

Kurşun Stresinin Bazı Ss Bitkilerinde Protein Metabolizmasına Etkileri

Nurselin Yılmaz

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Ocak 2021

Effects of Lead Stress on Protein Metabolism in Some Ornamental Plants

Nurselin Yılmaz

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Agricultural Biotechnology

January 2021

Kurşun Stresinin Bazı Süs Bitkilerinde Protein Metabolizmasına Etkileri

Nurselin Yılmaz

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Sergül Ergin

Ocak 2021

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Dr. Öğr. Üyesi Segül Ergin danışmanlığında hazırlamış olduğum " Kurşun Stresinin Bazı Süs Bitkilerinde Protein Metabolizmasına Etkileri" başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik, ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri, akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 08/01/2021

Nurselin YILMAZ

ÖZET

Kurşun stresinin, hiperakümülatör bitki olarak bilinen kına çiçeği (*Impatiens balsamina* L. 'Pink Single') ve süs lahanasının (*Brassica oleracea* L. var. *Acephala* 'Nagoya Purple') protein metabolizması üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada, çeşitlere ait tohumlar torf içeren viyollere ekilmiş ve fideler 3-4 gerçek yapraklı hale geldikten sonra torf, toprak ve perlit (1:1:1) karışımı içeren 17x18 cm boyutlarındaki saksılara şaşırtılarak 22/18°Cde (gündüz/gece) ve %65 nemde sera koşullarında yetiştirilmiştir. Fideler 6 haftalık olduklarında iki günde bir 150 ml/saksı olacak şekilde üç farklı kurşun nitrat Pb (NO₃)₂ çözeltisi (100 ppm, 200 ppm ve 400 ppm) ile 6 hafta boyunca muamele edilmiştir. Kontrol bitkileri ise saf su ile sulanmıştır. Bitkilerin yaprak dokularında hücrel zararlanma, toplam klorofil miktarı, prolin miktarı, toplam çözünebilir protein miktarı, SDS PAGE ve immunblot analizleri yapılmıştır. Ayrıca, bitkilerin toprak üstü aksam yaş ve kuru ağırlıkları ile kök yaş ve kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Kurşun konsantrasyonu arttıkça her iki bitki türünde de hücrel zararlanmanın arttığı, yaprak oransal su kapsamının azaldığı, turgor kaybının arttığı belirlenmiştir. Toplam klorofil miktarı, toprak üstü aksam yaş ve kuru ağırlıklar ile kök yaş ve kuru ağırlıklarının kurşun uygulamalarından etkilenmediği görülmüştür. Kına çiçeğinin prolin miktarı kurşun nitrat konsantrasyonuna bağlı olarak artarken, süs lahanasında ise azalmıştır. Toplam çözünebilir protein miktarının, kına çiçeğinde konsantrasyon artışı ile birlikte azaldığı tespit edilirken, süs lahanasında ise bütün konsantrasyonlarda kontrolden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. SDS PAGE'de uygulamalara göre değişen 17 kDa ve 137 kDa aralığında birçok protein bandı tespit edilmiştir. Yapılan immunblot analizleri sonucunda HSP 60'ın her iki türde de kurşun stresinde biriktiği ve yoğunluğunun yüksek konsantrasyonlarda daha fazla olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla HSP 60'ın bu iki süs bitkisinde kurşun stresine toleransta rolü olduğu belirlenmiştir. HSP 23'ün kına çiçeğinde kurşun stresine toleransta önemli bir etkisi belirlenmezken, süs lahanasında ise özellikle 200 ppm'de etkin bir rolünün bulunduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kına çiçeği, Süs lahanası, Kurşun, Protein

