

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

139627

TÜRKİYE'DE YETİŞEN FARKLI PAMUK
GENOTİPLERİNİN AĞIR METAL STRESİNE KARŞI
TARANMASI VE SEÇİLEN GENOTİPLERİN *IN VITRO*
REJENERASYONU

139627

Prof. Dr. Nezhun Gören

M. Gül

Biyolog Emel BIÇAKÇI

Prof. Dr. Amir Kılıç

F.B.E Biyoloji Anabilim Dalı'nda
Hazırlanan

Prof. Dr. Güler Temizhan

P. Memon

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dr. Aysegül Popal Sarıbayrak

Prof. Dr. Sule ARI

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Nezhun GÖREN (YTÜ)
İkinci Tez Danışmanı : Prof. Dr. Abdülrezzak MEMON (TÜBİTAK-GMBAE)

İSTANBUL, 2003

T.C. YÜKSEK ÖĞRETİM BAKANLIĞI
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KISALTMA LİSTESİ	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	.iiv
ÇİZELGE LİSTESİ.....	v
ÖNSÖZ	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	3
2.1 Pamuk Bitkisi.....	3
2.2 Bitkilerde Çevresel Stres.....	3
2.3 Ağır Metallerin Genel Özellikleri.....	3
2.3.1 Kadmiyum (Cd)	4
2.3.2 Bakır (Cu)	5
2.4 Ağır Metal Kirliliği	5
2.5 Bitkilerde Metal Alımı	6
2.6 Bitkilerde Metal İyonlarının Taşınması	6
2.7 Bitkilerde Metal Depolanması	7
2.8 Bitkilerde Metal Toksikitesi Mekanizması	8
2.9 Bitkilerde Ağır Metal Toleransı ve Detoksifikasyonu.....	10
2.9.1 Mikorizalar.....	11
2.9.2 Hücre Duvarı ve Kök Salgıları	11
2.9.3 Plazma Membran	11
2.9.4 Organik Asitler ve Amino Asitler.....	12
2.10 Metal Stresine Hücresel Düzeyde Verilen Cevaplar	12
2.10.1 Durdurma	12
2.10.2 Dışlama	12
2.10.3 Metallotiyoninler.....	12
2.10.4 Fitokelatinler	14
2.10.5 Stres proteinleri	15
2.10.6 Vakuolde Biriktirme	15
2.11 Organogenez	16
2.12 Pamuk Doku Kültürü	17
3. MATERYAL ve METOD	19
3.1 Materyal	19
3.1.1 Bitki Materyali	19

3.1.2	Besiyerleri	19
3.1.2.1	Ağır Metal Dayanıklılığı Tarama Deneylerinde Kullanılan Besiyeri.....	19
3.1.2.2	<i>In Vitro</i> Rejenerasyon Deneylerinde Kullanılan Besiyerleri	19
3.1.3	Kimyasallar	22
3.1.3.1	Yaş Yakma Yönteminde Kullanılan Kimyasallar.....	22
3.1.3.2	Karbamik Asit Muamelesinde (Cu Boyama) Kullanılan Kimyasallar	22
3.1.4	Tamponlar	22
3.1.4.1	Protein Deneylerinde Kullanılan Tamponlar	22
3.1.5	Stok Solüsyonlar	23
3.2	Metod	26
3.2.1	Tohum Sterilizasyonu	26
3.2.2	Bitkilerin Yetiştirilmesi	26
3.2.2.1	Ağır Metal Dayanıklılığı Tarama Deneyleri Bitkileri	26
3.2.2.2	<i>In vitro</i> Rejenerasyon Deneyleri Bitkileri.....	26
3.2.3	Bitkilerin Ağır Metal Analizi.....	27
3.2.3.1	Bitkilerin AAS Analizi İçin Hazırlanışı.....	27
3.2.3.2	Yaş Yakma (Nitrik Asit – Perklorik Asit Yöntemi)	27
3.2.3.3	Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre Ölçümü.....	28
3.2.4	<i>In vitro</i> Rejenerasyon Metodları	28
3.2.4.1	Doğrudan Organogenez	28
3.2.4.2	Dolaylı Organogenez	29
3.2.5	Protein Deneyleri	29
3.2.5.1	Protein Özütlemesi.....	29
3.2.5.2	Protein Örneklerin Derişiminin Belirlenmesi.....	30
3.2.5.3	Doğal Jel Elektroforezi	30
3.2.5.4	Karbamik Asit Muamelesi (Cu Boyama)	30
4.	BULGULAR.....	31
4.1	Pamuk Genotiplerinin Cd Stresine Karşı Dayanıklılığının Taranması.....	31
4.1.1	Morfolojik Bulgular	31
4.1.2	Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre Analizi	42
4.2	Pamuk Genotiplerinin Cu Stresine Karşı Dayanıklılığının Taranması.....	42
4.2.1	Morfolojik Bulgular	42
4.2.2	Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre Analizi	45
4.2.3	Protein Analizi	48
4.3	<i>In vitro</i> Rejenerasyon.....	49
4.3.1	Doğrudan Organogenez	49
4.3.1.1	Rejenere Bitkilerin Toprağa Aktarılması.....	53
4.3.2	Dolaylı Organogenez	55
5.	SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	57
5.1	Ağır Metal Stresine Karşı Dayanıklılığın Taranması	58
5.1.1	Pamuk Genotiplerinin Cd Stresine Karşı Dayanıklılığının Taranması.....	58
5.1.2	Pamuk Genotiplerinin Cu Stresine Karşı Dayanıklılığının Taranması.....	58
5.2	<i>In vitro</i> Rejenerasyon.....	60
	KAYNAKLAR.....	65
	ÖZGEÇMİŞ	71

KISALTMA LİSTESİ

AAS	Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre
MS	Murashige and Skoog besiyeri
MSGerm	Çimlendirme besiyeri
B.B.D.	Bitki Büyüme Düzenleyicisi
MT	Metallotiyonin
FK	Fitokelatin
Cys	Sistein



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 4.1	Farklı konsantrasyonlarda Cd içeren MS besiyerinde yetiştirilen 21 günlük 84S bitkilerinin büyüme farklılıkları.	35
Şekil 4.2	Farklı konsantrasyonlarda Cd içeren MS besiyerinde yetiştirilen 21 günlük Sel-5 bitkilerinin büyüme farklılıkları.	36
Şekil 4.3	Farklı konsantrasyonlarda Cd içeren MS besiyerinde yetiştirilen 21 günlük M503 bitkilerinin büyüme farklılıkları.	36
Şekil 4.4	Farklı konsantrasyonlarda Cd içeren MS besiyerinde yetiştirilen 21 günlük 143 bitkilerinin büyüme farklılıkları.	37
Şekil 4.5	Farklı konsantrasyonlarda Cd içeren MS besiyerinde yetiştirilen 21 günlük Erşan-92 bitkilerinin büyüme farklılıkları.	37
Şekil 4.6	Farklı konsantrasyonlarda Cd içeren MS besiyerinde yetiştirilen 21 günlük Ç-1518 bitkilerinin büyüme farklılıkları.	38
Şekil 4.7	Karbamik asit muamelesi.	48
Şekil 4.8	Nazilli 143 pamuk genotipinin doğrudan sürgün ve kök rejenerasyonu.	51
Şekil 4.9	Nazilli M503 pamuk genotipinin doğrudan sürgün ve kök rejenerasyonu.	52
Şekil 4.10	<i>In vitro</i> ortamda rejenere edilmiş bitkilerin toprağa aktarımı.	53
Şekil 4.11	<i>In vitro</i> rejenere edilmiş olgun pamuk bitkileri.	53
Şekil 4.12	143 genotipi kotiledon eksplantından kallus ve kök oluşumu.	55
Şekil 4.13	Nazilli 143 ve M503 genotiplerinin dolaylı rejenerasyonu.	56

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1	Doğrudan rejenerasyon için denenen bitki büyüme düzenleyicileri..	21
Çizelge 3.2	Dolaylı rejenerasyon için denenen bitki büyüme düzenleyicileri.....	21
Çizelge 3.3	Doğal jel elektroforezinde kullanılan tamponlar.....	22
Çizelge 3.4	Kullanılan B.B.D'lerin katalog no ve çözücüleri.....	25
Çizelge 3.5	Poliakrilamid jellerin içeriği.....	30
Çizelge 4.1	Cd uygulanan farklı genotip pamuk bitkilerinin gövde ve kök boyları.....	33
Çizelge 4.2	Cd uygulanan farklı genotip pamuk bitkilerinin gövde ve kök boylarındaki oransal azalma.....	34
Çizelge 4.3	Cd uygulanan farklı genotip pamuk bitkilerinin gövde ve köklerinde biriken Cd miktarı.....	40
Çizelge 4.4	MS besiyerinden bitkiye taşınan Cd oranı.....	41
Çizelge 4.5	Cd'un köklerden bitkinin üst kısımlarına taşınma oranı.....	41
Çizelge 4.6	Cu uygulanan farklı genotip pamuk bitkilerinin gövde ve kök boyları.....	43
Çizelge 4.7	Cu uygulanan farklı genotip pamuk bitkilerinin gövde ve kök boylarındaki oransal azalma.....	44
Çizelge 4.8	Cd uygulanan farklı genotip pamuk bitkilerinin gövde ve köklerinde biriken Cu miktarı.....	46
Çizelge 4.9	MS besiyerinden bitkiye taşınan Cu oranı.....	47
Çizelge 4.10	Cu'ın köklerden bitkinin üst kısımlarına taşınma oranı.....	47
Çizelge 4.11	143 ve M503 genotipi pamuk bitkilerinin kotiledon nodu ve sürgün ucundan rejenerasyonu.....	50
Çizelge 4.12	Nazilli 143 ve M503 pamuk genotipleri için doğrudan rejenerasyon prosedürü.....	54
Çizelge 4.13	Farklı B.B.D'lerin 143 ve M503 pamuk bitkilerinin kotiledon ve hipokotil eksplantları zerinde kallus oluşturma etkisi.....	57

ÖNSÖZ

Yalnızca yapmak istediğim bilim alanı için önemli bir adım olmakla kalmayıp, yaşamı öğrenmemde de önemli bir süreç olarak geçen Yüksek Lisans Tez çalışmam boyunca her türlü desteğiyle yanımda olan değerli Hocam Prof. Dr. Nezhun Gören'e,

TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsünde laboratuvarını bize açan ve bilimsel katkılarını esirgemeyen Prof. Dr. Abdülrezzak Memon'a, Enstitü yetkililerine ve Dr. Kasım Bayroviç'e,

Yardımlarından dolayı Aylin Özdemir, Birsen Cevher, Diğdem Aktopraklıgil, Dr. Şenay Vural Korkut, Günseli Kurt, Esra Yüca, Ömer Kaçar ve Dr. Cemal Ün'e

Sevgileriyle her zaman beni destekleyen Ailem'e ve Levent Ordu'ya, teşekkür ederim.

Bu çalışma Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 21-01-07-01



ÖZET

Türkiye’de pamuk yetiştiriciliği abiyotik streslerden sıklıkla etkilenen Ege, Güney Doğu Anadolu ve Akdeniz bölgelerinde yapılmaktadır. Ağır metal kirliliği, sıcaklık ve kuraklık gibi diğer abiyotik streslerle birlikte bir yandan ürün verim ve kalitesini düşürürken diğer yandan pamuk gibi ticari öneme sahip bitkilerin ekilebileceği tarım alanlarını da kısıtlamaktadır. Bu olumsuz etkiyi azaltmak amacıyla metal stresine dayanıklı genotipleri seçmek için Türkiye’nin farklı bölgelerinde yetişen 6 pamuk genotipi Cd, ve 5 pamuk genotipi Cu metallerini farklı konsantrasyonlarda (10, 50, 100, 200 ve 500 µM) içeren ortamlarda yetiştirilerek metal stresine karşı tarandı. Nazilli M503 ve Nazilli 143 genotiplerinin denenen metallere dayanıklı olduğu tespit edildi. Ege bölgesinde yaygın olarak yetiştirilen 84S genotipinin ise bu metallere karşı hassas özellikler gösterdiği ve artan metal konsantrasyonlarındaki büyüme performansının diğer genotiplere göre düşük olduğu belirlendi. Daha dayanıklı yeni genotipler geliştirebilmek amacıyla, metal stresine karşı dayanıklılıktan sorumlu olduğu bilinen MTI (Metalloprotein I) genini aktarmada kullanılmak üzere bitki rejenerasyon denemeleri dayanıklı genotipler olan Nazilli 143 ve Nazilli M503 ile yapıldı. Doğrudan ve dolaylı rejenerasyon şartlarının optimize edilmesinde kotiledon nodu, sürgün ucu, hipokotil ve kotiledon eksplantları kullanıldı. Bu eksplantlar bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren farklı besiyerlerinde test edildi. Kotiledon nodu eksplantı %90’dan fazla sürgün rejenerasyonu ve %50-%70 oranlarında kök rejenerasyonu gösterdi. Sürgün ucu eksplantları ise %90’dan fazla sürgün rejenerasyonu göstermelerine rağmen kök rejenerasyonu ancak %35 oranında gerçekleşti. Her iki genotipin sürgün ucu ve kotiledon nodu eksplantlarından en iyi sürgün rejenerasyonu 0.2 mg/l IBA ve 0.1 mg/l NAA + 0.1 mg/l IBA içeren MS besiyerinde görüldü. Nazilli 143 genotipinin kotiledon nodundan kök rejenerasyonu 0.1 mg/l NAA içeren MS besiyerinde en yüksek iken, Nazilli M503 genotipinin en yüksek kök rejenerasyonu 0.2 mg/l NAA içeren MS (Murashige ve Skoog) besiyerinde elde edildi. Rejenere bitkiler toprağa aktarılarak, bitki büyüme kabinlerinde yetiştirildi. 3-4 ay sonunda olgun pamuk kozaları görüldü.

Anahtar kelimeler: pamuk, ağır metal stresi, *in vitro* rejenerasyon, organogenez.

ABSTRACT

Most of the cotton growing areas in Turkey are located in the Aegean and Southern regions of Turkey and these areas are often affected by abiotic stresses. Abiotic stresses such as heavy metal, heat, and water deficiency can significantly reduce crop yield and quality and restrict the cultivable areas for commercially important crops like cotton. Therefore, to select heavy metal resistant cotton genotypes, 6 cotton genotypes from different regions of Turkey were screened against several concentrations of Cd, and 5 cotton genotypes were screened against several concentrations of Cu (10, 50, 100, 200 and 500 μ M). Nazilli M503 and Nazilli 143 were found to be resistant to tested metals. In contrast, the most widely grown genotype in Aegean region of Turkey, Nazilli 84S, was found to be sensitive to these metal toxicity and its growth performance both at shoot and root level was very poor when grown at high metal concentration. To obtain more resistant cotton genotypes via transformation of MTI (Metallothionein I) gene which is known to be responsible for resistance against heavy metal stress, plant regeneration experiments were performed with resistant genotypes Nazilli 143, and Nazilli M503 genotypes. Plant regeneration conditions were optimized and regeneration experiments were carried out with cotyledonary node, shoot apex, hypocotyl, cotyledon and tissues cultured at different hormonal ratios in the media. Cotyledonary nodes were good in regenerating both shoots (more than 90%) and roots (around 50% to 70%). Shoot apex also showed good regeneration for shoots (more than 90%) but their root regeneration efficiencies were low (maximum regeneration was around 35 % in some media). The highest shoot regeneration efficiencies from both cotyledonary nodes and shoot apex of Nazilli 143 and M503 genotypes were obtained on MS media supplemented with 0.2 mg/l IBA and 0.1mg/l NAA + 0.1 mg/l IBA. High root regeneration efficiencies from the cotyledonary nodes of Nazilli 143 were obtained when grown on MS media containing 0.1 mg/l NAA. Nazilli M503 showed good root regeneration when their cotyledonary nodes were supplemented with 0.2 mg/l NAA. Regenerated plants from both cotyledonary node and shoot apex of tolerant genotypes Nazilli M503 and 143 were transferred to pot culture in growth room and full mature cotton bolls were obtained in 3-4 month.

Key Words: cotton, heavy metal stress, *in vitro* regeneration, organogenesis.

1. GİRİŞ

Artan dünya nüfusuna paralel olarak insanoğlunun karşı karşıya kaldığı en önemli problem beslenme olmakla birlikte diğer birçok ihtiyaca cevap verebilme kapasitesinden dolayı lif üretimine olan ihtiyaç da beslenme kadar önemlidir. En önemli lif kaynaklarından biri olan pamuk başta tekstil endüstrisi olmak üzere birçok endüstri alanına (kumaş, iplik, sicim, barut, vernik, cila, yapay deri, otomobil lastiği, gübre, margarin, yemeklik yağ, kozmetik, deterjan, sabun, mum vb.) ham madde sağlayan bir bitkidir. Pamuk, tohumlarındaki yüksek yağ oranıyla yağ sanayi için oldukça önemli hale gelmiştir. Yağı çıkarıldıktan sonra arta kalan küspesi hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Pamuk bitkisinin dalları ve yaprakları da işlemlerden geçirilerek yem amaçlı olarak kullanılmaktadır (Gregory vd., 1999; [2]; [5]).

Tarım ürünlerindeki kabul edilebilir toksik metal seviyeleri halen tam olarak belirlenebilmiş değilse de USA The National Research Council hayvanlar için yem olarak kullanılacak bitkilerde bulunmasına izin verilebilir kadmiyum (Cd), bakır (Cu), nikel (Ni) ve çinko (Zn) miktarlarını her hayvan türüne göre farklı belirlemiştir. Buna göre, örneğin koyunun alabileceği Cd miktarı 0.5 mg/kg, Cu miktarı ise 25 mg/kg'dır (Gardiner vd., 1995; Das vd., 1997). Pamuk bitkisi de yem olarak kullanılan bitkiler arasında olduğundan içerdiği ağır metal miktarı önemlidir.

Pamuğun tarih öncesi zamanlardan beri Eski Mısır, Hindistan ve Çin'de kullanıldığı bilinmektedir. Güney Amerika'da mezar kazıları sırasında bulunan pamuk kumaşlar bunların İnka kültürlerine ait olduğunu göstermektedir [2]. Günümüzde pamuk, tekstil endüstrisinde kullanılan tüm lifin %55'ini karşılamaktadır (De Mastro vd., 1998). Dünyada pamuk tarımı yapılan 106 ülkede yaklaşık 33.911.000 hektar alana pamuk ekilmekte ve 20.856.000 ton pamuk üretilmektedir. Dünya çapında hektar başına düşen lif verimi 615 kg'dır. Pamuk üreticisi ülkeler arasında Türkiye sahip olduğu yaklaşık 700.000 hektar ekim alanıyla 7., lif verimi açısından ise 1.290 kg/ha lif verimi ile 3. sırada yer alan önemli bir pamuk ülkesidir. Türk tekstil sanayi, ülke gereksinimini karşıladığı gibi Türkiye ihracat gelirinin de %38'ini oluşturmaktadır (Anonymous, 2001). Bu büyük kapasitesi ile pamuk, Türk tekstil endüstrisi ve Türk tarımı için önemli bir üründür. Dünya piyasası ile rekabet edebilmek için ürettiğimiz pamuğun hem miktar hem de kalite yönünden geliştirilmesi kaçınılmazdır.

Türkiye'de pamuk yetiştiriciliğinin yoğunlukla yapıldığı Ege ve Güney Anadolu sıcaklık, kuraklık ve metal kirliliği gibi abiyotik streslerle karşı karşıya olan bölgelerdir. Abiyotik stresler ürün miktarını ve kalitesini düşürdüğü gibi ticari öneme sahip ekim alanlarını da

kısıtlamaktadır (Memon vd., 2000). Çalışmamızda öncelikle metal kirliliğinin yarattığı stres üzerinde durulmuştur.

Hassas bir bitki olan pamuk çeşitli biyolojik streslere maruz kalmaktadır. Bu stresi yaratan zararlılarla mücadele için kullanılan tarım ilaçları, gübreleme, motorlu taşıtların eksoz gazları, çevredeki maden yatakları ve nehirlere bırakılan kontrolsüz atıklar nedeniyle tarım için kullanılan toprak ve sulama suları metallerle kirlenmektedir. Tüm bunlar ülkemizde pamuk bitkisinin metal stresi ile karşı karşıya kalmasının başlıca nedenleridir (Gardiner vd., 1995; Gümgüm vd., 1994).

Metal stresine karşı yeni pamuk genotiplerinin bulunması ve/veya geliştirilmesi ile pamuk verim ve kalitesi artırılarak ekonomiye önemli katkılar sağlanacaktır. Strese toleranslı genotipler kullanılamaz haldeki tarım arazilerinin ve endüstriyel bölgelerin geri kazanılmasında gereklidir. Ayrıca pamuk bitkisinin hayvan yemi olarak kullanılıyor olması nedeniyle içereceği ağır metalin besin zincirine girmesi dolaylı yoldan insan sağlığı için tehlike teşkil etmektedir. Metal stresini bünyesinden dışlayarak tolerans gösteren genotiplerin bulunması ve/veya geliştirilmesi insan sağlığı için önemlidir. Metal kirliliği sanayileşmiş ve sanayileşmekte olan tüm ülkelerin önemli problemleri arasında yer almaktadır. Bu nedenle ekonomik olarak önemli bitkilerin metal stresine dayanıklılığının incelenmesi ve dayanıklı yeni genotiplerin geliştirilmesi amacıyla gen aktarımına yönelik rejenerasyon sistemlerinin oluşturulması güncel ve önemli bir konudur.

Bu amaçla çalışmamızda, ülkemizde yetişen 13 pamuk genotipi metal stresine karşı dayanıklılıkları bakımından tarandı ve ağır metal stresine karşı verdikleri tepkiler açısından incelendi. Daha dayanıklı yeni genotipler geliştirmek üzere gen aktarımında kullanılmak amacıyla, seçilen dayanıklı genotiplerin doğrudan ve dolaylı organogenez metoduyla rejenerasyonu optimize edildi.

Cd, bitki büyüme ve gelişimi için mutlak gerek duyulmayan elementlerin bitkilerde birikimi ve tolerans mekanizmalarının araştırıldığı birçok çalışmada model olarak kullanılmıştır (Salt vd., 1995; Peijnenburg vd., 2000; Nigam vd., 2001; Vasconcelos ve Leal, 2001; Clemens vd., 2002). Bu nedenle çalışmamızda öncelikle kadmiyum (Cd) ve bakır (Cu) kirliliği üzerinde durulmuştur.

2. LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1 Pamuk Bitkisi

Pamuk, Malvaceae (Ebegümeçigiller) familyasının *Gossypium* genusuna ait bir bitkidir. Bu genusta A, B, C, D, E, F ve G olarak adlandırılan 7 genom bulunmaktadır. Diploid türler ($2n=26$) tüm kıtalara yayılmıştır ancak bunların çok azının tarımsal önemi vardır. En önemli tarımsal pamuk türleri *G. hirsutum* ve *G. barbadense*'dir. Her iki tür de tahminen Eski Dünya A genomu ($2n=26$) ve Yeni Dünya D genomu ($2n=26$) arasında doğal şartlarda gerçekleşmiş bir melezleme sonucu ortaya çıkmış allotetraploidlerdir (AADD) ve 52 somatik koromozoma sahiptirler (Çağırğan ve Barut, 2000; [4]).

Pamuk yıllık olarak ekilen ve tropikal bir bitki olmasına rağmen, düzenli yağmur alan ılımlı iklimlerde de iyi bir şekilde yetiştirilebilmektedir. Dikotiledon bir bitki olan pamuğun yaprakları 3 lobludur, tohumları kozalar içinde bulunmaktadır [2].

