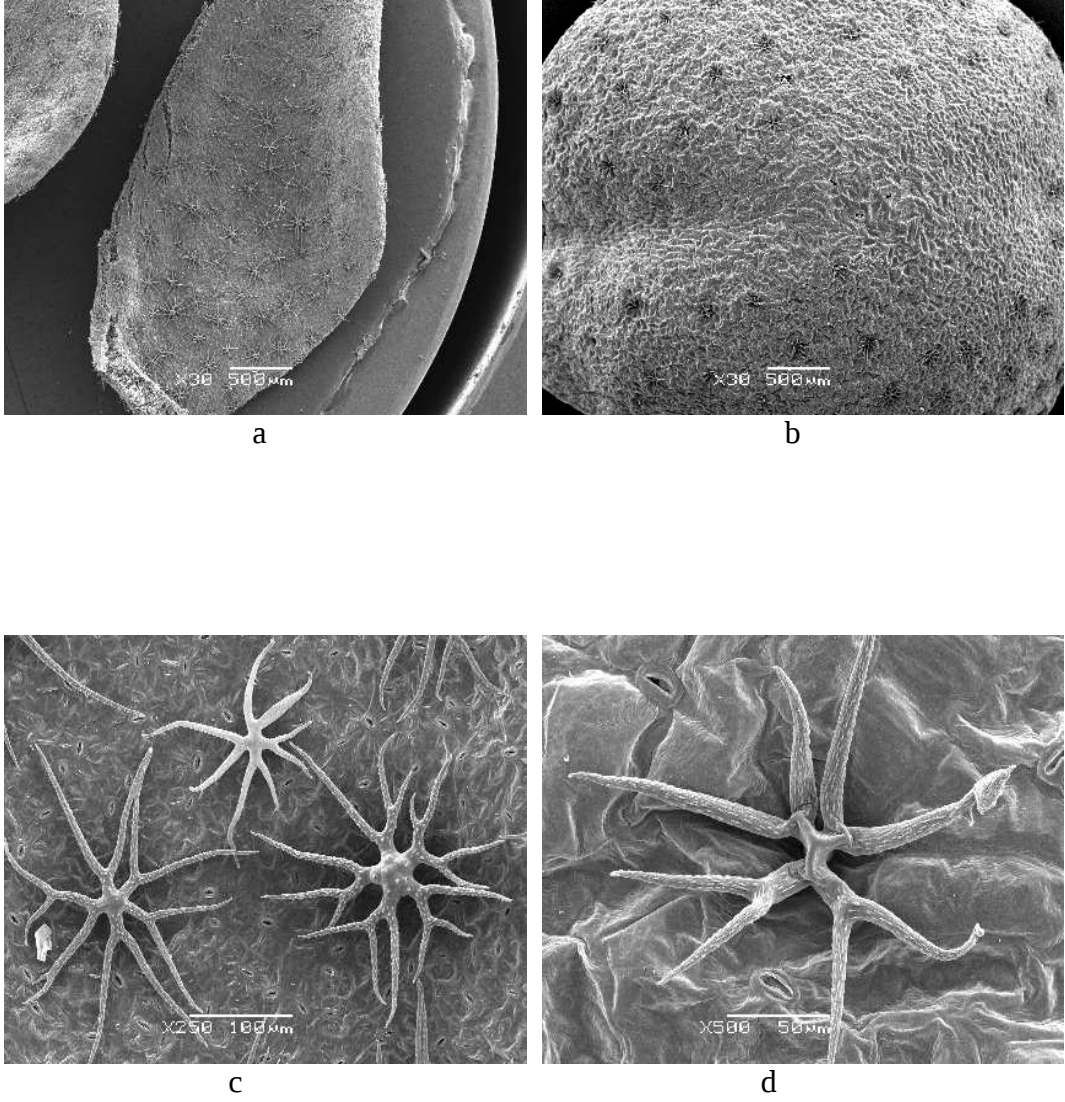


Resim 4.9. 0,01 mM nikel uygulanmış *A. corsicum* bitkisinin alt yapraklarına ait elektron mikroskop görüntüleri
 a) Alt yaprak alt yüz genel görünüm
 b) Alt yaprak üst yüz genel görünüm
 c) Alt yaprak üst yüz stomalar
 d) Alt yaprak üst yüz yaprak tüyü
 e) Alt yaprak üst yüz diğer bir yaprak tüyü



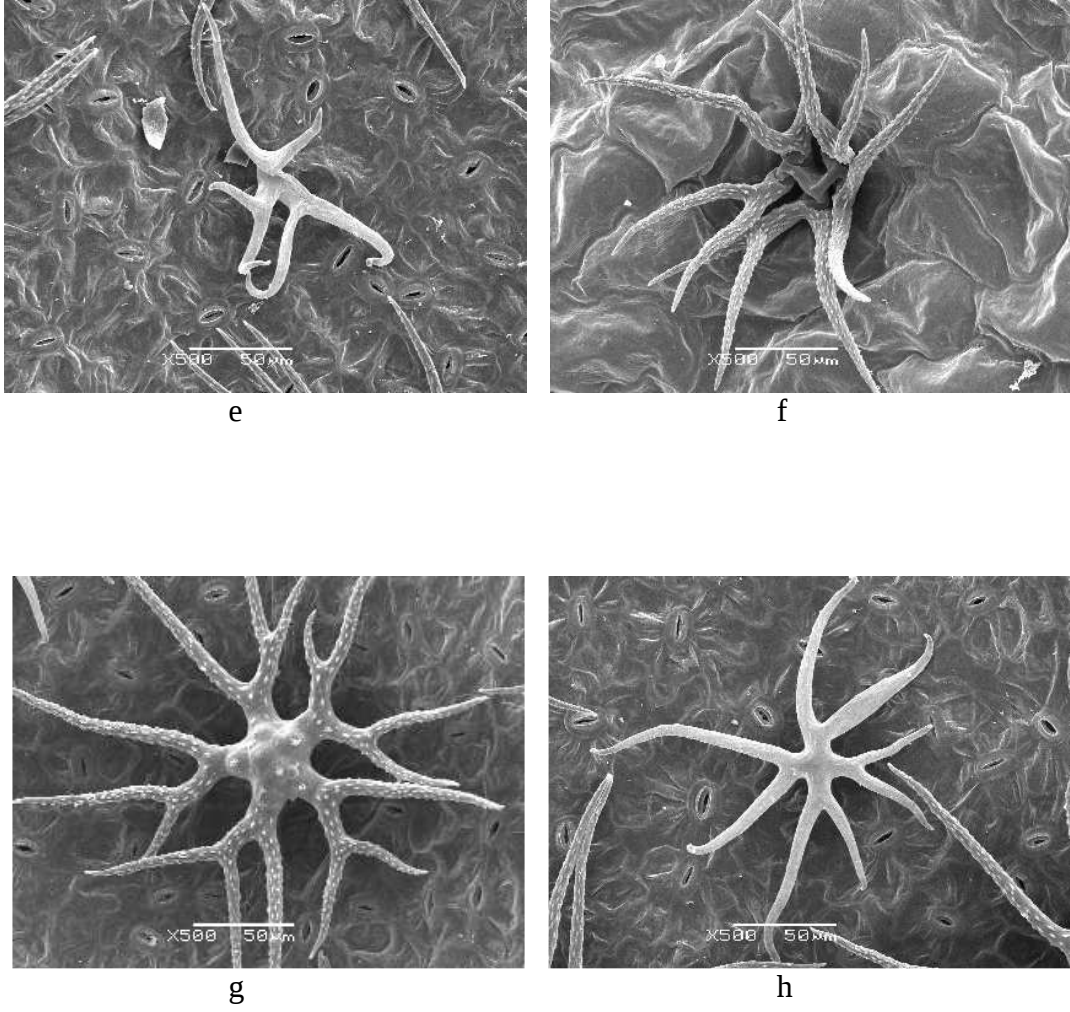
Resim 4.10. 0,04 mM ikel uygulanmış *A. corsicum* bitkisinin alt yapraklarına ait elektron mikroskop görüntüleri

- a) Alt yaprak alt yüz genel görünüm
- b) Alt yaprak üst yüz genel görünüm
- c) Alt yaprak alt yüz yaprak tüy ü
- d) Alt yaprak üst yüz yaprak tüyü
- e) Alt yaprak üst yüz diğer bir yaprak tüyü



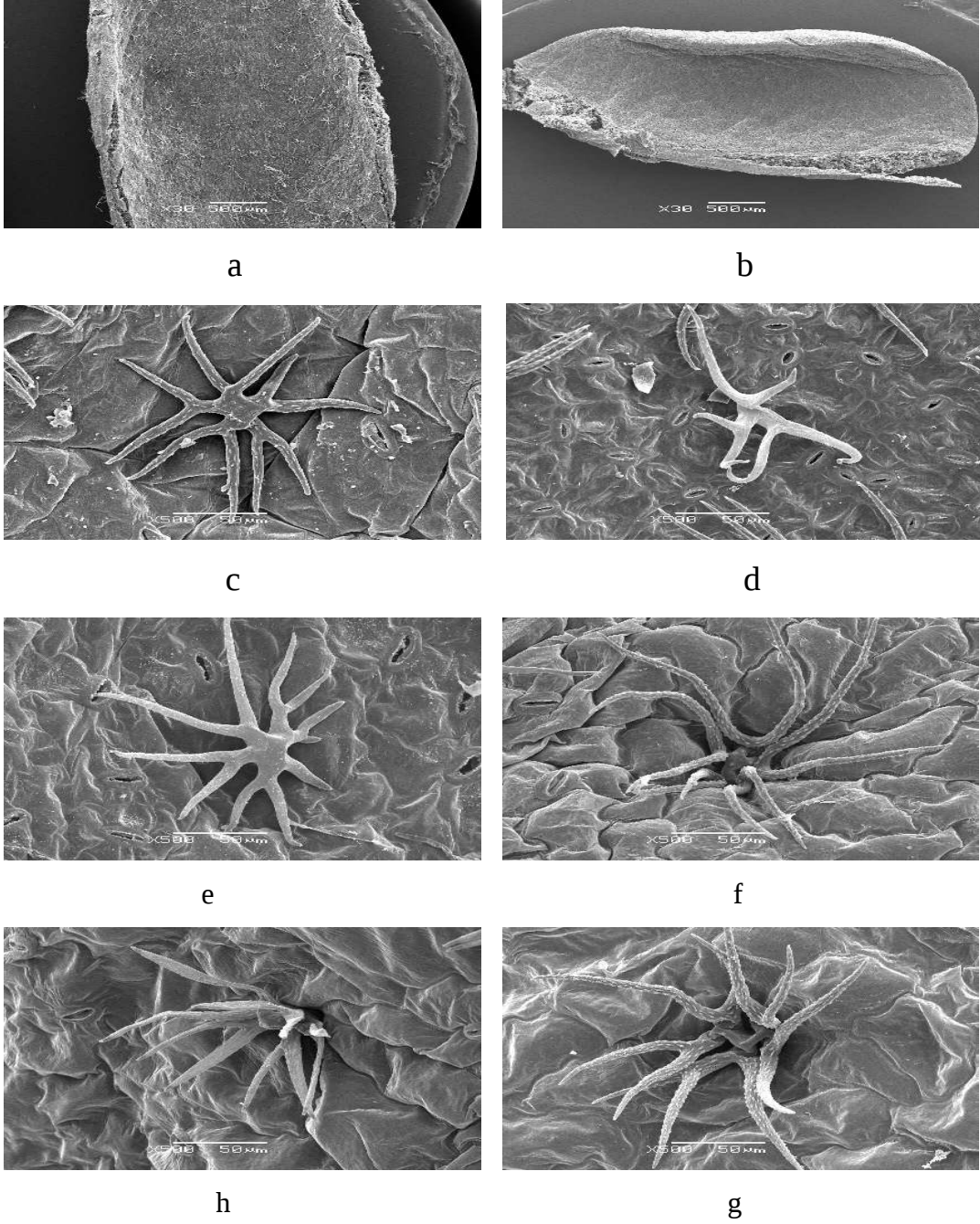
Resim 4.11. 0,2 mM nikel uygulanmış *A. corsicum* bitkisinin alt yapraklarına ait elektron mikroskop görüntüleri

- a) Alt yaprak alt yüz genel görünüm
- b) Alt yaprak üst yüz genel görünüm
- c) Alt yaprak alt yüz yaprak tüy yapıları
- d) Alt yaprak üst yüz yaprak tüy yapısı
- e) Alt yaprak alt yüz yaprak tüy yapıları
- f) Alt yaprak üst yüz diğer bir yaprak tüy yapısı
- g) Alt yaprak alt yüz yaprak tüy yapısı
- h) Alt yaprak alt yüz diğer bir yaprak tüy yapısı



Resim 4.11. (Devam) 0,2 mM nikel uygulanmış *A. corsicum* bitkisinin alt yapraklarına ait elektron mikroskop görüntüleri

- a) Alt yaprak alt yüz genel görünüm
- b) Alt yaprak üst yüz genel görünüm
- c) Alt yaprak alt yüz yaprak tüy yapıları
- d) Alt yaprak üst yüz yaprak tüy yapısı
- e) Alt yaprak alt yüz yaprak tüy yapıları
- f) Alt yaprak üst yüz diğer bir yaprak tüy yapısı
- g) Alt yaprak alt yüz yaprak tüy yapısı
- h) Alt yaprak alt yüz diğer bir yaprak tüy yapısı



Resim 4.12. Kontrol ve 0,01; 0,04; 0,2 mM nikel uygulanan *A. corsicum* bitkisinin alt yapraklarına ait elektron mikroskop görüntülerinin karşılaştırılması

- a) Kontrol alt yaprak alt yüz genel görünüm
- b) 0,01 mM nikelli alt yaprak alt yüz genel görünüm
- c) 0,04 mM nikelli alt yaprak alt yüz yaprak tüyü
- d) 0,2 mM nikelli alt yaprak alt yüz yaprak tüyü
- e) Kontrol alt yaprak alt yüz yaprak tüyü
- f) 0,01 mM nikelli alt yaprak üst yüz yaprak tüyü
- g) 0,04 mM nikelli alt yaprak üst yüz yaprak tüyü
- h) 0,2 mM nikelli alt yaprak alt yüz yaprak tüyü

SEM ile görüntülenen bölgelerin aynı anda EDX analizleri yapılmıştır. Ni, Mg, Ca, Fe metallerinin üst yapraklara ait dağılım bulguları çizelge 4.2’de, alt yapraklara ait metal dağılım bulguları ise çizelge 4.3’te verilmiştir. Üst yapraklardaki EDX analizleri, SEM fotoğraflarında görülen genel görünüm, stoma, tüy ortası ve tüy kolunda yapılmıştır. Alt yapraklardaki analizler ise genel görünüm, epidermal hücre, stoma, tüy ortası ve tüy kolunda yapılmıştır. Çizelgelerde belirtilen bulgulara ait grafikler şekil 4.6-4.9’ da verilmiştir.

Üst yaprakların üst yüzeyinde yapılan SEM-EDX metal analizinde nikel derişimine bağılı olarak genel görünüm, stoma, tüy ortası ve tüy kolunda nikel miktarları tespit edilmiştir. Kontrol bitkisinin genel görünüm EDX incelemesinde nikel oranı 0,00 c/s iken, bu oranın 0,01 mM nikel uygulanan bitki genel görünümünde 0,60 c/s, 0,04mM nikel uygulanan bitkide 0,75 c/s, 0,2 mM nikel uygulanan bitkide ise 0,68 c/s olduğu belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin stoma EDX incelemesinde nikel oranı 0,00 c/s iken, bu oranın 0,01 mM nikel uygulanan bitki stomasında 0,50 c/s, 0,04mM nikel uygulanan bitkide 0,95 c/s, 0,2 mM nikel uygulanan bitkide ise 1,56 c/s olduğu belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin tüy ortası EDX incelemesinde nikel oranı 0,28 c/s iken, bu oranın 0,01 mM nikel uygulanan bitki tüy ortasında 0,76 c/s, 0,04mM nikel uygulanan bitkide 0,57 c/s, 0,2 mM nikel uygulanan bitkide ise 1,64 c/s olduğu belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin tüy kolu EDX incelemesinde nikel oranı 0,29 c/s iken, bu oranın 0,01 mM nikel uygulanan bitki tüy kolunda 0,52 c/s, 0,04mM nikel uygulanan bitkide 0,78 c/s, 0,2 mM nikel uygulanan bitkide ise 0,94 c/s olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.6-a).

Bu sonuçlara göre nikel miktarının üst yaprak üst yüzeyde en belirgin olarak stomalarda arttığı daha sonra ise tüy kolu ve tüy ortasında artış gösterdiği görülmüştür. En çok biriktirme oranı ise 0,2 mM nikel derişimi uygulanan bitkilerdedir. Genel görünümde ise 0,2 mM derişimde nikel biriktirme oranında diğer derişimlerdeki biriktirme oranına göre bir düşme belirlenmiştir.

Üst yaprakların alt yüzeyinde yapılan SEM-EDX metal analizinde nikel derişimine bağılı olarak genel görünüm, stoma, tüy ortası ve tüy kolunda nikel miktarları tespit

edilmiştir. Kontrol bitkisinin genel görünüm EDX incelemesinde nikel oranı 0,00 c/s iken, bu oranın 0,01 mM nikel uygulanan bitki genel görünümünde 0,00 c/s, 0,04mM nikel uygulanan bitkide 0,53 c/s, 0,2 mM nikel uygulanan bitkide ise 0,80 c/s olduğu belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin stoma EDX incelemesinde nikel oranı 0,00 c/s iken, bu oranın 0,01 mM nikel uygulanan bitki stomasında 0,30 c/s, 0,04mM nikel uygulanan bitkide 0,50 c/s, 0,2 mM nikel uygulanan bitkide ise 0,70 c/s olduğu belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin tüy ortası EDX incelemesinde nikel oranı 0,00 c/s iken, bu oranın 0,01 mM nikel uygulanan bitki tüy ortasında 0,00 c/s, 0,04mM nikel uygulanan bitkide 0,89 c/s, 0,2 mM nikel uygulanan bitkide ise 0,82 c/s olduğu belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin tüy kolu EDX incelemesinde nikel oranı 0,04 c/s iken, bu oranın 0,01 mM nikel uygulanan bitki tüy kolunda 0,00 c/s, 0,04mM nikel uygulanan bitkide 0,92 c/s, 0,2 mM nikel uygulanan bitkide ise 1,12 c/s olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.6-b).

Bu sonuçlara göre nikel miktarının üst yaprak alt yüzeyde en belirgin olarak stoma ve tüy kolunda arttığı, en çok biriktirme oranının ise 0,2 mM nikel derişiminde tüy kolunda olduğu belirlenmiştir.