SUMMARY

In this study, the effects of lead stress on the protein metabolism of the garden balsam (*Impatiens balsamina* L. 'Pink Single') and the ornamental kale (*Brassica oleracea* L. var. *Acephala* 'Nagoya Purple'), which are known as hyperaccumulator plants, were investigated. The seeds were planted in viola with peat. The seedlings were transplanted into pots with a size of 17x18 cm, containing a mixture of peat, soil, and perlite (1:1:1), at 3-4 true leaves stage. Plants were grown in greenhouse conditions at 22/18°C (day/night) temperature with a relative humidity of ≈65 %. Three different concentrations of lead nitrate (Pb (NO₃)₂) solution (100 ppm, 200 ppm, and 400 ppm) were applied to 6-week old seedlings every two days at 150 ml/pot for 6 weeks. Control plants were irrigated with distilled water. The degree of cell injury, leaf relative water content, turgor losses, total chlorophyll content, proline amount, total soluble protein amount, SDS PAGE and immunoblot analysis were examined in leaf tissues of plants. Besides, fresh and dry weights of aboveground parts and roots were determined. Cellular damage was increased with the lead concentration increased, relative water content was decreased and turgidity loss was increased in leaves in both species. Also, it was determined that the lead applications did not cause any significant changes in the total chlorophyll amount, the wet and dry weight of the aboveground parts, and the fresh and dry weight of roots. Furthermore, it was found that the proline amount of the garden balsam increased with the concentrations, but it was decreased in the ornamental kale. It has been observed that the total amount of soluble proteins decreases with increasing concentrations according to the control in the garden balsam, while it was higher in all concentrations in ornamental kale. This situation occurs in higher concentrations in the ornamental kale. Many protein bands were detected in SDS PAGE varying between 137 kDa and 17 kDa, depending on the applications. As a result of the immunoblot analysis, it was determined that HSP 60 accumulated under lead stress in both species and its density was higher at high concentrations. Therefore, HSP 60 has been associated with tolerance to lead stress in both ornamental plants, while any significant effect of HSP 23 on tolerance to lead stress was not observed in the garden balsam but it had an effective role in the ornamental kale, especially at 200 ppm.

Keywords: Garden balsam, Ornamental kale, Lead, Protein

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	7
3. MATERYAL VE YÖNTEM	22
3.1. Materyal	22
3.2. Yöntem.....	23
3.2.1. Kurşun nitrat [Pb (NO ₃) ₂] uygulamaları.....	23
3.2.2. Hücre membran zararlanma oranı.....	24
3.2.3. Yaprak oransal su kapsamı (YOSK) ve turgor kaybı (TK).....	25
3.2.4. Toplam klorofil miktarı	25
3.2.5. Gövde ve kök yaş-kuru ağırlığı.....	26
3.2.6. Prolin miktarı	26
3.2.7. Toplam çözünebilir protein analizi	27
3.2.8. SDS-PAGE analizi	27
3.2.9. İmmünblot (Western Blot) analizi	30
3.3. Verilerin Değerlendirilmesi	32
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	33
4.1. Hücre Membran Zararlanma Oranı	33
4.2. Yaprak Oransal Su Kapsamı (YOSK) ve Turgor Kaybı (TK)	34
4.3. Toplam Klorofil Miktarı	36

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.4. Gövde ve Kök Yaş-Kuru Ağırlığı	37
4.5. Prolin Miktarı	41
4.6. Toplam Çözünebilir Protein Miktarı	42
4.7. SDS-PAGE.....	44
4.8. İmmünblot (Western Blot).....	46
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	53
EK AÇIKLAMALAR.....	72
EK AÇIKLAMALAR (devam)	73
Ek Açıklamalar-A: Kına çiçeği Zararlanma Oranı (%).....	74
Ek Açıklamalar-B: Süs lahanası Zararlanma Oranı (%)	75
Ek Açıklamalar-C: Kına çiçeği Yaprak Oransal Su Kapsamı (%)	76
Ek Açıklamalar-D: Süs lahanası Yaprak Oransal Su Kapsamı (%).....	77
Ek Açıklamalar-E: Kına çiçeği Turgor Kaybı (%).....	78
Ek Açıklamalar-F: Süs lahanası Turgor Kaybı (%)	79
Ek Açıklamalar-G: Kına çiçeği Toplam Klorofil Miktarı (mg/g TA).....	80
Ek Açıklamalar-H: Süs lahanası Toplam Klorofil Miktarı (mg/g TA)	81
Ek Açıklamalar-F: Kına çiçeği Gövde Yaş Ağırlığı (g).....	82
Ek Açıklamalar-G: Süs lahanası Gövde Yaş Ağırlığı (g).....	83
Ek Açıklamalar-H: Kına çiçeği Kök Yaş Ağırlığı (g).....	84
Ek Açıklamalar-I: Süs lahanası Kök Yaş Ağırlığı (g).....	85
Ek Açıklamalar-J: Kına çiçeği Gövde Kuru Ağırlığı (g)	86
Ek Açıklamalar-K: Süs lahanası Gövde Kuru Ağırlığı (g).....	87
Ek Açıklamalar-L: Kına çiçeği Kök Kuru Ağırlığı (g)	88
Ek Açıklamalar-M: Süs lahanası Kök Kuru Ağırlığı (g).....	89
Ek Açıklamalar-N: Kına çiçeği Prolin Miktarı (µM Prolin/gTA)	90
Ek Açıklamalar-O: Süs lahanası Prolin Miktarı (µM Prolin/gTA).....	91
Ek Açıklamalar-P: Kına çiçeği Toplam Çözünebilir Protein (mg protein/gTA)	92
Ek Açıklamalar-R: Süs lahanası Toplam Çözünebilir Protein (mg protein/gTA)	93