2.2 Bitkilerde Çevresel Stres

Sıcak çöller, tuzlu topraklar, çok yüksek dağ zirveleri gibi ortamlarda dahi sağlıklı bir şekilde varlıklarını sürdürebilen bitkiler için stresi tanımlamak zordur. Çevresel şartlardaki devamlı ya da geçici olarak meydana gelen olumsuz fakat öldürücü olmayan değişimler stres olarak bilinir. 1972'de Jacob Levit çevresel stresi, bitki büyüme ve gelişimini değiştiren ya da engelleyen, çevresel şartlardaki herhangi bir değişim olarak tanımlamıştır (Salisbury ve Ross, 1985).

Geçici süre için meydana gelen stres faktörlerine karşı bitki herhangi bir belirti göstermese bile canlılığı gerilemeye başlar ve stres devam ettikçe geri dönüşümsüz zararlar ortaya çıkabilir. Çevresel stres biyotik ve abiyotik olarak ikiye ayrılır. Biyotik stres, enfeksiyon oluşturan mikroorganizmalar, böcek, nematod gibi zararlıları kapsamaktadır. Abiyotik stres ile kastedilen ise sıcaklık, kuraklık, radyasyon, kimyasal, manyetik, elektriksel etkiler, ağır metal kirliliği gibi faktörlerdir. Bitkilerin stres faktörlerine karşı gösterdiği tepkiler yaşa, adaptasyon derecesine, mevsime bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (Gürel ve Türker, 2001).

2.3 Ağır Metallerin Genel Özellikleri

Ağır metaller periyodik tabloda bakır ile civa arasında yer alan, atom ağırlıkları 63,546 ile 200,590 arasında değişen ve 5 gr/cm^3 'den daha fazla özgül ağırlığa sahip bir grup element

olarak tanımlanırlar (Zenk, 1996). Doğal olarak oluşan 90 elementin 53'ü ağır metaldir (Toppi ve Gabbrielli, 1999). Çözünürlüklerine ve fizyolojik durumlarına göre bu metaller organizmalar ve ekosistem için önem taşımaktadırlar (Schützendübel ve Polle, 2002). Çevrede doğal olarak yer alırlar, taşlarda, toprakta, bitkilerde ve hayvanlarda bulunmaktadır. Suda çözülmüş iyonlar şeklinde, toz parçacıkları ya da buhar formunda atmosferde geniş ölçüde yayılmışlardır. Ayrıca organik ve inorganik moleküllerle bağ yapabilirler ([3]; Zenk, 1996).

2.3.1 Kadmiyum (Cd)

Cd mutlak gerekli olmayan elementlerin bitkilerde birikim ve tolerans mekanizmalarının araştırıldığı birçok çalışmada model olarak kullanılmıştır (Salt vd, 1995; Peijnenburg vd, 2000; Nigam vd., 2001; Vasconcelos ve Leal, 2001; Clemens vd., 2002).

Hemen hemen her zaman divalent olan kadmiyum kimyasal olarak çinko ile yakın benzerlik gösterir ve neredeyse tüm çinko yataklarında izomorf yer değiştirme ile oluşur. Sülfid, kurşun ve bakır gibi madenlerle birlikte bulunduğu ekonomik olarak toplanabilmektedir. Geçtiğimiz yüzyılın ilk dönemleri boyunca Cd'a olan talep çok düşük düzeydeydi ve Zn çıkarılması sırasında bu elementin izole edilmesi için herhangi bir girişim yoktu. Bundan dolayı Cd, Zn ürünlerin bir kirleticisi olarak artakalmıştır ya da çinkonun işlenmesi boyunca çevreye yayılmıştır. 1930'lardan beri Cd'a olan talep dünya çapında sürekli olarak artmıştır. (Schützendübel ve Polle, 2002). Bağlı olarak ender bulunan bir element olan kadmiyum yerkabuğunda her yerde dağılmıştır, toprak ve sedimentlerdeki ortalama konsantrasyonunun 0,15-1 mg/kg arasında olduğu bildirilmektedir (Das vd., 1997; hc-sc.gc.ca). Bazı kaynaklarda ise kirlenmemiş topraklarda Cd'un 0,04-0,32 μM arasında olduğu ve 0,32 μM 'dan daha fazla Cd bulunan toprakların kirlenmiş topraklar olarak kabul edildiği bildirilmiştir (Toppi ve Gabbrielle, 1999). Yapraklarda 1 ppm (mg/kg) üzerinde Cd bulunması toksik olarak kabul edilmektedir (Pence vd., 2000). Cd birçok canlı için toksiktir, bitki ve hayvanlarda birikme eğilimi göstermektedir. Doğrudan sudan alınabildiği gibi hava ve yiyecekler yoluyla dayayılmaktadır (Wagner, 1993). Cd yüksek çözünürlüğe sahip olması, bitkiler tarafından hızlı ve kolay absorblanabilmesi, yüksek hareket edebilme yeteneği ve küçük konsantrasyonlarda dahi bitkiler üzerinde zararlı etkisinden dolayı toksik metaller arasında en tehlikelisi olarak kabul edilmektedir (Das vd., 1997; Nigam vd., 2001).

2.3.2 Bakır (Cu)

Cu, enzimlerin yapısal ve katalitik kofaktörüdür. Bitkiler normal büyüme ve gelişimi için Cu'ya ihtiyaç duyarlar. Topraktaki Cu'nun %98'i düşük molekül ağırlıklı organik bileşiklerle kompleks oluşturmuş durumda bulunur. Cu'nun çözünürlüğü toprağın pH'sına bağlıdır ve çözünürlük düşük pH ile artmaktadır. Toprak pH'ı 5'e eriştiğinde Cu⁺² toksisitesi oluşur. Cu köklerdeki katyon değiştirme bölgelerine bağlanabilir. Topraktaki Cu'nun çoğu bitkilerin kullanabildiği formda değildir. Çünkü organik maddeler ve diğer toprak kolloidleri tarafından güçlü bir şekilde tutulmaktadır (Epstein, 1972; Lidon ve Henriques, 1998; Lin vd., 2003).

2.4 Ağır Metal Kirliliği

Doğal salınım dışında, endüstriyel devrimin sonucu olarak ağır metallere olan talebin büyümesi ve kullanımının artması, biyosferde ağır metalin yüksek dağılımına neden olmuştur (Zenk, 1996; Schützendübel ve Polle, 2002; [3]).

Ağır metal kaynaklarının başlıcaları, aşınan kayalar, maden çıkarılması ve işlenmesi, fosil yakıtlar, şehir trafiği, atık sular, şehir atıkları, gübreler, böcek ilaçları, toprağın fizyolojik şartlarını iyileştirse de içerdiği metallere dolaylı olarak kanalizasyon sularıdır ([3]; Gardiner vd., 1995). Bu gibi nedenlerle artan metal akışı rüzgar ve suyla taşınabilmekte ve böylece bitki ve hayvanları etkilemektedir (Landberg ve Greger, 1996; Hall, 2002).

Bitkiler ve hayvanların yaşamları mikroelementler olarak adlandırılan bazı metallere bağlıdır. Örneğin, birçok enzimin ve diğer proteinlerin yapısında bulunan Zn ve Cu gibi ağır metaller normal bitki büyümesi ve gelişmesi için gereklidir. Bununla birlikte topraktaki mutlak gerekli ve mutlak gerekli olmayan elementlerin yüksek konsantrasyonları ve bunların bazılarının küçük miktarları dahi insan, hayvan ve çevre için toksik olabilir (Hall, 2002; Mejare ve Bülow, 2001). Bazı tesadüfi olaylar, kadmiyum ve civa gibi metallerin neden olduğu toksik etkilerin ciddiyetini ortaya koymaktadır. Örneğin, 1950'lerde pirinçten kronik kadmiyum zehirlenmesi diyet eksiklikleri ile birleşince, epidemik böbrek hasarı ve Japonya'da orta yaş kadınları arasında görülen ve İtai-İtai denen iskelet hastalığına neden olmuştur. Yine Japonya'da kirlenmiş bir koydan tutulan balıkların yenmesiyle ortaya çıkan civa zehirlenmesi sonucu Minimata olarak bilinen hastalık görülmüştür. 1950 ve 1960'larda çiftçilerin tohumları küflenmekten korumak için metil merkürü kullanması çok sayıda kuşun ölümü ile sonuçlanmıştır [1]; [3].

2.5 Bitkilerde Metal Alımı

Bitkilerde metal alımı bitkinin alım sistemleri ve türe özel gereksinimler dışında, toprağın bu elementi bulundurma kapasitesi ve toprak solüsyonundaki kimyasal erişilebilirliği ile kontrol edilir. *Lettuce sativa* üzerinde yapılan çalışmalarda metal alımının metale bağımlı olduğu gösterilmiştir (Peijnenburg vd., 2000).

Rizosferin pH'sı, karboksilatların salınımı, köklere yerleşmiş mikorizalar ve bakteriler toprak partikülleri tarafından tutulmuş metallerin kullanımını kolaylaştırıcı faktörlerdendir. Metaller, toprakta hareketlenmelerini takiben bitkinin kök hücreleri tarafından tutulur. Önce hücre duvarlarına bağlanan metaller, daha sonra taşıyıcı sistemler ve hücre içi bağlanma bölgeleri ile düzenlenerek plazma membrandan geçer. Metal iyonlarının alımının kanal proteinleri ve/veya taşıyıcı proteinler tarafından gerçekleştirildiği düşünülmektedir. Cu^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} ve Cd^{+2} gibi divalent katyonlar bitkinin kökleri içine bazı taşıyıcı proteinler ile taşınır. Toprakta Fe eksikliği durumunda demir taşıyıcı protein köklerde birikir ve Fe^{+2} bulamayınca Cd^{+2} ve Zn^{+2} gibi divalent ağır metal katyonlarının taşınmasını sağlar. Plazma membranın iç kısmının (-) yüklü olması katyonların alımı için geçiş gücü sağlamaktadır (Briat ve Lebrun, 1998; Clemens vd., 2002).

Kök epidermisi ve korteksinin apoplastı çözünür maddelere karşı geçirgendir. Apoplast, hücre ve dokular arasında iyon dağılımı, taşınması ve çevresel streslere karşı savunmada önemli bir rol oynamaktadır ve geçiş metallerinin depolandığı bir havuz olarak da hizmet edebilir. Kök hücre duvarının kimyasal özelliklerine bağlı olarak katyonların hücre duvarına bağlanmasında seçicilikler vardır.

Esas bir element olmamasına rağmen Cd iyonları bitki kökleri tarafından alınır ve yapraklara taşınır. Cd'un yapraklardan ve doğrudan gövdeden alımı da söz konusudur (Steffans, 1990; Ouzounidou vd., 1997; Çakmak vd., 2000). Pasif olarak absorblandığı ve serbest taşındığı bilinmekle birlikte pirinç, buğday, soya fasulyesi ve mısır gibi bitkilerde yapılan çalışmalarda Cd'un kök hücreleri plazma membranından geçişinin konsantrasyona bağlı bir işlem olduğu ve bunun taşıyıcı bir sistemle düzenlendiği görüşü desteklenmiştir (Das vd., 1997; Hart vd., 1998).

2.6 Bitkilerde Metal İyonlarının Taşınması

Çözünür maddeler ksileme girmeden önce kök hücresi simplasmına alınmak zorundadır. Metalin kök simplasmına alımını takiben kökten ksileme geçmesinde 3 aşamada gerçekleşir;

metallerin kök hücreleri içinde birikimi, simplastik taşınma ve ksilem içine salınma. İyonların ksileme taşınması genellikle taşıyıcı membran proteinleri ile sağlanır. Bu metal taşıyıcı proteinler tam olarak tanımlanabilmiş olmasa da histidin ve nikotinamin gibi ligantların metallerle kompleks oluşturarak metalleri ksileme yönlendirdiği bilinmektedir. Fitokelatinler gibi bazı ligantlar ise bunun tam tersine metallerin kökte birikimini sağlamaktadır (Clemens vd., 2002).

Ksilem özsuyuna alınan metaller terleme gücü ile bitkinin üst kısımlarına taşınır. Organik asitler, özellikle sitrat ksilemdeki başlıca metal bağlayıcılarıdır. Ksilem özsuyundaki amino asitler de Ni ve Cd için potansiyel metal bağlayıcılarıdır. Ksilem özsuyunda serbest histidinin artması Ni'in bitkinin üst kısımlarına taşınmasını arttırmıştır. Bir metiyonin türevi olan nikotinaminin de ksilemde Cu'ın taşınmasında rolü vardır (Briat ve Lebrun, 1998). Ksilem içinde düşük molekül ağırlıklı metal bağlayıcılar, hidratlanmış serbest metal katyonları, terleme akışı ve ksilem kanalı hücre duvarındaki metal bağlayıcı bölgeler arasında pH'ya bağlı bir denge mevcuttur.

Metaller ksilem özsuyu içinde yaprak apoplastlarına ulaştırılır. Taşıyıcılar simplast içine alımı sağlar ve yaprak içine dağılım apoplast ve simplast yoluyla gerçekleşir. Her bitki hücresi içinde metal trafiği oluşur ve her organelde özel fizyolojik oranlarda metal konsantrasyonu meydana gelir. Mutlak gerekli elementlerin fazlası ve mutlak gerekli olmayan elementler yaprak hücresi vakuollerinde biriktirilir. Farklı yaprak tipleri farklı birikim gösterirler (Clemens vd., 2002).

Her bitki organı membran seçiciliği ve ağır metalleri immobilize etme mekanizmalarından dolayı Cd'un topraktan yukarı kısımlara hareketi için bir bariyer oluşturur. Bitki tarafından biriktirilen toplam Cd'un yalnızca çok küçük bir miktarı yapraklara ulaşır ve yine bunun da bir kısmı kloroplastlara girebilir (Siedlecka ve Krupa, 1999). Besleyici solusyondaki metal bağlayıcılar da Cd alımına yardım edebilir. Ortamdaki organik asit konsantrasyonunun artışı ile Cd alımı da artmaktadır. Organik bileşik yapmış Cd'un aynı miktar iyonik formundan daha kolay ve hızlı hareket ettiği bilinmektedir. Sitrik, malik, oksalik, aspartik ve glutamik asit gibi organik asitlerin potansiyel metal bağlayıcılar oldukları bildirilmiştir (Nigam vd., 2001).

2.7 Bitkilerde Metal Depolanması

Bitkilerde metal birikiminin, bitkinin metali alım kapasitesi ve hücre içi bağlanma bölgelerinin bir fonksiyonu olduğu düşünülmektedir. Çok hücreli organizmalarda doku ve

hücrelere özel farklılıklar ve hücreler arası taşınımından dolayı metal birikim mekanizması daha karmaşıktır. Metalin topraktaki hareketliliği, topraktan alınması, kökte birikim, vakuole taşınma, ksilem taşınımının etkinliği ve topraküstü kısımlarda metalin dağılımı metal birikimini etkileyen faktörlerdir.

Bitki hücrelerinde aşırı ve kullanılmayan metal varlığında bu metallerin toksik etkisinden korunabilmek amacıyla çeşitli proteinler, peptidler ve küçük organik moleküller vasıtasıyla gerçekleşen bazı depolama yöntemleri gelişmiştir. Ferritinler, metalotiyoninler ve fitokelatinler metal iyonlarının depolanması ve detoksifikasyonundan sorumlu başlıca proteinlerdir. Ferritinler her molekülde birkaç bin demir atomu bağlayabilen, her yerde varolan multimerik demir depolayıcı proteinlerdir. Bitkilerde bu proteinler küçük bir grup gen tarafından kodlanır ve plastidlere yerleşmişlerdir. Ferritinlerin ekspresyonu gelişimsel olarak düzenlenir ve demirin aşırı varlığı gibi çeşitli sinyallerle aktive olur (Briat ve Lebrun, 1998; Clemens vd., 2002). Metalotiyoninler 2.10.3'de, fitokelatinler 2.10.4'de anlatılmaktadır.

2.8 Bitkilerde Metal Toksisitesi Mekanizması

Ağır metallerin bitkiler üzerindeki etkisi bitkilerin büyüme dönemlerine bağlıdır. Gelişimin erken evresindeki bitkilerde toksik etki büyümenin durması ile sonuçlanırken, daha yaşlı bitkilerde senesensin hızlanması şeklinde kendini gösterir.

Bir elementin aşırı varlığı durumunda bu element,

- diğer elementlerle yarışa girerek,
 - fonksiyonel bölgelerdeki temel elementlerle yer değiştirerek,
 - proteinlerin sülfidril gruplarına bağlanıp enzimlerin inaktivasyonuna neden olarak ya da yapılarını bozarak,
 - oksidatif strese neden olarak,
 - su dengesini değiştirerek,
- metabolizmayı engelleyebilmektedir.

Aşırı miktarda ağır metal bulunduğu görülen toksik belirtiler hücresel ve moleküler düzeyde etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. Ayrıca ağır metallerin aşırı varlığı serbest radikallerin ve reaktif oksijen türevlerinin oluşmasını destekleyerek oksidatif strese neden olmaktadır (Hall, 2002). Oksijen molekülü diğer moleküllerden elektron aldığı anda serbest oksijen radikalleri oluşur ve hücre içindeki birçok reaksiyon oksijeni süperokside (O_2^-) ve hidrojen perokside (H_2O_2) indirger. Bu moleküller her ne kadar çok fazla reaktif değilse de

biyolojik sistemde birçok oksidatif hasara neden olan hidroksil radikallerini ($\cdot\text{OH}$) oluşturabilir. Demir ve bakır gibi geçiş metalleri genellikle paylaşılmamış elektronlara sahip olduğundan oksijenin indirgenmesinde iyi birer katalizör rolü oynarlar. Hidroksil radikalleri DNA'nın şeker-fosfat omurgasına ya da bazlarına H atomu ekleyerek ya da çıkartarak günde hücre başına 10^4 - 10^5 DNA baz değişimine neden olabilir. Metal iyonları ayrıca, serbest amino asit ve proteinlerin oksidatif değişimlerinde önemli rol oynamaktadır. Histidin, arjinin, lizin, prolin, metiyonin ve sistein bakiyeleri proteinlerde oksidasyonun yaygın olduğu bölgelerdir. Bu değişimler, spesifik hedef olan metal bağlama bölgesindeki amino asitler için spesifiktir (Briat ve Lebrun, 1998). Cd'un da oksidatif stres oluşturduğu bulunmuştur (Schützendübel ve Polle, 2002). Cd'un soğan, fasulye, bezelye ve arpada kromozomal sapmalara neden olduğu, pirinçte RNA sentezini değiştirdiği ve ribonükleaz aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir. Rosas ve ark. 1984'de Cd'un hücre bölünmesini inhibe ettiği ve kromozomları değiştirdiğinden bahsetmişlerdir (Das vd., 1997; Toppi ve Gabrielle, 1999).

0,01-0,1 mg/l Cd'un ATP konsantrasyonunu ve klorofil konsantrasyonunu indirdiği, oksijen üretimini düşürdüğü bilinmektedir. Kök ve gövdede büyümenin durması ya da indirgenmesi, yapraklarda kıvrılma ve klorosis, fosfor eksikliği, düşük manganez transportu problemleri, senesensin hızlanması, stoma hareketlerinin zarar görmesi (stomaların kapanması ya da sürekli açık durumda bloke olmaları), peroksidaz, ribonükleaz ve deoksiribonükleaz aktivitelerinin artması, glukoz-6 fosfat dehidrogenaz, glutamat dehidrogenaz, malik enzim, isositrik dehidrogenaz, rubisco ve karbonik anhidraz gibi enzimlerin inhibisyonu Cd toksisitesinin en yaygın belirtileridir (Kennedy ve Gonsalves, 1987; Van Assche ve Clijdens, 1990; Das vd., 1997; Siedlecka ve Krupa, 1999; Toppi ve Gabbrielle, 1999).

Cd gibi mutlak gerekli olmayan elementler toksik etkilerini aktif enzim ya da membran protein bölgeleri için gerekli olan mutlak gerekli elementlerle yarışarak gösterirler ve normal metabolik işlemleri engellerler. Bu yarışın hücre yüzeyinde mi yoksa hücre içi metabolik bölgelerde mi olduğu bilinmemekle birlikte her iki bölgede de olduğu tahmin edilmektedir.

Çünkü karboksil, sülfidril ve porfirin grupları gibi metal bağlayıcı fonksiyonel gruplar hem taşıyıcı membran proteinlerinde hem de hücre içi enzimlerde bulunmaktadır (Vaconcelos ve Leal, 2001). Cd alımı ve taşınmasının Ca, Mg, P ve K gibi elementler ve suyun bitkiler tarafından kullanımını engellediği gösterilmiştir (Das vd., 1997).

Bitki tarafından biriktirilen toplam Cd'un yalnızca %1'lik bir kısmı kloroplastlarda birikmesine karşın yine de kloroplast yapı ve fonksiyonlarında hasara neden olur.

Kloroplastlar Cd stresine, Fe eksikliği veya aşırı varlığına karşı en hassas organellerdir. Cd'un kloroplastlara verdiği hasarlar, tilakoid membranında serbest yağ asitlerinin artması, grana yapısının zarar görmesi, plastoglobuli miktar ve büyüklüğünde artış, PS2nin ışığı toplayan antenasında, PS2 reksiyon merkezinde hasar, plastokinon ve ferrodoksin miktarında azalma olarak gözlenmiştir (Siedlecka ve Krupa, 1999). Cd'un neden olduğu klorosis Cd'un kloroplast replikasyonunu ve hücre bölünmesini engellemesinden dolayı kloroplast yoğunluğunda göze çarpan bir düşüşün ve mezofil hücre büyüklüğünde bir artışın ifadesidir. Klorofil kaybı kloroplast yoğunluğundaki azalma nedeniyle ortaya çıkmaktadır (Barylá vd., 2001).

Cu ve Zn gibi bazı elementlerin aşırı varlığı durumunda organizmalar bu metalleri bünyelerine alıp, almamakta nasıl davranacağı konusunda ikilemede kalırlar. Bu iyonlar birçok metabolik yol için gerekli olmakla birlikte potansiyel olarak tehlike taşımaktadır. Zn iyonları, DNA bağlayıcı proteinler ve hidrolitik enzimlerde yapısal ve katalitik bir eleman olduğu halde, kontrolsüz bağlanması enzimleri inaktive edebilir. Cu^+ ve Cu^{+2} iyonları çeşitli organik moleküllere yüksek ilgi gösterir. Fotosentez gibi birçok elektron transfer zincirinde kullanılan Cu'un redoks aktivitesi oksijen radikallerinin meydana gelmesine neden olur (Vaconcelos ve Leal, 2001). Cu aşırı miktarda absorblandığında, toksik bir element gibi hareket eder ve büyümeyi durdurur. Toleranslı olmayan bir çok bitkide Cu^{+2} toksisitesinin mitozun zarar görmesi, kök büyümesinin durması, kök epidermal hücrelerinin ve kök hücre membranlarının zarar görmesi ile ilgili olduğu bildirilmiştir (Marschener, 1986; Lin vd., 2003).

2.9 Bitkilerde Ağır Metal Toleransı ve Detoksifikasyonu

Ağır metallere toleranslı bitkiler, toksik olan topraklarda diğer bitkilere göre hayatta kalma yeteneği olan bitkiler olarak tanımlanabilir. Bu durum çevre ve genotiple etkileşim içindedir (Zhu vd., 1999).

Bitkilerde ağır metal toleransı evrim biyologlarının olduğu kadar bitki ekologlarının ve fizyologlarının da ilgisini çeken bir konudur. Metal toleransı, ağır metal iyonlarına aşırı maruz kalmanın getirdiği zararlı etkiyi indirgemenin yolu olarak gelişmiştir (Das vd., 1997).