Üst yaprakların üst ve alt yüzeyinde yapılan SEM-EDX metal analizinde nikel derişimine bağlı olarak genel görünüm, stoma, tüy ortası ve tüy kolunda magnezyum miktarları tespit edilmiştir. Kontrol, 0,01; 0,04 ve 0,2 mM nikel derişimi uygulanan bitkilerin yaprak üst yüzeyinde daha belirgin olmak üzere Mg oranının nikel derişimindeki artışa bağlı olarak düştüğü tespit edilmiştir. Düşüş belirgin olarak tüy ortası (0,18; 4,58; 3,96; 2,39 c/s) ve tüy kolunda (3,82; 2,72; 0,51; 1,44 c/s) görülmektedir (Bkz. Şekil 4.6 c,d).

Üst yaprakların üst ve alt yüzeyinde yapılan SEM-EDX metal analizinde nikel derişimine bağlı olarak genel görünüm, stoma, tüy ortası ve tüy kolunda kalsiyum miktarları tespit edilmiştir. Kontrol, 0,01; 0,04 ve 0,2 mM nikel derişimi uygulanan bitkilerin üst yaprak üst ve alt yüzeyinde kalsiyum miktarının giderek yükseldiği ancak 0,2 mM nikel derişiminde en düşük değeri gösterdiği görülmüştür. Oranlardaki

yükselme ve düşme belirgin olarak alt yüzeyde tüy ortası (11,8; 24,3; 29,9; 2,05c/s) ve tüy kolunda (9,77; 11,9; 5,01; 4,40 c/s) görülmektedir (Bkz. Şekil 4.7 a,b).

Üst yaprakların üst ve alt yüzeyinde yapılan SEM-EDX metal analizinde (Bkz. Çizelge 4.2.) nikel derişimine bağı olarak genel görünüm, stoma, tüy ortası ve tüy kolunda demir miktarları tespit edilmiştir. Kontrol, 0,01; 0,04 ve 0,2 mM nikel derişimi uygulanan bitkilerin yaprak alt yüzey tüy ortasında (0,21; 0,82; 0,94; 1,83 c/s) demir miktarının giderek arttığı gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.7 c,d).

Alt yaprakların üst yüzeyinde yapılan SEM-EDX metal analizinde (Bkz. Çizelge 4.3.) nikel derişimine bağı olarak genel görünüm, epidermal hücre, stoma, tüy ortası ve tüy kolunda nikel miktarları tespit edilmiştir. Kontrol bitkisinin genel görünüm EDX incelemesinde nikel oranı 0,00 c/s iken, bu oranın 0,01 mM nikel uygulanan bitki genel görünümünde 0,00 c/s, 0,04mM nikel uygulanan bitkide 0,00 c/s, 0,2 mM nikel uygulanan bitkide ise 0,45 c/s olduğu belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin epidermal hücre EDX incelemesinde nikel oranı 0,00 c/s iken, bu oranın 0,01 mM nikel uygulanan bitki genel görünümünde 0,50 c/s, 0,04mM nikel uygulanan bitkide 1,37 c/s, 0,2 mM nikel uygulanan bitkide ise 0,73 c/s olduğu belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin stoma EDX incelemesinde nikel oranı 0,00 c/s iken, bu oranın 0,01 mM nikel uygulanan bitki stomasında 1,06 c/s, 0,04mM nikel uygulanan bitkide 1,24 c/s, 0,2 mM nikel uygulanan bitkide ise 0,00 c/s olduğu belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin tüy ortası EDX incelemesinde nikel oranı 0,00 c/s iken, bu oranın 0,01 mM nikel uygulanan bitki tüy ortasında 0,61 c/s, 0,04mM nikel uygulanan bitkide 0,95 c/s, 0,2 mM nikel uygulanan bitkide ise 0,76 c/s olduğu belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin tüy kolu EDX incelemesinde nikel oranı 0,00 c/s iken, bu oranın 0,01 mM nikel uygulanan bitki tüy kolunda 0,59 c/s, 0,04mM nikel uygulanan bitkide 1,47 c/s, 0,2 mM nikel uygulanan bitkide ise 0,81 c/s olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.8-a).

Bu sonuçlara göre nikel miktarının alt yaprak üst yüzeyde en belirgin olarak 0,04 mM nikel derişiminde tüm kısımlarda arttığı gözlenmiştir.

Alt yaprakların alt yüzeyinde yapılan SEM-EDX metal analizinde nikel derişimine bağılı olarak genel görünüm, stoma, tüy ortası ve tüy kolunda nikel miktarları tespit edilmiştir. Kontrol bitkisinin genel görünüm EDX incelemesinde nikel oranı 0,00 c/s iken, bu oranın 0,01 mM nikel uygulanan bitki genel görünümünde 0,38 c/s, 0,04mM nikel uygulanan bitkide 0,00 c/s, 0,2 mM nikel uygulanan bitkide ise 0,00 c/s olduğu belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin epidermal hücre EDX incelemesinde nikel oranı 0,00 c/s iken, bu oranın 0,01 mM nikel uygulanan bitki genel görünümünde 0,00 c/s, 0,04mM nikel uygulanan bitkide 0,96 c/s, 0,2 mM nikel uygulanan bitkide ise 0,78 c/s olduğu belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin stoma EDX incelemesinde nikel oranı 0,00 c/s iken, bu oranın 0,01 mM nikel uygulanan bitki stomasında 0,44 c/s, 0,04mM nikel uygulanan bitkide 0,88 c/s, 0,2 mM nikel uygulanan bitkide ise 0,57 c/s olduğu belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin tüy ortası EDX incelemesinde nikel oranı 0,00 c/s iken, bu oran 0,01 mM nikel uygulanan bitkide tüy olmadığı için belirlenemezken, 0,04 mM nikel uygulanan bitkide 0,96 c/s, 0,2 mM nikel uygulanan bitkide ise 1,24 c/s olduğu belirlenmiştir. Kontrol bitkisinin tüy kolu EDX incelemesinde nikel oranı 0,00 c/s iken, bu oran 0,01 mM nikel uygulanan bitkide tüy olmadığı için belirlenemezken, 0,04mM nikel uygulanan bitkide 1,00 c/s, 0,2 mM nikel uygulanan bitkide ise 0,45 c/s olduğu belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.8-b).

Bu sonuçlara göre nikel miktarının alt yaprak üst yüzeyde en belirgin olarak 0,04 mM nikel derişiminde tüm kısımlarda arttığı gözlenmiştir. 0,2 mM nikel derişimi uygulandığında ise tüy ortasında artışın en yüksek düzeye ulaştığı gözlenmiştir.

Alt yaprakların üst ve alt yüzeyinde yapılan SEM-EDX metal analizinde nikel derişimine bağılı olarak genel görünüm, epidermal hücre, stoma, tüy ortası ve tüy kolunda magnezyum miktarları tespit edilmiştir. Kontrol, 0,01; 0,04 ve 0,2 mM nikel derişimi uygulanan bitkilerin yaprak üst yüzeyi genel görünüm ve tüy ortasında magnezyum miktarının giderek yükseldiği ancak 0,2 mM nikel derişiminde en düşük değeri gösterdiği görülmüştür. Oranlardaki yükselme ve düşme belirgin olarak üst yüzeyde genel görünüm (0,18; 0,34; 1,01; 0,50 c/s) ve tüy ortasında (1,02; 1,23; 1,28; 0,45 c/s) görülmektedir.

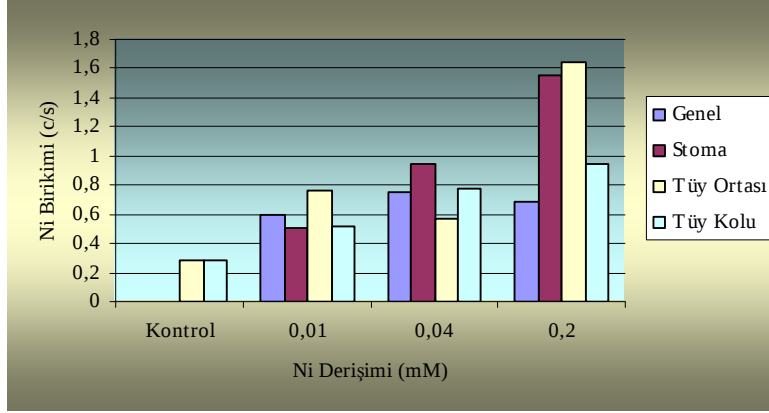
Kontrol, 0,01; 0,04 ve 0,2 mM nikel derişimi uygulanan bitkilerin yaprak alt yüzeyinde magnezyum miktarında stomalarda (1,16; 0,78; 0,79; 0,54 c/s) orantılı bir azalma gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.8-c,d).

Alt yaprakların üst ve alt yüzeyinde yapılan SEM-EDX metal analizinde nikel derişimine bağı olarak genel görünüm, stoma, tüy ortası ve tüy kolunda kalsiyum miktarları tespit edilmiştir. Kontrol, 0,01; 0,04 ve 0,2 mM nikel derişimi uygulanan bitkilerin yaprak üst ve alt yüzeyinde kalsiyum miktarının giderek yükseldiğı ancak 0,2 mM nikel derişiminde düştüğü görülmüştür. Oranlardaki yükselme ve düşme belirgin olarak üst yüzeyde epidermal hücre (1,31; 1,41; 2,84; 0,66 c/s) ve tüy ortasında (2,65; 3,67; 6,53; 4,08 c/s) görülmektedir. (Bkz. Şekil 4.9 a,b).

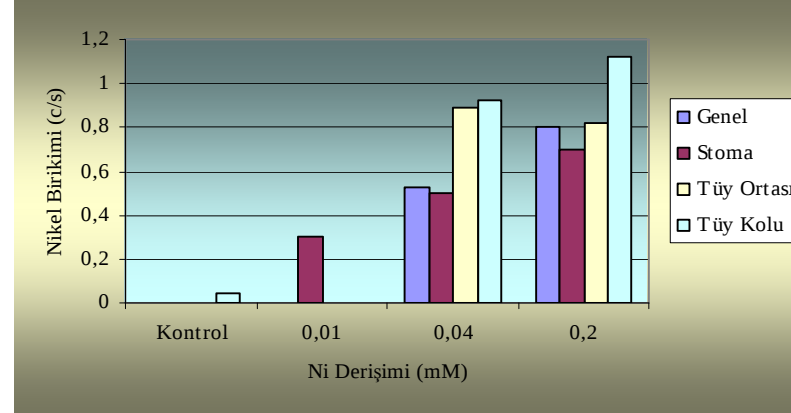
Alt yaprakların üst ve alt yüzeyinde yapılan SEM-EDX metal analizinde nikel derişimine bağı olarak genel görünüm, stoma, tüy ortası ve tüy kolunda demir miktarları tespit edilmiştir. Kontrol, 0,01; 0,04 ve 0,2 mM nikel derişimi uygulanan bitkilerin yaprak üst yüzeyinde demir miktarında orantılı bir değışim gözlenmezken, yaprak alt yüzeyi epidermal hücrelerinde demir miktarının giderek yükseldiğı ancak 0,2 mM nikel derişiminde düştüğü gözlenmiştir (0,40; 0,99; 1,21; 0,60 c/s) (Bkz. Şekil 4.9 c,d).

Çizelge 4.2. Farklı nikel derişimleri uygulanmış *A. corsicum* türü üst yapraklarının SEM/EDX metal analiz sonuçları

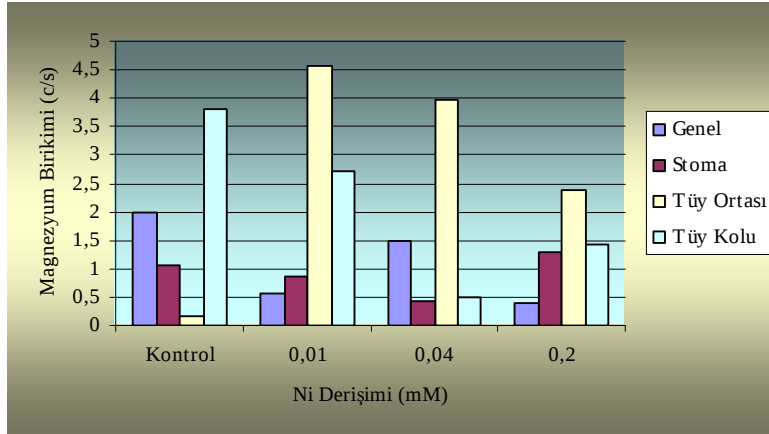
		Genel				Stoma				Tüy Ortası				Tüy Kolu			
	Sayım/ saniye (c/s)	Ni	Mg	Ca	Fe	Ni	Mg	Ca	Fe	Ni	Mg	Ca	Fe	Ni	Mg	Ca	Fe
Kontrol	Üst yüzey	0,00	2,00	1,60	1,01	0,00	1,05	2,26	0,95	0,28	0,18	3,46	0,57	0,29	3,82	5,89	0,70
	Alt yüzey	0,00	0,08	1,50	0,88	0,00	1,29	1,48	0,55	0,00	4,22	11,8	0,21	0,04	0,83	9,77	0,33
0,01 mM Ni	Üst yüzey	0,60	0,55	5,10	0,67	0,50	0,86	2,20	0,53	0,76	4,58	11,43	1,26	0,52	2,72	9,48	0,92
	Alt yüzey	0,00	2,27	3,01	0,91	0,30	0,60	1,76	0,60	0,00	3,21	24,3	0,82	0,00	2,85	11,9	0,35
0,04 mM Ni	Üst yüzey	0,75	1,49	1,84	1,39	0,95	0,43	8,64	0,74	0,57	3,96	23,65	1,43	0,78	0,51	2,96	0,46
	Alt yüzey	0,53	0,30	2,62	0,61	0,50	0,48	2,05	0,62	0,89	1,70	29,9	0,94	0,92	0,61	5,01	1,06
0,2 mM Ni	Üst yüzey	0,68	0,41	1,20	0,48	1,56	1,28	1,53	0,56	1,64	2,39	3,63	0,34	0,94	1,44	5,67	1,15
	Alt yüzey	0,80	1,03	3,71	0,80	0,70	1,17	1,77	0,57	0,82	2,36	2,05	1,83	1,12	0,98	4,40	0,74



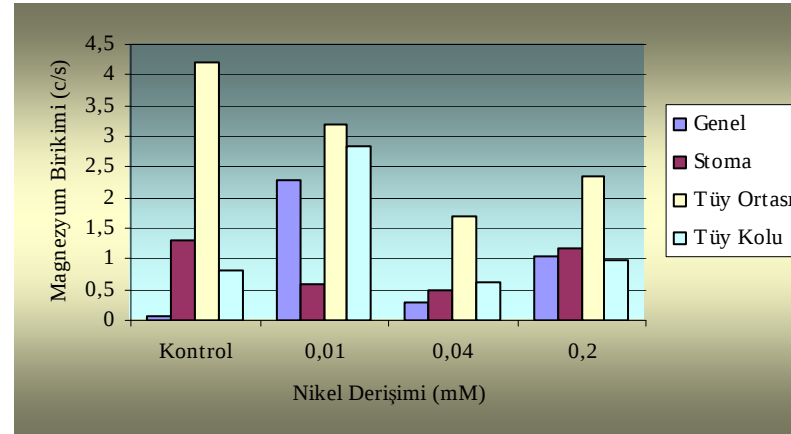
a



b



c



d

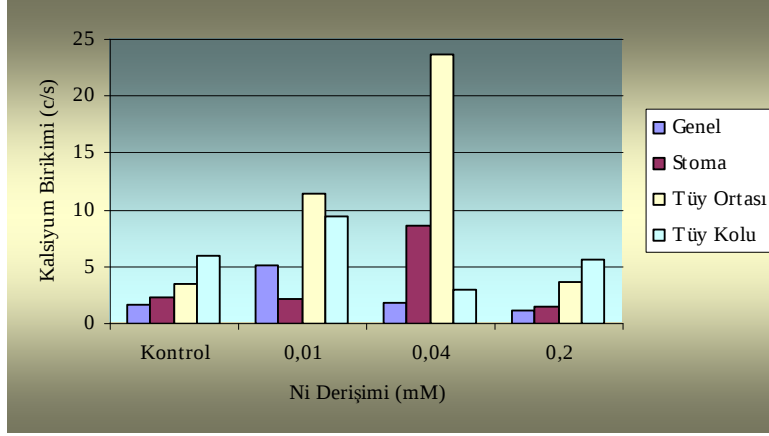
Şekil 4.6. Üst yaprak üst ve alt yüzeylerinin çeşitli kısımlarında SEM-EDX ile ölçülen Ni, Mg metallerinin oranları

a) Üst yaprak üst yüz Ni

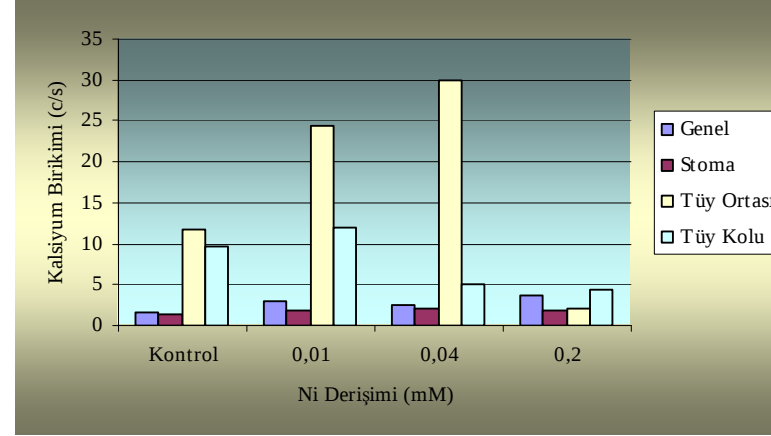
b) Üst yaprak alt yüz Ni

c) Üst yaprak üst yüz Mg

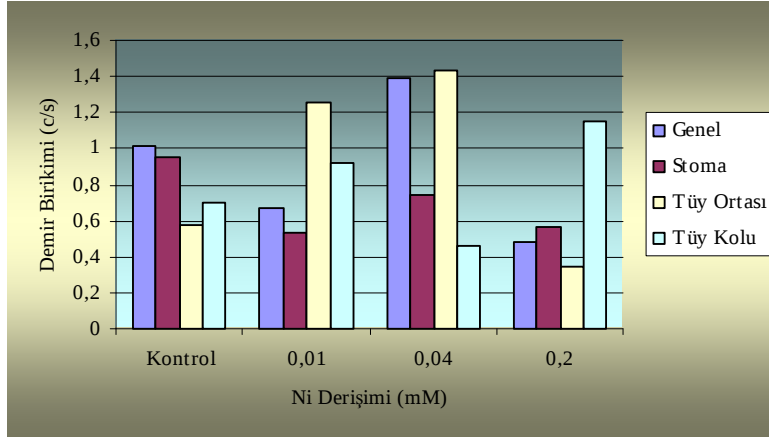
d) Üst yaprak alt yüz Mg



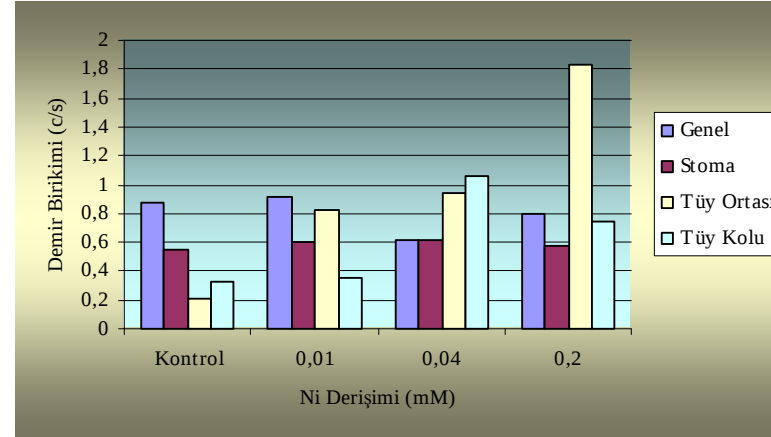
a



b



c



d

Şekil 4.7. Üst yaprak üst ve alt yüzlerinin çeşitli kısımlarında SEM-EDX ile ölçülen Ca, Fe metallerinin oranları