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Kına çiçeğinin genel görünümü (a) ve süs lahanasının genel görünümü (b).....	22
3.2. Fidelerin çıkış aşamasındaki görünümü. Kına çiçeği (a), süs lahanası (b).....	23
3.3. Şaşırtma işlemi sonrası bitkilerin görünümü. Kına çiçeği (a), süs lahanası (b)...	24
3.4. Kurşun nitrat uygulamaları başlangıcında bitkilerin görünümü. Kına çiçeği (a), süs lahanası(b).....	24
4.1. Kurşun nitrat uygulamalarının (a) kına çiçeği ve (b) süs lahanası bitkilerinin yapraklarındaki hücre membran zararlanması. Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS' larını göstermektedir.....	33
4.2. Kurşun nitrat uygulamasına bağlı olarak (a) kına çiçeği ve (b) süs lahanası bitkilerinin yapraklarındaki yaprak oransal su kapsamı (YOSK). Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS' larını göstermektedir.....	34
4.3. Kurşun nitrat uygulamalarına bağlı olarak (a) kına çiçeği ve (b) süs lahanası bitkilerinin turgor kaybındaki (TK) değişimi. Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS' larını göstermektedir.....	35
4.4. Kurşun nitrat uygulamalarına bağlı olarak (a) kına çiçeği ve (b) süs lahanası bitkilerinde toplam klorofil miktarı. Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS' larını göstermektedir.....	36
4.5. Kurşun nitrat uygulamalarına bağlı olarak (a) kına çiçeği ve (b) süs lahanası bitkilerinde gövde yaş ağırlığı. Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS' larını göstermektedir.....	38
4.6. Kurşun nitrat uygulamalarına bağlı olarak (a) kına çiçeği ve (b) süs lahanası bitkilerinde kök yaş ağırlığı. Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS' larını göstermektedir.....	38
4.7. Kurşun nitrat uygulamalarına bağlı olarak (a) kına çiçeği ve (b) süs lahanası bitkilerinde gövde kuru ağırlığı. Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS' larını göstermektedir.....	39
4.8. Kurşun nitrat uygulamalarına bağlı olarak (a) kına çiçeği ve (b) süs lahanası bitkilerinde kök kuru ağırlığı. Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS' larını göstermektedir.....	40

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.9. Kurşun nitrat uygulamalarına bağlı olarak (a) kına çiçeği ve (b) süs lahanası bitkilerinde prolin miktarı. Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS' larını göstermektedir.....	41
4.10. Kurşun nitrat uygulamalarına bağlı olarak (a) kına çiçeği ve (b) süs lahanası bitkilerinde toplam çözünebilir protein miktarı. Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS' larını göstermektedir.....	43
4.11 Kurşun nitrat uygulamalarına bağlı olarak kına çiçeği ve süs lahanası bitkilerinde SDS-PAGE protein profilleri. MA: Moleküler ağırlık standardı (kDa).....	45
4.12. Kurşun nitrat uygulamalarına bağlı olarak kına çiçeği ve süs lahanası bitkilerinde HSP 60 proteininin görünümü (a) ve HSP 60 proteinin bant yoğunluğu (b).....	46
4.13. Kurşun nitrat uygulamalarına bağlı olarak kına çiçeği ve süs lahanası bitkilerinde HSP 23 proteininin görünümü (a) ve HSP 23 proteinin bant yoğunluğu (b).....	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Kurşun metali ile ilgili genel bilgiler.....	7