Bitkiler ağır metal stresine karşı detoksifikasyon ve tolerans ile ilgili hücresel düzeyde mekanizmalara sahiptir. Bu mekanizmaların hepsinin öncelikle hücrenin hassas bölgelerinde toksik konsantrasyonun oluşmasını önlemekle ilgili olduğu bilinmektedir. Metallerin detoksifikasyonu için bitkiler en çok, kimyasal olarak uygun ligantları kullanarak toksik

olmayan kararlı kompleksler oluşturma yolunu izler (Salt vd., 2002).

Metal toleransı ve detoksifikasyonundan sorumlu birçok mekanizma bulunmaktadır. Plazma membranı, protoplast içindeki ısı şoku proteinleri ya da metalotiyoninler gibi proteinler, organik asitler, amino asitler, peptidler, protein olmayan yüksek sistein (Cys) içerikli tiyoller gibi bağlayıcı moleküller, metallerin vakuollere taşınarak metabolik yollardan uzaklaştırılması bu mekanizmalar arasındadır (Zhu vd., 1999; Hall, 2002).

2.9.1 Mikorizalar

Mikorizalar ve ektomikorizalar konakçı bitkilerde metallerin zararlı etkilerinin düzeltilmesinde etkilidir. Mantarlarda hücresel düzeyde ağır metalleri tolere etme mekanizmaları büyük oranda yüksek bitkilerdeki stratejilerle benzerdir (hücre dışı materyallere bağlanma ya da vakuollerde biriktirme gibi). Ektomikorizalar çeşitli dışlama işlemleri ile konakçı bitkiye yardım ederler (Schützendübel ve Polle, 2002).

2.9.2 Hücre Duvarı ve Kök Salgıları

Hücre duvarının bağlayıcı özelliği ve bunun metal toleransındaki rolü tartışılan bir konudur. Her ne kadar kök hücre duvarı toprak solüsyonu içinde metallerle doğrudan temas halinde ise de, hücre duvarına adsorbsiyon sınırlıdır. Bitki hücre duvarları % 25- 30 selüloz, % 15-25 hemiselüloz, % 35 pektin, % 5-10 glikoprotein içerir. Pektin ve glikoproteinlerin anyonik karboksilat grupları metal iyonlarını bağlama kapasitesine sahiptir. Belli metallerin alımını arttıran metal bağlayıcı kök salgıları bu konuda çeşitli rollere sahiptir. Ni-hiperbiriktirici bitkilerde Ni-bağlayıcı salgıların incelenmesi sonucu Ni-bağlayıcı histidin ve sitratın hiperbiriktirici olmayan bitkilerin kök salgılarında biriktiği ve böylece Ni alımını azaltmaya yardım ettiği görülmüştür (Briat ve Lebrun, 1999; Macfie ve Wellbourn, 2000; Clemens vd., 2002; Hall, 2002).

2.9.3 Plazma Membranı

Plazma membranı ağır metallerin alımını azaltarak ya da sitosole giren metallerin dışa pompalanmasını sağlayarak toleransa katkıda bulunmaktadır. Bitki plazma membranı metal toksisitesi için ilk canlı hedefidir. Yüksek konsantrasyonda metal varlığında plazma membran çok çabuk etkilenir ve oksidasyon, protein tiyollerinin çapraz bağlanması, H⁺-ATPaz gibi membran proteinlerinin durdurulması ya da membran lipidlerinin akışkanlığı ve kompozisyonunun bozulması gibi çeşitli zararlar meydana gelir. Membran üzerindeki olaylar

metal spesifiktir (Hall, 2002; Clemens vd., 2002).

2.9.4 Organik Asitler ve Amino Asitler

Ağır metaller için potansiyel ligantlar olan bazı amino asitler, organik asitler ve fosfat türevleri ağır metal toleransı ve detoksifikasyonunda rol oynarlar. Örneğin, Ni-hiperbiriktirici bitki *Alyssum lesbiacum*'da Ni muamelesi sonucu ksilemlerin histidin içeriğinde 36 kat artış tespit edilmiştir. Sitrat Ni^{+2} ve Cd^{+2} gibi metallere afinite göstermekle birlikte en çok Fe ile ilişkisi gösterilmiştir (Hall, 2002; Salt vd., 2002).

2.10 Metal Stresine Hücresel Düzeyde Verilen Cevaplar

Bitki hücreleri metal stresine karşı bazı savunma sistemleri geliştirmiştir

- Durdurma (immobilizasyon)
- Dışlama
- Metalloiyonun sentezi (MT)
- Fitokelatin sentezi (FK)
- Stres proteinlerinin sentezi
- Vakuolde biriktirme

2.10.1 Durdurma

Metal stresine karşı ilk engel kök düzeyinde, kök hücre duvarı ve hücrelerarası karbonhidratlar sayesinde metal iyonlarının durdurulmasıyla gerçekleşmektedir. Çalı fasulyesinde yapılan deneylerde Cd iyonlarının hücre duvarının pektik bölgelerine ve histidil gruplarına bağlanarak hücreye alımının durdurulduğu görülmüştür (Toppi ve Gabbrielli, 1999; Mejare ve Bülow, 2001).

2.10.2 Dışlama

Cd iyonlarının plazma membran hareketi vasıtasıyla sitosol içerisine girişini önleme yolu teorik olarak en iyi savunma mekanizmasıdır (Memon vd., 2001; Hall, 2002). Ni-hiperbiriktiricisi olmayan bitkilerde Ni-bağlayıcı salgılar olan histidin ve sitratın bitkilerin kök salgılarında biriktiği ve böylece Ni alımını dışladığı görülmüştür (Clemens vd., 2002).

2.10.3 Metalloiyoninler

Tüm organizmalar toksik metallerin hücredeki konsantrasyonunu dengelemek için sistince

zengin, genellikle aromatik amino asitleri olmayan düşük molekül ağırlıklı metallothiyonin denilen proteinler sentez ederler (Briat ve Lebrun, 1998; Liu vd., 2000; Hall, 2002). Sisteince zengin olan MTler, indirgenmiş durumda sülfür arayan metalleri düzenleyen mercaptid bağları için tiyol temin eder (Kagi ve Schaffer, 1988; Rauser, 2000). Metallothiyonin ismi ilk kez 1957'de at böbrek korteksinden izole edilen ve çok miktarda sülfür ve Cd içeren bir proteini tanımlamak üzere kullanılmıştır. Daha sonra farklı organizmalardan bu proteinlere benzeyen ve Zn^{+2} , Cu^{+2} ve Cd^{+2} iyonları ile ilişkili olduğu gözlenen proteinler izole edilmiştir. Bitkilerde ise ilk kez 1985 yılında poli(γ -glutamil-sisteinil)glisin yapısında Cd ligantları tanımlanmıştır. Bunlar sınıf III MT'lerdir ve "Fitokelatinler" olarak bilinir. Sınıf III MT'ler I ve II'lerden çok farklıdır, bunlar enzimatik olarak türevlenir ve en yaygın şekilleri poli(γ -glutamil-sisteinil)glisin $[(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}]^n$ 'dir. Fitokelatinler bölüm 2.3.9.4'de ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Birçok bitkiden izole edilen MT benzeri genler (sınıf II MT'leri) Cys bakiyelerinin yerleşimine göre 2 tipe ayrılmıştır. Tip I, N ve C terminalde Cys-Xaa-Cys motiflerinin korunduğu proteinler, Tip II ise N terminalde Cys-Cys ve Cys-Xaa-Xaa-Cys motifleri taşıyan proteinler kodlar (Xaa, Cys amino asidinden farklı başka bir amino asit). Tip I genlerinin transkriptleri metal ile kirlenmiş bölgelerde büyüyen bitkilerin köklerinde daha fazla görülmektedir. Tip II genleri ise öncelikle yapraklarda anlatım yapmaktadır (Robinson vd., 1993; Hudspeth vd., 1996; Rauser, 2000; Vasak ve Hasler, 2000; Cobbett, 2002).

Bitkilerde karakterize edilen Cd^{+2} komplekslerinin çoğu sınıf III MT'lerinin amino asit kompozisyonuna sahiptir. Cu kompleksleri ise daha çok MT genlerinin ürünlerine benzemektedir. Oksidatif stres ile meydana gelmiş olan DNA zincir kırıklarının arttırılmış MT varlığında azalması MT'lerin antioksidant rollerinin olduğunu göstermektedir (Robinson vd., 1993). MT geninin aktarıldığı transgenik tütün bitkilerinde Cd toleransının arttığı görülmüştür (Liu, 2000).

MT sitoplazmik bir protein olmasına rağmen lizozimde de birikebilir ve gelişim boyunca nukleusta da görülmüştür (Kagi ve Schaffer, 1988). *Arabidopsis thaliana*'da 4500 ve 8000 D moleküler ağırlıklı (MTI ve MTII), Cu ile indüklenmiş iki metallothiyonin izole edilmiştir (Foley vd., 1997; Toppi ve Gabrielle, 1999).

MT'lerin yüksek bitkilerde bulunduğu bilinmektedir, ancak literatürde Cd tarafından indüklenen metallothiyoninin yüksek bitkilerde varlığına dair kesin bir bilgi yoktur. Bu sebepten metallothiyoninlerin Cd detoksifikasyonundaki rolü fitokelatinler ve stres proteinleri ile karşılaştırıldığında ikinci sırada yer almaktadır.

Her ne kadar Cu uygulaması ile MT'ler indüklense ve hayvanlarda ve mantarlarda ağır metal toleransında rolü olduğuna dair kanıtlar varsa da bitkilerde ağır metal detoksifikasyonunda MT'lerin rolü tam olarak anlaşılammıştır. MT'ler metal metabolizmasında çok açık bir rol oynamaktadır fakat fonksiyonları henüz tam olarak netleştirilememiştir (Briat ve Lebrun, 1998; Vasak ve Hasler, 2000; Hall, 2002; Cobbett, 2002).

MT biyosentezi transkripsiyonel evrede düzenlenir (Mejare ve Bülow, 2001). MT'lerin en büyük özelliği indüklenebilir oluşlarıdır. Metal stresi MT biyosentezini arttıran en önemli faktör olmakla birlikte hormonlar (absisik asit), senesens, sitotoksik ajanlar, fiziksel ve kimyasal streslerle ilgili çeşitli patofizyolojik durumlar da MT sentezini indükler. İndükleme transkripsiyonun başlama aşamasında oluşur ve 1-2 gün içinde maksimum MT konsantrasyonuna erişilir. MT'lerin yarı ömrü 1-4 gündür (Kagi ve Schaffer, 1988; Cobbett, 2002).

2.10.4 Fitokelatinler

Metallerin yüksek afiniteye sahip ligantlar tarafından sitosolde bağlanması ağır metal toleransı ve detoksifikasyonu için önemli bir mekanizmadır. Fitokelatinler potansiyel ligantlar arasında yer almaktadır. Fitokelatinler özellikle bitkilerde Cd toleransı ile ilgilidir (Cobbett, 2000).

1973'de Grill ve arkadaşları tarafından ilk kez izole edilip saflaştırıldığında civa ile muamele edilmiş hücrelerden elde edilmesi nedeniyle bunlara organo-merkür kompleksleri adı verilmişti. Fitokelatinlerin genel yapısı $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{X}$ şeklindedir, X, Gly, β -Ala, Ser ya da Glu'dir ve n, 2-11 arasında değişmektedir (Cobbett, 2000; Mejare ve Bülow, 2001). Ağır metaller arasında özellikle Cd genel yapısı $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ olan fitokelatin sentezini aktive etmektedir. Fitokelatinler sistemin tiyolik grupları sayesinde Cd ile molekül ağırlıkları 2500-3600 D arasında değişen çeşitli kompleksler oluştururlar. Cd'un bağlanması sonucu serbest Cd'un sitosol içinde sirkülasyonu önlenmiş olur.

Fitokelatinler özel bir γ -glutamilsistein dipeptidil transpeptidaz olan fitokelatin sentez enzimi ile glutatiyondan sentez edilir. Cd içeri girdikten sonra birkaç dakika içinde fitokelatin sentez edilmeye başlar, Cd bağlanır ve reaksiyon Cd girişi bitinceye kadar devam eder. *In vivo* deneyler Cd uygulanan bitki hücresi kültürlerinde serbest glutatiyonun önemli ölçüde düştüğünü göstermiştir (Robinson vd., 1993; Toppi ve Gabbrielli, 1999, Cobbett, 2002).

Cd ve Cu uygulanması glutatiyon sentezi için genlerin transkripsiyonunu artırır. Her ne kadar

yabani tip üzerinde arttırılmış glutatyon düzeyi metal dayanıklılığını arttırmaya da düşük glutatyon düzeyine sahip bitkiler Cd'a karşı çok hassastır. FK'ler kadmiyum ve arsenat detoksifikasyonunda önemlidir fakat Zn, Ni ve Se iyonlarının detoksifikasyonunda rolleri yoktur. Cu' karşı toleranslı *Mimulus guttatus* üzerinde yapılan çalışmalarla FK'lerin Cu toleransında rol oynadıkları gösterilmiştir ancak Cu toleransında FK'lerin rolü henüz çözülmüş değildir (Briat ve Lebrun, 1998; Zhu vd., 1999; Hall, 2002; Cobbett, 2002).

2.10.5 Stres proteinleri

Yüksek sıcaklık, ağır metal, kimyasal muameleler, tuz ve kuraklık streslerine maruz kalan bitki hücreleri sıklıkla stres proteinleri olarak bilinen ısı şoku proteinlerini (hsp-heat shock protein) sentez etmeye başlarlar. Bitkilerde birçok hsp sınıfı bulunmaktadır. Bu proteinler moleküler büyüklüklerine göre sınıflandırılırlar; (1) hsp100, hsp90, hsp70, hsp60; (2) moleküler ağırlıkları 17,000- 30,000 arasında değişen küçük hsp'ler; (3) sadece 76 amino aside sahip yüksek derecede korunmuş her yerde varolan hsp'ler (Toppi ve Gabbrielli, 1999).

Hsp'ler normal protein katlanmasında ve toplanmasında moleküler şaperon olarak hareket ederler. *L. peruvianum* hücre kültürleri ile yapılan çalışmalarda hsp70'in metal stresine karşı anlatım yaptığı ve nukleus, sitoplasma ve plasma membranda bulunduğu bildirilmiştir (Hall, 2002).

2.10.6 Vakuolde Biriktirme

Vakuolde biriktirme Cd detoksifikasyonu ve toleransında önemli bir rol oynamaktadır. Cd iyonlarının serbest bir şekilde sitosolde dolaşmasını engeller ve iyonları sınırlı bir bölgede toplar. *S. pombe*'de Cd-Fitokelatin kompleksini vakuole taşıyan *htm1* geni bulunmuştur. Yine *S. pombe* JS237 mutantlarında cAMP ve Ca iyonlarını içeren sinyal transdüksiyon olaylarının Cd'un vakuollerde birikmesinde önemli bir rol oynadığı görülmüştür. MgATP varlığında Cd-Fitokelatin komplekslerinin spesifik taşıyıcılarla konsantrasyon gradientine karşı taşındığı ve tonoplast vesikülleri içinde eksternal solüsyondaki konsantrasyonundan 38 kez daha fazla bulunduğu saptanmıştır. Eğer serbest Cd iyonu varsa bunların $Cd^{+2}/2H^{+}$ antiport vasıtasıyla vakuole girdiği görülmektedir. Vakuol içinde asidik pH'dan dolayı yüksek moleküler ağırlıklı kompleksler ayrışır ve Cd sitrat, oksalat, malat gibi vakuolar organik asitlerle ve amino asitlerle kompleks oluşturabilir (Toppi ve Gabbrielli, 1999; Hall, 2002; Cobbett, 2002).

2.11 Organogenez

Döllenme dişi ve erkek gametlerin füzyonla bir araya gelerek zigot denilen tek hücreli bir yapıyı meydana getirmesidir. Döllenmeyi takiben, hızlı bir mitotik döngüye giren zigot, yüksek yapılı bir bitkinin doku ve organlarını meydana getirir. Bitkilerde tamamen farklılaşan hücreler yeniden meristematik özellik kazanarak mitotik bölünme gösterebilirler. Bu bölünmeler sonucunda ya doğrudan adventif sürgün veya kök (**doğrudan organogenez**) ya da önce farklılaşmamış hücre yığını olarak tanımlanan kallus ve daha sonra da bu kallustan sürgün veya kök (**dolaylı organogenez**) meydana gelir. Bitkiyi meydana getiren ve farklılaşmasını tamamlayan canlı hücrelerden herhangi birisi tekrar bölünerek ve farklılaşarak yeni bir bitki meydana getirebilme kapasitesine sahiptir. Hayvansal organizmalardan farklı olarak bitkilerin sahip olduğu bu özelliğe totipotensi adı verilmektedir. *In vitro* olarak yetiştirilen bitki dokularının bu özelliğinden çeşitli amaçlarla yararlanılmaktadır.

Tipik kallus hücresi çok sayıda vakuol içeren ve çok ince çevresel bir sitoplazma katmanı ile hücre duvarına karşı baskılanmış bir nükleusu olan parenkima hücresidir. Kallus herhangi bir organizasyon göstermemiş hücreler yığını olarak da tanımlanabilir.

Aynı bitki türünden alınan eksplantların organogenez kapasiteleri büyük farklılıklar gösterir. Bitki büyüme düzenleyicileri de etkili bir organogenez metodu oluşturmakta önemlidir. Oksin ve sitokin *in vitro* kültürde en çok ihtiyaç duyulan bitki büyüme düzenleyicileridir. Ortamda bulunan oksin ve sitokin konsantrasyonu ve birbirlerine oranı, *in vitro* büyümeyi kontrol eder. Bitki büyüme düzenleyicileri doğal ya da sentetik olarak elde edilebilir. En sık kullanılan oksinler 2,4- diklorofenoksiasetik asit (2,4- D), naftelin asetik asit (NAA), indol asetik asit (IAA) ve indol bütirik asittir (IBA). Kinetin ve N6-benziladenin/ benzil amino pürin (BA/BAP) en çok kullanılan sitokinlerdir. Bitkilerin çoğu oksin ve sitokin oranına uygun olarak sürgün ya da kök oluştururlar. Bazı durumlarda iki farklı oksin veya sitokin karışımının tek oksin veya sitokin karışımından daha iyi sonuçlar verdiği bilinmektedir. Bazı durumlarda ise oksin veya sitokininden sadece biri organogenez için yeterli olabilir. Organogenez için sitokin yerine çeşitli pürin, pirimidin ve ürealar oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.

Organogenezdeki anahtar morfolojik özellik meristematik merkezlerin oluşumudur. Doğrudan ve dolaylı organogenezin her ikisinde de meristematik merkezler vakuollü parenkimatik hücrelerden oluşmuştur. Bu hücreler yapı olarak küçük, izodiyametik, ince duvarlı hücrelerdir ve yoğun bir şekilde boyanan belirgin nükleuslara sahiptir.

Eksplantın ortama konulmasından belirgin bir organ ortaya çıkana kadar geçen süre içinde yeterlilik, kararlılık ve morfolojik farklılaşma olmak üzere üç ayrı aşamada bir dizi olay gerçekleşir.

Organogenez hücre veya dokulardan yeni bir bitki meydana getirmeye imkan tanıdığı için, generatif yollardan üremesi zor olan bitki türlerinin üretiminde ve bitki transformasyon sistemlerinin kurulmasında önemli bir yoldur (Dodds ve Roberts, 1995; Hatipoğlu, 1997; Gürel vd., 2001).

2.12 Pamuk Doku Kültürü

Pamukla ilgili ilk genetik çalışmalar Sikka ve Joshi tarafından 1960 yılında yapılmıştır (Basu, 1996). Genetik mühendisliği pamuk lifi, yem ve yağ miktarı arttırmada ve bu ürünlerin kalitelerinin geliştirilmesinde önemli bir role sahiptir. Pamukta ilk başarılı transformasyon Firoozabady (1987) ve Umbeck (1987) tarafından bildirilmiştir (Umbeck vd., 1987; Hemphill vd., 1998). Transgenik pamuk üretiminin rejenerasyon ve uygun doku transformasyonu gerektirmesinden dolayı pamuk transformasyonu üzerine fazla bilgi yoktur. İlk apikal meristem kültürü 1967'de Chappell ve Mauney tarafından yapılmıştır, ancak başarılı bir rejenerasyon sistemi elde edilememiştir. 1991'de Gould vd., pamuk apikal meristem kültürü şartlarını optimize ederek, normal bitkiler elde etmeyi başarmıştır (Morre vd., 1998).

Pamuk rejenerasyonunda, rejenerasyon meydana gelmeden önce uzun bir doku kültürü süresi gerekmesi, rejenerasyonun yüksek derecede genotipe bağımlı oluşu ve pamuğun doku kültüründe verdiği tepkilerin tahmin edilemeyişi gibi oldukça fazla zorlukla karşılaşmaktadır. Pamuk transformasyon prosedürlerinde en iyi rejenerasyon olan genotiplerde bile süre 10-12 aydır. Bu uzun süre de somaklonal varyasyonun yüksek oranda oluşmasına neden olur. Ekonomik öneminden dolayı yüksek etkili rejenerasyon ve transformasyon sistemi kurulabilmesi pamuk bitkisi için önemli olduğu halde (Hemphill vd., 1998; Zapata vd., 1999) pamuk rejenerasyonu ve transformasyonu için kurulabilmiş standart bir prosedür yoktur (Saeed vd., 1997; Sunilkumar ve Rothore, 2001; Zhang vd., 2001).

Bitkiler basit bir MS besiyerinde inoküle edilmiş sürgünlerden doğrudan oluşabilir. Sürgün uçları, diğer eksplantlardan rejenerasyonun zor olduğu pamuk gibi bitkilerde genetik transformasyon için kullanılan en yararlı eksplanttır (Morre vd., 1998). Sürgün ucundan rejenerasyon olan bitkilerde mutasyon ve somaklonal varyasyon oranı düşüktür. Bunun nedeni kallus ve somatik embriyogenez kültürlerinde yaygın olan doku farklılaşma aşamalarının

doğrudan sürgün organogenezi için programlanmış meristematik dokularda olmayışıdır. Sürgün ucu mısır, pirinç, muz ve pamuk gibi birçok bitkide transformasyon amacıyla başarı ile kullanılmıştır (Gould ve Cedeno, 1998; Zapata vd., 1999). Hemphill vd., (1998) kotiledon nodunu kullanarak sürgün oluşturmayı başarmıştır. Kök oluşumu genotipe bağlıdır. Kök oluşturamayan sürgünler bir süre sonra ölmektedir (Zapata vd., 1999). Pamuk kallus üretimi farklı bitki büyüme düzenleyicilerini içeren birçok besiyerinde gerçekleştirilmiştir ancak bu ortamlarda bitki elde edilememiştir. Hipokotil eksplantları kallus oluşumu için kullanılan en yaygın kısımdır (Kumar vd., 1998). Kallus oluşumunda kullanılan yaprak ve hipokotil eksplantlarından hipokotil çok daha iyi sonuçlar vermiştir (Zhang vd., 2000). Kotiledon eksplantları da pamuk doku kültüründe kallus oluşumu için kullanılmıştır (Zhang vd., 2001).



3. MATERYAL ve METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Bitki Materyali

Çalışılan pamuk bitkilerinin tohumları Çukurova Üniversitesi Pamuk Araştırma ve Uygulama Merkezi (Paum-2, Paum-4, Selection-5, Ç-1518, Stv-453, Lachata, Erşan-92, Crema-111, Aydın) ve TC Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Nazilli Pamuk Araştırma Enstitüsü'den (143, M503, 84S, Giza-45) sağlandı.