a) Üst yaprak üst yüz Ca

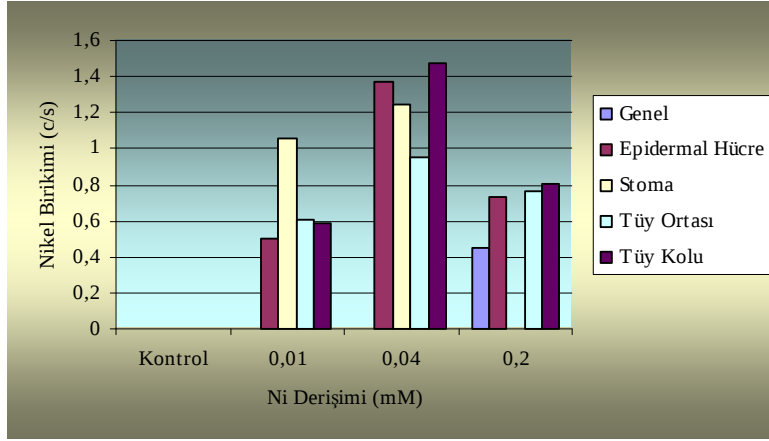
b) Üst yaprak alt yüz Ca

c) Üst yaprak üst yüz Fe

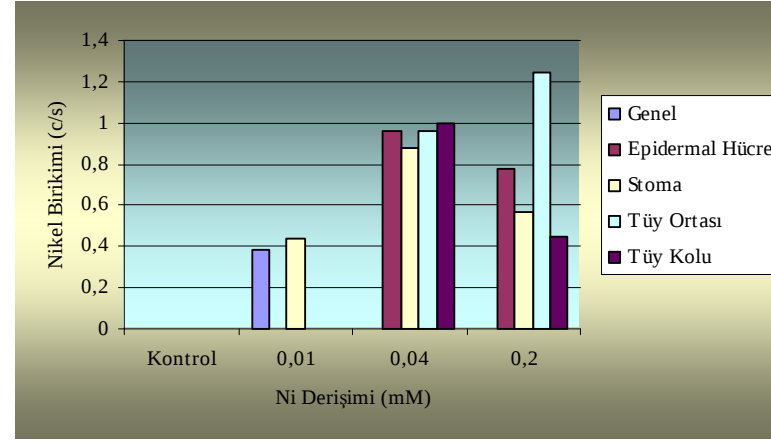
d) Üst yaprak alt yüz Fe

Çizelge 4.3. Farklı nikel derişimleri uygulanmış *A. corsicum* türü alt yapraklarının SEM-EDX metal analiz sonuçları

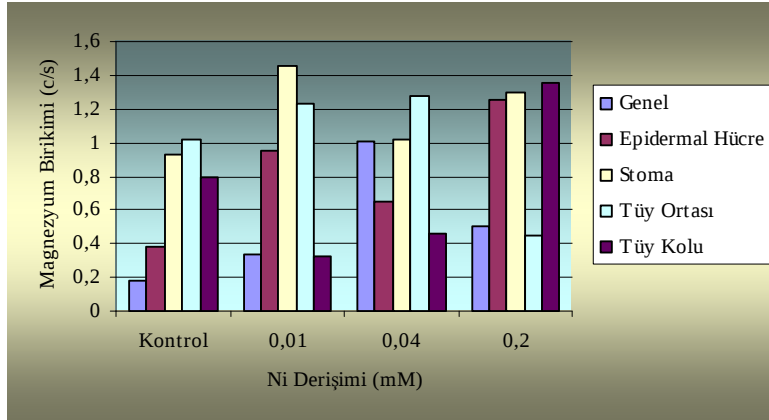
		Genel				Epidermal Hücre				Stoma				Tüy Ortası				Tüy Kolu			
	Sayım/ saniye (c/s)	Ni	Mg	Ca	Fe	Ni	Mg	Ca	Fe	Ni	Mg	Ca	Fe	Ni	Mg	Ca	Fe	Ni	Mg	Ca	Fe
Kontrol	Üst yüzey	0,00	0,18	0,91	0,56	0,00	0,38	1,31	1,57	0,00	0,93	1,47	0,01	0,00	1,02	2,65	0,84	0,00	0,80	2,84	0,78
	Alt yüzey	0,00	0,03	0,92	0,57	0,00	0,22	1,15	0,40	0,00	1,16	1,07	0,96	0,00	0,59	1,20	0,00	0,00	1,76	0,41	0,76
0,01 mM Ni	Üst yüzey	0,00	0,34	0,77	1,12	0,50	0,95	1,41	0,43	1,06	1,45	1,17	0,65	0,61	1,23	3,67	1,04	0,59	0,32	1,71	1,02
	Alt yüzey	0,38	0,60	0,26	0,79	0,00	0,39	0,68	0,99	0,44	0,78	1,13	0,96	-	-	-	-	-	-	-	-
0,04 mM Ni	Üst yüzey	0,00	1,01	1,06	0,99	1,37	0,65	2,84	0,59	1,24	1,02	1,82	0,66	0,95	1,28	6,53	0,41	1,47	0,46	4,86	0,50
	Alt yüzey	0,00	0,38	0,25	0,56	0,96	0,44	0,78	1,21	0,88	0,79	0,56	1,13	0,96	1,52	3,99	1,69	1,00	0,36	4,23	1,02
0,2 mM Ni	Üst yüzey	0,45	0,50	0,33	1,05	0,73	1,25	0,66	1,00	0,00	1,30	0,26	0,87	0,76	0,45	4,08	1,03	0,81	1,35	3,20	0,86
	Alt yüzey	0,00	0,00	0,17	0,00	0,78	0,38	0,69	0,60	0,57	0,54	0,99	1,19	1,24	0,29	4,28	1,09	0,45	1,26	0,69	0,85



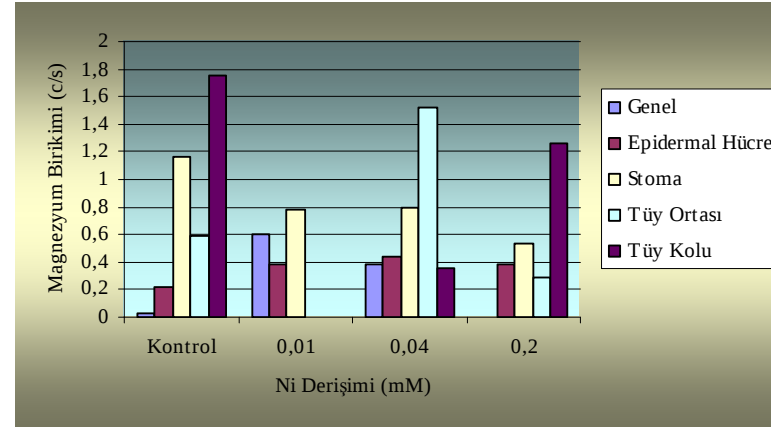
a



b



c



d

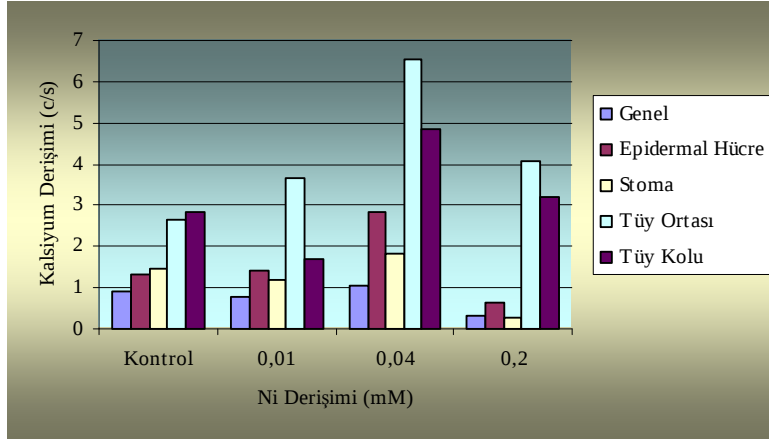
Şekil 4.8. Alt yaprak üst ve alt yüzeylerinin çeşitli kısımlarında SEM-EDX ile ölçülen Ni, Mg metallerinin oranları

a) Alt yaprak üst yüz Ni

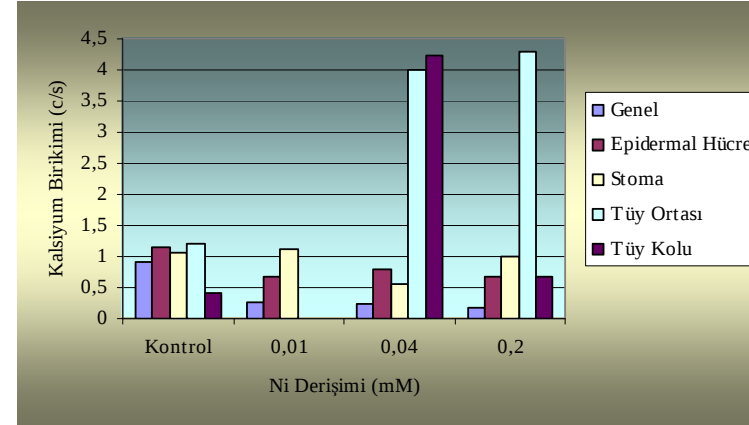
b) Alt yaprak alt yüz Ni

c) Alt yaprak üst yüz Mg

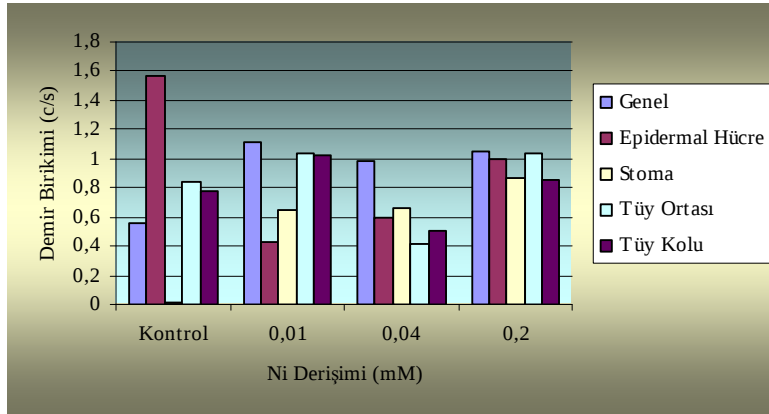
d) Alt yaprak alt yüz Mg



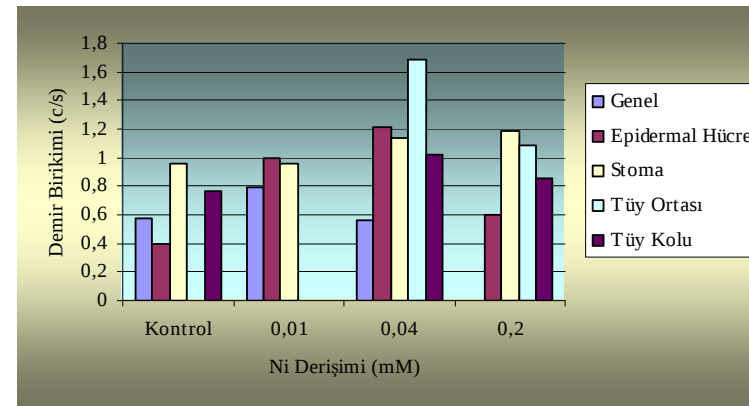
a



b



c



d

Şekil 4.9. Alt yaprak üst ve alt yüzeylerinin çeşitli kısımlarında SEM-EDX ile ölçülen Ca, Fe metallerinin oranları

a) Alt yaprak üst yüz Ca

b) Alt yaprak alt yüz Ca

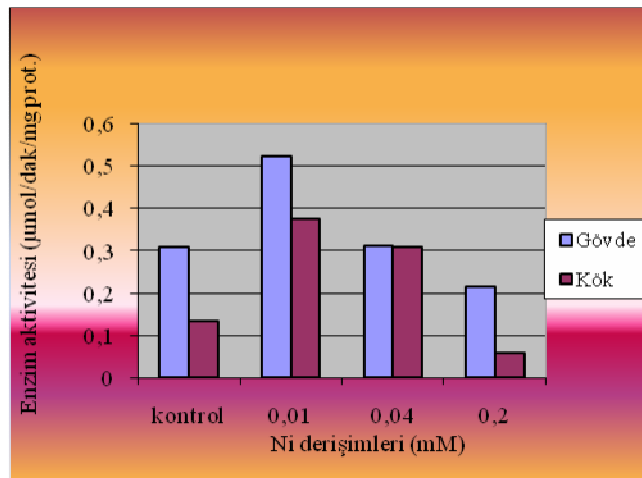
c) Alt yaprak üst yüz Fe

d) Alt yaprak alt yüz Fe

4.2. Antioksidant Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

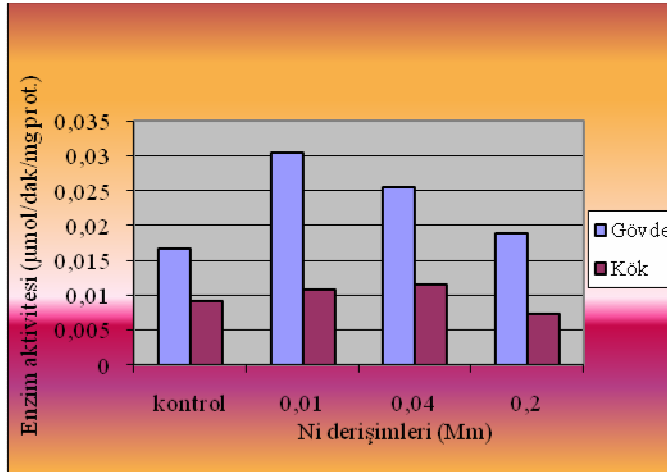
Tüm nikel derişimlerinde geliştirilen *A.corsicum* bitkisine ait gövde ve kök örneklerinden toplam enzim ekstraksiyonu yapıldıktan sonra antioksidant enzimlerden sırasıyla katalaz, glutatyon reduktaz ve askorbat peroksidazın aktivitelerindeki değişimler nikel derişimindeki artışa bağlı olarak incelenmiştir.

Farklı derişimlerde sırasıyla kontrol, 0,01 mM, 0,04 mM ve 0,2 mM nikel uygulanmış *A.corsicum* bitkisinin; gövde kısmındaki katalaz enzim aktivitesi (0,30684; 0,52207; 0,31028; 0,21266 $\mu\text{mol/dak/mgprot.}$) ve kök kısmındaki katalaz enzim aktivitesi (0,13404; 0,37354; 0,30762; 0,05636 $\mu\text{mol/dak/mgprot.}$) olarak tespit edilmiştir. Gövde ve köklerdeki katalaz enzim aktivitesinin 0,01 mM nikel derişiminde belirgin bir artış gösterdiği daha sonra düştüşü gözlenmiştir (Şekil 4.10).



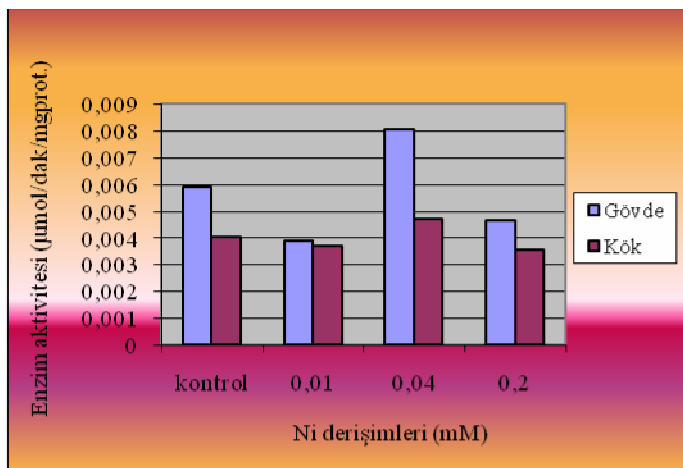
Şekil 4.10. Farklı derişimlerde nikel uygulanmış *A. corsicum* bitkisinin gövde ve köklerindeki katalaz enzim aktivitesi değişimi

Farklı derişimlerde sırasıyla kontrol, 0,01 mM, 0,04 mM ve 0,2 mM nikel uygulanmış *A.corsicum* bitkisinin; gövde kısmındaki glutatyon reduktaz enzim aktivitesi (0,01665; 0,03048; 0,0255; 0,01879 $\mu\text{mol/dak/mgprot.}$) ve kök kısmındaki enzim aktivitesi (0,0091; 0,01086; 0,0115; 0,00727 $\mu\text{mol/dak/mgprot.}$) olarak tespit edilmiştir. Glutatyon reduktaz enziminin gövdedeki aktivitesinin de aynı şekilde 0,01 mM nikel derişiminde artış gösterdiği ve diğer derişimlerde düşmeye devam ettiği gözlenmiştir. Ancak kökteki aktivitesi 0,04 mM nikel derişimine kadar artma göstermiş, 0,2 mM derişimde düşmüştür (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Farklı derişimlerde nikel uygulanmış *A. corsicum* bitkisinin gövde ve köklerindeki glutatyon reduktaz enzim aktivitesi değişimi

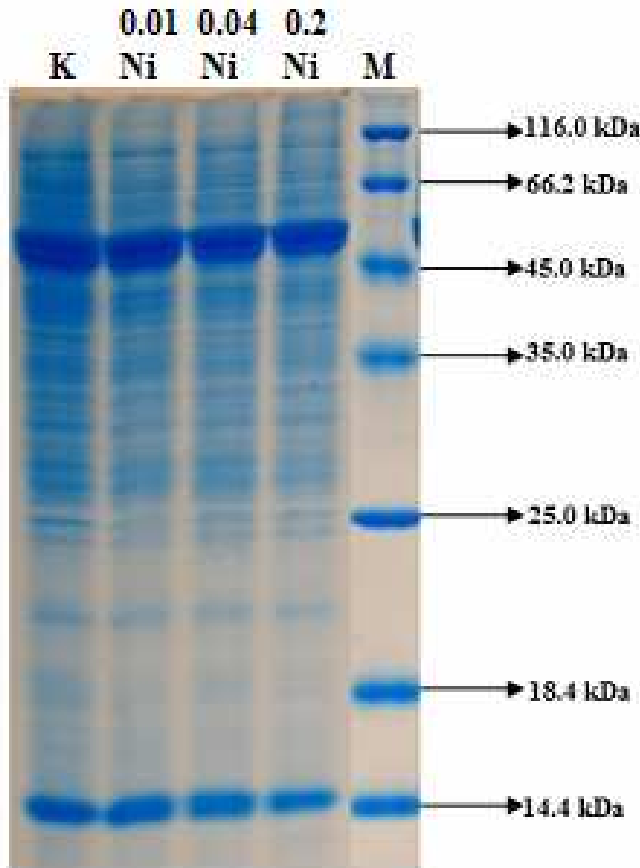
Farklı derişimlerde (sırasıyla kontrol, 0,01 mM, 0,04 mM ve 0,2 mM) nikel uygulanmış *A.corsicum* bitkisinin; gövde kısmındaki askorbat peroksidaz enzim aktivitesi (0,00591; 0,0039; 0,00805; 0,00462 µmol/dak/mgprot.) ve kök kısmındaki enzim aktivitesi (0,00404; 0,00367; 0,00469; 0,00353 µmol/dak/mgprot.) olarak tespit edilmiştir. Bu verilere göre askorbat peroksidazın gövde ve kökteki aktivitesinin sadece 0,04 mM nikel derişiminde belirgin bir artış gösterdiği diğer derişimlerde ise aktivitenin değişken olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Farklı derişimlerde nikel uygulanmış *A. corsicum* bitkisinin gövde ve köklerindeki askorbat peroksidaz enzim aktivitesi değişimi

4.3. Toplam Yaprak Protein Profillerinin Belirlenmesi

Farklı nikel derişimlerinde geliştirilen *A. corsicum* bitkisine ait yaprak örneklerinden toplam protein izolasyonu yapılmış ve SDS-PAGE ile yürütülmüştür (Şekil 4.13). Jelde 49 kDa ve 14 kDa ağırlığında iki temel bant elde edilmiştir bunlar RuBisCO proteininin büyük (LSU, 49 kDa) ve küçük (SSU, 15 kDa) alt üniteleridir. Ayrıca 45 kDa ve 18,4 kDa arasında dağılan çok sayıda küçük bantlar tespit edilmiştir. Bitkilere ait protein bant desenlerinin tüm nikel derişimleri için aynı olduğu ve bantların yoğunluk ya da hareket bakımından kontrolden fark göstermediği görülmüştür.