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
BSA	Bovine Serum Albümin
HSP	Isı Şoku Proteini (Heat Shock Protein)
sHSP	Küçük Isı Şoku Proteini (Small Heat Shock Protein)
PVPP	Polivinilpolipirrolidon
rpm	Dakikadaki Dönme Sayısı (Revolution Per Minute)
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TBS	Tris Buffer Saline
TBST	Tris Buffer Saline Tween-20
TCA	Trikloro Asetik Asit
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametiletildiamin
TA	Taze Ağırlık
YOSK	Yaprak Oransal Su Kapsamı
TK	Turgor Kaybı
TÇP	Toplam Çözünebilir Protein
SS	Standart Sapma
dH ₂ O	Saf Su
EC	Elektriksel İletkenlik
KM	Klorofil Miktarı
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
DMF	Dimethylformamide (Dimetilformamid)
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mM	Milimolar
DTT	Dithiothreitol

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Büyüme, gelişme ve metabolizmayı olumsuz yönde etkileyecek kadar değiştiren veya bunu engelleyebilen durumların meydana gelmesine stres denir (Levitt, 1980). Doğaları gereği sürekli değişen stres faktörlerine maruz kalan bitkiler bu stres etmeninden uzaklaşarak kaçınma gibi bir seçeneğe sahip olamadıklarından stresle doğrudan yüzleşirler (Al-Whaibi, 2011). Bitkiler yaşamları boyunca birden fazla stres etmeni ile karşılaşmaktadırlar. Bu stres faktörleri biyotik ve abiyotik olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır. Biyotik faktörler; mikroorganizmaların (fungus, bakteri ve virüs) enfeksiyonu ve zararlı hayvanların (böcekler, nematodlar) saldırıları sonucu oluşmaktadır. Abiyotik faktörler ise; su, sıcaklık, kuraklık, tuzluluk, oksidatif stres, radyasyon, manyetik alanlar, çeşitli kimyasallar (zirai ilaçlar, endüstriyel kirleticiler vb.) ve ağır metaller gibi çevresel faktörler sebebiyle ortaya çıkmaktadır (Levitt, 1980).

Abiyotik stres faktörleri bitkilerin büyümesini, gelişimini, verimini ve tohum kalitesini olumsuz yönde etkilemekte ve aynı zamanda birbirleriyle bağlantılı olup ozmotik stres, iyon dağılımı ve bitki hücresi homeostazisinde bozulma şeklinde de zararlar meydana getirmektedirler. Abiyotik faktörler, bitkisel üretimde verimin yaklaşık %70'inin azalmasına sebep olmakta ve dolayısıyla tarımsal üretim için büyük bir kısıt olarak kabul edilmektedir. Bu durum, bitkisel üretim ile nüfus artışı arasındaki bozulmuş denge nedeni ile daha da kötüleşmiştir (Acquaah, 2007; Jewell vd., 2010).

Ağır metallerin neden olduğu toprak kirliliği küresel ölçekte en önemli çevre sorunlarından birisidir (Wuana vd., 2011). Atomik yoğunluğu 5 g/cm^3 'ten daha fazla olan metal ve metaloitler grubu ağır metalleri oluşturmaktadır. Bazı temel ağır metaller arasında krom (Cr), demir (Fe), bakır (Cu), nikel (Ni), çinko (Zn), kobalt (Co), civa (Hg), kurşun (Pb), kadmiyum (Cd) olmak üzere 60'tan fazla metal çeşidi bulunmaktadır (Baba vd., 2009). Çevreye doğal ve yapay bir şekilde eklenen ağır metaller, çevre ve toprakta karmaşık yapılar oluşturdukları için tehlikeli kirleticiler olarak tanımlanırlar.

Ağır metaller çevrede biyolojik olarak parçalanmadığı için genellikle kolayca birikebilmekte ve toksik etkileri daha da artıracak oldukça karmaşık yapılar oluşturabilmektedirler (Sarı, 2009).