3.1.2 Besiyerleri

3.1.2.1 Ağır Metal Dayanıklılığı Tarama Deneylerinde Kullanılan Besiyeri

Ağır metal dayanıklılığı tarama deneyleri için 6 (500 μ M, 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 10 μ M ve 0 μ M) farklı konsantrasyonda ağır metal (Cd ve Cu) içeren MS besiyerleri hazırlandı. Hemphill (1998)'de çimlendirme besiyeri (MSGerm) olarak bahsedilen B.B.D. (bitki büyüme düzenleyicisi) içermeyen ½ MS besiyeri kullanıldı. Bu deneylerde kullanılan MS besiyeri laboratuvarında stok solüsyonlar halinde sıvı olarak hazırlandı (Murashige ve Skoog, 1962; Gürel vd., 2001). 50 ml makro element stok solüsyonu, 5 ml mikro element stok solüsyonu, 12,5 ml Fe-EDTA stok solüsyonu ve 10 g sukroz 900 ml çift distile su içinde çözüldü ve hacim 1 litreye tamamlandı. pH 0.1 ve 1 N HCl ve NaOH ile 7'ye ayarlandı. Uygulanacak farklı metal konsantrasyonları besiyerlerine otoklavdan önce, stok solüsyondan uygun miktarda alınarak ilave edildi. Katılaştırıcı olarak 3g/l fitajel kullanıldı. Besiyerleri 121°C'de 1,5 atmosfer basınçta 20 dakika otoklavlandı. Otoklavdan sonra besiyeri elle dokunulabilir sıcaklığa geldiğinde, filtre ile steril edilerek 1 ml'lik stoklar halinde +4°C'de saklanan vitamin solüsyonu besiyerlerine eklendi. Hazırlanan besiyerleri 121°C'de 1,5 atmosfer basınçta 30 dakika otoklavlanarak steril sterilize edilmiş 1 litrelik cam kavanozlara 125'er ml olacak şekilde döküldü.

3.1.2.2 *In Vitro* Rejenerasyon Deneylerinde Kullanılan Besiyerleri

In vitro rejenerasyon deneylerinde kullanılan MS (Sigma - M5524) ticari olarak satın alındı.

Çimlendirme besiyeri:

In vitro rejenerasyon deneyleri için eksplant almak üzere bitkiler bir hafta süreyle

çimlendirme besiyerinde (MSGerm = ½ MS) yetiştirildi (Hemphill, 1998).

2.16 g toz MS preparatı ve 10 g sukroz 900 ml çift distile su içinde çözüldü ve hacim 1 litreye tamamlandı. pH 0.1 ve 1 N HCl ve NaOH ile 7'ye ayarlandı. Katılaştırıcı olarak 3g/l fitajel eklendi. Hazırlanan besiyerleri 121°C'de 1,5 atmosfer basınçta 20 dakika otoklavlanarak sterilize edildi ve aynı şartlarda 30 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiş magenta (Sigma- V-8505) kutularına ~ 35 ml olacak şekilde döküldü. Filtre ile steril edilerek 1 ml'lik stoklar halinde +4°C'de saklanan vitamin solüsyonu besiyerleri magenta kutularına dökülmeden önce besiyeri elle dokunulabilir sıcaklığa geldiğinde eklendi.

Rejenerasyon besiyeri:

Çimlendirme besiyerinde yetiştirilen bir haftalık bitkilerden alınan eksplantlar rejenerasyon kapasitelerinin ölçülmesi amacıyla farklı kompozisyonda bitki büyüme düzenleyicisi içeren rejenerasyon besiyerlerinde kültüre alındı.

4.33 g toz MS preparatı ve 20g sukroz 900 ml çift distile su içinde çözüldü ve hacim 1 litreye tamamlandı. pH 0.1 ve 1 N HCl ve NaOH ile 5.6-5.8'e ayarlandı. Katılaştırıcı olarak 3g/l fitajel eklendi (Agrawal vd., 1997; Hemphill, 1998; Morre vd., 1998). Hazırlanan besiyerleri 121°C'de 1,5 atmosfer basınçta 20 dakika steril edildi ve herbirine 25 ml olacak şekilde steril Petri kutularına döküldü. Filtre ile steril edilerek 1 ml'lik stoklar halinde +4°C'de saklanan vitamin solüsyonu besiyerleri Petri kutularına dökülmeden önce, besiyeri elle dokunulabilir sıcaklığa geldiğinde eklendi. Kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri ticari olarak Sigma'dan temin edildi ve otoklavlanabilme özelliğinde olduklarından dolayı otoklavdan hemen önce besiyerlerine eklendi.

Çizelge 3.1 Doğrudan rejenerasyon için denenen bitki büyüme düzenleyicileri ve konsantrasyonları

Besiyerleri	B.B.D. (mg/l)			
	NAA	IBA	BAP	GA
1	0.1	-	-	-
2	0.2	-	-	-
3	0.5	-	-	-
4	1	-	-	-
5	2	-	-	-
6	-	0.2	-	-
7	0.1	0.2	-	-
8	0.1	0.1	-	-
9	0.1	-	0.1	-
10	0.2	-	-	1

Çizelge 3.2 Dolaylı rejenerasyon için denenen bitki büyüme düzenleyicileri ve konsantrasyonları

Besiyerleri	B.B.D. (mg/l)		
	Zeatin	NAA	2,4-D
1	2	-	-
2	1	-	-
3	0.5	-	-
4	0.1	-	-
5	0.01	-	-
6	-	2	-
7	-	1	-
8	-	0.5	-
9	-	0.1	0.2
10	2	2	-

3.1.3 Kimyasallar

3.1.3.1 Yaş Yakma Yönteminde Kullanılan Kimyasallar

- Nitrik Asit (HNO₃), %65 Extra Pure M_A= 63,01 g/mol, 1litre=1,40 kg (Merck)
- Perklorik Asit (HClO₄), %70 Analytical Reagent, M_A=100,46 gr/mol, 1litre=1,67 kg (Reidel-de Haen)

3.1.3.2 Karbamik Asit Muamelesinde (Cu Boyama) Kullanılan Kimyasallar

- Dietilditiyo-karbamik asit (C₅H₁₀NS₂Na, M_A=171.3- SIGMA D-3506)

3.1.4 Tamponlar

3.1.4.1 Protein Deneylerinde Kullanılan Tamponlar

Protein özütleme tamponu içeriği ve hazırlanışı:

Protein özütleme tamponu için gereken maddeler stok solüsyonlardan gereken miktarlarda alınıp istenilen konsantrasyona getirildi. 500 ml tampon için, 2 M sukroz stoğundan 250 ml, 0.1 M HEPES (Sigma) stok solüsyonunda 50 ml, 1 M MgCl₂ (Fluka) solüsyonundan 2.5 ml alınarak çift distile su ile 500 ml'ye tamamlandı. Benzamidin (Sigma), DTT (Fermentas) ve pmsf (Sigma) tampon kullanılmadan hemen önce eklendi. Bezamidin 0.5 mM, DTT 5 mM ve pmsf 0.1 mM olacak şekilde ilave edildi. Pmsf 2 saat içinde etkinliğini kaybettiğinden her 2 saatte bir özütleme tamponuna yeniden pmsf eklendi (Memon vd., 1993).

Elektroforezde Kullanılan Tamponlar:

Çizelge 3.3 Doğal jel elektroforezinde kullanılan elektroforez tamponu ve örnek yükleme tamponu içeriği

Tampon	İçerik
1 litre elektroforez tamponu (pH 8.3)	3.02 g Tris BASE (Sigma)
	14.4 g Glisin
Örnek yükleme tamponu	% 30 sukroz % 0.01 bromofenol mavisi 125 mM Tris (pH 8.8)

3.1.5 Stok Solüsyonlar

MS besiyeri makro element stok solüsyonu:

<u>Elementler</u>	<u>1l'deki miktarı</u>
NH ₄ NO ₃ (SIGMA)	16.5 g
KNO ₃ (SIGMA)	19 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O (PANREAC)	3.32 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O (Fluka)	3.4 g
KH ₂ PO ₄ (Merck)	1.7 g

MS besiyeri mikro element stok solüsyonu:

<u>Elementler</u>	<u>1l'deki miktarı</u>
MnSO ₄ .4H ₂ O (Fluka)	1.69 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O (PANREAC)	0.6 g
H ₃ BO ₃ (CARLO ERBA)	0.62 g
KI (SIGMA)	0.083 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (SIGMA)	0.025 g
CuSO ₄ .5H ₂ O (SIGMA)	0.0025 g
CoCl ₂ .6H ₂ O (SIGMA)	0.0025 g

Fe-EDTA stok solüsyonu:

<u>Elementler</u>	<u>1l'deki miktarı</u>
FeSO ₄ .7H ₂ O (BAKER)	0.556 g
Na ₂ EDTA (Fluka)	0.744 g

Makro element stok solüsyonundan 50 ml, mikro element stok solüsyonundan 5 ml ve Fe-EDTA stok solüsyonundan 12.5 ml alınıp, hacim çift distile su ile 1 litreye tamamlanarak ½ MS besiyeri hazırlandı.

2 M Sukroz: 342.3 g sukroz son hacim 500 ml olacak şekilde çift distile su içinde çözüldü,

kaba filtreden geçirilerek gerektiğinde kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edildi. (SIGMA-C₁₂H₂₂O₁₁, M_A=342.3g)

0.1 M HEPES: 11.915 g HEPES son hacim 500 ml olacak şekilde çift distile su içinde çözülerek otoklavlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi. (SIGMA- N-[2-hidroksietil]piperazin- N'- [2-etansülfonik asit], C₈H₁₈N₂O₄S, M_A= 238.3)

1 M MgCl₂: 10.1655 g tartılıp, 50 ml çift distile su içinde çözülerek otoklavlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi. (Fluka-M_A=203.31g)

0.1 M Benzamidin: 0.1566 g tartılıp 10 ml çift distile su içinde çözüldü. 1 ml'lik tüplere bölünerek -20 °C'de muhafaza edildi. (SIGMA-M_A=156.60g)

1 M DTT: 1.542 g tartılıp 10 ml çift distile su içinde çözüldü. 1 ml'lik tüplere bölünerek -20 °C'de muhafaza edildi. (Fermentas-dithiothreitol-C₄H₁₀O₂S₂, M_A=154.2g)

0.1 M PMSF: 0.1742 g tartılıp 10 ml EtOH içinde çözüldü. 1 ml'lik tüplere bölünerek -20 °C'de muhafaza edildi. (SIGMA-Fenilmetansülfonilflorid- M_A=174.2g)

Akrilamid-Bisakrilamid %30: 58.34 g akrilamid, 0.83 g bisakrilamid tartılıp son hacim 200 ml olacak şekilde çift distile su içinde çözüldü ve gece boyu karıştırıldı. Hazırlanan solüsyon +4°C'de muhafaza edildi. (SIGMA)

1.5 M Tris-HCl pH 8.8 : 18.16 g tartılıp son hacim 100 ml olacak şekilde çift distile su ile çözüldü ve pH 8.8'e ayarlandı. Hazırlanan solüsyon +4°C'de muhafaza edildi. (SIGMA-M_A=121.1g)

1 M Tris-HCl pH 6.8: 12.11 g tartılıp son hacim 100 ml olacak şekilde çift distile su ile çözüldü ve pH 6.8'e ayarlandı. Hazırlanan solüsyon +4°C'de muhafaza edildi. (SIGMA-M_A=121.1g)

%10 APS: 0.1 gr APS 1 ml çift distile su içinde çözülerek hazırlandı ve taze olarak hazırlanıp, kullanıldı. (MERCK- amonyum persülfat %98+)

Stok Bitki Büyüme Düzenleyicileri: 1 mg/ml stok solüsyon hazırlamak için 100 mg bitki büyüme düzenleyicisi 2-5 ml çözücüsü içinde çözüldü ve tamamen çözüldükten sonra hacim çift distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan solüsyon +4°C'de muhafaza edildi. Toz B.B.D.'ler Sigma'dan temin edildi.

Çizelge 3.4 Kullanılan B.B.D'lerin katalog no ve çözücüleri

B.B.D.	Katalog No	B.B.D.'nin çözücüsü
NAA	N0640	Su
IBA	I5386	EtOH, 1N NaOH
BAP	B3274	1N NaOH
Zeatin	Z0164	1N NaOH
2,4-D	D8407	EtOH, 1N NaOH
GA	G7645	EtOH



3.2 Metod

3.2.1 Tohum Sterilizasyonu

Çok sayıda pamuk lifinin etrafını sarması nedeniyle pamuk tohumları bakteri, mantar ya da bu organizmaların sporları ile kontamine olmuş durumdadır. Bu nedenle pamuk tohumları öncelikle derişik H_2SO_4 ile 15 dakika muamele edildi. Bu işlemin ardından tohumları asitten arındırmak amacıyla her biri üçer dakika olmak üzere üç kez distile su ile çalkalandı. Tohumlar gece boyu distile su içinde çalkalanarak havalandırıldı. Tween 20 içeren (2 damla/100 ml) %70 EtOH ile 1-2 dakika muamele edildi. Daha sonra Tween 20 içeren (2 damla/100 ml) %20'lik çamaşır suyu ile 30 dakika boyunca çalkalandı. En son olarak tohumlar çamaşır suyunun temizlenmesi amacıyla her biri üçer dakika olmak üzere üç kez steril distile su ile çalkalanarak yıkandı. (Saeed vd., 1997; Hemphill, 1998; Zapata, 1999; Zhang vd., 2001.). Sterilize edilen tohumların testaları steril şartlar altında çıkarıldı ve besiyerine ekildi.

3.2.2 Bitkilerin Yetiştirilmesi

3.2.2.1 Ağır Metal Dayanıklılığı Tarama Deneyleri Bitkileri

Sterilizasyon işleminden sonra gece boyu distile su içinde çalkalanarak havalandırma sonucu çimlenmeye başlamış olan iri tohumlar seçilerek, testaları çıkarıldı ve 6 farklı konsantrasyonda ağır metal (Cd, Cu) içeren MS besiyerlerine ekildi. Bitkiler 21 gün boyunca 16 / 8 saat aydınlık / karanlık fotoperiyodunda $25^\circ C / 23^\circ C$ 'de, % 60-70 nem ve $96,385 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ ışık yoğunluğuna ayarlanmış bitki büyütme kabinlerinde yetiştirildi.

Ağır metal stresine toleranslı ve hassas pamuk genotiplerinin belirlenmesi amacıyla 21 günlük büyüme süresi sonunda bitkilerin gösterdiği morfolojik tepkiler kaydedildi, gövde ve kök boyları ölçüldü.

3.2.2.2 *In Vitro* Rejenerasyon Deneyleri Bitkileri

Tohum Çimlendirilmesi ve Eksplant Hazırlığı:

Yüzey sterilizasyonunun hemen ardından steril kabinde steril şartlar altında testaları çıkarılan steril pamuk tohumları çimlendirme ortamına aktarıldı. 3.2.2.1'de belirtildiği gibi ayarlanan bitki büyütme kabinlerinde 1 hafta süreyle büyütüldü. 7 günlük büyüme süresinden sonra besiyerinden alınan pamuk bitkilerinden kotiledon nodu, sürgün ucu, kotiledon ve hipokotil

eksplantları alınarak ZT, 2,4-D, BAP, GA, IBA, NAA bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonları ve kombinasyonlarını içeren farklı MS besiyerlerinde kültüre alındı.

3.2.3 Bitkilerin Ağır Metal Analizi

6 farklı konsantrasyonda metal verilerek 21 gün boyunca yetiştirilmiş pamuk bitkiciklerinde ağır metal birikiminin olup olmadığını kontrol etmek ve eğer olduysa organ spesifik birikimi tespit etmek amacıyla Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre (AAS) ölçümü yapıldı.

3.2.3.1 Bitkilerin AAS Analizi İçin Hazırlanışı

Büyüme ortamından zarar vermeden çıkarılan pamuk bitkicikleri köklerine bulaşan besiyerinden arındırılmak için distile su ile yıkandı ve kağıt havlu üzerinde kurumaya bırakıldı. Daha sonra temiz bir makas ile kök ve gövde olarak ayrıldı. Her bir kısım yaş ağırlığı ölçüldükten sonra kağıt zarflar içine yerleştirildi ve etiketlendi. Hasat işlemi bitirildikten sonra eksplantlar 72°C'de 2 gün boyunca ya da 60°C'de 3 gün boyunca kurutuldu. Kurutulmuş bitki parçalarının kuru ağırlıkları ölçüldü ve elde edilen kuru bitki örnekleri yaş yakma metodu ile AAS ölçümüne hazırlandı (Kaçar, 1972; Memon vd., 1979).

3.2.3.2 Yaş Yakma (Nitrik Asit – Perklorik Asit Yöntemi)

Kurutulmuş bitki eksplantları ufalanarak 100 ml'lik erlenlere konuldu ve her bir erlen içine 5-6 cam boncuk atıldı. Nitrik asidin ortamdaki kolaylıkla uzaklaşp, gitmesini önlemek ve organik maddelerin oksitlenmesinin düzenli bir şekilde olmasını sağlamak için erlenlerin ağızlarına huni yerleştirildi ve üzerleri etiketlendi. Örnekler 1 g'dan az olduğu için miktarına bakılmaksızın her birine 5 ml Nitrik Asit ilave edildi ve 60-80°C'ye ayarlanan ısıtıcı tabla üzerinde yakma işlemi başlatıldı. Kahverengi duman çıkışı bitinceye kadar bu işleme devam edildi (~1-1,5 saat). Kahverengi duman çıkışı bittikten sonra her bir örneğe 2 ml Perklorik Asit ilave edilerek sıcaklık 250-300°C'ye çıkarıldı ve yakma işlemine devam edildi. Erlenler içlerini kesif beyaz dumanlar kapladıktan sonra yaklaşık 30 dk daha ısıtıcı tabla üzerinde bırakıldı. Kuruma halinde kükürt ve fosfor kaybı olabileceği gibi patlama da olabileceğinden yakma işleminin sonunda perklorik asidin tamamen uçup gitmemesine dikkat edildi. İçlerinde yaklaşık 1ml örnek kalan erlenler ısıtıcı tabla üzerinden indirilerek soğumaya bırakıldı. Soğuduktan sonra örnek hacmi çift distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Önceden çift distile su ile ıslatılmış süzgeç kağıtları kullanılarak örnekler süzüldü. Böylece çöken silisyum kısmı ayrılmış oldu. Hazırlanan örnekler 15 ml'lik Falcon tüplerinde etiketlenerek atomik

absorbsiyon ölçümüne hazırlandı.

3.2.3.3 Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre Ölçümü

Cd analizi için hazırlanan standartlar: 0.1 ppm Cd, 0.2 ppm Cd, 0.4 ppm Cd.

Cu analizi için hazırlanan standartlar: 1 ppm Cu, 2 ppm Cu, 4 ppm Cu.

Standartlar ve bitki örnekleri Alev Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre (SHIMADZU 6100 and UNICAM 929) cihazında hava ve asetilen karışımı kullanılarak analiz edildi.

Bitkilerin metal içerikleri yaş ağırlıkları esas alınarak hesaplandı.

Metal içeriği (mg/g) = A x H / K

A= AAS ölçümü sonucu (mg/l)

H= Yakılmış bitki materyalinin çözüldüğü hacim (lt)

K= Bitkinin yaş ağırlığı

3.2.4 *In vitro* Rejenerasyon Metodları

Ağır metal stresine daha toleranslı yeni genotipler geliştirebilmek amacıyla gen aktarımında kullanılmak üzere, dayanıklı olarak seçilen pamuk genotiplerinin *in vitro* rejenerasyon deneyleri yapıldı. Doğrudan ve dolaylı organogenez metodu kullanıldı.

3.2.4.1 Doğrudan Organogenez

Doğrudan organogenez yöntemi ile rejenerasyon için denenecek olan eksplantlar (kotiledon nodu ve sürgün ucu) 3.2.2.2'de anlatıldığı gibi yetiştirilen 7 günlük bitkilerden alındı. Sürgün uçları Gould vd. (1998)'de olduğu gibi 2-3 mm olacak şekilde çıkarıldı ve kotiledon nodları 9-16 mm² boyutlarında kesildi. Elde edilen eksplantlar Çizelge 3.1'de belirtilen 10 farklı kültür ortamına dik pozisyonda yerleştirildi. Eksplantların bu ortamlardaki rejenerasyonu bir ay süreyle izlendi ve kaydedildi. Bir ay sonunda kotiledon nodu ve sürgün ucu eksplantlarından rejenere olan pamuk bitkicikleri B.B.D içermeyen MS besiyerine aktarıldı. B.B.D içermeyen besiyerinde de bir ay boyunca gelişimini sürdüren bitkiler daha sonra otoklavlanmış toprak ve kum karışımı (1:1) içeren saksılara aktarıldı. Saksılara aktarılmış bitkiciklerin *in vitro* ortamdaki nem koşullarının korunması amacıyla saksıların üzerleri plastik torba ile kaplandı. Üç hafta sonra bitkiler plastik torbalar çıkarılarak, 3.2.2.1'de

belirtilen özelliklere sahip bitki büyütme kabinlerinde büyütülmeye başlandı. 5-6 ay sonunda pamuk bitkileri koza verdi ve açılan kozalardan pamuk lifleri ve tohumlar toplandı.

3.2.4.2 Dolaylı Organogenez

Dolaylı organogenez yöntemi ile rejenerasyon sistemi şartlarını oluşturabilmek için 3.2.2.2'de anlatıldığı gibi yetiştirilen bir haftalık bitkilerden alınan hipokotil ve kotiledon dokuları kullanıldı. Kotildon eksplantları 0.25-0.5 cm² boyutlarında kesilerek, alt yüzeyleri besiyerine degecek pozisyonda Çizelge 3.2'de belirtilen kültür ortamlarına yerleştirildi. Hipkotil eksplantları 0.5-1 cm uzunluğunda kesildi ve yaralanmış uçlar besiyerine degecek şekilde hafifçe bastırılarak kültür ortamlarına yerleştirildi. Her ay sonunda oluşan kallusların alt kültürleri yapıldı, gözlemlerin kayıtları tutuldu.

3.2.5 Protein Deneyleri

Bakır uygulanarak 21 gün boyunca yetiştirilen farklı pamuk genotipi bitkilerinin ağır metal stresine karşı gösterdikleri tepkiler arasında farklar olup olmadığı belirleyebilmek amacıyla protein deneyleri yapıldı. Ağır metal verilerek yetiştirilen bitkilerin kök dokularından izole edilen proteinler doğal jel üzerinde elektroforez yöntemi ile ayrıldı ve jeller, boyanan bakırın, bağlanmış olduğu metal bağlayıcı proteinin varlığını göstereceği düşünülerek Cu boyama özelliği bilinen karbamik asit ile boyandı.

3.2.5.1 Protein Özütlemesi

Bitki materyalinin hazırlanışı:

Bitkiler 6 farklı konsantrasyonda Cu (0, 10, 50, 100, 200 ve 500 µM) içeren MS basal besiyerinde 21 gün boyunca 3.2.2.1'de belirtilen özelliklere ayarlanmış bitki büyütme kabinlerinde yetiştirildi. 21 gün sonunda kök ve gövde olarak ayrılan bitkiler ağırlıkları ölçüldükten sonra sıvı azotta dondurularak kullanılacakları zamana kadar muhafaza edilmek üzere -80 °C derin dondurucuya kaldırıldı.