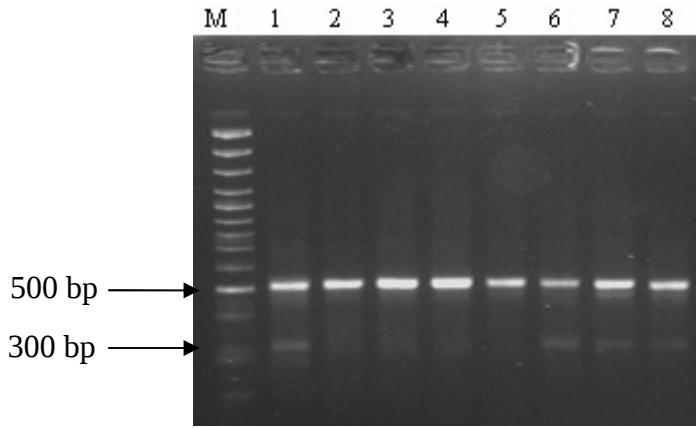


Şekil 4.13. Farklı nikel derişimlerinde geliştirilen *A. corsicum*' un SDS-PAGE ile elde edilen toplam yaprak protein profilleri (M) Protein marker (116 kDa β -galaktozidaz, 66,2 kDa bovin serum albumin, 45,0 kDa ovalbumin, 35,0 kDa laktat dehidrojenaz, 25,0 kDa RE az Bsp 981, 18,4 kDa β - laktoglobulin, 14,4 kDa lizozim)

4.4. DNA' ların RAPD-PZR ile incelenmesi

Farklı derişimlerde nikel varlığında geliştirilen *A. corsicum* bitkisine ait gövde ve kök örneklerinden total DNA izolasyonu yapılmış ve bu DNA' lara OPW10, OPB10, OPA17, B7, OPO04 primerleri ile RAPD-PZR işlemi uygulanmıştır. Bu deneylere ait sonuçlar şekil 4.14-4.18'da verilmiştir.

OPW10 primeri, RAPD-PZR denemesinde 500 bp büyüklüğünde yoğun bir bant ve 300 bp büyüklüğünde zayıf bir bant çoğaltmıştır. Gözlenen bantlarda nikel derişimlerine göre belirgin bir fark yoktur (Bkz. Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Farklı derişimlerde nikel uygulanan *A. corsicum* türünün OPW10 primeri ile elde edilen RAPD profili

M) 100bp DNA Ladder

1) 0,04mM gövde

2) 0,04mM kök

3) 0,2mM kök

4) 0,2mM gövde

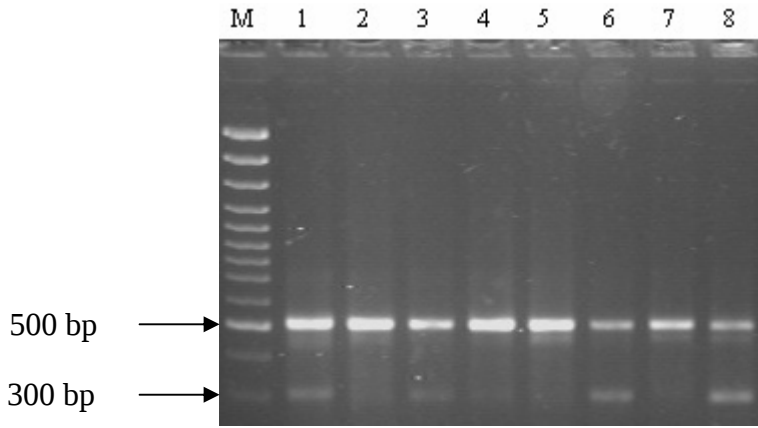
5) 0,01mM kök

6) 0,01 mM gövde

7) Kontrol kök

8) Kontrol gövde

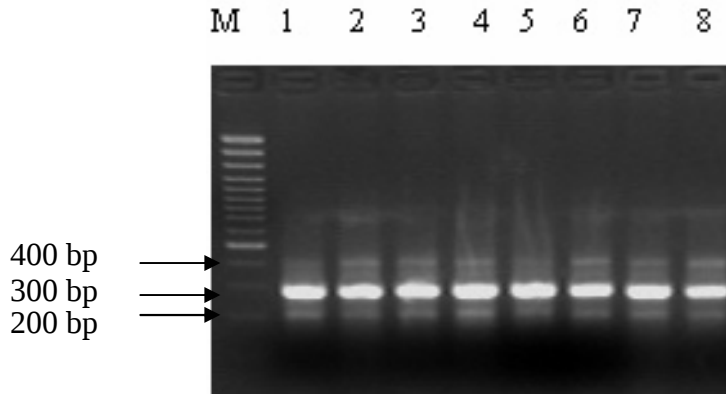
OPB10 primeri, RAPD-PZR denemesinde 500 bp büyüklüğünde yoğun bir bant ve 300 bp büyüklüğünde zayıf bir bant çoğaltmıştır. Gözlenen bantlarda nikel derişimlerine göre belirgin bir fark yoktur (Bkz. Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Farklı derişimlerde nikel uygulanan *A. corsicum* türünün OPB10 primeri ile elde edilen RAPD profili

- | | |
|---------------------|------------------|
| M) 100bp DNA Ladder | 5) 0,01mM kök |
| 1) 0,04mM gövde | 6) 0,01 mM gövde |
| 2) 0,04mM kök | 7) Kontrol kök |
| 3) 0,2mM kök | 8) Kontrol gövde |
| 4) 0,2mM gövde | |

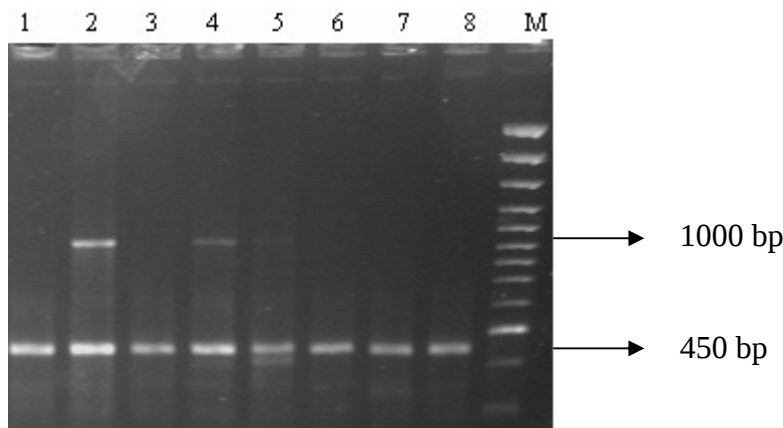
OPB 17 primeri, RAPD-PZR denemesinde yaklaşık 400 bp ve 200 bp büyüklüğünde iki zayıf bant ve 300 bp ve büyüklükte yoğun bir bant çoğaltmıştır. Gözlenen bantlarda nikel derişimlerine göre belirgin bir fark yoktur (Bkz. Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Farklı derişimlerde nikel uygulanan *A. corsicum* türünün OPA17 primeri ile elde edilen RAPD profili

- | | |
|---------------------|------------------|
| M) 100bp DNA Ladder | 5) 0,01mM kök |
| 1) 0,04mM gövde | 6) 0,01 mM gövde |
| 2) 0,04mM kök | 7) Kontrol kök |
| 3) 0,2mM kök | 8) Kontrol gövde |
| 4) 0,2mM gövde | |

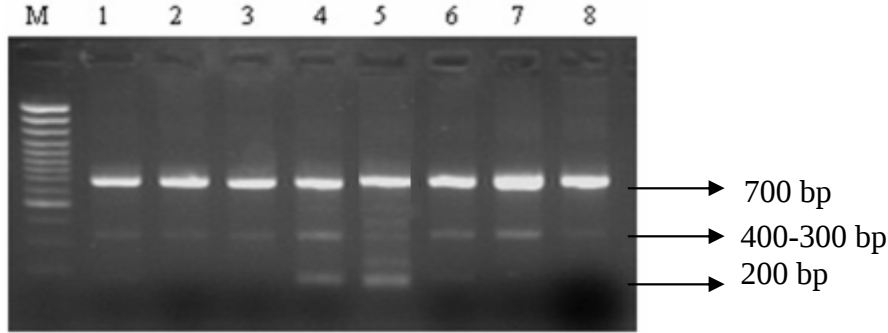
B7 primeri, RAPD-PZR denemesinde yaklaşık 1000 bp ve 450 bp büyüklüğünde iki bant çoğaltmıştır. 900 bp büyüklüğündeki bantın sadece 0,04 mM nikel uygulanan bitki kökünde, 0,2 mM nikel uygulanan bitki gövdesinde ve 0,01 mM nikel uygulanan bitki kökünde çoğaltıldığı diğer örneklerde yer almadığı görülmüştür. En yoğun olarak ise 0,04 mM nikel uygulanan bitki kökünde yer almaktadır (Bkz. Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Farklı derişimlerde nikel uygulanan *A. corsicum* türünün B7 primeri ile elde edilen RAPD profili

- | | | |
|-----------------|------------------|---------------------|
| 1) 0,04mM gövde | 4) 0,2mM gövde | 7) Kontrol kök |
| 2) 0,04mM kök | 5) 0,01mM kök | 8) Kontrol gövde |
| 3) 0,2mM kök | 6) 0,01 mM gövde | M) 100bp DNA Ladder |

OPO04 primeri, RAPD-PZR denemesinde yaklaşık 700 bp büyüklüğünde yoğun bir bant ve 400 bp-300 bp aralığında zayıf bir bant çoğaltmıştır (Bkz. Şekil 4.18). Bunun haricinde 0,01 mM nikel uygulanan bitki kökünde ve 0,2 mM nikel uygulanan bitki gövdesinde yaklaşık 200 bp büyüklüğünde bir bant ortaya çıkmıştır.



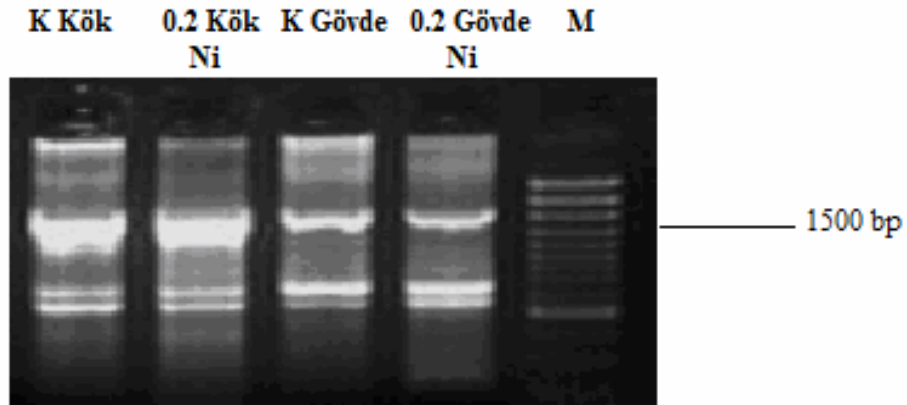
Şekil 4.18. Farklı derişimlerde nikel uygulanan *A. corsicum* türünün OPO04 primeri ile elde edilen RAPD profili

- | | |
|---------------------|------------------|
| M) 100bp DNA Ladder | 5) 0,01mM kök |
| 1) 0,04mM gövde | 6) 0,01 mM gövde |
| 2) 0,04mM kök | 7) Kontrol kök |
| 3) 0,2mM kök | 8) Kontrol gövde |
| 4) 0,2mM gövde | |

OPW10, OPB10, OPA17 primerleri ile yapılan çoğaltmalarda bant farklılıkları görülmezken, OPO04 ve B7 primerleri ile elde edilen RAPD profillerinde bant farklılıkları belirlenmiştir.

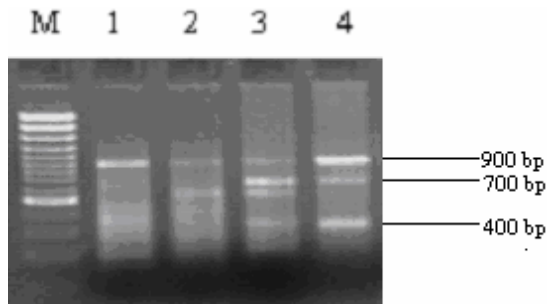
4.5. cDNA' ların RAPD-PZR ile incelenmesi

Bitkilere ait gövde ve kök örneklerinden RNA izole edilmiş ve bu RNA'lar cDNA' ya çevrilerek RAPD-PZR uygulanmıştır. Bant farklılıkları OPA02 primerinde yoğunluk farkı olarak gözlenmiştir (Şekil 4.19). Buna göre kontrol ve 0,2 mM nikel derişimi uygulanan bitkilerin köklerinde yaklaşık 1500 bp büyüklüğünde bir bant daha yoğun iken kontrol ve 0,2 mM nikel muamele edilen bitki gövdesinde yoğunluğunu kaybetmiştir. Yine yaklaşık 500 bp büyüklüğündeki bir bant kontrol ve 0,2 mM nikel derişiminde gövdede daha yoğun görünürken köklerde bantın yoğunluğu daha azdır (Bkz. Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Farklı konsantrasyonlarda Ni uygulanan *A. corsicum* türüne ait cDNA'ların OPA02 primeri ile elde edilen RAPD profili

Bant farklılıkları OPB08 primerinde bazı bantların eksilmesi veya ortaya çıkması şeklinde gözlenmektedir (Şekil 4.20). Buna göre kontrol ve 0,2 mM nikel derişimi uygulanan bitkilerin kök ve gövdelerinde yaklaşık 900 bp büyüklüğünde bir bant ortak olarak görünmektedir ancak 700 bp ve 400 bp büyüklüğünde bir bant sadece 0,2 mM ve kontrol gövde nikel derişiminde bulunurken 600 bp büyüklüğünde bir bant ise sadece 0,2 mM kök ve kontrol gövdede mevcuttur (Bkz. Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Farklı konsantrasyonlarda Ni uygulanan *A. corsicum* türüne ait cDNA'ların OPB08 primeri ile elde edilen RAPD profili

M) 100 bp DNA ladder

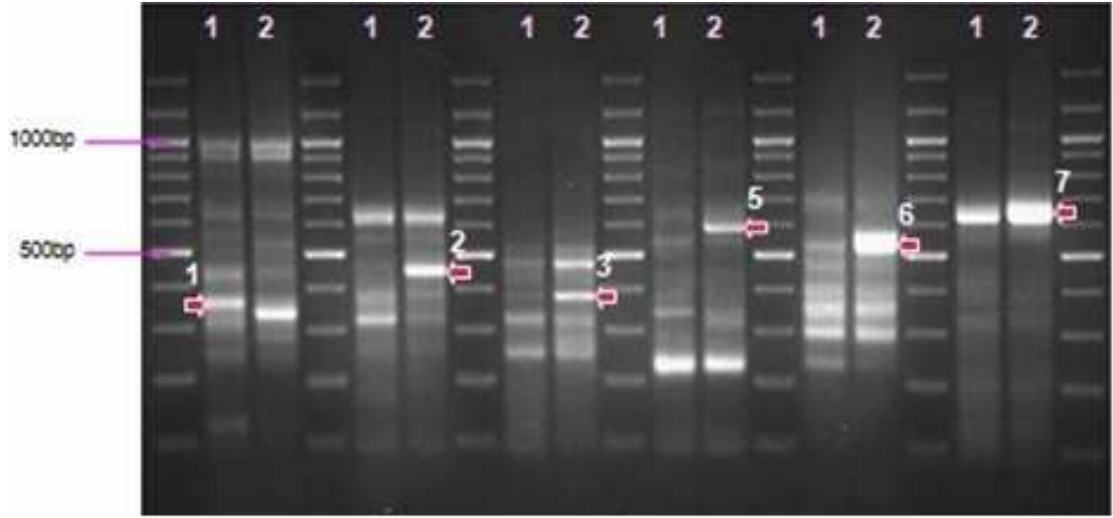
- 1) Kontrol kök
- 2) 0,2 mM kök
- 3) Kontrol gövde
- 4) 0,2 mM gövde

4.6. Farklı İfade Olunan Genlerin Belirlenmesi

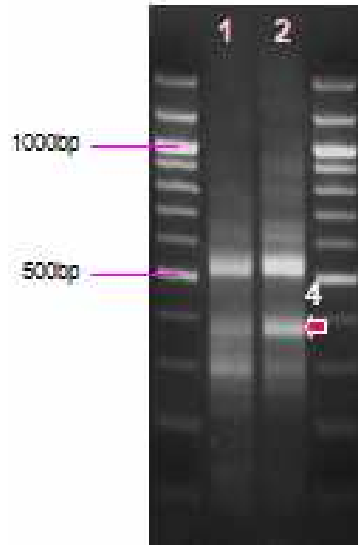
Kontrol ve 0,2 mM nikel uygulanmış bitki örneklerinin kök ve gövdesinden izole edilen toplam RNA ticari bir analiz şirketine gönderilmiştir. RNA' lar cDNA' ya çevrilmiş ve farklı ifade olan bantlar belirlenmiştir (Şekil 4.21). Bu bantlar jelden geri kazanılarak ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) ile dizi analizleri yapılmıştır.