Protein özütleme yöntemi:

-80 °C derin dondurucudan alınan bitki kökleri sıvı azot kullanılarak havan içinde toz haline getirildi. 1 g bitki materyali için 1.5 ml özütleme tamponu konularak materyal tamamen homojenize edildi. Elde edilen homojenat huni yardımı ile dört kat tülbentten geçirilerek süzüldü. Süzme işlemi sırasında madde kaybı olmaması için tülbentler önceden özütleme

tamponu ile ıslatıldı. Falcon tüplerinde toplanan süzüntü önceden etiketlenerek hazırlanmış olan mikrosantrifüj tüplerine alındı ve 11500 rpm'de 15 dk santrifüjlendi. Üst sıvı protein kaynağı olarak kullanıldı. Hazırlanan örnekler elektroforez için kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi. Tüm işlemler buz üzerinde yapıldı (Memon vd., 1993).

3.2.5.2 Protein Örneklerin Derişiminin Belirlenmesi

3.2.5.1'de anlatıldığı gibi elde edilen pamuk kök proteini özütlerinin protein miktar tayini için "Micro BCA Protein Assay" kullanıldı (SIGMA 23235). Her bir örnek 10 µg olacak şekilde jele yüklendi. Elektroforez sistemi olarak BIO-RAD mini dikey elektroforez kullanıldı.

3.2.5.3 Doğal Jel Elektroforezi

Metal bağlayıcı protein varlığını tespit etmek amacıyla metal verilerek yetiştirilen bitkilerin köklerinden izole edilen protein, doğal jel elektroforezi ile ayrıldı. % 5'lik poliakrilamid yükleme jeli, % 12'lik poliakrilamid ayırma jeli kullanıldı.

Çizelge 3.5 Elektroforezde kullanılan poliakrilamid jellerin içeriği (Sambrook vd., 1989).

İçerik	Ayrırma jeli (%12'lik)	Yükleme jeli (%5'lik)
H ₂ O	1.6 ml	1.4 ml
%30 akrilamid karışımı	2.0 ml	0.33 ml
1 M Tris (pH 6.8)	-	0.25 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3 ml	-
%10 Amonyum persülfat	0.05 ml	0.02 ml
TEMED	0.002 ml	0.002 ml

3.2.5.4 Karbamik Asit Muamelesi (Cu Boyama)

Cu bağlanmış olan proteinleri tespit etmek amacıyla protein jelleri küçük miktarda bakırın kolorimetrik tayininde kullanılan %0.2'lik dietilditiyo-karbamik asit ile yaklaşık 1 saat boyunca muamele edildi. Uygulama sonucu Cu bulunan bölgeler kahverengiye dönüştü.

4. BULGULAR

Her iki metal için de ortamdaki artan metal konsantrasyonuna rağmen tohumların çimlenme oranlarında bir azalma olmadı. 500 μM konsantrasyonda dahi tohumlar %100 oranında çimlendi, ancak ortamdaki metal konsantrasyonunun artmasıyla birlikte çimlenmeden sonra büyüme yavaşladı ya da durdu. Metal konsantrasyonu arttıkça bitkilerin yapısında değişiklikler meydana geldi, esas ve yanal kökler kısaldı. 500 μM Cu içeren ortamda yanal kökler tamamen yok olurken, 500 μM Cd içeren ortamda 2-3 mm de olsa yanal köklerin varlığı devam etti. Yüksek konsantrasyonlarda (200 μM ve 500 μM) Cd içeren ortamlarda bitkilerin yapraklarında kıvrılma tespit edildi.

4.1 Pamuk Genotiplerinin Cd Stresine Karşı Dayanıklılığının Taranması

4.1.1 Morfolojik Bulgular

Denemelerin başlangıcında 13 pamuk genotipi Cd'a karşı dayanıklılık ve hassasiyetleri açısından karşılaştırılmak üzere 6 farklı konsantrasyonda Cd içeren MS besiyerlerinde yetiştirildi. İlk morfolojik gözlemlerden sonra bu 13 genotip arasından 6 genotip çalışmanın devamında kullanılmak üzere seçildi. Yapılan seçimde genotiplerin metal içeren besiyerlerinde gösterdiği büyüme özelliklerindeki benzerlik ve farklılıklar, pamuk tarımında kullanımının yaygınlığı, hassasiyet ve dayanıklılık açılarından örnek teşkil edebilmesi özellikleri dikkate alındı. Cd'a karşı dayanıklılık taraması denemelerinin devamında seçilen 6 genotip (143, M503, Ç-1518, 84S, Sel-5 ve Erşan-92) kullanıldı.

Seçilen 6 genotip farklı konsantrasyonlarda (0 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM ve 500 μM) Cd içeren MS besiyerinde yetiştirildi. 21 gün sonunda bitkilerin dayanıklılık kapasitesini belirlemek üzere kök ve gövde uzunlukları ölçüldüğünde aşağıda bahsedilen sonuçlar elde edildi.

Cd ile yapılan deneylerde tüm genotiplerin kök ve gövde büyümesi besiyerindeki Cd konsantrasyonunun artmasıyla birlikte gittikçe artan bir düşüş gösterdi. Bu etki 84S ve Sel-5 genotiplerinde diğerlerine göre (143, M503, Erşan-92 ve Ç-1518) daha açık bir şekilde görüldü (Çizelge 4.1-2; Şekil 4.1-2). Cd uygulanan 84S ve Sel-5 genotiplerinin bitkiciklerinde 50 μM Cd'dan itibaren büyüme gözle görünür biçimde yavaşladı ve klorosis ortaya çıktı. Bitkiler minimal miktarda (10 μM) Cd ile muamele edildiklerinde 84S ve Sel-5 genotipi bitkilerinin gövde uzunlukları % 18-19 oranında azaldı. Diğer yandan aynı miktar Cd içeren

ortamda yetiştirilen 143, M503, Erşan-92, Ç-1518 bitkilerinin gövde uzunluğunda ya çok az (%5-7) azalma görüldü ya da hiç azalma görülmedi (Çizelge 4.2). Cd içermeyen (kontrol besiyeri) besiyerlerinde tüm genotipler yaklaşık aynı büyüme özelliklerini gösterdi ve bunların morfolojik ve fenotipik özellikleri birbirinden farklı değildi. 50 µM Cd içeren besiyerlerinde yetiştirildiklerinde 84S ve Sel-5 bitkilerinin gövde uzunluğu diğerlerine göre daha fazla azalma gösterdi. 200 µM Cd uygulandığında 84S genotipinin gövde ve kök büyümesi oldukça fazla zarar gördü. Yüksek konsantrasyonlarda Cd içeren besiyerlerinde yetiştirildiklerinde Erşan-92 genotipinin büyüme performansı diğer genotiplerden daha iyiydi (Çizelge 4.1-2; Şekil 4.1-2-3-4-5-6). 500 µM Cd her ne kadar Erşan-92'nin kök ve gövde büyümesini durdurduysa da bu dokularda gözle görünür bir hasar meydana getirmedi. Öte yandan aynı miktarda Cd içeren ortamda 84S ve Sel-5 bitkilrinin kök dokusu kahverengileşti ve diğer genotiplerin köklerine göre daha fazla hasar gördü.

Çalışmamızda besiyerine 200-500 µM Cd uygulandığında M503 genotipinin rizosferinde metal kompleksinin oluştuğu gözlemlendi. Kökler etrafında kahverengi bölgeler meydana geldi.

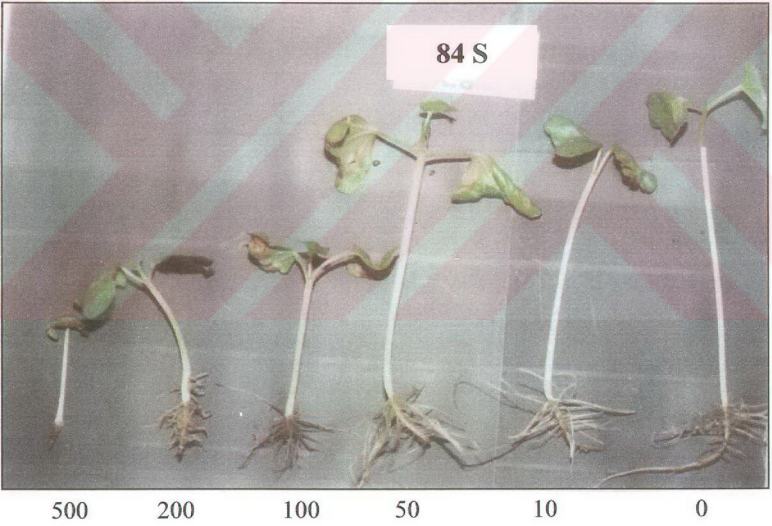
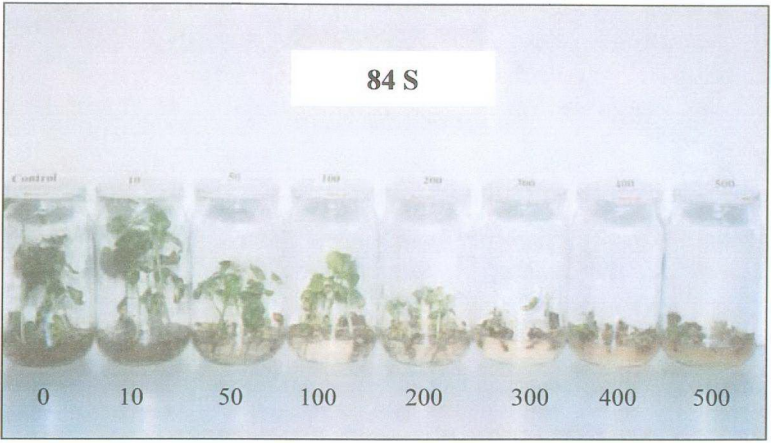
Çizelge 4.1 Farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 50, 100, 200, 500 μ M) Cd içeren MS besiyerinde yetişen pamuk genotiplerinin gövde ve kök boyları. Herbir denemede 5 bitki olmak üzere 3 tekrarda toplam 15 bitki kullanılarak hesaplanmıştır.

Bitki kısmı	Ortamdaki Cd miktarı (μ M)	Gövde ve kök uzunluğu (cm)					
		143	M503	Ç-1518	84S	Sel-5	Erşan-92
Gövde	0	11.7 \pm 2.5	12.07 \pm 2.5	11.2 \pm 2	9.6 \pm 4.4	8.9 \pm 2.7	13.01 \pm 3.4
	10	11.6 \pm 1.5	11.5 \pm 1.4	10.4 \pm 1.2	7.8 \pm 2.9	7.3 \pm 1.8	12.02 \pm 1.2
	50	8.9 \pm 2.3	7.7 \pm 1.7	8.5 \pm 1.9	*4.9 \pm 1.9	5.1 \pm 1.1	11.8 \pm 1.8
	100	*6.5 \pm 1.8	7.5 \pm 2.3	8.0 \pm 1.3	4.1 \pm 1.6	4.7 \pm 1.8	8.4 \pm 2.8
	200	5.8 \pm 0.7	*7.1 \pm 1.08	*7.7 \pm 0.8	3.5 \pm 1.1	*4.4 \pm 1.8	8.4 \pm 1.8
	500	2.3 \pm 1.4	3.7 \pm 1.5	2.7 \pm 2.4	1.9 \pm 1.1	3.1 \pm 1.5	*5.7 \pm 1.5
Kök	0	8.7 \pm 3	10 \pm 2.5	9.2 \pm 2.1	9.04 \pm 5	9.9 \pm 1.8	8.11 \pm 2.4
	10	8.6 \pm 2.2	9.9 \pm 2.7	8.06 \pm 0.9	8.2 \pm 5.1	7.5 \pm 2.1	7.8 \pm 1.9
	50	6.1 \pm 2.9	7.07 \pm 2.1	5.3 \pm 0.5	*6.4 \pm 4.5	*4 \pm 2.5	7.4 \pm 2.4
	100	5.2 \pm 2.5	5.5 \pm 1.08	*3.3 \pm 0.4	2.8 \pm 1.5	3.5 \pm 3	6.5 \pm 3.4
	200	*3.8 \pm 1.6	*4.3 \pm 0.6	2.8 \pm 0.3	1.9 \pm 0.8	4 \pm 2	5.4 \pm 1.1
	500	1.3 \pm 0.3	2.5 \pm 1.05	1.4 \pm 0.8	0.7 \pm 0.4	2.7 \pm 1.5	*2.8 \pm 2

(*) Boy kısalmasının anlamlı düzeye (0.001<P0.01) eriştiği konsantrasyonlar.

Çizelge 4.2 Farklı konsantrasyonlarda (10, 50, 100, 200, 500 μM) Cd içeren MS besiyerinde yetişen pamuk genotiplerinin kök ve gövde boylarındaki % azalma, Cd içermeyen kontrol besiyerinde yetiştirilen bitkilerin kök ve gövde boyları ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır.

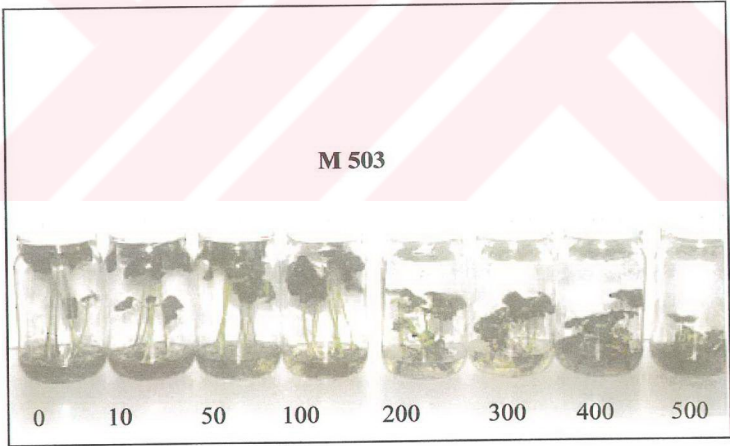
Bitki kısmı	Ortamdaki Cd miktarı (μM)	Gövde ve kök boyunda % azalma					
		143	M503	Ç-1518	84S	Sel-5	Erşan-92
gövde	0	0	0	0	0	0	0
	10	1	5	7	19	18	2
	50	24	36	24	49	43	4
	100	45	38	29	57	47	32
	200	51	41	31	64	51	32
	500	80	69	76	80	65	56
kök	0	0	0	0	0	0	0
	10	1	1	13	9	24	4
	50	30	29	42	29	60	13
	100	41	45	63	69	65	20
	200	57	57	70	79	66	33
	500	85	75	84	92	73	65



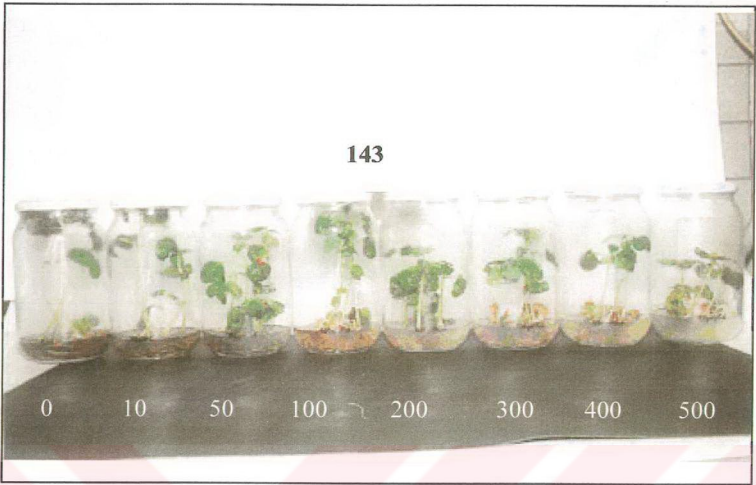
Şekil 4.1 Farklı konsantrasyonlarda Cd ($0\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, $200\mu\text{M}$ ve $500\mu\text{M}$) içeren MS besiyerinde yetiştirilen 21 günlük 84S bitkilerinin büyüme farklılıkları.



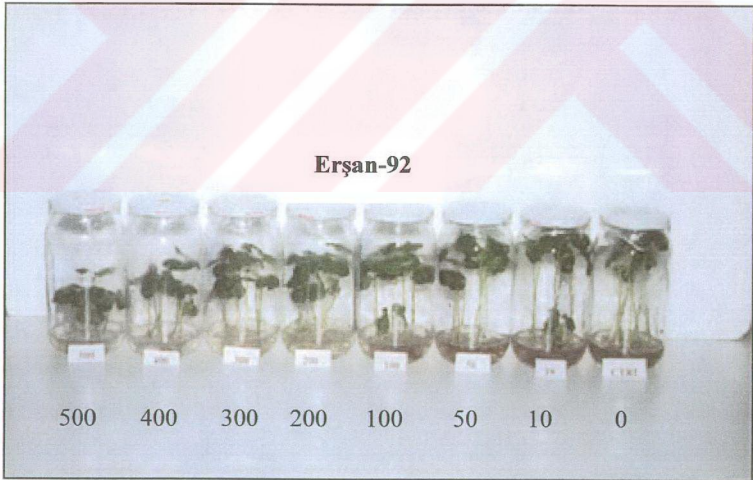
Şekil 4.2 Farklı konsantrasyonlarda Cd ($0\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, $200\mu\text{M}$ ve $500\mu\text{M}$) içeren MS besiyerinde yetiştirilen 21 günlük Sel-5 bitkilerinin büyüme farklılıkları.



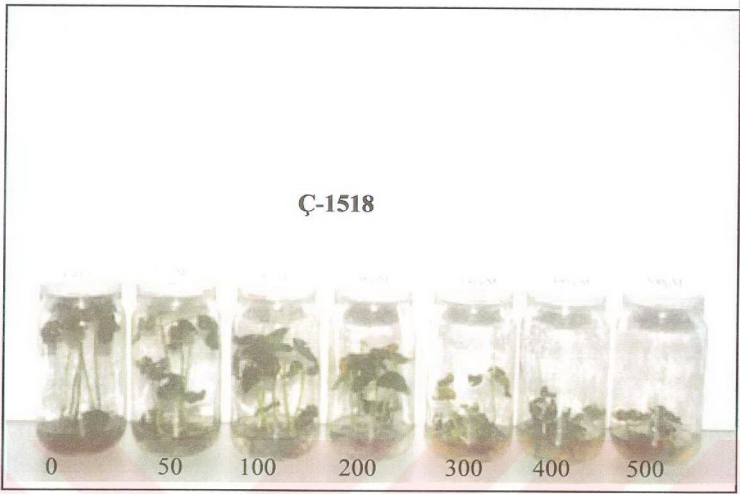
Şekil 4.3 Farklı konsantrasyonlarda Cd ($0\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, $200\mu\text{M}$ ve $500\mu\text{M}$) içeren MS besiyerinde yetiştirilen 21 günlük M503 bitkilerinin büyüme farklılıkları.



Şekil 4.4 Farklı konsantrasyonlarda Cd ($0\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, $200\mu\text{M}$ ve $500\mu\text{M}$) içeren MS besiyerinde yetiştirilen 21 günlük 143 bitkilerinin büyüme farklılıkları.



Şekil 4.5 Farklı konsantrasyonlarda Cd ($0\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, $200\mu\text{M}$ ve $500\mu\text{M}$) içeren MS besiyerinde yetiştirilen 21 günlük Erşan-92 bitkilerinin büyüme farklılıkları.



Şekil 4.6 Farklı konsantrasyonlarda Cd ($0\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $50\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, $200\mu\text{M}$ ve $500\mu\text{M}$) içeren MS besiyerinde yetiştirilen 21 günlük Ç-1518 bitkilerinin büyüme farklılıkları.

4.1.2 Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre Analizi

6 farklı metal konsantrasyonu içeren ortamlarda yetiştirilmiş farklı genotip bitkilerinin metal biriktirme kapasiteleri arasındaki en belirgin farklar besiyerindeki metal konsantrasyonlarının 50-500 μM arasında olduğu ortamlarda izlendi. Bu konsantrasyonlarda köklerinde en düşük Cd miktarını Erşan-92, en yüksek Cd miktarını ise Ç-1518, Sel-5 ve 84S biriktirdi (Çizelge 4.3). Morfolojik gözlemlere göre Cd stresine hassasiyet ve tolerans gösteren genotipler arasındaki farklılıklar 200 ile 500 μM arasında Cd içeren besiyerlerinde daha açık bir hale geldi. Cd stresinden diğerlerine göre daha fazla etkilenen Sel-5 ve 84S'in köklerinde diğer genotiplerin köklerinden 2-3 kat daha fazla Cd ölçüldü. Cd stresinden nispeten daha az etkilenen genotiplerle karşılaştırıldığında 84S ve Sel-5 genotipleri aynı zamanda gövde ve yapraklarında da daha fazla miktarda Cd biriktirdi ve yüksek Cd konsantrasyonları içeren besiyerlerinde hayatta kalamadı (Çizelge 4.3; Şekil 4.1-2).

143, M503, Ç-1518 and Erşan-92 bitkileri 200 μM Cd içeren besiyerinde yetiştirildiklerinde gövde ve yapraklarında daha az Cd biriktirdi ve Sel-5 ve 84S'e göre daha iyi büyüdü ve daha sağlıklı morfolojik görünüm sergiledi. (Çizelge 4.3, Şekil 4.3-4-5-6).

Çizelge 4.3 Farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 50, 100, 200, 500 μM) Cd içeren MS besiyerinde yetişen pamuk genotiplerinin köklerinde ve gövdelerinde biriken Cd miktarı. Herbir denemede 5 bitki olmak üzere 3 tekrarda toplam 15 bitki kullanılarak hesaplanmıştır.

Bitki kısmı	Ortamdaki Cd miktarı (μM)	Cd birikimi ($\mu\text{g/g}$ yaş ağırlık)					
		143	M503	Erşan-92	Ç-1518	Sel-5	84S
gövde	0	0.5±0.2	0.4±0.2	0.2±0.1	0.3±0.2	0.1±0	0.4±0.04
	10	3.7±1.8	5.2±3.3	4.2±0.6	3.8±0.4	9.4±5.1	4.0±0.6
	50	8.3±7.07	10.5±2.0	16.2±5.0	24.5±6.7	23.2±20	14.3±0.12
	100	18.5±1.6	36±4.0	37.7±10	41.6±5.3	35.5±93	28.8±21.8
	200	50.2±0.2	42.1±1.6	52.3±20	55.1±14	38.5±18	96.6±40.8
	500	72±3.8	83.6±10.3	66±20	111±5.9	136.5±15	140.2±8.4
kök	0	0.1±0.1	0.3±0.03	0.3±0	0.4±0.05	0.2±0.1	0.8±0.1
	10	16.4±5.3	17.1±3.3	13.9±1	10.7±1.2	4.9±1	14.0±4.9
	50	37.7±3.6	37.5±3.8	18.2±0.4	109.4±9	42.5±21	29.6±11.2
	100	60.4±3.3	114.2±19.1	60.3±30	178.3±11	70±55	70.8±5.3
	200	116.2±6	163.7±27.6	154.8±10	199.8±76	141.6±12	315.6±24
	500	293.4±26	169±6.7	172.2±10	361.8±13	490.5±53	560.8±27

Çizelge 4.4 MS besiyerinden bitkiye taşınan Cd oranı.