Dizilerin uyumlu olduğu genler NCBI BLAST aracılığıyla gen bankasında kayıtlı diziler içinde aranmış ve bu analize ait sonuçlar çizelge 4.4-4.14' te verilmiştir.

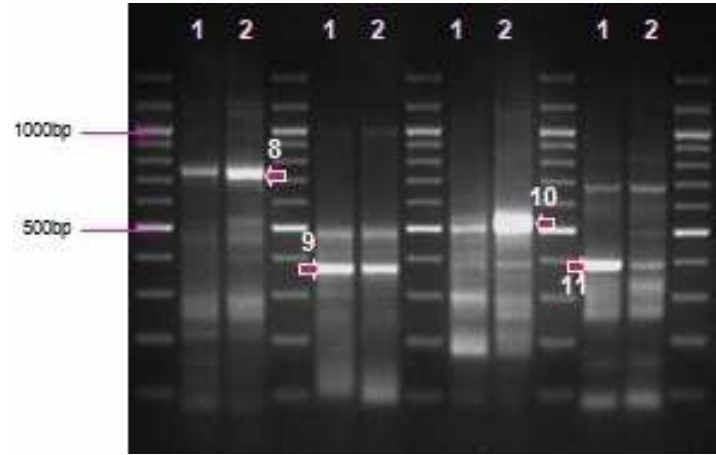
Jel fotoğrafında gözlenen 1 nolu farklı ifade edilen gen dizisi, gen bankasındaki bitki genom dizileri ile karşılaştırıldığında *Arabidopsis thaliana* 1. kromozom dizisinin BAC T24P13 kısmına ait genomik dizisi ile %93 benzer olduğu görülmüştür (Bkz. Çizelge 4.4). 2 nolu farklı ifade edilen gen dizisi, gen bankasındaki bitki genom dizileri ile karşılaştırıldığında *Arabidopsis thaliana* kalmodulin-bağlayan protein (AT5G40190) mRNA' sı ile %68 benzer olduğu gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.5). 3 nolu farklı ifade edilen gen dizisi gen bankasındaki bitki genom dizileri ile karşılaştırıldığında *Arabidopsis thaliana* hipotetikal protein mRNA' sı ile %72 benzer olduğu gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.6). 4 nolu farklı ifade edilen gen dizisi gen bankasındaki bitki genom dizileri ile karşılaştırıldığında *Arabidopsis thaliana* CKB3 (kazein kinaz II beta zincir 3) (CKB3) mRNA ile %49 benzer olduğu gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.7). 5 nolu farklı ifade edilen gen dizisi gen bankasındaki bitki genom dizileri ile karşılaştırıldığında *Arabidopsis thaliana* Lhca2 protein (Lhca2) mRNA' sı ile %99 benzer olduğu görülmüştür (Bkz. Çizelge 4.8). 6 nolu farklı ifade edilen gen dizisi gen bankasındaki bitki genom dizileri ile karşılaştırıldığında *Arabidopsis thaliana* klon 30081 mRNA ile %68 benzer olduğu görülmüştür (Bkz. Çizelge 4.9). 7 nolu farklı ifade edilen gen dizisi gen bankasındaki bitki genom dizileri ile karşılaştırıldığında *Arabidopsis thaliana* proteaz inhibitor/tohum depo/lipit transfer protein (LTP) ailesi protein (AT4G22490) mRNA'sına %41 benzer olduğu görülmüştür (Bkz. Çizelge 4.10).



a



b



c

Şekil 4.21. Kontrol (1) ve 0,2 mM (2) nikel uygulanmış *A. corsicum* bitkisinde farklı ifade olan toplam 11 adet gen bölgesi
a) 1-7 farklı ifade edilen gen bölgesi
b) 4. farklı ifade edilen gen bölgesi
c) 8-11 farklı ifade edilen gen bölgesi

8 nolu farklı ifade edilen gen dizisi gen bankasındaki bitki genom dizileri ile karşılaştırıldığında *Brassica oleracea* var. *acephala* WSCP1R mRNA suda çözünen klorofil proteini ile %55 benzer olduğu görülmüştür (Bkz. Çizelge 4.11). 9 nolu farklı ifade edilen gen dizisi gen bankasındaki bitki genom dizileri ile karşılaştırıldığında *Brassica rapa subsp. pekinensis* klon KBrB081M20 ile %60 benzer olduğu görülmüştür (Bkz. Çizelge 4.12). 10 nolu farklı ifade edilen gen dizisi gen bankasındaki bitki genom dizileri ile karşılaştırıldığında *Arabidopsis thaliana* proteaz inhibitör/tohum depo/lipit transfer protein (LTP) ailesi protein (AT4G22490) mRNA ile %31 benzer olduğu görülmüştür (Bkz. Çizelge 4.13). 11 nolu farklı ifade edilen gen dizisi gen bankasındaki bitki genom dizileri ile karşılaştırıldığında *Lobularia maritima* kloroplast DNA' sı, tamamlanmış dizi ile %99 benzer olduğu görülmüştür (Bkz. Çizelge 4.14).

Çizelge 4.4. DEG1; *Arabidopsis thaliana* 1. Kromozom dizisinin BAC T24P13 kısmına ait genomik dizisi %93 benzer.

Örnek	25	ACTACAAATGGTTTTTCATTANAGAAA - TGCTATTTCCATTTGACAATCTTTGTAATAATA	83
Refer	47900	ACTACAAATGTTTTGCAACAAAACAAGTGTTATTTCCATTTGAATGTCTTTGTAATAATA	47959
Örnek	84	TCATTGTATGATTTATTCTATGAGGCAAAGAATTACAGGAAAGCAAAATGGTA - - TCTCT	141
Refer	47960	TCATTGGATGTTTCCTTCCATGAGGCAAGGAATTACAGAAAACCAAAATGGTTACTCTCT	48019
Örnek	142	CTGGTGATCTTACAAACAATTAGCTCTAAAAGTTTCGNGNGGATACCAAGGCTATTGTAG	201
Refer	48020	CTATTGATCCTACAAGCAATTAGTTTCAACATTTG-----TAACTTGT-TACTCTAT	48070
Örnek	202	GCCGANAANAGCCTTCATTGCCTTCTTTTTTCGATACCACTTTGCCATAAACACCCTTTCC	261
Refer	48071	GCCAAGAAGAGTCTTCATTGCCTTCTTTTTTCGATACCACTTTGCCATAAACCCCTTCCC	48130
Örnek	262	TAGCTTCATGATTTTTTCCATCTCTGCAATGGTACTGCAACCTCCAGTCTTCTTCTTCAT	321
Refer	48131	TAGCTTCATGATTTTCTCCATCTCCACAATGTTACTGAAACCTCCATGCTTCTTCATCAT	48190
Örnek	322	CCCTTCCACTACCGTCTTCATCAGTCTCTCATCACTTC	359
Refer	48191	CCCTTCCACAGCCATCTTCATCAATCTCTCATCACTTC	48228

Çizelge 4.5. DEG 2; *Arabidopsis thaliana* kalmodulin-bağlayan protein (AT5G40190) mRNA' sı, %68 benzer.

Örnek	1	CCTTCTCTCTCGCTTCTTCAGCTACAGGGGCAGTTATGCGACGCCATGAAGAAAGAAGGT	60
Refer	379	CCGTCTCTATCGCTTCTTCAGTTGCAGACTCAGTTATGTGATATGTTGAAGAAAGAATCT	438
Örnek	61	GTTGAGATTGGTGAGGAGTATCGTCCTGATTCGTGGGTTCCGTTTTGTCCTGTGGCTCTT	120
Refer	439	GTTGACATTGGTGAAGAGTATCGTGTTGATTCTTGGGTTCCGTTTTGTCCCGTGGCTCTT	498
Örnek	121	GATGTGCCGAAATCGCGTATGGCTGAGGGTTTCTCGGTTTTGAGAGATTTGAAGCTCCCC	180
Refer	499	GATGTTCTAAGTCTCGTATGGCTGAGGCTTTCTCTGTGTTGAGAGATTTGAAGCTTCCG	558
Örnek	181	GTGAATGGTTACGCCATGGATATTGGTCTTGTTGAGTTCTCCCTGTTGTTGAGTCTTC	240
Refer	559	GTGAATGGTTATGGTATGGAGATTGGTCTCGTTGAGTTTCTCTCTGTTGTTGAGTCTTC	618
Örnek	241	TCTTTTGCTCTTGGTAAACATTTGGAGTCTTGA	273
Refer	619	TCATTTCTCTTGGTAAACATTTGGAGTCTTGA	651

Çizelge 4.6. DEG 3 *Arabidopsis thaliana* hipotetik protein mRNA'sı %72 benzer

Örnek	1	ACGAGGAAGGGCACGTGGAGGACGAATCGACCGTTGGATATGCATTTACCTATAAAGGAA	60
Refer	1429	ACGAGGAAGGACACGTGGAAGATGAAACAACCGTTGGATATGCTTTCACGTTTAAAGGAA	1488
Örnek	61	ACAGCGTGGAACAATTGACGCAAACTCTACGAGAAGAAACATGCTTGGAGGATGCTGTGG	120
Refer	1489	ATAGCGTGCGGAGCTGACTCAGACATTGCGAGAAGAAACGTGCATGGAAGACGCTGTGG	1548
Örnek	121	TCTGTACTCGGAGTCCCTTAAACGGCAAGTTGTTTCCTCTCCGTTTGCAACTTCCACCTA	180
Refer	1549	TGTGTACTCGTAGTCCCTTAAACGGCAAGCTGTTTCCTCTTCGTTTGCAACTTCCCTCCTA	1608
Örnek	181	ACAACGGAACATTGCATGTCATTTTGGTACCCTCCGCTGCCACCCTCTAG	230
Refer	1609	ACAACGGAACATTGCATGTCATTTTACTACCCTCCAGCGCGAGCCTCTAG	1658

Çizelge 4.7. DEG 4; *Arabidopsis thaliana* CKB3 (kazein kinaz II beta zincir 3) (CKB3) mRNA, %49 benzer

Örnek	154	TTTTCCCCCAACGAGTTAGGCTGTTGTGAT--TAAGTTTTTCTTGGAAGTC-----	203
Refer	1191	TTTTCCCCAATGAGCCAGGCTGTTGCACTTCTAAG-TTTTCTTGGAAGTCATGAGATT	1133
Örnek	204	---TCACGAATCCAAGTTTAACTTCATTTTTTAGCTCTCATCTTCT-ACCCAATGATTG	259
Refer	1132	CTTTCAGATTCCATCTTCAACTTC-----AGCTCTCATCCTCTAACCCAATGGTTG	1080
Örnek	260	ATTCCATGCTCCATTCAAACCACAGCTA-CTCTTCAATTAGCTCA	303
Refer	1079	A-TGTATGCTCCAGTC--ACCGCAGCTATCGTTTCAGTT-GCTCA	1039

Çizelge 4.9. DEG 6; *Arabidopsis thaliana* klon 30081 mRNA, %68 benzer

Örnek	164	ATCACTCTCATATATTGAACACATGCAGCTCATTATTCATTAACTTATAATGACTGA - -	221
Refer	651	ATGACTCTCATATATCCAACACAA - - - CTCTTTATTT - TTCCACATTCAAAGAGTGATA	597
Örnek	222	- - AATCAACATGATTCAACCACACAAACGCATGCATGGATAGGATA - - - - - GCCACAC	272
Refer	596	AAAATCGGCATGCTTCAATCACACATAC - - ATGTACGGACAGGATAATAGATAGTCACAC	539
Örnek	273	GAGGAGGGCTCTCCTCTATTCTCGGACAAGAGATGTCCGTCGATTTCTTTGGAGACCTC	332
Refer	538	GAGGAATATTCTCCTCTATCCCTCGGCCAAGAGATGTTCGTCGATYTCTTKGGAGACYTC	479
Örnek	333	GACG - CAGAACTGGAGGAGAGTTTCGGGATGAGCAACCTCGTCGCTAATTTTCTCATACT	391
Refer	478	RACGRCAGAAYTGGAGGAGAGTYTCRGGATGAGCYACCTCSTCGYTGATTTTCTCATACT	419
Örnek	392	CAAGGTGCCAGTGCACAATACTCCCTGCCCCTCCATGCTTAGGGGTCACCTGGATTGTGA	451
Refer	418	CAARGTGCCAATGCACMAYACTTCCWGRACCTCCATGCTTAGGRGTCACYTGGATYGTGA	359
Örnek	452	TCAAGAAGCTCTTGACTCTTTCATCAGATCACCTTCTATAACCCTAAACGTGATCAAGT	511
Refer	358	TCAAAAAGCTCTTGACTCTTTCATCAGATCACCTTCTATAACCCTRAACGTGATCAAGT	299
Örnek	512	TTTTC 516	
Refer	298	TYTTC 294	

Çizelge 4.10. DEG 7; *Arabidopsis thaliana* proteaz inhibitor/tohum depo/lipit transfer protein (LTP) ailesi protein(AT4G22490) mRNA, %41 benzer

Örnek	352	TGGTGGCGGACACTGAAAACCAATAGGAAAAACCATATTGCAAGCGAAAAAGATTTACAG	411
Refer	393	TGGTGGTGGACACTGGAAACCGATAGGAAAAACCCTATTGCAAGCAAAAAAGATTTCTCT	334
Örnek	412	AATGGCCTCATCAATAGCAAAAACCAAAGGAATTGGCCTGAAGACATAGCAAAGGCAATC	471
Refer	333	AACGGCCACATCAATACCGAAAACCAACGGAATCGGCCTGAAGATAAAGCAGAGACAATC	274
Örnek	472	GGCCACTTGAACATTCGGGAGGCCCTGGATAGCATCGCAACATGCCCGTGCCCTTGGGTC	531
Refer	273	GGTTACTTGAACATTAGTGAGGCCATTGAGGGCAGTGCAACACTGTCGTGCTCTGGGGTC	214
Örnek	532	GCCGGCAAATACATTGGGTAGGCCAGGTAAATTGGCACACACGCCTAGTTGCAATGGGTC	591
Refer	213	GCCAGCTGTAAACATTGGCTAGGCCAAGGACGTTGGCACATACGCCTAGTTGCAATGGGTT	154
Örnek	592	TCTAGGGCACGTGCCAAAGTTGTCGGTC	619
Refer	153	TCTGGGACATGAGCCAAAGTTGTTGGTC	126

Çizelge 4.11. DEG 8 *Brassica oleracea* var. *acephala* WSCP1R mRNA suda çözünen klorofil proteini, %55 benzer

Örnek	1	AGAGCTGTTGTCGGTTGGCTTAAGATAAGGGCGGCTATGAGGTGGGGCTTCTTTATCAGG	60
Refer	56784	AGAGCTGTTGTTGGGTGGCTTAAGATAAAGGCAGCAATGAGATGGGGTTTCTTCATCAGG	56725
Örnek	61	AGGAAAGCCGCTGAGAGGCGAGCACAGATGGTAGAGCTTGATGATGACGAAGAGGAATAG	120
Refer	56724	AGGAAAGCTGCTGAGAGGCGTGACAGATTGTAGAGCTGGATGATGATGACGAAGAATAG	56665
Örnek	121	TCTGGTCTATCTTTACCA---CAGATCAT---TAACTCATGATGGTAACAACACTGAT	173
Refer	56664	TCTGGTCCTTCTTCATCATGATCGTATCATACCTTCA-TGATGATGGTAACAACACTACT	56606
Örnek	174	GACTC-AAACCGTGTTTACC	192
Refer	56605	GACTCAAAACAGTGTTTACC	56586

Çizelge 4.12. DEG 9 *Brassica rapa subsp. pekinensis* klon KBrB081M20, %60 benzer

Örnek	1	AGAGCTGTTGTCGGTTGGCTTAAGATAAGGGCGGCTATGAGGTGGGGCTTCTTTATCAGG	60
Refer	56784	AGAGCTGTTGTTGGGTGGCTTAAGATAAAGGCAGCAATGAGATGGGGTTTCTTCATCAGG	56725
Örnek	61	AGGAAAGCCGCTGAGAGGCGAGCACAGATGGTAGAGCTTGATGATGACGAAGAGGAATAG	120
Refer	56724	AGGAAAGCTGCTGAGAGGCGTGCACAGATTGTAGAGCTGGATGATGATGACGAAGAATAG	56665
Örnek	121	TCTGGTCTATCTTTACCA----CAGATCAT---TACACTCATGATGGTAACAACACTGAT	173
Refer	56664	TCTGGTCCTTCTTCATCATGATCGTATCATACCTTCA-TGATGATGGTAACAACACTACT	56606
Örnek	174	GACTC-AAACCGTGTTTACC	192
Refer	56605	GACTCAAAACAGTGTTTACC	56586

Çizelge 4.13. DEG 10 *Arabidopsis thaliana* proteaz inhibitör/tohum depo/lipit transfer protein (LTP) ailesi protein (AT4G22490) mRNA, %31 benzer

Örnek	345	TGGTGGCGGACACTGAAAACCAATAGGAAAAACCATATTGCAAGCGAAAAAGATTTACAG	404
Refer	393	TGGTGGTGGACACTGGAAACCGATAGGAAAAACCCTATTGCAAGCAAAAAAGATTTCTCT	334
Örnek	405	AATGGCCTCATCAATAGCAAAAACCAAGGAATTGGCCTGAAGACATAGCAAAGGCAATC	464
Refer	333	AACGGCCACATCAATACCGAAAACCAACGGAATCGGCCTGAAGATAAAGCAGAGACAATC	274
Örnek	465	GGCCACTTGAACATTTCGGGAGGCCCTGGATAGCATCGCAACA	506
Refer	273	GGTTACTTGAACATTAGTGAGGCCATTGAGGGCAGTGCAACA	232

Çizelge 4.14. DEG 11 Lobularia maritima kloroplast DNA' sı, tamamlanmış sekans, %99 benzer

Örnek	1	TCaaaaaaaaGAATTTGTATCGAATAAAATATATACTTCGTCTTTGTTGTGTTAAACT	60
Refer	2292	TCAAAAAAAAAAGAATTTGTATCGAATAAAATATATACTTCGTCTTTGTTGTGTTAAACT	2233
Örnek	61	TTGGCTCGTAAACGTAAAAGTACTGTACGCGCTTTTTTAAAAGGGTTGGGCTCGGGTTTA	120
Refer	2232	TTGGCTCGTAAACACAAAAGTACTGTACGCGCTTTTTTAAAAGGGTTGGGCTCGGGTTTA	2173
Örnek	121	TTGGAAGAATTCCTTACGGGGGAAGACCAGGTTCTTTCTTTAATCTTCCCAAGAAGCTAT	180
Refer	2172	TTGGAAGAATTCCTTACGGGGGAAGACCAGGTTCTTTCTTTAATTTTCCCAAGAAGTTAT	2113
Örnek	181	TATGCTTCTAAAAGATTATATCGAGTGCGGATTTGGTATTTGGATATTCTTTATCTTAAT	240
Refer	2112	TATGCTTCTAAAAGATTATATCGAGTGCGGATTTGGTATTTGGATATTCTTTATCTTAAT	2053
Örnek	241	GATTTGGTCAATCATGAATAATTGGGTTATGAGA - TCCCGTAAATTAAATCAAAATTTAT	299
Refer	2052	GATTTGGTCAATCATGAATAATTGGGTTCTGAGACTCCA - TAAATGAAATCAAAAGTTAT	1994
Örnek	300	CATAACTTATACAGAGATAAAAAAAAAAAAAA	331
Refer	1993	CATAACTTATGCAGAGATAACAAAAAAGAAA	1962

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda başta ağır metaller olmak üzere pek çok inorganik ve organik kirleticinin çevreden uzaklaştırılmasında “bitkisel arıtım” tekniği kullanılmaktadır. Bitkisel arıtım; kirletilmiş durumdaki toprak, su ve havanın; metaller, pestisidler, çözücüler, patlayıcılar, ham petrol ve türevleri ile çeşitli diğer kirleticileri bulundukları ortamdan tutma, indirgeme veya giderme özelliğine sahip bitkilerce arındırılmasıdır [5].