Ortamdaki Cd miktarı (μM)	Ortamdan bitkiye taşınan Cd (%)					
	143	M503	Erşan-92	Ç-1518	Sel-5	84S
10	1.8	2	1.6	1.3	1.3	1.6
50	0.8	0.8	0.6	2.4	1.1	0.8
100	0.7	1.3	0.9	2	0.9	1.9
200	0.7	0.9	0.9	1.1	0.8	1.8
500	0.6	0.4	0.4	0.4	1.1	1.2

Çizelge 4.5 Besiyerinden köklere giren Cd'un bitkinin üst kısımlarına taşınma oranı

Ortamdaki Cd miktarı (μM)	Kökten üst kısımlara taşınan Cd (%)					
	143	M503	Erşan-92	Ç-1518	Sel-5	84S
10	18	23	23	26	65	22
50	18	21	47	18	35	32
100	23	23	38	18	33	28
200	30	20	25	21	21	23
500	19	33	27	23	21	20

4.2 Pamuk Genotiplerinin Cu Stresine Karşı Dayanıklılığının Taranması

4.2.1 Morfolojik Bulgular

Pamuk genotiplerinin Cu metaline karşı gösterdikleri tolerans ya da hassasiyeti belirlemek üzere Cd ile yapılan ilk denemeler referans alınarak 13 genotip arasından seçilen 5 genotip (M503, 143, Ç-1518, 84S ve Sel-5) 6 farklı konsantrasyonda (0 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM ve 500 μM) Cu içeren MS besiyerinde yetiştirildi. 21 gün sonunda bitkilerin dayanıklılık kapasitesini belirlemek üzere kök ve gövde uzunlukları ölçüldüğünde aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

Kök uzunlukları ölçüldüğünde 50 μM Cu içeren besiyerinde genotipler arasındaki farkın açıkça ortaya çıktığı görüldü (Çizelge 4.6). Bu konsantrasyonda yetişen 84S genotipi bitkilerinin kök uzunluğu kontrol bitkisine göre %62 azalma gösterdi. 50 μM Cu içeren MS besiyerinde diğer genotip bitkilerinin kök uzunluğunda sadece %3- %22 arasında azalma oldu. Bu genotipler arasında M503 genotipi %3 azalma ile 50 μM Cu konsantrasyonuna en dayanıklı genotip olarak görüldü. 100 μM Cu'lu besiyerlerinde Ç-1518 (%80.4), Sel-5 (%70.5) ve 84S (%69) kök uzunluğunda en fazla azalmayı gösterdi. M503 bitkisinin kök uzunluğunda 100 μM Cu içeren besiyerinde % 54 azalma gerçekleşirken bu bitkinin kök uzunluğundaki en anlamlı azalma % 83.6 ile 200 μM Cu içeren besiyerinde oldu. Bahsedilen 4 genotipten farklı olarak 143 genotipi bitkileri 10, 50 ve 100 μM Cu içeren besiyerlerinde yetiştirildiğinde kök uzunluklarında %14.1- % 17.6 artış gösterirken, bu genotip bitkilerinin kök uzunluğu 200 μM Cu'da % 71 oranında ani bir azalma gösterdi (Çizelge 4.7).

6 farklı Cu miktarı içeren besiyerlerinde yetiştirilen tüm bitkilerin gövde boylarında yavaş ancak giderek artan bir azalma ortaya çıktı. En belirgin azalma 200 μM ve 500 μM Cu'lu besiyerlerinde görüldü. Gövde boyları bakımından genotipler arasında belirgin farklar bulunmadı (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 Farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 50, 100, 200, 500 μM) Cu içeren MS besiyerinde yetişen pamuk genotiplerinin gövde ve kök boyları. 5 bitkinin ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

Bitki kısmı	Ortamdaki Cu miktarı (μM)	Gövde ve kök uzunluğu (cm)				
		143	M503	Ç-1518	84S	Sel-5
Gövde	0	11.7 \pm 1.9	12.8 \pm 2.7	11.8 \pm 4.6	9.2 \pm 1.3	9.8 \pm 1.4
	10	9.3 \pm 2.8	12.3 \pm 2.8	10.3 \pm 4.7	8.1 \pm 1.5	8.5 \pm 1.7
	50	9.1 \pm 2	10 \pm 1.3.3	9.03 \pm 2.1	7.9 \pm 2.5	8.2 \pm 1.6
	100	*6.5 \pm 2.7	10.3 \pm 1.3	9.05 \pm 2.5	6.7 \pm 4	7.6 \pm 2.7
	200	5.7 \pm 1.4	*6.9 \pm 1.1	*6.1 \pm 1.7	*5.9 \pm 2.9	*4.1 \pm 0.9
	500	2.1 \pm 0.8	3.7 \pm 0.3	1.4 \pm 0.7	2.8 \pm 0.8	2.8 \pm 0.6
Kök	0	8.5 \pm 1.4	9.8 \pm 3	9.7 \pm 1.9	9.7 \pm 2.7	9.5 \pm 1.1
	10	10.7 \pm 2.4	9.5 \pm 2.8	7.6 \pm 2.2	8.1 \pm 3.1	9.2 \pm 1.8
	50	9.7 \pm 3.6	9.5 \pm 2.6	7.5 \pm 0.4	*3.7 \pm 1.7	8.2 \pm 1.8
	100	9.7 \pm 2.6	*4.5 \pm 0.9	*1.9 \pm 0.6	3 \pm 1.9	*2.8 \pm 0.5
	200	*2.4 \pm 2.4	1.6 \pm 0.5	1.7 \pm 0.2	0.8 \pm 0.3	1 \pm 0.05
	500	1.3 \pm 0.3	0.9 \pm 0.1	0.6 \pm 0.5	0.7 \pm 0.4	0.7 \pm 0.2

(*) Boy kısalmasının anlamlı düzeye (0.001<P<0.01) eriştiği konsantrasyonlar.

Çizelge 4.7 Farklı konsantrasyonlarda (10, 50, 100, 200, 500 μM) Cu içeren MS besiyerinde yetişen pamuk genotiplerinin kök ve gövde boylarındaki % azalma, Cu içermeyen kontrol besiyerinde yetiştirilen bitkilerin kök ve gövde boyları ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. (+) işareti boydaki artmayı göstermektedir.

Bitki kısmı	Ortamdaki Cu miktarı (μM)	Gövde ve kök boyunda % azalma				
		143	M503	Ç-1518	84S	Sel-5
gövde	0	0	0	0	0	0
	10	19.6	3.9	12.7	12	13.2
	50	22.2	22	23	14.1	16.3
	100	44.4	22	23	27.1	22.4
	200	51.2	46	48	35.8	58.1
	500	82	71	88	69.5	71.4
kök	0	0	0	0	0	0
	10	+17	3	21.6	16.4	3.1
	50	+14.1	3	22.6	61.8	13.6
	100	+14.1	54	80.4	69	70.5
	200	71	83.6	82.4	91.7	89.4
	500	84	90.8	93.8	92.7	92.6

4.2.2 Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre Analizi

Genotipler arasındaki Cu biriktirme farklılıklarına bakıldığında düşük konsantrasyonlarda (10 μM ve 50 μM) Cu içeren ortamlarda Ç-1518 ve Sel-5 genotiplerinin köklerinde diğer genotiplerden yaklaşık 2 kat daha fazla Cu biriktirdiği tespit edildi. 100 μM Cu'da M503 genotipi diğer 4 genotipe göre yaklaşık %50 az Cu içerirken 200 ve 500 μM gibi yüksek konsantrasyonlarda bu özelliğini koruyamadı. 200 μM Cu'da Ç-1518 en az Cu biriktiren, 143 (229 $\mu\text{g/g}$) en çok Cu'ı biriktirdi. 500 μM Cu'da ise M503 (655 $\mu\text{g/g}$) kök dokusunda en fazla Cu biriktiren genotip olarak tespit edildi.

Gövde dokusundaki Cu birikimleri karşılaştırıldığında 50 μM 'a kadar genotipler arasında açık bir fark gözlenmezken, 100 μM Cu içeren besiyerinde M503 genotipi köklerinde olduğu gibi diğerlerinin yarısı kadar (6.2 $\mu\text{g/g}$) Cu biriktirdi. 200 μM Cu'lu besiyerlerinde Ç-1518 100 μM 'daki ile aynı miktarı korudu (10.7 $\mu\text{g/g}$), Sel-5 (36.3 $\mu\text{g/g}$) ve M503 (19.84 $\mu\text{g/g}$) ise 3 kat daha fazla Cu biriktirdi (Çizelge 4.8).

Bitkilerdeki toplam Cu miktarı gözönüne alındığında, M503 10, 50 ve 100 μM Cu içeren ortamlarda diğer genotiplere göre Cu'ı bünyesinden uzak tuttu. Sel-5, 84S ve 143 bu konsantrasyonlarda M503'ün 2 katı Cu biriktirdi. 500 μM Cu içeren besiyerinde Sel-5 en az (363.8 $\mu\text{g/g}$) miktarda bakır biriktiren Ç-1518 en fazla (843.9 $\mu\text{g/g}$) Cu biriktiren genotip oldu. Dayanıklı genotiplerden M503 Cu'ı köklerinde toplayıp (655 $\mu\text{g/g}$) topraküstü kısımlarından (gövde ve yaprak) uzaklaştırırken, diğer dayanıklı genotip 143 yapraklarında M503'ün yapraklarında biriktirdiği miktarın 3 katını biriktirerek Cu'ı hem kökte hem de yapraklarında biriktirdi (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8 Farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 50, 100, 200, 500 μ M) Cu içeren MS besiyerinde yetişen pamuk genotiplerinin köklerinde ve gövdelerinde biriken Cu miktarı. 5 bitkinin ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

Bitki kısmı	Ortamdaki Cu miktarı (μ M)	Cu birikimi (μ g/g yaş ağırlık)				
		143	M503	Ç-1518	84S	Sel-5
gövde	0	3.54	1.54	2.09	0.65	1.2
	10	5.31	3.19	5.74	1.61	1.7
	50	6.58	4.06	6.54	2.96	4.6
	100	10.85	6.22	10.78	12.52	12.9
	200	22.04	19.84	10.71	15.19	36.3
	500	212.3	67.88	259.9	82.85	68.1
kök	0	3.621	0.591	0.6	0.059	0.6
	10	6.802	3.872	7.04	2.801	5.1
	50	13.62	12.38	27.86	11.01	25.55
	100	79.62	35.29	58.71	77.81	84.49
	200	229.2	180.1	123.5	180.2	145.4
	500	429.3	655	584	514.1	295.7

Çizelge 4.9 MS besiyerinden bitkiye taşınan Cu oranı

Ortamdaki Cu miktarı (μM)	Ortamdan bitkiye taşınan Cu (%)				
	143	M503	Ç-1518	84S	Sel-5
10	0.17	0.1	0.18	0.06	0.09
50	0.21	0.17	0.36	0.14	0.31
100	0.71	0.32	0.54	0.71	0.76
200	1.3	1.05	0.70	1.02	0.95
500	1.6	1.89	2.21	1.56	0.95

Çizelge 4.10 Besiyerinden köklere giren Cu'nun bitkinin üst kısımlarına taşınma oranı

Ortamdaki Cu miktarı (μM)	Kökten üst kısımlara taşınan Cu (%)				
	143	M503	Ç-1518	84S	Sel-5
10	43	45	44	36	25
50	32	24	19	21	15
100	11	14	15	13	13
200	8	9	7	7	19
500	33	9	30	13	18

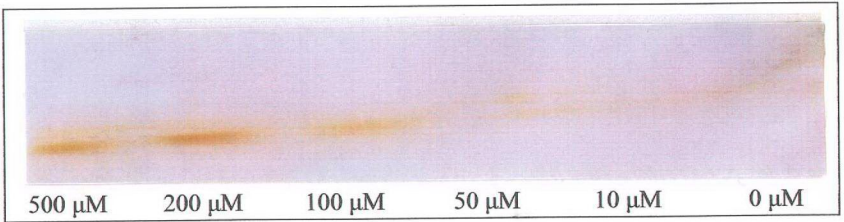
4.2.3 Protein Analizi

Cu stresine karşı dayanıklılığı taranan genotiplerden 3 tanesinin (143, M503 ve 84S) metal stresine gösterdikleri tepkiler arasında farklar olup, olmadığı belirleyebilmek amacıyla bu genotipler için protein düzeyinde denemeler yapıldı. Ağır metal stresine karşı 84S genotipi hassas, M503 ve 143 genotipleri ise dayanıklı bir fenotip sergilemesi nedeniyle protein çalışması için seçildi.

Köklerde anlatımı yapılan metal bağlayıcı proteinin/proteinlerin varlığını belirlemek amacıyla 6 farklı konsantrasyonda (0, 10, 50, 100, 200, 500 μM) Cu içeren MS besiyerinde yetiştirilen bitkilerin köklerinden izole edilen protein, doğal jel protein elektroforezinde yürütüldü ve jeller, boyanan bakırın, bağlanmış olduğu bakır bağlayıcı proteinin varlığını da göstereceği düşünülerek Cu boyama özelliği bilinen karbamik asit ile boyandı (Şekil 4.7).

84S genotipinde tüm konsantrasyonlarda boyanma görüldü ve metal bağlayıcı protein varlığı gösterildi. Protein varlığının gösterilmesinin yanı sıra 84S genotipine ait protein jelleri karbamik asit ile boyandığında, bitkilerin yetiştirildiği ortamdaki Cu miktarı arttıkça jelde boyanan bantların rengi de koyulaştı (Şekil 4.7). Ancak bu yöntem antikor ile işaretleme yöntemi kadar kesin bir sonuç veremeyeceğinden yüksek konsantrasyonlarda bu metal bağlayıcı proteinin artıp, artmadığı konusunda bir yorum getirmekten kaçınıldı

M503 ve 143 genotiplerinde ise jellerde boyanma görülmüdü. Bu genotiplerde metal bağlayıcı protein varlığı bu yöntemle belirlenemedi.



Şekil 4.7 6 Farklı Cu konsantrasyonu içeren MS ortamlarında yetiştirilmiş 84S genotipi bitkilerinin köklerinden izole edilmiş proteinlerin doğal protein jeli elektroforezinde yürütüldükten sonra karbamik asit ile muamelesi sonucu boyanan Cu miktarındaki farklılıklar.

4.3 *In vitro* Rejenerasyon

4.3.1 Doğrudan Organogenez

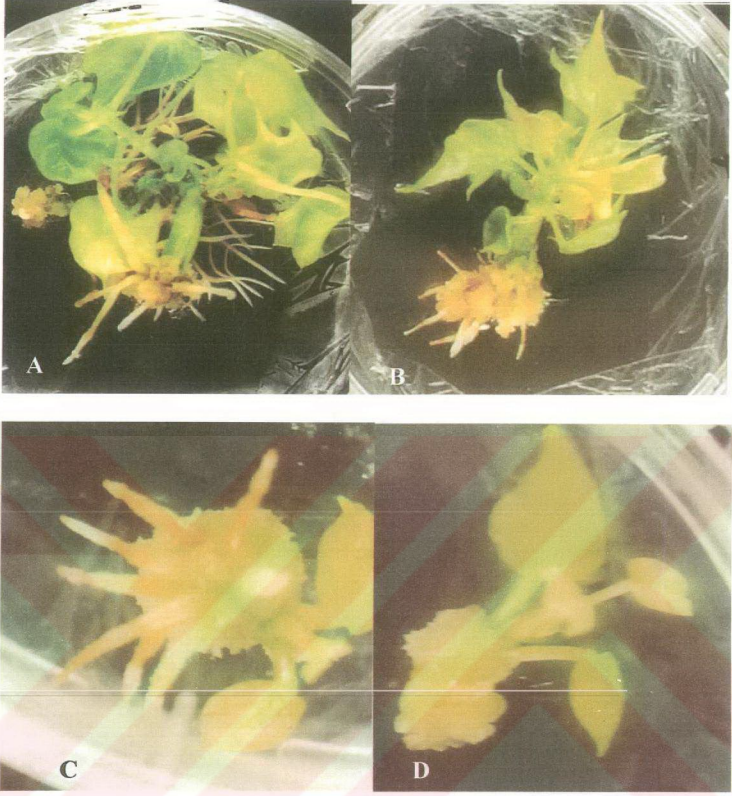
Sürgün ucu ve kotiledon nodu eksplantları doğrudan organogenez için kullanıldı. Sürgün ve kök oluşumları 30 gün boyunca gözlemlendi.

Kotiledon nodlarından %90'ın üzerinde sürgün, %50-70 arasında kök rejenerasyonu gerçekleşti. Sürgün uçları %90'ın üzerinde sürgün oluşumu gösterdiyse de bu eksplantlardan elde edilen kök rejenerasyonu %35'e ulaşabildi (Çizelge 4.11). Denenen tüm doğrudan rejenerasyon besiyerlerinde sürgün ucu ya da kotiledon nodu eksplant olarak kullanıldığında, sürgün oluşumu kök oluşumundan önce başladı.

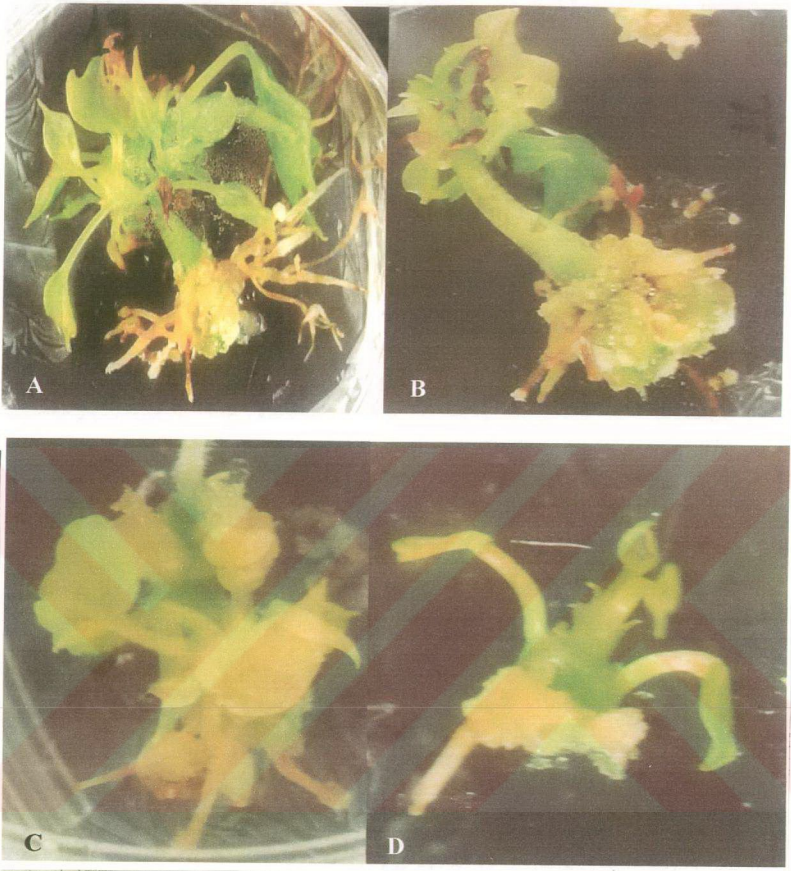
En yüksek sürgün rejenerasyonu hem 143 hem de M503 genotipinin her iki eksplantından da 0.2 mg/l IBA ve 0.1 mg/l NAA+0.1 mg/l IBA içeren MS besiyerinde elde edildi (Çizelge 4.11; Şekil 4.8-9). İki genotipten alınan eksplantlar Çizelge 4.3.1.2'de gösterilen besiyerlerine kültüre alındıklarında, Nazilli 143 genotipinin kotiledon nodundan en iyi kök rejenerasyonu 0.1 mg/l NAA içeren MS besiyerinde elde edilirken, Nazilli M503 genotipinin kotiledon nodu eksplantı 0.2 mg/l NAA içeren ortamda en iyi kök rejenerasyonunu verdi (Çizelge 4.11; Şekil 4.8). 143 genotipinin kotiledon nodu eksplantı kullanılarak 0.2 mg/l IBA içeren MS besiyerinde %100 sürgün rejenerasyonuna ulaşılabilirdiysen de bu besiyerinde oluşan kök rejenerasyonu ancak %13'e ulaşabildi. Diğer yandan M503 genotipinden %100 sürgün rejenerasyonu, sürgün ucu eksplantından, 1 mg/l NAA içeren MS besiyerinde alındı ve yine burada da kök rejenerasyonu %20 olabildi (Çizelge 4.11; Şekil 4.9).

Çizelge 4.11 143 ve M503 genotipi bitkilerinin kotiledon nodu ve sürgün ucu eksplantları kullanılarak 10 farklı besiyerinde gösterdikleri rejenerasyon oranları. Her bir denemede 20 eksplant olmak üzere 3 tekrarda toplam 60 eksplant kullanılmıştır.

Bitki Büyüme Düzenleyicisi (mg/l)	143 genotipi				M503 genotipi			
	nod		sürgün ucu		nod		sürgün ucu	
	sürgün %	kök %	sürgün %	kök %	sürgün %	kök %	sürgün %	kök %
0.1 NAA	74.65 ± 23	72.43 ± 8	78.05 ± 2.75	9.52 ± 1.34	75 ± 17.67	45 ± 7.07	78.3 ± 16.54	11.65 ± 2.3
0.2 NAA	88.2 ± 0.32	0 ± 0	91.65 ± 11.8	7.75 ± 3.18	97.91 ± 2.9	50.83 ± 13	85 ± 2 1.2	20 ± 14.14
0.5 NAA	94 ± 8.48	55 ± 7.7	84.4 ± 6.22	7.75 ± 3.18	97.8 ± 3.11	20 ± 2.8	90 ± 14.14	26.65 ± 9.4
1 NAA	90 ± 14.14	23.3 ± 4.66	86.5 ± 19.09	16.65 ± 2.3	96.65 ± 4.73	20 ± 0	100 ± 0	20 ± 14.14
2 NAA	96.87 ± 4.4	53.97 ± 12	46.25 ± 4.7	5 ± 0.7	92.5 ± 3.53	20 ± 0	90 ± 14.14	35 ± 7.07
0.2 IBA	100 ± 0	13.04 ± 1.8	87.5 ± 17.67	3.3 ± 4.66	95 ± 7.07	7.5 ± 1.6	96.87 ± 4.41	0 ± 0
0.1 NAA+0.2 IBA	90 ± 14.14	60 ± 5.6	60 ± 28.28	8 ± 1.13	86.25 ± 19.6	50.55 ± 14	77.5 ± 17.67	5 ± 7.07
0.1NAA+0.1 IBA	95 ± 7.07	2.25 ± 3.18	96.65 ± 4.73	5 ± 7.07	97.5 ± 3.53	10 ± 0	100 ± 0	0 ± 0
0.1 NAA+0.1 BAP	87.5 ± 15.5	0 ± 0	78.9 ± 14.92	0 ± 0	92.35 ± 3.32	0 ± 0	91.65 ± 2.33	0 ± 0
0.2 NAA+ 1 GA	87.5 ± 10.6	7.5 ± 3.53	78 ± 16.97	0 ± 0	16.65 ± 23.5	6.65 ± 4.9	67.5 ± 31.81	5 ± 7.07



Şekil 4.8 30 günlük kültürde Nazilli 143 pamuk genotipinin doğrudan sürgün ve kök rejenerasyonu. **A.** 2 mg/l NAA içeren MS besiyerinde nod eksplantından rejenerasyon, **B.** 0.1mg/l NAA+ 0.2 mg/l IBA içeren MS besiyerinde nod eksplantından rejenerasyon, **C.** 0.1mg/l NAA+ 0.2 mg/l IBA içeren MS besiyerinde sürgün ucundan rejenerasyon, **D.** 0.5 mg/l NAA içeren MS besiyerinde sürgün ucundan rejenerasyon.