Brassicaceae familyası üyelerinden pek çoğu bu özelliklere sahiptir. Özellikle *Alyssum* cinsine ait pek çok türün nikel metalini biriktirmesi ve bazı türlerde bu oranın kuru yaprak ağırlığının %3’ üne tırmanması bu alanda elde edilmiş önemli bulgulardandır [7]. Bugüne kadar *Alyssum* türünün nikel biriktiren üyeleri üzerine yapılan çalışmalar daha çok *Alyssum murale* bitkisi üzerine yoğunlaşmıştır.

Bu çalışmada nikel biriktirici türlerden *Alyssum corsicum*, doku kültürü şartlarında farklı nikel derişimleri varlığında yetiştirilerek nikel biriktirme potansiyeli ve metal içeriğindeki değişim belirlenmiş, bitkiye nikelin değişen oranları uygulandıktan sonra; yaprak morfolojisinde, antioksidant enzim aktivitesinde, toplam yaprak proteinlerinde ve DNA profilindeki değişimler tespit edilmiş ayrıca farklı nikel derişimlerinde bitkide farklı ifade olunan genler ortaya çıkartılmıştır.

Çalışmada çeşitli metallerin X-ışınları floresans (XRF) spektroskopisi yöntemi ile bitkideki miktarları incelenmiştir. Kontrol, 0,01; 0,04; 0,2 mM nikel içeren ortamlarda gelişen bitkinin gövdesinde bulunan nikel derişimi sırasıyla 19; 34,5; 93,7; 932,5 µg/g oranında bulunmuştur. Köklerde ise bu oran sırasıyla; 20,03; 20,9; 74,9; 499,7 µg/g’dır. Özellikle 0,2 mM nikel derişiminde gövdedeki nikel birikiminin 932,5 µg/g gibi yüksek bir orana ulaştığı görülmektedir. Aynı derişimde kökteki oran daha azdır (499,7 µg/g) . Uygulanan diğer nikel derişimlerinde de fark bu kadar belirgin olmasa da gövdedeki oranın köklerden daha fazla olduğu belirlenmiştir, bu sebepten *Alyssum corsicum* bitkisinin nikel metalini köklerden çok gövdesinde biriktirdiği söylenebilir. Kükürt (%0,54, %0,58, %0,73, %0,82) ve çinko

oranının (144,9; 126,9; 247,9; 268,1 µg/g) gövdede nikel derişimi ile orantılı bir şekilde artış gösterdiği görülmüştür. Mangan derişimi (%0,035, %0,035, %0,040, %0,044) de gövdede diğer metaller kadar belirgin olmamakla birlikte artan bir değer göstermiştir. Köklerde ise Mg derişimi (%0,038, %0,038, %0,045, %0,07) artış göstermektedir.

Gövde üst yapraklarında SEM-EDX ile yapılan morfolojik incelemelerde; artan nikel derişimleriyle birlikte kontrole göre üst yüzeyde daha belirgin olmak üzere yaprak tüylerinde sayı ve yoğunluk bakımından bir azalma olduğu gözlenmiştir. 0,04 mM ve 0,2 mM nikel derişimlerinde, yaprak tüy uçlarında kıvrılmaların meydana geldiği yer yer yaprak tüylerinin dinamik yapılarını ve dikensi çıkıntılarını kaybettiği ayrıca yaprak tüy merkezlerinin değişik şekiller oluşturduğu ve üzerlerinde düzensiz çıkıntıların olduğu gözlenmiştir.

Gövde alt yapraklarında yapılan tüm morfolojik incelemeler sonucunda ise; 0,01 mM nikel derişiminde alt yüzeydeki yaprak tüylerinin tamamen dökülmüş olduğu görülmüştür. Bunun sebebinin alt yaprakların nikelli besiyeri ile olan temasından olabileceği düşünülmektedir. 0,01 mM, 0,04 mM ve 0,2 mM nikel derişimlerinde yaprak tüylerinin yer yer yaprak epiderm hücreleri arasına gömüldüğü gözlenmiştir. 0,2 mM nikel derişiminde daha belirgin olmak üzere yine yaprak tüylerinin dinamik yapılarını ve dikensi çıkıntılarını kaybettiği, tüylerde şekil bozukluklarının meydana geldiği ve üzerlerinde düzensiz çıkıntıların olduğu gözlenmiştir.

Çalışmada *A.corsicum* bitkisinin SEM-EDX incelemesinde özellikle üst yaprakların yoğun tüyler ile örtülü olduğu görülmektedir. Tüyler tek hücrelidir ve bazal kompartman, sap ve kollardan oluşmaktadır. Esas olarak tohumda bulunan çok az miktarda nikel oranı bile normal bitki gelişimi ve büyümesini sağlamaya yetmektedir [109]. Bu yüzden kontrol bitkilerinde nikel derişimlerine rastlamak mümkündür.

Bitkilerde üst yaprak üst yüzeyde nikel miktarının en belirgin olarak stomalarda arttığı daha sonra ise tüy kolu ve tüy ortasında artış gösterdiği görülmüştür. En çok biriktirme oranı ise 0,2 mM nikel derişimi uygulanan bitkilerdedir. Genel görünümde

ise 0,2 mM derişimde nikel biriktirme oranında bir düşme belirlenmiştir. Üst yaprak alt yüzeyde ise nikel miktarının en belirgin olarak stoma hücrelerinde ve tüy kolunda arttığı, en çok biriktirme oranının ise 0,2 mM nikel derişiminde tüy kolunda olduğu belirlenmiştir. Alt yaprak üst yüzeyde nikel miktarının en belirgin olarak 0,04 mM nikel derişiminde tüm kısımlarda arttığı gözlenmiştir. Alt yaprak üst yüzeyde ise nikel miktarının en belirgin olarak 0,04 mM nikel derişiminde tüm kısımlarda arttığı gözlenmiştir. 0,2 mM nikel derişimi uygulandığında ise tüy ortasında artışın en yüksek düzeye ulaştığı gözlenmiştir.

Mcneer ve arkadaşlarının [110] X -ışını ile desteklenmiş mikrotomograf cihazı ile yaptıkları çalışmada 100 mg/kg ve 2000 mg/kg nikel varlığında, toprakta geliştirilen *A. murale* yaprak, gövde ve kök örnekleri incelenmiştir ve nikelin gövde ve yaprak dermal dokularında Mn ile birlikte biriktirildiği görülmüştür. Toplam nikel miktarı 1300 µg/g seviyesine kadar çıkmaktadır. Yapraklarda nikelin temel olarak yerleştiği bölge ise tüy ve tüy tabanları olarak gözlenmiştir [110]. Ancak *A. murale* bitkisinin en başarılı nikel biriktirici türlerden olduğu da göz önünde bulundurulmalıdır.

Tüyler su kaybının önlenmesinde ve böceklerle karşı bir savunma mekanizması olarak kullanılırlar. Öncelikli olarak kalsiyum okzalat veya kalsitten oluşurlar bu yüzden bizim çalışmamızda SEM-EDX deneylerinde Ca oranı tüy ve tüy kollarında diğer tüm metallere çok daha fazla çıkmıştır. SEM-EDX cihazı ile yapılan ölçümlerde Ca oranı miktarı aynı zamanda görüntü alanında kaç tane kalsiyum ya da nikelce zengin yapının bulunduğu ile de ilgilidir [110]. Ayrıca Ca hücre duvar yapısına da katılan, bolca rastlanan bir elementtir [79].

Metal biriktiren bitkilerde, metallerin epidermal yerleşimi; organik asitlerle kompleksler yaparak epidermal hücrelerdeki vakuoller içinde bölmelendirilmeleri ile ilgilidir. Pek çok nikel biriktirici tür üzerine yapılan çalışmalar histidin ve sitratı ilk olarak kompleks oluşturan bağlayıcılar olarak göstermektedir. Ayrıca metal derişimlerinin farklılığı yaşa da bağlıdır. Genel olarak yaşlı yapraklar genç olanlardan daha çok ayrılmış metal bulundurmaktadır [110].

Alyssum murale üzerine yapılan çalışmada artan nikel oranları ile birlikte trikom yoğunluğunda da bir azalma gözlenmiştir. Manganez ve çinko oranlarında ise nikel derişimi ile orantılı bir artış gözlenmiştir. Ayrıca nikel oranları ile kükürt arasında da benzer bir korelasyon bulunmuştur [78]. Çalışmamızda da bu yönde bulgular elde edilmiştir. Kükürtün artan seviyesi kükürt içeren ligandların nikel tutumu ile ilgili olabilir [109]. Yine Broadhurst ve arkadaşlarının [78] yaptığı çalışmada nikel tüm bekçi hücrelerinde tespit edilmiştir. Kalsiyumun da güçlü bir şekilde tüylerde ve özellikle de kolların üst yüzeyinde ve nodüllerde biriktirildiği belirlenmiştir [78].

Alyssum lesbiacum üzerine yapılan bir çalışmada nikelin yine tüylerde biriktirildiği ve yine bu yapıların yüksek oranda kalsiyum ve potasyum bulundurduğu görülmüştür [111]. Psaras ve arkadaşlarının [112] yapmış olduğu çalışmada ise nikelin stoma bekçi hücrelerinden atıldığı gözlenmiştir.

Çalışmada 0,01 mM, 0,04 mM, 0,2 mM nikel derişimlerinde geliştirilen *A.corsicum* bitkisine ait gövde ve köklerde antioksidant enzimlerden sırasıyla katalaz, glutatyon reduktaz ve askorbat peroksidazın aktivitelerindeki değişimler nikel derişimindeki artışa bağlı olarak incelenmiştir. Gövde ve köklerdeki katalaz enzim aktivitesinin 0,01 mM nikel derişiminde belirgin bir artış gösterdiği daha sonra düştüğü gözlenmiştir.

Glutatyon reduktaz enziminin gövdedeki aktivitesinin de aynı şekilde 0,01 mM nikel derişiminde artış gösterdiği ve diğer derişimlerde düşmeye devam ettiği gözlenmiştir. Ancak kökteki aktivitesi 0,04 mM nikel derişimine kadar artma göstermiş, 0,2 mM derişimde düşmüştür. Askorbat peroksidazın gövde ve kökteki aktivitesinin ise sadece 0,04 mM nikel derişiminde belirgin bir artış gösterdiği diğer derişimlerde ise aktivitenin değişken olduğu gözlenmiştir.

Kadmiyum ve bakırın *Pisum sativum* L. antioksidant enzimleri üzerine olan etkilerini inceleyen Chaoui ve El Frejani [113] her iki metalin de 20 ve 100 μM 'lık oranlarda muamelesi ile bitkideki katalaz aktivitesinin düştüğünü görmüşlerdir.

Çinko toksikliği altında *Brassica juncea* bitkisinin antioksidant enzim aktivitelerindeki değişimleri araştıran Prasad ve arkadaşları [114] bitkilere sıvı kültürde 0,007; 0,05; 5 ve 10 mM çinko uyguladıktan sonra katalaz, askorbat peroksidaz ve glutatyon reduktaz aktivitesinin arttığını gözlemişlerdir.

Schickler ve Caspi [94]' nin nikel derişimleri varlığında *Alyssum argenteum* ve *Alyssum maritimum*' un antioksidant enzim aktiviteleri üzerine yaptıkları çalışmada; hiperakümülatör tür olan *A. argenteum*' un askorbat peroksidaz aktivitesinin nikel derişimi ile birlikte giderek arttığı bulunmuştur. Glutatyon reduktaz aktivitesi ise kontrolde yüksek iken 0,01 mM derişimde azalmış daha sonra 0,1 mM derişimde hızlı bir artışa geçmiştir.

A. corsicum ile yapmış olduğumuz çalışmada glutatyon reduktaz aktivitesinin yüksek derişimlerde azaldığı görülmüştür. Bunun sebebi metalin glutatyon döngüsündeki sülfidril grupları ile doğrudan etkileşimi olabilir. Ancak genel olarak yüksek metal derişimlerine doğru tüm antioksidant enzim aktivitelerindeki azalma nikel biriktiren *A. corsicum*' un serbest radikallerin oluşumunu azaltan ya da yok eden bir sisteme sahip olduğunu böylece O_2^- oluşumunu engellediğini ve antioksidant enzimlerin aktive edilmesine olan ihtiyacı azalttığını düşündürmektedir.

Farklı nikel derişimlerinde geliştirilen *A. corsicum* bitkisine ait yaprak örneklerinden toplam protein izolasyonu yapılmış ve SDS-PAGE ile yürütülmüştür. Jelde 49 kDa ve 14 kDa ağırlığında iki temel bant elde edilmiştir bunlar RuBisCO proteininin büyük (LSU, 49 kDa) ve küçük (SSU, 15 kDa) alt üniteleridir ayrıca 45 kDa ve 18,4 kDa arasında dağılan çok sayıda küçük bantlar tespit edilmiştir. Bitkilere ait protein bant desenlerinin tüm nikel derişimleri (kontrol, 0,01 mM, 0,04 mM, 0,2 mM) için aynı olduğu ve bantların yoğunluk ya da hareket bakımından kontrolden fark göstermediği görülmüştür.

Hajduch ve arkadaşları [97]' nin yapmış oldukları çalışmada ağır metal stresi ile prinç yaprak protein dizilimlerinde ortaya çıkan değişiklikler incelenmiştir. Temel değişiklikler RuBisCO proteininin büyük (LSU, 49 kDa) ve küçük (SSU, 15 kDa)

alt ünitelerinde görülmüştür. Ağır metallere özellikle de bakır, kadmiyum ve civa muamelesi bu proteinlerin kontrole göre miktarında azalma yaratmıştır. Bizim çalışmamızda ise *A. corsicum* bitkisinin yaprak protein bant desenlerinde, yetiştirilmiş olduğu hiçbir nikel derişiminde bir farklılık görülmemiştir. Ancak sadece SDS-PAGE yöntemi ile protein dizilimlerindeki değişiklikler hakkında yorum yapmak yeterli değildir.

Farklı derişimlerde nikel varlığında geliştirilen *A. corsicum* bitkisine ait gövde ve kök örneklerinden total DNA izolasyonu yapılmış ve bu DNA' lara OPW10, OPB10, OPA17, B7, OPO04 primerleri ile RAPD-PZR işlemi uygulanmıştır. Denemeler sonucunda OPW10, OPB10, OPA17 primerleri ile yapılan çoğaltmalarda bant farklılıkları görülmezken, OPO04 ve B7 primerleri ile elde edilen RAPD profillerinde bant farklılıkları belirlenmiştir. Bu bant farklılıkları bazı bantların ortaya çıkması ve bazılarının yoğunluğunun artması veya azalması şeklinde olmuştur.

B7 primeri ile RAPD-PZR denemesinde yaklaşık 1000 bp ve 450 bp büyüklüğünde iki bant çoğaltılmıştır. 900 bp büyüklüğündeki bantın sadece 0,04 mM nikel uygulanan bitki kökünde, 0,2 mM nikel uygulanan bitki gövdesinde ve 0,01 mM nikel uygulanan bitki kökünde çoğaltıldığı diğer örneklerde yer almadığı görülmüştür. En yoğun olarak ise 0,04 mM nikel uygulanan bitki kökünde yer almaktadır.

OPO04 primeri ile RAPD-PZR denemesinde yaklaşık 700 bp büyüklüğünde yoğun bir bant ve 400 bp-300 bp aralığında zayıf bir bant ortaya çıkmıştır. Bunun haricinde 0,01 mM nikel uygulanan bitki kökünde ve 0,2 mM nikel uygulanan bitki gövdesinde yaklaşık 200 bp büyüklüğünde bir bant gözlenmiştir.

Liu ve arkadaşları [115], kadmiyum metalinin *Hordeum vulgare* DNA' sına etkilerini RAPD-PZR yöntemi ile belirlemişlerdir. Sonuçlar bazı bantların kazanılması ya da kaybedilmesi, yoğunluklarındaki artış veya azalma olarak ifade edilmiştir ve derişimler doza dayalıdır.

Atienzar ve arkadaşları [116] benzo{a}piren' in *Daphnia magna* üzerine genotoksik etkilerini RAPD-PZR ile incelemişlerdir. Enan [117] kurşun, bakır, manganez, kadmiyum ağır metallerin *Phaseolus vulgaris* üzerine olan etkilerini RAPD-PZR yöntemi ile incelemiştir. Conte ve arkadaşları [118] ağır metallerin değişen seviyelerinin *Arabidopsis thaliana* üzerine etkilerini RAPD-PZR ile araştırmıştır.

Bizim çalışmamızda kullanılan primerlerle elde edilen bulgulara göre nikel metalinin *A. corsicum* bitkisinin DNA'sı üzerine RAPD-PZR yöntemi ile belirlenen gözle görülür herhangi bir etkisi yoktur.

RAPD belirteçler pek çok bileşiğin ve UV radyasyonun ortaya koyduğu genotoksikliği belirlemede kullanılmaktadır. Bu işlem muamele görmüş ya da görmemiş bireyler arasındaki bant yoğunluklarının, bant kaybı ve kazanımlarının analizi ile yapılır. Gerçekten de RAPD bantları arasındaki bu tür farklılıklar genotoksik maddelerin neden olduğu DNA hasarı, mutasyonlar veya yapısal tekrar düzenlenmeler sonucu primer bağlanma bölgelerinin etkilenmesi ya da uzaklıkların değiştirilmesi sonucu oluşabilmektedir. Ancak genotoksiklik yanında DNA kopya sayısı farklılıkları, heterozigotluk, birlikte göç ya da PZR ürünleri arasındaki yarış gibi pek çok diğer faktörler de RAPD bantlarının yoğunluğunu etkilemektedir. Bu yüzden bazı yazarlar sadece iyi çözünmüş yüksek yoğunluktaki bantların değerlendirmede kullanılması gerektiğini söylemektedir [86].

Bitkilere ait gövde ve kök örneklerinden RNA izole edilmiş ve bu RNA'lar cDNA' ya çevrilerek RAPD-PZR uygulanmıştır. Bant farklılıkları OPA02 primerinde yoğunluk farkı olarak gözlenmiştir. Buna göre kontrol ve 0,2 mM nikel derişimi uygulanan bitkilerin köklerinde yaklaşık 1500 bp büyüklüğünde bir bant daha yoğun iken kontrol ve 0,2 mM nikel muamele edilen bitki gövdesinde yoğunluğunu kaybetmiştir. Yine yaklaşık 500 bp büyüklüğündeki bir bant kontrol ve 0,2 mM nikel derişiminde daha yoğun görünürken köklerde bantın yoğunluğu daha azdır.

Bant farklılıkları OPB08 primerinde bazı bantların eksilmesi veya ortaya çıkması şeklinde gözlenmektedir. Buna göre kontrol ve 0,2 mM nikel derişimi uygulanan bitkilerin kök ve gövdelerinde yaklaşık 900 bp büyüklüğünde bir bant ortak olarak görünmektedir ancak 700 bp ve 400 bp büyüklüğünde bir bant sadece 0,2 mM ve kontrol gövde nikel derişiminde bulunurken 600 bp büyüklüğünde bir bant ise sadece 0,2 mM kök ve kontrol gövdede mevcuttur.

A. corsicum bitkisinin kontrol ve 0,2 mM nikel maruz bırakılmış örneklerinde farklı ifade edilen genlerin araştırılması sonucu jel fotoğrafında nikel uygulanan bitkide bulunmadığı gözlenen 1 nolu farklı ifade edilen gen dizisi, gen bankasındaki bitki genom dizileri ile karşılaştırıldığında *Arabidopsis thaliana* 1. kromozom dizisinin BAC T24P13 kısmına ait genomik dizisi ile %93 benzer olduğu görülmüştür.

Bu gen bölgesinin kodladığı proteinler arasında Genişleme-A10 öncüsü proteini ve Dof çinko parmak proteini yer almaktadır. Genişleme-A10 öncüsü protein; selüloz mikrofibriller ve matriks glukanlar arasındaki kovalent olmayan bağları çözerek bitki hücre duvarında gevşemeye ve uzamaya sebep olmaktadır [119]. Bitki yaprak gelişiminde önemli bir rolü vardır ve sapın mekanik kırılmasını etkilemektedir. Dof çinko parmak proteini bitkilerde bir transkripsiyon faktörüdür ve tam olarak fonksiyonunun ne olduğu konusunda çalışmalar devam etmektedir [120].

Nikel uygulanan bitkide ortaya çıktığı gözlenen 2 nolu farklı ifade edilen gen dizisi, gen bankasındaki bitki genom dizileri ile karşılaştırıldığında *Arabidopsis thaliana* kalmodulin-bağlayan protein (AT5G40190) mRNA' sı ile %68 benzer olduğu gözlenmiştir.

Nikel uygulanan bitkide ifadesinin arttığı gözlenen 3 nolu farklı ifade edilen gen dizisi gen bankasındaki bitki genom dizileri ile karşılaştırıldığında *Arabidopsis thaliana* hipotetik protein mRNA'sı ile %72 benzer olduğu gözlenmiştir.

Nikel uygulanan bitkide ifadesinin arttığı gözlenen 4 nolu farklı ifade edilen gen dizisi gen bankasındaki bitki genom dizileri ile karşılaştırıldığında *Arabidopsis*

thaliana CKB3 (kazein kinaz II beta zincir 3) (CKB3) mRNA ile %49 benzer olduğu gözlenmiştir.

Nikel uygulanan bitkide yer alan 5 nolu farklı ifade edilen gen dizisi gen bankasındaki bitki genom dizileri ile karşılaştırıldığında *Arabidopsis thaliana* Lhca2 protein (Lhca2) mRNA' sı ile %99 benzer olduğu görülmüştür. Bu gen fotosistem I ışık toplayan kompleks genidir ve klorofil bağlayan LHCA2' yi kodlamaktadır.

Nikel uygulanan bitkide ifadesinin yoğun bir şekilde arttığı gözlenen 6 nolu farklı ifade edilen gen dizisi gen bankasındaki bitki genom dizileri ile karşılaştırıldığında *Arabidopsis thaliana* klon 30081 mRNA ile %68 benzer olduğu görülmüştür.

Nikel uygulanan bitkide ifadesinin arttığı gözlenen 7 nolu farklı ifade edilen gen dizisi gen bankasındaki bitki genom dizileri ile karşılaştırıldığında *Arabidopsis thaliana* proteaz inhibitör/tohum depo/lipit transfer protein (LTP) ailesi protein (AT4G22490) mRNA sına %41 benzer olduğu görülmüştür.

Nikel uygulanan bitkide ifadesinin arttığı gözlenen 8 nolu farklı ifade edilen gen dizisi gen bankasındaki bitki genom dizileri ile karşılaştırıldığında *Brassica oleracea* var. *acephala* WSCP1R mRNA suda çözünen klorofil proteini ile %55 benzer olduğu görülmüştür.

Nikel uygulanan bitkide ifadesinin azaldığı gözlenen 9 nolu farklı ifade edilen gen dizisi gen bankasındaki bitki genom dizileri ile karşılaştırıldığında *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* klon KBrB081M20 ile %60 benzer olduğu görülmüştür.

Nikel uygulanan bitkide ifadesinin yoğun bir şekilde arttığı gözlenen 10 nolu farklı ifade edilen gen dizisi gen bankasındaki bitki genom dizileri ile karşılaştırıldığında *Arabidopsis thaliana* proteaz inhibitör/tohum depo/lipit transfer protein (LTP) ailesi protein (AT4G22490) mRNA ile %31 benzer olduğu görülmüştür.

Nikel uygulanan bitkide ifadesinin azaldığı gözlenen 11 nolu farklı ifade edilen gen dizisi gen bankasındaki bitki genom dizileri ile karşılaştırıldığında *Lobularia maritima* kloroplast DNA' sı, tamamlanmış dizisi ile %99 benzer olduğu görülmüştür. Bu gen maturaz K genidir. *OrfK* olarak bilinen *MatK* geni kloroplast *trnK* geninin intron bölgesinde bulunur. 1500 bp uzunluğundadır. İntronların uzaklaştırılmasında görev alan bir proteindir [121].

Günümüzde çevre kirliliğinin artmasına paralel olarak ağır metal kirliliği de hızla artış göstermektedir. İnsanların çeşitli aktiviteleri ile toprak ve sularımıza karışan ve tüm canlılar için belli derişimlerden sonra zehir etkisi gösteren ağır metallerin çevreden temizlenmesinde yeni bir yaklaşım olan bitkisel arıtım tekniğinde pek çok bitki kullanılabilmektedir. Bitkiler topraktaki ağır metali özütledikten sonra bünyelerinde biriktirmekte daha sonra da hasat edilmektedirler. Bu bitkilerden bir tanesi de bitkisel arıtımda potansiyel kullanım imkanına sahip bir cins olan *Alyssum* (*Brassicaceae*)' a ait *Alyssum corsicum*' dur. Çalışmamızda *A. corsicum* bitkisinin farklı nikel derişimlerinde özellikle de 0,2 mM gibi yüksek bir nikel derişimi varlığında dahi zarar görmeden gelişebildiği ve bu metalin zehirli etkilerinden zarar görmemek üzere enzim ve gen düzeyinde bazı mekanizmaları devreye soktuğu farklı ifade edilen gen bölgelerinin incelenmesinde görülmektedir. Daha sonra yapılacak çalışmalarda belirlenen aday bölgeler Eş Zamanlı PZR denemeleri ile nikelli ve kontrol ortamlarında çalışılarak gen ifade düzeylerinin farklılıkları belirlenebilir.

Ülkemiz oldukça zengin bir floraya ve başta *Alyssum* olmak üzere pek çok metal biriktirici türün yayılış gösterdiği serpentin topraklara sahiptir. Bu bakımdan henüz metal biriktirme potansiyeli belirlenmemiş pek çok tür keşfedilmeyi beklemektedir.

Bitkilerin ağır metal fazlalığına vermiş olduğu fizyolojik ve moleküler cevapların incelenmesi ile daha etkili metal biriktirme potansiyeline sahip bitkilerin klasik ve transgenik yöntemlerle yetiştirilmesi mümkün olabilecektir. Ancak tüm bu çalışmaların mutlaka arazi uygulamaları ile desteklenerek hayata geçirilmeleri büyük önem arz etmektedir. Bu sayede halk açısından memnun edici, çevresel tahribatı en az olan ve ekonomik bir çevre temizleme yöntemi bitkisel arıtım teknolojisi

Ülkemizde de uygulama alanı bulabilecektir. Üstelik bitkilerce özütlenen metallerin bir Şekilde bitkilerden geri kazanılabiliyor olması da ekonomik bakımdan büyük bir kazanç olabilir. Ancak tüm bu uygulamalar esnasında bitkisel arıtımda kullanılan bu bitkilerin mutlaka izole bir Şekilde yetiŐtirilmeleri, canlıların yiyecek döngüsüne karıŐmamaları ve hatta transgenik yöntemler kullanılıyor ise çevredeki gen kaynaklarını bozmamaları sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Sağlam, N., Cihangir, N., “Ağır Metallerin Biyolojik Süreçlerle Biyosorbsiyonu Çalışmaları”, *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 11: 157-161 (1995).
2. Cunningham, S.D., Ow, D.W., “Promises and prospects of phytoremediation”, *Plant Physiol*, 110 (3): 715-719 (1996).
3. İnternet: Refik Saydam Hifzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Toprak kirliliği kontrol ve arş. lab.
http://rshm.gov.tr/index.php?option=com_content&task=view&id=158, (2008).
4. Nedelkoska, T.V., Doran, P.M., “Characteristics of heavy metal uptake by plant species with potential for phytoremediation and phytomining”, *Minerals Engineering*, 13: 549-561 (2000).
5. Glass, D.J., “Economic potential of phytoremediation”, *Phytoremediation of toxic metals; Using plants to clean up the environment*, Raskin, I. and Ensley, B.D., *John Wiley & Sons, Inc.*, Canada, 15-33 (2000).
6. Environmental Protection Agency (EPA), National Risk Management Research Laboratory Office of Research and Development, “Introduction to phytoremediation”, *EPA/600/R-99/107, Cincinnati, Ohio*, 1-72 (2000).
7. Krämer, U., Charnack, J.M., Baker, A.J.M, “Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel”, *Nature*, 379: 635-638 (1996).
8. Glos, M., Singh, S.P., “A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its by products”, *Applied Ecology and Environmental Research*, 3(1): 1-18 (2005).
9. Smits, E.P., Pilon, M., “Phytoremediation of Metals Using Transgenic Plants”, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21: 1-18 (2002).
10. Altın, A., “Yeraltı suyu ve toprak kirliliği arıtımında kullanılan yöntemler”, *Çevre 2004 1. Ulusal Çevre Kongresi*, Sivas, 173-182 (2004).
11. Kocaer, F.O., Başkaya, H.S., “Metallerle kirlenmiş toprakların temizlenmesinde uygulanan teknolojiler”, *Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 8(1): 121-131 (2003).
12. Martin, M.H., Coughtrey, P.J., “Biological monitoring of heavy metal pollution: Land and air, ”, *Applied Science Publishers*, London, 22-33 (1982).

13. Shaw, B.P., Sahu, S.K., Mishra, R.K., "Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants", Heavy metal stres in plants, 2nd ed., Prasad, M.N.V., **Springer**, India, 84-126 (2004).
14. Prasad, M.N.V., "Heavy metal stres in plants, 2nd ed.", Prasad, M.N.V., **Springer**, India, v-vi, 47-83 (2004).
15. Greger, M., "Heavy metal stres in plants, 2nd ed.", Prasad, M.N.V., **Springer**, India, 1-27, 345-391 (2004).
16. Negri, M.C., Hinchman, R.R., "Plants that remove contaminants from the environment", **Laboratory Medicine**, 27(1): 36-40 (1996).
17. Cunningham, S.D., Berti, W.R., and Huang, J.W., "Phtoremediation of contaminated soils", **Trends in Biotechnology**, 13: 393-397 (1995).
18. Pivetz, B.E., (Office of Solid Waste and Emergency Response Office of Research and Development United States Environmental Protection Agency), "Ground Water Issue Phytoremediation of Contaminated Soil and Ground Water at Hazardous Waste Sites", **EPA/540/S-01/500, Ada, Oklahoma**, 1-36 (2001).
19. Assunção, A., Martins, P., De Folter, S., Vooijs, R., Schat, H., Aarts, M.G.M., "Elevated expressions of metal transporter genes in three accessions of the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*", **Plant Cell Environ**, 24: 217-226 (2001).
20. Bert, V., Meerts, P., Saumitou-Laprade, P., Salis, P., Gruber, W., Verbruggen, N., "Genetic basis of Cd tolerans and hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*", **Plant Soil**, 249: 9-18 (2003).
21. Machair, M., Bert, V., Huitson, S.B., Saumitou-Laprade, P., Petit, D., " Zinc tolerance and Hyperaccumulation are genetically independent characters", **Proc. Royal Soc. of London Series B-Biol. Sci.**, 266: 2175-2179 (1999).
22. Peer, W.A., Baxter, I.R., Richards, E.L., Freeman, J.L., Murphy, A.S., "Phytoremediation and hyperaccumulator plants", *Molecular Biology of metal homeostasis and detoxification*, Tamas, M.J, Martinoia, E., **Springer**, Berlin, 14: 299-340 (2006).
23. Bandada, B.R., Ma, L.Q., "Tolerance of heavy metals in vascular plants: Arcenic hyperaccumulation by Chinese, Brake Fern (*Pterzs Vzttata L.*)", *Pteridology in the New Millennium: NBRI Golden Jubilee Volume*, Chandra, S., Srivastava, M., **Kluwer Academic Publishers**, Netherlands, 397-420 (2003).
24. Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I., "Phytoremediation", **Annu Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.**, 49: 643-668 (1998).

25. Lombi, E., Zhao, F., McGrath, S., Young, S., Sacchi, G., “Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype”, **New Phytol**, 149: 53-60 (2001).
26. Blaylock, M., Salt, D., Dushenkov, S., Zakharova, O., Gussman, C., Kapulnik, Y., Ensley, B., Raskin, I., “Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents”, **Environ. Sci. Technol.**, 31: 860-865 (1997).
27. Turgut, C., Pepe, K.M., Cutright, T.J., “The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr and Ni from soil using *Helianthus annuus*”, **Environ. Pollution**, 131: 147-154 (2004).
28. Nanda Kumar, P.B.A., Dushenkov, V., Motto, H., Raskin, I., “Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils”, **Environ. Sci. Technol.**, 29(5): 1232-1238 (1995).
29. Bañuelos, G.S., Ajwa, H.A., Mackey, B., Wu, L.L., Cook, C., Akohove, S. and Zambrzuski, S., “Evaluation of different plant species used for phytoremediation of high soil selenium”, **J. Environ. Qual.**, 26: 639-646 (1997).
30. Blaylock, M.J., Huang, J.W., “Phytoextraction of metals”, *Phytoremediation of toxic metals; Using plants to clean up the environment*, Raskin, I. and Ensley, B.D., **John Wiley & Sons, Inc.**, Canada, 53-70 (2000).
31. Berti, W.R., Cunningham, S.D., “Phytostabilization of metals”, *Phytoremediation of toxic metals; Using plants to clean up the environment*, Raskin, I. and Ensley, B.D., **John Wiley & Sons, Inc.**, Canada, 71-88 (2000).
32. Internet: Brazil Scientific Electronic Library Online
<http://www.scielo.org>
33. Dushenkov, V., Nanda Kumar, P.B.A., Motto, H., Raskin, I., “Rhizofiltration: The use of plants to remove heavy metals from aqueous streams”, **Environ. Sci. Technol.**, 29: 1239-1245 (1995).
34. Kirk, J., Klironomos, J., Lee, H., Trevors, J.T., “The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil”, **Environ. Pollut.**, 133: 455-465 (2005).
35. Schnoor, J., Licht, L., Mccutcheon, S., Wolfe, N., Carreira, L., “Phytoremediation of organic and nutrient contaminants”, **Environ. Sci. Technol.**, 29: A318-A323 (1995).
36. Tollsten, L., Muller, P., “Volatile organic compounds emitted from beech leaves”, **Phytochem.**, 43: 759-762 (1996).

37. Rugh, C.L., Gragson, G.M., Meagher R.B., “Toxic mercury reduction and remediation using transgenic plants with modified bacterial genes”, *HortScience*, 33:618-621 (1998).
38. Ensley, B.D., “Rationale for use of phytoremediation”, Phytoremediation of toxic metals; Using plants to clean up the environment, Raskin, I. and Ensley, B.D., *John Wiley& Sons, Inc.*, Canada, 3-11 (2000).
39. Li, Y., Chaney, R., Brewer, E., Roseberg, R., Angle, J.S., Baker, A., Reeves, R., Nelkin, J., “Development of a technology for commercial phytoextraction of nickel: economic and technical considerations”, *Plant and Soil*, 249: 107–115 (2003).
40. Negri, C.M., Hinchman, R.R., “The use of plants for the treatment of radionuclides”, Phytoremediation of toxic metals; Using plants to clean up the environment, Raskin, I. and Ensley, B.D., *John Wiley& Sons, Inc.*, Canada, 107-132 (2000).
41. Boyd, V., “Pint-sized plants pack a punch in fight against heavy metals”, *Environ. Protect.*, 7 (5): 38-39 (1996).
42. Internet: International Food Policy Research Institute Environment and Production Technology Division, “Ecological risks of novel environmental crop technologies using phytoremediation as an example”, www.ifpri.org/divs/eptd/dp/papers/eptdp133.pdf , (2005).
43. Clemens, S., Palmgren, M.G., Krämer, U., “A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation”, *TRENDS in Plant Science*, 7: 309-315 (2002).
44. Environmental Protection Agency (EPA), “Pollution prevention fact sheet persistent, bioaccumulative and toxic chemicals nickel and nickel compounds”, *EPA number 96, Ohio*, 1-2 (2002).
45. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, “Draft toxicological profile for nickel”, *ATSDR, Atlanta, Georgia*, 23-168 (2003).
46. Minguzzi, C., Vergnano, O., “ Il contenuto di nichel nelle ceneri di *Alyssum bertolonii*”, *Atti della Società Toscana di Scienze Naturale*, 55: 49-74 (1948).
47. Brooks, R.R., “Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals; Their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining”, Brooks, R.R., *CAB International*, Cambridge, 1-14, 15-53, 153-180 (2000).