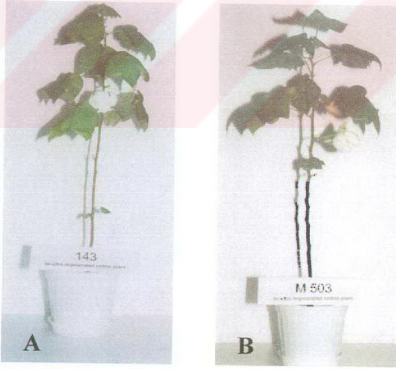
Şekil 4.9 30 günlük kültürde Nazilli M503 pamuk genotipinin doğrudan sürgün ve kök rejenerasyonu. **A.** 0.1mg/l NAA+ 0.2 mg/l IBA içeren MS besiyerinde nod eksplantından rejenerasyon, **B.** 2 mg/l NAA içeren MS besiyerinde nod eksplantından rejenerasyon, **C.** 0.5 mg/l NAA içeren MS besiyerinde sürgün ucundan rejenerasyon, **D.** 0.2 mg/lNAA içeren MS besiyerinde sürgün ucundan rejenerasyon.

4.3.1.1 Rejenere Bitkilerin Toprağa Aktarılması

Doğrudan organogenez ile kotiledon nodu ve sürgün ucu eksplantlarından elde edilen rejenere 9 haftalık M503 ve 143 bitkicikleri saksılarda steril edilmiş kum toprak karışımına aktarıldı. Bitki büyütme odalarında olgun bitkiler haline gelen rejenere pamuk bitkilerinden pamuk kozalarının oluşması 3-4 ay sonunda gerçekleşti. Tohum ve pamuk liflerinin toplanması rejenerasyon süresinin başlangıcından itibaren yaklaşık 6 ay sonunda gerçekleşti (Çizelge 4.12; Şekil 4.10-11).



Şekil 4.10 *In vitro* ortamda rejenere edilmiş bitkilerin toprağa aktarımı. A. Nazilli 143, B. M503



Şekil 4.11 *In vitro* rejenere edilmiş olgun pamuk bitkileri A. Nazilli 143, B. M503.

Çizelge 4.12 Nazilli 143 ve M503 pamuk genotipleri için doğrudan rejenerasyonu prosedürü.

Steril edilmiş ve tohum paltoları çıkarılmış pamuk tohumları MSGerm besiyerine aktarılır.

↓ 7 gün

Sürgün ucu ve kotiledon nodu eksplantları en iyi sürgün rejenerasyonu için 0.1mg/l NAA + 0.1mg/l IBA içeren besiyerinde ve en iyi kök rejenerasyonu için eksplanta bağlı olarak NAA'in farklı konsantrasyonlarını içeren besiyerinde kültüre alınır. (Çizelge 4.11).

↓ 1 ay

2-3 cm sürgün ve kök yapılarına sahip rejener bitkiler, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besiyerine aktarılır.

↓ 1 ay

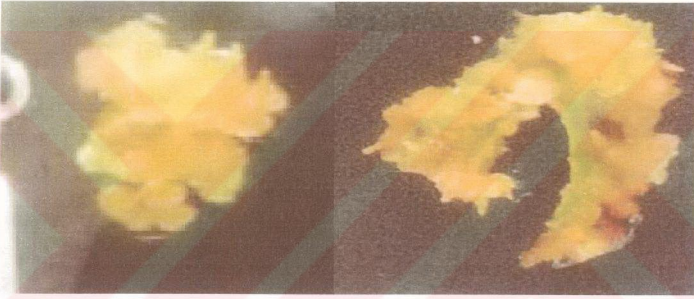
5-6 cm boyundaki bitkicikler steril kum ve toprak karışımına aktarılır.

↓ 3-4 ay

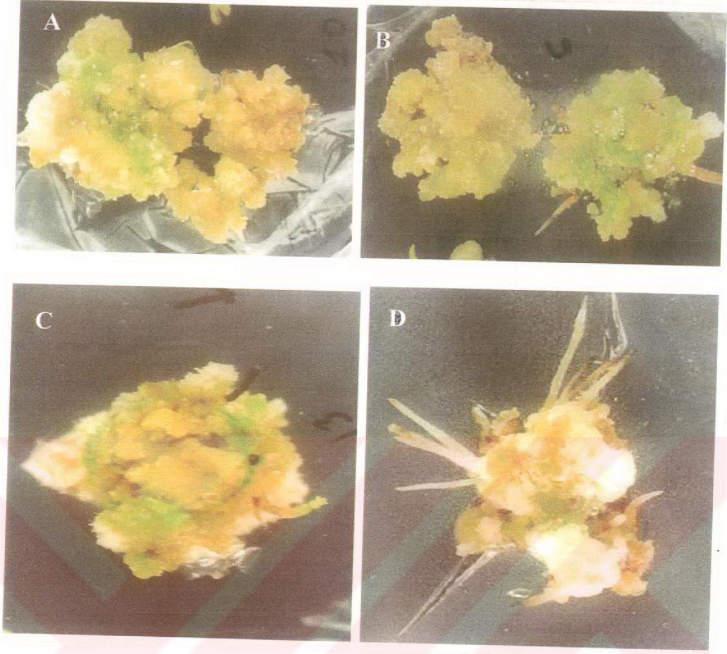
Bitkilerin çiçeklenme aşaması tamamlanır, tohum ve lif elde edilir.

4.3.2 Dolaylı Organogenez

Her iki genotip (M503 ve 143) bitkiciklerinden alınan hipokotil eksplantları sadece Zeatin içeren, sadece NAA içeren ve her ikisini birlikte içeren besiyerlerinde kallus oluşumu gösterdi. Bununla birlikte Zeatin (0.01mg/l) ve NAA (0.5 mg/l) için denenen en düşük konsantrasyonlarda kallus oluşumu görülmedi (Çizelge 4.13; Şekil 4.13). Kotiledon eksplantından kallus oluşumu sadece 143 genotipinden 0.1 mg/l NAA+0.2 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l NAA + 2 mg/l Zeatin içeren MS besiyerlerinde elde edildi (Çizelge 4.13; Şekil 4.12). Kalluslar üzerinde kök oluşumu gözlemlendi, fakat denenen besiyerlerinin hiçbirinde her iki genotip için de kallustan sürgün oluşumu görülmedi.



Şekil 4.12 0.1 mg/l NAA+ 0.2 mg/l 2,4-D içeren 30 günlük MS kültürde 143 genotipi kotiledon eksplantından kallus ve kök oluşumu.



Şekil 4.13 30 günlük kültürde Nazilli 143 ve M503 genotiplerinin dolaylı rejenerasyonu. A. 2 mg/l NAA içeren MS besiyerinde 143 genotipi bitkisinin hipokotil ekplantından kallus oluşumu, B. 0.5 mg/l ZT içeren MS besiyerinde 143 genotipi bitkisinin hipokotil ekplantından kallus ve kök oluşumu, C. 0.1 mg/l NAA+ 0.2 mg/l IBA içeren MS besiyerinde M503 genotipi hipokotil eksplantından kallus ve kök oluşumu, D. 2 mg/l ZT içeren MS besiyerinde M503 genotipi hipokotil eksplantından kallus ve kök oluşumu.

Çizelge 4.13 Farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin 143 ve M503 pamuk bitkilerinin kotiledon ve hipokotil eksplantları üzerine kallus oluşturma etkisi

Bitki Büyüme Düzenleyicisi (mg/l)	143 genotipi		M503 genotipi	
	kotiledon	hipokotil	kotiledon	hipokotil
2 Zeatin	-	++	-	++
1 Zeatin	-	++	-	++
0.5 Zeatin	-	++	-	++
0.1 Zeatin	-	+	-	+
0.01 Zeatin	-	-	-	-
2 NAA	-	+	-	+
1 NAA	-	+	-	+
0.5 NAA	-	-	-	-
0.1 NAA+0.2 2,4-D	+	-	-	-
2 NAA + 2 Zeatin	+	+	-	+

(+) işareti BBD'lerin kallus oluşumu üzerindeki etkisinin olumlu, (-) işareti olumsuz olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

5.1 Ağır Metal Stresine Karşı Dayanıklılığın Taranması

5.1.1 Pamuk Genotiplerinin Cd Stresine Karşı Dayanıklılığının Taranması

Cd ile yapılan denemelerde tüm genotiplerin kök ve gövde büyümesi besiyerindeki Cd konsantrasyonunun artmasıyla birlikte gittikçe düştü. Bu etki 84S ve Sel-5 genotiplerinde daha fazla görüldü. Cd uygulanmasının buğday ve yonca gibi başka bitkilerde de kök ve gövde boyunda kısalma ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Peralta ve ark., 2001; Ouzounidou, 1997).

Bitkiler minimal miktarda (10 μ M) Cd ile muamele edildiklerinde bu genotiplerin gövde uzunlukları % 18-19 oranında azaldığı halde diğer genotiplerde (143, M503, Erşan-92, Ç-1518) ya çok az (%5-7) azalma görüldü ya da hiç azalma görülmedi (Çizelge 4.2). Artan konsantrasyonlarda bitkilerin kök ve gövde büyümesi performansları karşılaştırıldığında denenen tüm konsantrasyonlarda 84S ve Sel-5 ağır metal stresinden daha fazla zarar gördü.

Her ne kadar 143, M503, Erşan-92 ve Ç-1518'nin kök ve gövde büyümesi de durdurduysa da yüksek ağır metal stresinin bu dokulardaki etkisi 84S ve Sel-5'deki etkisine göre daha az oldu. Morfolojik ve fenotipik gözlemlere dayanan bu tespitlere göre Erşan-92, M503, 143 ve Ç-1518 genotipleri nispeten dayanıklı genotipler olarak görülmektedir. 84S ve Sel-5 genotipleri ise hassas genotiplerdir. (Çizelge 4.1-2; Şekil 4.1-2-3-4-5-6).

Bitkilerin metal biriktirme özelliklerine bakıldığında büyük ölçüde yetiştirildikleri besiyerindeki metal miktarından etkilendi. Yüksek miktarlarda Cd içeren besiyerlerinde (200, 500 μ M) yetiştirildiklerinde genotipler arasındaki metal biriktirme farklılıkları açıkça görülmektedir. Bitkiler yüksek Cd konsantrasyonu içeren ortamlarda yetiştirildiklerinde farklı absorpsiyon kapasiteleri olduğu Peralta (2001) and Lin (2003) tarafından da gösterilmiştir.

Cd²⁺ içeren ortamlarda yetişen ayçiçeği bitkilerinin hem kök hem de gövde dokularında Cd birikiminde bir artış görülmüştür. 10 ve 20 μ M Cd uygulanmış bitkilerin köklerinde Cd²⁺ miktarının 21- 31 kez arttığı tespit edilmiştir (Cagno vd.,1999). Sonuçlarımıza göre Ç-1518 genotipi yüksek Cd konsantrasyonu içeren besiyerlerinde yetiştirildiğinde köklerinde yüksek Cd birikimi gösterdi. M503, Erşan-92 and 143 genotipleri ise aynı miktarda Cd içeren

ortamlarda Cd'ü hem gövde hem de köklerinden dışladı (Çizelge 4.3). Sel-5 ve 84S ise yüksek Cd konsantrasyonlarında (50- 500 μ M) Cd'a karşı oldukça hassastı ve kötü bir büyüme performansı gösterdi. 143 genotipi metali bünyesinden uzak tutan diğerlerinden farklı olarak nispeten köklerinde daha fazla Cd birikimi gösterdi. Bu da bize diğer genotiplerde (M503 ve Erşan-92) Cd'un doğrudan bitkinin topraküstü kısımlarına taşındığı ve burada biriktirildiğini düşündürmektedir. Bu durum 1995'te Salt vd. tarafından birkaç bitki türünde gösterilmiştir. Köklerden yapraklara taşınan Cd miktarı kök düzeyindeki bağlanma ve kompleks oluşturma özelliklerine ve ksilem taşınma etkinliğine bağlıdır. Ksilem taşınma etkinliği ise terleme oranına ve stoma yoğunluğuna bağlıdır (Marchiol vd., 1996). ABA ile indüklenen stoma kapanması yoluyla yapraklardaki Cd birikiminin azaldığı gösterilmiştir (Salt ve ark. 1995).

Sonuçlarımıza göre hassas genotip olarak belirlediğimiz 84S ve Sel-5'de muhtemelen stoma yoğunluğu ve terleme oranı, yüksek Cd konsantrasyonu içeren ortamlarda yetiştirildiğinde artmaktadır ve bu da köklerden yüksek miktarda Cd taşınması ve gövdede birikmesi anlamına gelmektedir. Bundan dolayı Cd'un kloroplast düzeyindeki toksik etkisi yüksek Cd miktarı uygulandığında bu genotipin yapraklarındaki Cd miktarı ile açıklanabilir. Marul mesofil protoplastlarının fotosentetik CO₂ fiksasyonu üzerinde Cd'un bu inhibe edici etkisi Weigel (1985) tarafından bildirilmiştir.

Cd biriktirici buğday varyetelerinin rizosferde düşük molekül ağırlıklı organik asitleri yüksek miktarda biriktirdiği bildirilmiştir (Ciešliński vd., 1998). Al'a karşı dayanıklılık gösteren buğday varyetelerinin de hassas olanlardan daha fazla organik asit ürettiği gösterilmiştir (Basu vd., 1994; Rayan vd., 1995). Son bilgiler bitkilerde özellikle Al, Pb ve Cd'a karşı dayanıklılık mekanizmalarının varlığını göstermektedir. Bu metallerin organik asitler gibi metal bağlayıcı ligantlar sayesinde köklerden dışlandığı bildirilmiştir (Jones 1998; Zheng vd., 1998; Yang vd., 2000). Bu ligantlar rizosfere salındığında metalleri etkin bir şekilde bağlar ve kök içine girişini azaltır. Muhtemelen Erşan-92 ve M503 genotipleri de besiyerine organik asitler salmakta ve fitajel içeren besiyerinde metalleri bağlamaktadır. Böylece Cd köklere taşınmamakta ve bu kökler diğer genotiplerin kökleriyle karşılaştırıldıklarında daha düşük miktarda Cd içermektedir.

M503 ve Erşan-92'nin metali bünyesinden uzak tutma özelliğinde olduğunu ve yüksek metal stresi uygulandığında bulunduğu besiyerine organik asitler salgıladığı düşünülmektedir. Biriktirici genotipler (örneğin Ç-1518) ise bu organik asitler vasıtasıyla metal bağlama kapasitesini kök hücrelerinin sitoplazmasında kullanmaktadır ve bu kompleksleri vakuolde biriktirmektedir. Benzer metal (Mn, Cu, Cd)- organik asit komplekslerinin bazı metale

dayanıklı bitkilerde varolduğu literatürde bildirilmiştir (Reilly 1972; Tiffin 1972; Memon vd., 1982).

Kullanılan pamuk genotipleri bu sonuçlara göre Cd dayanıklılığına karşı 3 kategoriye ayrılmıştır. 1. metal hassas (Sel-5 ve 84S), 2. metale dayanıklı A. metal biriktirici (Ç-1518), B. Metali bünyesinden uzak tutan (M503, Erşan-92 and 143).

5.1.2 Pamuk Genotiplerinin Cu Stresine Karşı Dayanıklılığının Taranması

Kök uzunlukları ölçüldüğünde 50 μM Cu içeren besiyerinde genotipler arasındaki farkın açıkça ortaya çıktığı görüldü (Çizelge 4.6). Bu konsantrasyonda yetişen 84S genotipi bitkilerinin kök uzunluğu kontrol bitkisine göre % 62 azalma gösterdi. 50 μM Cu içeren MS besiyerinde diğer genotip bitkilerinin kök uzunluğunda sadece % 3- % 22 arasında azalma oldu. Diğerlerinden farklı olarak 143 genotipi bitkileri 10, 50 ve 100 μM Cu içeren besiyerlerinde yetiştirildiğinde kök uzunluklarında % 14.1- % 17.6 artış gösterirken bu genotip bitkilerinin kök uzunluğu 200 μM Cu'da % 71 oranında ani bir azalma gösterdi (Çizelge 4.2.1.2). Ayçiçeği ile yapılan denemelerde de 10^{-5} , 10^{-4} ve 10^{-3} M Cu uygulanan *H. annuus* bitkilerinde kök boylarının kontrol bitkilerine göre daha uzun olduğunu ancak konsantrasyon arttıkça kök yapılarının değiştiği bildirmiştir (Lidon ve Henriques, 1998; Lin vd., 2003). M503 genotipi bitkilerinin de kök boylarında anlamlı bir azalma ancak 200 μM Cu'da meydana geldi.

Gövde boyları bakımından genotipler arasında açık farklar bulunmadı. (Çizelge 4.6). 6 farklı. En belirgin azalma 200 μM ve 500 μM Cu'lu besiyerlerinde görüldü.

Cu stresinden etkilenme durumları kök boylarına göre değerlendirildiğinde 84S genotipi Cu stresine karşı hassas, M503 ve 143 bitkileri ise toleranslı genotipler olarak belirlendi.

Genotiplerin Cu biriktirme özellikleri Cd deneylerinde olduğu gibi ortamdaki Cu miktarından etkilendi. Artan Cu konsantrasyonu ile birlikte bitkilerin biriktirdiği Cu miktarı da arttı. Genotipler arasındaki Cu biriktirme farklılıklarına bakıldığında farklı konsantrasyonlarda farklı özellikler gösterdikleri tespit edildi. Örneğin Ç-1518 düşük konsantrasyonlarda (10, 50 μM) diğer genotiplerden yaklaşık 2 kat daha fazla Cu biriktirdiği halde 200 μM Cu'da diğerlerine göre en az miktarda Cu biriktirdi. 100 μM Cu'da M503 genotipi diğer 4 genotipe göre yaklaşık %50 az Cu içerirken 200 ve 500 μM gibi yüksek konsantrasyonlarda bu özelliğini koruyamadı. 500 μM Cu'da M503 (655 $\mu\text{g/g}$) kök dokusunda en fazla Cu'ı topladı benzer özellikler gövde dokusunda da devam etti (Çizelge 4.8). Yüksek konsantrasyonlarda

bitkiler köklerinde toprak üstü kısımlarında biriktirdiğinden daha fazla Cu biriktirdi. Yüksek miktarda Cu uygulandığında toplam Cu'nun % 60-80'inin köklerde hücre duvarı fraksiyonlarına ve hücre duvarı-plazma membran arasına bağlanabileceği, az bir oranının bitkinin üst kısımlarına taşındığı bildirilmiştir (Das vd., 1997; Salt vd., 2002; Lin vd., 2003). *Heliantus annuus* ile yapılan çalışmada 10^{-3} M Cu uygulanan bitkilerin kontrole göre 25 kat daha fazla Cu biriktirdiği görülmüştür. Bitkilerin yukarı kısımlarına ise alınan bu Cu'nun yalnızca küçük bir miktarı taşınmıştır (Lin vd., 2003). Salt (1996) ve Liu (2000) ise bunun tersini bildirmiştir.

Cu metale karşı dayanıklılığı taranan genotiplerden 3 tanesinin (143, M503 ve 84S) metal stresine karşı gösterdikleri tepkiler arasında farklar olup, olmadığı belirleyebilmek amacıyla bu genotipler için protein düzeyinde denemeler yapıldı.

84S genotipi hassas, M503 ve 143 genotipleri ise dayanıklı bir fenotip sergilemesi nedeniyle protein çalışması için seçildi. Elimizde metal bağladığı bilinen metallothiyonin proteininin antikor olmadığından, köklerde eksprese edilen bu ya da benzeri metal bağlayıcı proteinleri tespit edebilmek üzere doğal jel üzerinde Cu boyama yönteminden yararlanıldı. 6 farklı konsantrasyonda (0, 10, 50, 100, 200, 500 μ M) Cu içeren MS besiyerinde yetiştirilen bitkilerin köklerinden izole edilen protein, doğal jel protein elektroforezinde yürütüldü ve jeller, boyanan bakırın, bağlanmış olduğu metal bağlayıcı proteinin varlığını da göstereceği düşünülerek Cu boyama özelliği bilinen karbamik asit ile boyandı (Şekil 4.7).

84S genotipinde tüm konsantrasyonlarda boyanma görüldü ve metal bağlayıcı protein varlığı gösterildi. Protein varlığının gösterilmesinin yanı sıra 84S protein jelleri karbamik asit ile boyandığında, bitkilerin yetiştirildiği ortamdaki Cu miktarı arttıkça jelde boyanan bantların rengi de koyulaştı (Şekil 4.7). Ancak bu yöntem antikor ile işaretleme yöntemi kadar kesin bir sonuç veremeyeceğinden yüksek konsantrasyonlarda bu metal bağlayıcı proteinin artıp, artmadığı konusunda bir yorum getirmekten kaçınıldı. Bununla birlikte Vliet vd., 1995 Cu'a karşı hassas Arabidopsis mutantında MT üretiminin arttığını göstermiş ancak Cu hassasiyeti ile MT artışı arasında bir bağlantı kurabilmek için daha geniş kanıtlara ihtiyaç olduğunu bildirmiştir.

M503 ve 143 genotiplerinde ise jellerde boyanma görülmedi. Bu genotiplerde metal bağlayıcı protein varlığı bu yöntemle belirlenemedi. Boyanmadaki farklılık bu hassas ve dayanıklı genotipler arasında Cu stresine karşı verilen mücadelede farklı savunma sistemlerinin kullanıldığını akla getirmektedir. Dayanıklı genotipler olarak belirlenen M503 ve 143 genotipleri bakır stresine karşı metal bağlayıcı protein sentezine gerek duymazken, hassas

genotip 84S'in bu strese karşı hayatta kalabilmek için daha fazla mücadele vererek metal bağlayıcı protein/ proteinlere gerek duyduğu düşünülmektedir. Bu durumda M503 ve 143 genotipleri topladıkları Cu'ı vakuolde biriktirmek gibi farklı bir yolla zararsız hale getiriyor olabilir.

5.2 *In vitro* Rejenerasyon

Pamuk rejenerasyonun zor ve kısıtlı olduğu ve genotipe bağlı olduğu bilinmektedir (Saeed 1997; Zapata vd., 1999). Kotiledon nodu ve sürgün ucu eksplantları pamuk bitkisi gibi rejenerasyonu zor olan bitkilerde genetik transformasyon çalışmaları için oldukça yararlıdır. Meristematik uç (apeks) ve kotiledon nodu hem *Agrobacterium* hem de biyolistik yöntemleri ile gen aktarımı için hedef doku olarak kolaylıkla kullanılabilir. Pamukta apikal meristem kültürü ilk kez 1967'de Chappell ve Manuey tarafından yapılmıştır fakat bitki rejenerasyonu başaramamıştır. 1991'de Gould vd., pamuk apikal meristem kültürü şartlarını optimize ederek, normal bitkiler elde etmeyi başarmıştır (Morre vd., 1998).

Pamuğun doku kültüründe verdiği yanıtlar düşük ve bazı genotipler ile sınırlıdır. Kallus dokusunun yavaş büyümesi, kallus büyümesini inhibe eden bazı pigmentlerin oluşması pamuk doku kültüründe karşılaşılan bazı problemlerendir (Rani vd., 1976). Birçok pamuk türünün rejenerasyonu ve transformasyonundaki zorluklar pamukta genetik mühendisliği işlemleri için halen başlıca engel olarak gösterilmektedir. Transgenik pamuk elde edilmesindeki zorlukların çoğu rejenerasyon ile ilgili olduğundan etkili bir rejenerasyon sistemi geliştirilmesi önemlidir.