48. Reeves, R.D., Adıgüzel, N., “The nickel hyperaccumulating plants of the serpentines of Turkey and adjacent areas: a review with new data”, ***Turk J.Biol.***, 32: 143-153 (2008).
49. Davis, P.H., Flora of Turkey and Aegean Islands, ***Edinburg Univ.***, Edinburg, 1: 362-409 (1965).
50. İnternet: Schede Di Botanica , “*Alyssum corsicum* Duby photo”
http://luirig.altervista.org/schedeit/ae/alyssum_corsicum.htm (2008).
51. Mengoni, A., Gonelli, C., Galardi, F., Gabrielli, R. and Bazzicalupo, M., “Genetic diversity and heavy metal tolerance in populations of *Silene paradoxa* L. (*Caryophyllaceae*): a random amplified polymorphic DNA analysis”, ***Molecular Ecology***, 9: 1319-1324 (2000).
52. Harrison, S., “Local and regional diversity in a patchy lanscape: Native, alien, and endemic herbs on serpentine”, ***Ecology***, 80: 70-80 (1999).
53. Prasad, M.N.V., “Toxic metals in plants; Nickelophilous plants and their significance in phytotechnologies”, ***Braz.. J. Plant Physiol.***, 17: 1 (2005).
54. Marschner, H., “Mineral nutrition of higher plants, 2nd ed.”, ***Academic Press***, New York, 1-889 (1995).
55. Rengel, Z., “Heavy metals as essential nutrients”, Heavy metal stres in plants, 2nd ed., Prasad, M.N.V., ***Springer***, India, 271-294 (2004).
56. Hall, J.L., “Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance”, ***Journal of Experimental Botany***, 53: 1-11 (2002).
57. Clemens, S., “Moleculer mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis”, ***Planta***, 212: 475-486 (2001).
58. Lombi, E., Tearall, K.L., Howarth, J.R., Zhao, F.J., Hawkesford, M.J., McGrath, S.P., “Influence of iron status on calcium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*”, ***Plant Physiol.***, 128: 1359-1367 (2002).
59. Tong, Y., Knerr, R., Zhu, Y., “Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for phytoremediation”, ***TRENDS in Plant Science***, 9:1 (2004).
60. Ross, S.M., “Toxic Metals in Soil-Plant Systems” , ***Wiley***, Chichester, U.K., 303-326 (1994).
61. Fox, T.C., Guerinot, M.L., “Molecular biology of cation transport in plants”, ***Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.***, 49: 669-696 (1998).

62. Yanga, X., Fenga, Y., Hea, Z., Stoffellab, P.J., "Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation", *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18: 339-353 (2005).
63. Nelson, N. "Metal ion transporters and homeostasis", *EMBO J.*, 18: 4361-4371 (1999).
64. Romheld, V., "The role of phytosiderophores in acquisition of iron and other micronutrients in graminaceous species: an ecological approach", *Plant Soil*, 130: 127-134 (1991).
65. Higuchi, K., Suzuki, K., Nakanishi, H., Yamaguchi, H., Nishizawa, N.K., Mori, S., "Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores", *Plant Physiol.*, 119: 471-479 (1999).
66. Burken, J.G., "Uptake and metabolism of organic compounds: green-liver model", In *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, ed. SC McCutcheon, JL Schnoor, **Wiley**, New York, 59-84 (2003).
67. Hale, K.L., McGrath, S., Lombi, E., Stack, S., Terry, N., et al., "Molybdenum sequestration in Brassica: a role for anthocyanins?", *Plant Physiol.*, 126: 1391-1402 (2001).
68. Smits, E.P., "Phytoremediation", *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56: 15-39 (2005).
69. Steffens, J.C., "The heavy metal-binding peptides of plants", *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41: 553-575 (1990).
70. Maitani, T., Kubota, H., Sato, K., Yamada, T., "The composition of metals bound to class II metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*", *Plant Physiol.*, 110: 1145-1150 (1996).
71. Gekeler, W., Grill, E., Winnacker, E.L., Zenk, M.H., "Survey of the plant kingdom for the ability to bind heavy metals through phytochelatins", *Z. Naturforsch Teil C.*, 44: 361-369 (1989).
72. Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E.L., Zenk, M.H., "Phytochelatin, the heavy-metal binding peptides of plants, are synthesised from glutathione by a specific γ -glutamyl-cysteine dipeptidyl transpeptidase phytochelatin synthase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 6838-6842 (1989).
73. Oritz, D.F., Ruscitti, T., McCue, K.F., Ow, D.W., "Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type B vacuolar membrane protein", *J. Biol. Chem.*, 270: 4721-4728 (1995).

74. Lu, Y.P., Li, Z.S., Rea, P.A., "AtMRP1 gene of Arabidopsis encodes a glutathione S-conjugate pump: isolation and functional definition of a plant ATPbinding cassette transporter gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 8243-8248 (1997).
75. Arora, A., Sairam, R.K., Srivastava, G.C., "Oxidative stress and antioxidative system in plants", *Current science*, 82 (10): 1227-1238 (2002).
76. Larson, R.A., "The antioxidants of higher plants", *Phytochemistry*, 27: 969-978 (1988).
77. Noctor, G., Foyer, C.H., "Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control", *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: 249-279 (1998).
78. Broadhurst, C.L., Chaney, J., Angle, J.S., Erbe, E.F., Mangel, T.K., "Simultaneous hyperaccumulation of nickel, manganese and calcium in *Alyssum* leaf trichomes", *Plant and Soil*, 265: 225-242 (2004).
79. Marmiroli, M., Gonnelli, C., E Maestri, R Gabbrielli, N Marmiroli, "Localisation of nickel and mineral nutrients Ca, K, Fe, Mg by scanning electron microscopy microanalysis in tissues of the nickel-hyperaccumulator *Alyssum bertolonii* desv. and the non-accumulator *Alyssum montanum* L.", *Plant Biosystems*, 138(3): 231-243 (2004).
80. Prasad, M.N.V., "Metal-biomolecule complexes in plants: Occurrence, functions and applications", *Analisis Magazine*, 6: 26 (1998).
81. İnternet: Wikipedia The Free Encylopedia, "X-ray fluorescence"
http://en.wikipedia.org/wiki/X-ray_fluorescence, (2008).
82. İnternet: Wikipedia The Free Encylopedia, "EDX",
http://en.wikipedia.org/wiki/Energy-dispersive_X-ray_spectroscopy, (2008).
83. Monteoliva, L., Albar, J.P., "Differential proteomics: An overview of gel and nongel based approaches", *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 3(3): 220-239 (2004).
84. Çevik, M.Ş., "Mikroarray Teknolojisi ve Bitkilerde Uygulama Alanları", *Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9-3 (2005).
85. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., "Detection and analysis of proteins expressed from cloned genes", Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, *Cold Spring Harbor*, New York, 3: 18.47 (1989).
86. Wolf, H, Blust, R., Backeljau, T., "The use of RAPD in ecotoxicology", *Mutation research*, 566: 249-262 (2004).

87. Moody E.D., "Genomics techniques: An overview of methods for the study of gene expression", *J. Anim. Sci.*, 79: 128-135 (2001).
88. Kärenlampi, S., Schat, H., Vangronsveld, J., Verkleij, J.A.C., Lelie, D. van der, Mergeay, M., Tervahauta, A.I., "Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils", *Environmental Pollution*, 107: 225-231 (2000).
89. Murashige, T., Skoog, F., "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture.", *Plant Physiol*, 15:473-497 (1962).
90. Abou Auda, M.M., Symeonidis, L., Hatzistavrou, E., Yupanis, T., "Nucleolytic activities and appearance of a new DNase in relation to nickel and manganese accumulation in *Alyssum murale*", *Journal of Plant Physiol*, 159: 1087-1095 (2002).
91. Tour, T.E.L., "Analysis of Rocks using X-Ray Fluorescence Spectrometry", *The Rigaku Journal*, 6/1: 3-9 (1989).
92. Johnson, D.M., Hooper, P.R. and Corney, R.M., "XRF analysis of rocks and minerals for major and trace elements on a single low dilution Li-tetraborate fused bead", *International Centre for Diffraction Data*, 843-867, (1999).
93. Stephens, W.E and Calder, A., "Analysis of non-organic elements in plant foliage using polarised X-ray fluorescence spectrometry", *Anal. Chem Acta*, 527: 89-96 (2004).
94. Schickler, H., Caspi H., "Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*", *Physiologia Plantarum*, 105(1): 39-44 (1999).
95. Bradford, M. M., "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding", *Anal. Biochem.*, 72: 248-254 (1976).
96. Çakmak, I., "Activity as ascorbate- dependent H₂O₂ scavenging enzymes and leaf chlorosis are enhanced in magnesium and potassium deficient leaves but not in phosphorus deficient leaves", *J.exp. bot*, 45: 1259-1266 (1994).
97. Hajduch, M., Rakwal, R., Agrawal, G., Yonekura, M., Pretova, A., "High resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaves....", *Electrophoresis*, 22: 2824-2831 (2001).
98. Laemli UK., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4", *Nature*, 227: 680-684 (1970).

99. Rogers, S.O., Bendich, A. J., "Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mumified plant tissue", *Plant Mol. Biol.*, 5(2): 69-76 (1985).
100. Darbre, P.D., "Basic Molecular Biology: Essential Techniques, Rickwood, D.", *John Wiley&Sons Inc.*, England, 1-194 (2001).
101. Williams, J., Kubelik, A. R., "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers", *Nucleic acid Res.*, 18: 6531-6535 (1990).
102. Hwang, I.T., Kim, Y.J., Kim, S.H., Kwak, C.I., Gu, Y.Y., Chun, J.Y., "Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification", *BioTechniques*, 35:1180-1184 (2003).
103. Hwang, K.C., Cui, X.S., Park, S.P., Shin, M.R., Park, S.Y., Kim, E.Y., Kim, N. H., "Identification of differentially regulated genes in bovine blastocysts using an annealing control primer system", *Mol. Reprod. Dev.*, 69:43-51 (2004).
104. Hwang, K.C., Lee, H.Y., Cui, S.S., Kim, J.H., Kim, N.H., "Identification of Maternal mRNAs in porcine parthenotes at the 2-cell stage: a comparison with the blastocyst stage" *Mol. Reprod. Dev.*, 70:314-323 (2005).
105. Kim, Y.J., Kwak, C.I., Gu, Y.Y., Hwang, I.T., Chun, J.Y., "Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels" *BioTechniques*, 36:424-426, 428, 430 (2004).
106. Kottom, T. J., Limper, A.H., "*Pneumocystis carinii* cell wall biosynthesis kinase gene *CBK1* is an environmentally responsive gene that complements cell wall defects of *cbk*-deficient yeast", *Infect. Immun.*, 72:4628-4636 (2004).
107. Lee, A.Y., Kim, N.H., Park, S.W., "All trans-retinoic acid (ATRA) elevated eukaryotic translation initiation factor 4A1 (eIF4A1) mRNA in ATRA-responsive vitiliginous epidermis", *Pigment Cell RES.*, 17:659-667 (2004).
108. Pohjanvirta, R., "Comparison of several hot-start Tag DNA polymerases for detection of differentially expressed genes by GeneFishing", *Biochemica*, 2:17-18. (2004).
109. Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F-J., Wieshammer, G., McGrath, S.P., "Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*", *Journal of Experimental Botany*, 52: 2291-2300 (2001).

110. Mcnear, D.H., Peltier, E., Everhart, J., Chaney, R.L., Sutton, S., Newville, M., Rivers, M., Sparks, D.L. "Application of quantitative fluorescence and absorption-edge computed microtomography to image metal compartmentalization in *Alyssum murale*", ***Environ. Sci. Technol***, 39: 2210-2218 (2005).
111. Kramer, U., Grime, G.W., Smith, J.A.C., Hawes, C.R., Baker, A. J.M., "Micro-PIXE as a technique for studying nickel localization in leaves of the hyperaccumulator plant *Alyssum lesbiacum*", ***Nuclear Instruments and methods in Physics Research B***, 130: 346-350 (1997).
112. Psaras, G.K., Constantinidis, T.H., Cotsopoulos, B., Manetas, Y., "Relative abundance of nickel in the leaf epidermis of eight hyperaccumulators: Evidence that the metal is excluded from both guard cells and trichomes", ***Annals of Botany***, 86: 73-78 (2000).
113. Chaoui, A., El Ferjani, E., "Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings", ***C.R. Biologies***, 328: 23-31 (2005).
114. Prasad, K.V.S.K., Saradhi, P.P., Sharmila, P., "Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea* ", ***Environmental and Experimental Botany***, 42: 1-10 (1999).
115. Liu, W., Li, P., Qi, X., Zhou, Q., Zheng, L., Sun, T., Yang, Y., "DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis", ***Chemosphere***, 61: 158-167 (2005).
116. Atienzar, F.A., Venier, P., Awadhesh, J.H.A., Depledge, M.H, "Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations", ***Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis***, 521: 151-163 (2002).
117. Enan, MR., "Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect the genotoxic effect of heavy metals", ***Biotechnol. Appl. Biochem.***, 43: 47-54 (2006).
118. Conte, C.I. Mutti, P. Puglisi, A. Ferrarini, G. Regina, E. Maestri and N. Marmiroli, "DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution." ***Chemosphere***, 37: 2739–2749. (1998).
119. Kende, H., Bradford, K.J., Brummell, D.A., Cho, H.T., Cosgrove, D.J., Fleming, A.J., Gehring, C., Lee, Y., McQueen-Mason, S.J., Rose, J.K.C., Voisenek, L.A.C., "Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins", ***Plant Mol. Biol.***, 55: 311-314 (2004).

120. Yanagisawa, S., "The Dof family of plant transcription factors", *Trends Plant Sci.*, 7:555-560 (2002).
121. Hilu, K.W, and Liang, H., "The *matK* Gene: Sequence Variation and Application in Plant Systematics", *American Journal of Botany*, 84: 830-839, (1997).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : AYDAŞ Babaoğlu, Selcen
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 05.11.1977, K.Maraş/Elbistan
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (312) 2159206
 e-mail : selcenb@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Lisans	Marmara Üniversitesi Biyoloji Eğitimi	1999
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji	2002

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2000-2008	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2008-	RSHM	Biyolog

Yayınlar

- Babaoğlu, S.**, Açık, L., Çelebi, A., Adıgüzel, N., *Gazi Üniv Fen Bilimleri Dergisi*, “Türkiye’ nin bazı *Alyssum* L (*Brassicaceae*) türlerinin RAPD-PCR ve SDS-PAGE yöntemleri ile moleküler analizleri”, 17(3):25-33, 2004

Ulusal kongrelerde posterler

- Açık, L., Adıgüzel, N., **Babaoğlu, S.**, “Türkiye’ de yetişen bazı *Alyssum* L. (*Brassicaceae*) türlerinin moleküler analizleri”, **XII. Biyoteknoloji Kongresi, Balıkesir, 17-21 Eylül 2001**

2. Açık, L., Babaoğlu, S., Adıgüzel, N., Çelebi, A., “Türkiye’ de yetişen bazı *Alyssum* L. (*Brassicaceae*) türlerinin SDS-PAGE analizleri”, **XIII. Biyoteknoloji Kongresi, Çanakkale, 25-29 Ağustos 2003**
3. Öztürk, F., Babaoğlu, S., Açık, L., "Bakteriler aracılığı ile ham petrol ve türevlerinin biyodegradasyonu", **18. Ulusal Biyokimya Kongresi, Trabzon, 15-19 Mayıs 2004**
4. Babaoğlu, S, Leyla Açık, Murat Ekici, Hasan AKAN, “*Astragalus* (*Fabaceae*) cinsine ait *Onobryhioidei* DC. Seksiyonundaki Taksonomik İlişkilerin Tohum Protein Profilleri ile Belirlenmesi” **XIV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Eskişehir, 31 Ağustos-2 Eylül 2005**
5. Babaoğlu, S, Suludere, Z., Açık, L., Adıgüzel, N., “Nikel hiperakümülatör bitki *Alyssum corsicum* (*Brassicaceae*)’ da SEM-EDX ile nikel miktarı analizi ve morfolojik incelemeler” **18. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, Eskişehir, 26-29 Ağustos 2007.**

Uluslararası kongrelerde posterler

1. Babaoğlu, S, Kuşvuran Ş, Ellialtığlu Ş, Açık L, Adıgüzel N, "Antioxidative enzyme response of heavy metal hyperaccumulator *Alyssum murale* to Ni+2 stress" **3 rd Ecological Protection of The Planet Earth With An International Exhibition of Innovations, Inventions and New Technologies, İstanbul, 10-11 June 2005**
2. Babaoğlu, S., Bani, B., Açık, L., Adıgüzel, N., “ Taxonomical relations among some Turkish serpentine endemic *Alyssum* (*Brassicaceae*)” **IV. Balkan Botanical Congress, Sofia, 20-26th June 2006 (Tamamı basılmış)**
3. Öztürk, F., Uzunhisarcıklı, E., Babaoğlu, S., Vural, M., Aık, L., “Taxonomical relations among species of *Althaea* (*Malvaceae*) growing in Turkey as revealed by RAPD-PCR and SDS-PAGE” **IV. Balkan Botanical Congress, Sofia, 20-26th June 2006**
4. Babaoğlu, S., Aık, L., Adıgüzel N., Ellialtıoğlu, Ş., “RAPD-PCR analyse of hyperaccumulator plants *A. corsicum* and *A. murale* induced by Ni treatment” **International Conference on Environment: Survival and Sustainability, Nicosia-Northern Cyprus, 19-24 February 2007**

5. **Babaoğlu S.**, Aık, L., Adıgüzel N., Kadioğlu, Y.K, “Quantitative analysis of nickel and a group of metals using X-ray fluorescence spectrometer and molecular analysis in the Ni hyperaccumulator *Alyssum corsicum*” **102° Meeting of the Italian Botanical Society (SBI) Joint Meeting SBI-BGCI Botanical gardens and Society: Investigation, Education and Popularization, Palermo-Italy, 26-29 September 2007**

Yer aldığı projeler

1. Projeyi Destekleyen Kurum: G. . Araştırma Fonu
Proje No: FEF. 05/2001-10
Proje Y r t c s : Doç. Dr. Nezaket ADIGÜZEL
Yardımcı Araştırıcı: Doç. Dr. Leyla AÇIK- Araş. Gör. Selcen Babaoğlu AYDAş
Projenin Adı: Türkiye’ de yetişen bazı *Alyssum* L. (*Brassicaceae*) türlerinin moleküler analizleri (Tamamlandı)
2. Projeyi Destekleyen Kurum: Devlet Planlama Teşkilatı Teknolojik Araştırmalar
Proje Kodu: 2003K120470/02
Proje Yürütücüsü : Doç. Dr. Leyla AÇIK
Yardımcı araştırıcı : Doç. Dr. Nezaket ADIGÜZEL
Araş. Gör. Selcen Babaoğlu AYDAş
Projenin Adı: Türkiye’ de yetişen bazı *Alyssum* L. (*Brassicaceae*) türlerinin nikel ak m lasyonlarının tayini ve moleküler yönden karakterizasyonu

Yabancı Dil

İngilizce

Hobiler

Klasik Türk Müziği ve Türk Halk Müziği, Yabancı Dil, Seyahat