Organogenez yoluyla bitki rejenerasyonu pamuk bitkisinin geliştirilmesinde başvurulan yöntemler arasında önemli bir yere sahiptir. Kallus oluşumun teşvik edilmesi ve organogenez yoluyla bitki rejenerasyonunda özellikle oksin ve sitokinin olmak üzere bitki büyüme düzenleyicilerinin önemi pamuk bitkisinin de içinde bulunduğu birçok bitki türünde denenmiştir (Murashige, 1974; Sunilkumar and Rathore, 2001). *In vitro* hücre seçimi iyi adapte olmuş bir genotipe tek bir özelliğin eklenmesinde önemli avantajlar sağlamaktadır (Brown ve Atasanov, 1984).

Çalışmamızda, metale (Cd, Cu) karşı toleranslı olarak seçtiğimiz pamuk genotiplerinin (M503 ve 143) rejenerasyon sıklığını önemli ölçüde etkileyebilecek olan bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı oran ve kombinasyonlarını içeren birçok faktör denendi. En yüksek sürgün rejenerasyon hem 143 hem de M503 genotipinin her iki eksplantından (sürgün ucu ve

kotiledon nodu) da 0.2 mg/l IBA ve 0.1 mg/l NAA+0.1 mg/l IBA içeren MS besiyerinde elde edildi (Çizelge 4.11; Şekil 4.8-9). Bununla birlikte genetik faktörlerin rejenerasyon üzerindeki etkileri burada da ortaya çıktı ve farklı genotiplerin aynı eksplantları denenen besiyerlerin çoğunda besiyerleri aynı olmasına rağmen farklı rejenerasyon özellikleri sergiledi. Farklı varyetelerin sürgün ucundan bitki rejenerasyonunda kaydedilir derecede bir fark meydana gelmektedir. Ekspat yaşı da pamuk bitkisinde başarılı bir rejenerasyon için temel bir faktördür. Sürgün ucu için en uygun bitkilerin 2-5 günlük olduğu bildirilmiştir (Saeed vd., 1997). Daha önce yapılan çalışmalarda da kotiledon nodu ve sürgün ucu eksplantları kullanılarak MS besiyerinde sürgün oluşturulmuştur. (Agrawal vd., 1997; Hemphill vd., 1998). Kotiledon nodu ve sürgün ucundan rejenerasyonu sağlayabilmek için BAP'ın farklı konsantrasyonları denenmiştir (Morre vd., 1998; Gupta vd., 1997). Sürgün uçlarının *in vitro* ortamda birkaç sürgün verdiği bildirilmiştir. Sürgün ucundan pamuk rejenerasyonu her ne kadar doğrudan olsa da tam bitkilerin yeniden oluşmasında sürgün uzaması ve kök oluşumunun başlaması gibi zorluklar vardır. Kök oluşması da genotipe bağlıdır. Kök oluşturamayan sürgünler bir süre sonra ölmektedir (Zapata vd., 1999; Luo ve Gould, 1999). *In vitro* ortamda kök oluşumunu teşvik etme çalışmaları genellikle başarısız olmuştur. Kültürde kök oluşumunu teşvik etmek üzere kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri genellikle kültürün ölümüne neden olmuştur (Zapata vd., 1999). Çalışmamızda kotiledon nodu eksplantından kök rejenerasyonunun sürgün ucu eksplantlarından daha yüksek olduğu görülmüştür. Aynı zamanda 143 ve M503 genotipleri için en başarılı kök rejenerasyonu sonuçları farklı besiyerlerinde kaydedilmiştir. 143 bitkisi kotiledon nodundan kök rejenerasyonu için en iyi sonuçlar 0.1 mg/l NAA içeren MS besiyerinde alınırken, M503 bitkileri kotiledon nodları en iyi kök rejenerasyonunu 0.2 mg/l NAA içeren ortamda göstermiştir. Sürgün ucundan en iyi kök rejenerasyonu (% 35) M503 bitkisi ile 2 mg/l NAA ieren MS besiyerinde gerçekleşmiştir.

Metal stresine karşı toleranslı genotipler olarak belirlenen M503 ve 143 genotiplerinin kotiledon nodu ve sürgün ucu eksplantlarından elde edilen rejenere bitkiler toprağa aktarılıp, rejenerasyon sürecinin başlangıcından itibaren 6 ay sonunda tohum ve kozaların toplanması gerçekleştirilmiştir.

Pamuk kallus üretimi farklı bitki büyüme düzenleyicilerini içeren birçok besiyerinde gerçekleşmiştir ancak kallus üreten bu ortamlarda bitki oluşmamıştır (Zapata vd., 1999). Hipokotil eksplantları kallus oluşumu için kullanılan en yaygın kısımdır (Kumar vd., 1998). 7 günlük bitkilerden alınan hipokotil ve kotiledon segmentleri 0.1 mg/l Zeatin ve 0.1 mg/l IAA içeren besiyerlerinde embriyonik kallus oluşturmuştur, ancak oluşan bitkiler normal

olmamıştır. 2,4-D'nin de embriyonik kallus oluşumunu teşvik ettiği görülmüştür. Fakat 2,4-D somatik embriyoların daha sonraki gelişimini engellemiştir. Yalnızca Zeatin içeren besiyerlerinde birçok olgun embriyo elde edilebilmiştir. Kallus oluşumunda kullanılan yaprak ve hipokotil eksplantlarından hipokotil çok daha iyi sonuçlar vermiştir (Zhang vd., 2000; Zhang, 2001).

Çalışmamızda her iki genotip bitkilerinin hipokotil eksplantları denenen besiyerlerinin çoğunda kallus oluşumu gösterdi. Kotiledon eksplantından kallus oluşumu sadece 143 genotipinden 0.1 NAA + 0.2 2,4-D ve 2 NAA + 2 Zeatin içeren MS besiyerlerinde elde edildi (Çizelge 4.13; Şekil 4.12-13). Kalluslar üzerinde kök oluşumu gözlemlendi fakat denenen besiyerlerinin hiçbirinde her iki genotip için de kallustan sürgün oluşumu görülmedi.

Sonuç olarak kök ve gövde boyları ölçülerek elde edilen morfolojik sonuçlara göre Nazilli M503 ve Nazilli 143 genotipleri denenen metaller (Cd ve Cu) için dayanıklı, 84S genotipi ise hassas olarak tespit edilmiştir. AAS sonucu, kullanılan pamuk genotiplerinin farklı miktarlarda Cd ve Cu biriktirmenin yanısıra kök ve gövdelerinde de farklı metal biriktirme özellikleri gösterdiği belirlenmiştir. Karbamik asit ile metal bağlayıcı protein belirleme çalışmalarının sonuçları 84S genotipi ile M503 ve 143 genotiplerinin Cu stresine karşı verilen mücadelede farklı savunma sistemlerinin kullanıldığını düşündürmektedir. M503 ve 143 genotipleri için oluşturulmuş olan *in vitro* rejenerasyon sistemi ileride yapılacak olan gen aktarımı ve mikroçoğaltım çalışmalarında yararlı olacaktır. Metal stresine karşı yeni pamuk genotiplerinin bulunması ve/veya geliştirilmesi ile pamuk verim ve kalitesi artırılarak ekonomiye önemli katkılar sağlanacaktır.

KAYNAKLAR

- Agrawal, D.C., Banerjee, A.K., Kolala, R.R., Dhage, A.B., Kulkarni, A.V., Nalawade, S.M., Hazra, S., Krishnamurty, K.V. (1997), "In vitro induction of multiple shoots and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.)", Plant Cell Report, 16:647-652.
- Anonymous (2001), "Cotton Review of the World Situation", International Cotton Advisory Committee, 55: (2).
- Baryla, A., Carrier, P., Franck, F., Coulomb, C., Sahut, C., Havaux, M. (2001), "Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth", Planta, 212:696-709.
- Basu, U., Douglas, G. Ve Taylor, G.J. (1994), "Aluminium resistance in *Triticum aestivum* associated with enhanced excretion of malate", J. Plant Physiol, 144:747-753.
- Basu, A.K. (1996), "Current genetic research in cotton in India", Genetica, 97: 279-290.
- Briat, J.F., Lebrun, M. (1998), "Plant responses to metal toxicity", Plant Biology and Pathology, 322:43-54.
- Brown, D.C.W. ve Atanasov, A. (1984), "Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplast of *Medicago sativa* L.", Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 4:111-122.
- Cagno, R.D., Guidi, L., Steffani, A. ve Soldatini, G.F. (1999), "Effect of cadmium on growth of *Helianthus annuus* seedlings", Physiological Aspects. New Phytol., 144:65-71.
- Chaney, R.L., Malik, M., Li, Y.M., Brown, S.L., Brewer, E.P., Angle, J.S. ve Bakers, A.J.M. (1997), "Phytoremediation of soil metals", Current Opinion in Biotechnology, 8:279-284.
- Cieśliński, G. (1998), "Low molecular weight organic acids in rhizosphere soils of durum wheat and their effect on Cd bioaccumulation", Plant and Soil, 203:109-117.
- Clemens, S., Palmgren, M.G. ve Kramer, U. (2002), "A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation", Trends in Plant Science, 7:309-314.
- Cobbett, C. (2000), "Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification", Current Opinion in Plant Biology, 3:211-216.
- Cobbett, C. (2002), "Phytochelatin and Metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis", Annu. Rev. Plant Biol., 53:159-182.
- Çağırğan, O. Ve Barut, A. (2000), Nazilli Pamuk Araştırma Enstitüsündeki Genetik-Stok Pamuk Çeşitleri, Nazilli Pamuk Araştırma Enstitüsü yayın no: 58.
- Çakmak, I., Welch, R.M., Hart, J., Norvell, W.A., Öztürk, L., Kochian, L.V. (2000), "Uptake and retranslocation of leaf applied cadmium (^{109}Cd) in diploid, tetraploid and hexaploid wheats", J. Experimental Botany, 51:221-226.
- Das, P., Samantaray, S. Ve Rout, G.R. (1997), "Studies on Cadmium toxicity in plants: a-review", Environmenta Pollution, 98:29-36.
- De Mastro, G., Marzi, V., Lucarelli, G. (1998), "Proceedings", FAO Interregional Cooperative Research Network on Cotton, 14-20 July 1998, Bari, Italy.
- Dodds, J.H. and Roberts, L.W. (1995), Experiments in Plant Tissue Culture, Cambridge Univ.

Press.

Epstein, E. (1972), Mineral Nutrition of plants: Principlea and Perspectives, John Wiley and ons Press, New York.

Foley, R.C., Liang, Z.M. ve Singh, K.B. (1997), "Analysis of type 1metallothionein cDNAs in *Vicia faba*", Plant Molecular Biology, 33:583-591.

Gardiner, D.T., Miller, R.W., Badamchian, B., Azzari, A.S., Sisson, D.R. (1995), "Effects of repeated sewage sludge applications on plant accumulation of heavy metals", Agriculture, Ecosystems and Enrironment, 55:1-6.

Gould, J.H. ve Cedeno, M.M. (1998), "Adaptation of cotton apex culture to *Agrobacterium*-mediated transformation", Plant Molecular Biology Reporter, 16:1-10.

Gregory, S.R., Hernandez, E. ve Savoy, B.R. (1999), Cotton: Origin, history, technology and production, John Wiley and Sons.

Gupta, S.K., Srivastava, A.K., Singh, P.K. ve Tuli, R. (1997), "*In vitro* proliferation of shoots and regeneration of cotton", Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 51: 149-152.

Gümgüm, B., Ünlü, E., Tez, Z., Gülşin, Z. (1994), "Heavy metal pollution in water, sediment and fish from the Tigris river in Turkey", Chemosphere, 29:111-116.

Gürel, E., Uçar Türker, A. (2001), Bitki Biyoteknolojisi Kitabı-I. Doku Kültürü ve Uygulamaları: Bölüm 2 Organogenesis, S.Ü. Vakfı Yayınları.

Gürel, A., Avcıoğlu, R. (2001), Bitki Biyoteknolojisi, Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları: Bölüm 21 Bitkilerde Strese Dayanıklılık Fizyolojisi, S.Ü. Vakfı Yayınları.

Hall, J.L. (2002), "Cellular mechnism for heavy metal detoxification and tolerance", Journal of Experimental Botany", 53:1-11.

Hart, J.J., Welch, R.M., Norvell, W.A., Sullivan, L.A., Kochian, L.V. (1998), "Characterization of cadmium binding, uptake, and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars", Plant Physiol., 116:1413-1420.

Hatipoğlu, R. (1997), Bitki Biyoteknolojisi, Ç.Ü. Ziraat Fak. Ofset Atölyesi, Adana.

Hemphill, J.K., Maier, C.G.A., Chapman, K.D. (1998), "Rapid *in vitro* plant regeneration of cotton", Plant Cell Report, 17:273-178.

Hudspeth, H.L., Hobbs, S.L., Anderson, D.M., Rajasekaran, K. Ve Grula, J.W. (1996), "Characterization and expression of Metallothionein-like genes in cotton", Plant Molecular Biology, 31:701-705.

Jones, D.L. (1998), "Organic acids in the rhizosphere a critical review", Plant and Soil, 205:25-44.

Kaçar, B. (1972), Bitki ve toprağın kimyasal analizleri, Ankara Üniv. Ziraat fak. Yayınları.

Kagi, J.H.R. ve Schaffer, A. (1988), "Biochemistry of Metallothionein", Biochemistry, 27:8509-8515.

Kennedy, C.D. ve Gonsalves, F.A.N. (1987), "The action of divalent zinc, cadmium, mercury, copper and lead on the trans-root potential and H⁺ efflux of excised roots", J Exp. Bot.,

38:800-817.

Kumar, S., Sharma, P., Pental, D. (1998), "A genetic approach to in vitro regeneration of non-regenerating cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars", *Plant Cell Reports*, 18:59-63.

Lendberg, T. Ve Greger, M. (1996), "Differences in uptake and tolerance to heavy metals in *Salix* from unpolluted and polluted areas", *Applied Geochemistry*, 11:175-180.

Lidon, F.C., Henriques, F.S. (1998) "Role of rice shoot vacuoles in copper toxicity regulation", *Environmental and Experimental Botany*, 39:197-202.

Lin, J., Jiang, W., Liu, D. (2003), "Accumulation of copper by roots, hypocotyls, cotyledons and leaves of sunflower (*H. annuus* L.)", *Bioresource Technology*, 86:151-155.

Liu, J.R., Suh, M.Ch., Choi, D. (2000), "Phytoremediation of cadmium contamination: Overexpression of metallothionein in transgenic tobacco plants", *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz*, 43:126-130.

Luo, J. ve Gould, J.H. (1999), "In-vitro shoot-tip grafting improves recovery of cotton plants from culture", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 57:211-213.

Macfie, S.M. ve Wellbourn, P.M., (2000), "The cell wall as a barrier to uptake of metal ions in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae)", *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39: 413-419.

Marchiol, L., Leita, L., Martin, M., Peressotti, Z.G. (1996), "Physiological responses of two soybean cultivars to cadmium", *J. Environ. Quality*, 25:562-566.

Marschner, H. (1986), *Mineral Nutrition in Higher Plants*, Academic Press pp 287.

Mejare, M. ve Bülow, L. (2001), "Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation on heavy metals", *Trends in Biotechnology*, 19:67-73.

Memon, A.R., Ito, S. Ve Yatazawa, M. (1979), "Absorption and accumulation of iron, manganese and copper in plants in the temperate forest of central Japan", *Soil Sci. Plant Nutr.*, 25:611-620.

Memon, A.R. and Yatazawa, M. (1982), "Chemical nature of manganese in the leaves of manganese accumulator plants", *Soil Sci. Plant Nutr.*, 28:401-412.

Memon, A.R., Clark, G.B. ve Thompson, G.A. (1993), "Identification of an ARF type low molecular mass GTP-binding protein in pea", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 193:809-813.

Memon, A.R., Özdemir, A., Cevher, B., Bıçakçı, E., Kumbaracı, M., Gencer, O. (2000), "Characterisation and Expression of Heavy Metal Induced Genes in Cotton Grow Southern Region of Turkey", *The Inter-Regional Cooperative Research Network on Cotton. Adana – TURKEY*.

Memon, A.R., Aktopraklıgil, D., Özdemir, A., Vertii, A. (2001), "Heavy metal accumulation and detoxification mechanisms in plants", *Turk J. Bot.*, 25:111-121.

Morre, J.L., Permingeat, H.R., Romagnoli, M.V., Heisterborg, C.M., Vallejos, R.H. (1998), "Multiple shoot induction and plant regeneration from embryonic axes of cotton", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 54:131-136.

Murashige, T. Ve Skoog, F. (1962), "A revised medium for rapid growth of and bioassays

withtobacco tissue cultures", *Physiol Plant*, 15:473-497.

Murashige, T. (1974), "Plant propagation through tissue culture", *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25:135-166.

Nigam, R., srivastava, S., Prakash, S. Ve Srivastava, M.M. (2001), "cadmium mobilisation and plant availability – the impact of organic acids commonly exuded from roots", *Plant and Soil*, 230:107-113.

Ouzounidou, G., Moustakas, M, Eleftheriou, E.P. (1997), "Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves", *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 32:154-160.

Peijnenburg, W., Baerselman, R., Grut, A., Jager, T., Leenders, D., Posthuma, L., Veen, R.V. (2000), "Quantification of metal bioavailability for lettuce (*Lactuca sativa* L.) in field soils", *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 39:420-430.

Pence, N.S., larsen, P.B., Ebbs, S.D., Letham, D.L.D., Lasat, M.M., Garvin, D.F., Eide, D., Kochian, L.V. (2000), "The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*", *PNAS*, 97:4956-4960.

Peralta, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., Tiemann, K.J., Gomez, E., Arteaga, S., Rascon, E., Parsons, J.G. (2001), "Uptake and Effects of five heavy metals on seed germination and plant growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.)", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 66:727-734.

Rani, A. ve Bhojwani, S.S. (1976), "Establishment of tissue cultures of cotton", *Plant Sci. Lett.*, 7:163-169.

Rauser, W.E. (2000), "The role of thiols in plants under metal stress", *Sulfur Nutrition and Sulfur Assimilation in Higher Plants*, pp.169-183.

Rayan, P.R., Delhaize, E. ve Randall, P.J. (1995), "Malate efflux from root apices and tolerance to aluminum and highly correlated in wheat", *Aust J. Plant Physiol.*, 22:531-536.

Reilly, C. (1972), "Amino acids and amino copper complexes in water-soluble extracts of copper-tolerant and non-tolerant *Becium homblei*", *Z. Pflanzenphysiol*, 66:294-296.

Robinson, N.J.,Tommey, A.M., Kuske, C. Ve Jackson, P.J. (1993), "Plant Metallothioneins", *Biochem. J.*, 295:1-10.

Saeed, N.A., Zafer, Y. Malik, K.A. (1997), "A simple procedure of Gossypium meristem shoot tip culture", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51:201-207.

Salisbury, F. B. ve Ross, C.W. (1985), *Plant Physiology*, Wadsworth Publishing Company.

Salt, D.E., Prince, R.C., Pickering, I.J., Raskin, I. (1995), "Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian Mustard", *Plant Physiol.* 109:1427-1433.

Salt DE, Blaylock M, Kumar PBAN, Dushenkov V, Ensley BD, Chet I and Raskin I (1996) Phytoremediation: a novel starategy for removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology* 13: 468- 474

Salt, D.E., Prince, R.C. ve Pickering, I.J. (2002), "Chemical speciation of accumulated metals in plants: evidence from X-ray absorption spectroscopy", *Microchemical Journal*, 71:255-259.

Sambrook, J.R., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T., (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory*

Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schützendübel, A., Polle, A. (2002), "Plant responses to abiotic stresses: heavy metal induced oxidative stress and protection by mycorrhization", *Journal of Experimental Botany*, 53:1351-1365.

Siedlecka, A. ve Krupa, Z. (1999), "Cd/Fe interaction in higher plants-its consequences for the photosynthetic apparatus", *Photoynthetica*, 36:321-331.

Steffans, J.C. (1990), "The heavy metal- binding peptides of plants", *Ann Review Plant Physiol and Plant Mol. Biol.*, 41:553-575.

Stillman, M.J. (1995), "Metallothioneins", *Coordination Chemistry Reviews*, 144:461-511.

Sunilkumar, G. ve Rathore, K.S. (2001), "Transgenic cotton: factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration", *Molecular Breeding*, 8:37-52.

Tiffin, L.O. (1972), "Translocation of micronutrients in plants. In *Micronutrients in agriculture*", Soil Sci. Soc. America, Inc. Madison, Wisconsin, U.S.A.

Toppi, L.S., ve Gabrielli, R. (1999), "Response to cadmium in higher plants", *Environmental and Experimental Botany*, 41:105-130.

Umbeck, P., Johnson, G., Barton, K. Ve Swain, W. (1987), "Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants", *Bio/Technology*, 5:263-266.

Van Asche, F. ve Clijsters, H. (1990), "Effects of metals on enzyme activity in plants", *Plant Cell and Environment*, 13:195-206.

Vasak, M. ve Hasler, D.W. (2000), "Metallothioneins: newfunctional and structural insights", 4:177-183.

Vasconcelos, M.T.S.D., ve Leal, M.F.C. (2001), "Antogonistic interactions of Pb and Cd on Cu uptake, growth inhibition and chelator release in the marine algae", *Marine Chemistry*, 75:123-139.

Vliet, V.C., Andersen, C.R. ve Cobbett, C.S. (1995), "Copper sensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*", *Plant Physiol.*, 109:871-878.

Wagner, G.J. (1993), "Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health", *Advances in Agronomy*, 51:173-212.

Weigel, H.J. (1985), "The effect of Cd²⁺ on photosynthetic reactions of mesophyll protoplasts", *Physiol. Plant*, 63:192-200.

Yang, Y.Y., Jung, J.Y., Song, W.Y., Suh, H.S., Lee, Y. (2000), "Identification of rice varieties with high tolerance or sensitivity to lead and characterization of the mechanism of tolerance", *Plant Physiol.*, 124:1019- 1026.

Zapata, C., Srivatanakul. M., Park. S.H., Lee, B.M., Salas, M.G. ve Smith, R.H. (1999), "Improvement in shot apex regeneration of two fiber crops: cotton and kenaf", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 56:185-191.

Zenk, M.H. (1996), "Heavy metal detoxification in higher plants-a review", *Gene*, 179:21-30.

Zhang, B.H., Liu, F. ve Yao, C.B. (2000), "Plant regeneration via somatic embryogenesis in cotton", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60:89-94.

- Zhang, B.H., Feng, R., Liu, F. ve Wang, Q. (2001), "High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety", *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 42:9-16.
- Zheng, S.J., Ma, J.F., Matsumoto, H. (1998), "High aluminum resistance in buckwheat: I. Al induced specific secretion of oxalic acid from root tips", *Plant physiol.*, 117:745-751.
- Zhu, Y.L., Pilon-Smits, E.A.H., Tarun, A.S., Weber, S.U., Jouanin, L., Terry, N. (1999), "Cadmium tolerance and accumulation in Indian Mustard is Enhanced by overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase", *Plant Physiology*, 121:1169-1171.

INTERNET KAYNAKLARI

- [1] www.hc-sc.gc.ca/ehp/ehd/catalogue/bch_pubs/dwgsup_doc/cadmium.pdf
- [2] www.factmonster.com/ceb/sci/A0857607.html
- [3] www.amap.no/assess/soaer7.htm
- [4] www.aphis.usda.gov.
- [5] www.fao.org

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	10.05.1977	
Doğum yeri	İstanbul	
Lise	1991-1994	İstanbul Pertevniyal Lisesi
Lisans	1994-1998	İstanbul Üniversitesi Fen Fak. Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans	2000-2003	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoloji Programı

Çalıştığı kurum(lar)

1998-Devam ediyor YTÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
Araştırma Görevlisi