Topraktaki ağır metallerin kaynağı toprağın oluşumu sırasında meydana gelen etkiler olabildiğı gibi mineral gübreler, madencilik ve endüstriyel faaliyetler, pestisitler, kanalizasyon atıkları, kentsel atıklar ve motorlu araçların egzoz gazları ile ağır metal içeren kayaların çeşitli nedenlerle çözünerek su ve toprak ortamına taşınmasıdır (nder, 2012; Seven vd., 2018).

Ekosfere ulaşan ağır metallere Zn, Co, Mn (mangan), Cu, Ni ve Mo (molibden) bitki gelişimi için mutlak gerekli iken Al (alüminyum), V(vanadyum), Cd, As (arsenik), Hg, Pb ve Se (Selenyum) toksik etkilidir (Shanker vd., 2005; Seven vd., 2018).

Bitki gelişimi için mutlak gerekli element olsun veya olmasın doku ve organlarda aşırı biriken ağır metallerin sebep olduğu bu stresin, yalnızca ekosistem işlevi ve toprak verimliliğı üzerine değil bununla birlikte besin zinciri aracılığıyla insan ve hayvan sağlığı üzerinde de ciddi etkileri mevcuttur. Bitki bünyesine geçen ve burada biriken bu ağır metaller fizyolojik aktiviteyi engeller, ürün verimliliğı ve kaliteyi düşürür ve sonuçta bitki ölümlerine sebep olabilir (Asri ve Sönmez, 2006).

Bitkiler farklı derecelerde toksisiteye sahip yüksek ağır metal konsantrasyonlarına maruz kaldığında birçok fizyolojik ve metabolik değişiklikler ortaya çıkmaktadır (Dubey, 2011; Villiers vd., 2011). Bitki büyümesinde azalma, yaprak klorozu, nekroz, tohum çimlenmesinde azalma, turgor kaybı, senesense neden olan fotosentetik yapının zarar görmesi ve hücre ölümü gibi semptomlar ağır metal toksisitesine bağlı olarak gerçekleşmektedir (Carrier vd., 2003; Dalcorsio vd., 2010). Ağır metal maruziyeti, bitki hücresi ve dokularında yapısal, biyokimyasal ve moleküler düzeyde değişikliklere neden olmaktadır (Gamalero vd., 2009).

Yüksek ağır metal konsantrasyonlarında, bitkilerde toksisite semptomları, esas olarak metallerin sülfidril grubu proteinlere bağlanması, yapıyı bozması ve aktivitesinin inhibisyonuna yol açması gibi hücresel düzeydeki etkileşimlerinden dolayı belirgin hale gelmektedir (Van Assche ve Clitjers, 1990; Hall, 2002).

Bitkilerin bu faktörlerin etkisini elimine etmesi, azaltması veya onarması ise bitki ve element türüne, stres etkisinde kalınan süreye, konsantrasyona, bitkinin gelişim evresine ve strese maruz kalan organ veya dokuların yapısına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Levitt, 1980). Bitkilerin gelişimi ve yaşayabilirliği için ağır metallerin cinsi ve miktarı, kullanışlılığı, hasarın şiddeti ile hasar oluşum süreci hakkındaki bilgiler önem arz etmektedir (Asri ve Sönmez, 2006). Bitkiler toksik seviyedeki metallere karşı çeşitli cevaplar geliştirmişlerdir. Bunlardan bazıları metallerin seçici alınımı, boşaltımı, spesifik ligantlar ile bir kompleks oluşturması ve iç detoksifikasyon mekanizmalarıdır (Gupta vd., 2009; Krzeslowska vd., 2011; Maestri vd., 2010; Singh vd., 2010; Jiang ve Liu, 2010).

Isı şoku proteinleri (HSP), abiyotik stres toleransı sağlanmasında anahtar rol oynar. Bitkiler, strese duyarlı bazı proteinlerin yanı sıra HSP'leri indükleyerek kendilerini çok sayıda stresden korurlar. HSP'lerin biyolojik işlevi, hücredeki diğer proteinlerin "kalite kontrol" ünü sürdürmek ve proteinin "yaşam, yaşlanma, hastalık ve ölüm" sürecinde önemli bir rol oynamaktır. Bu nedenle, çeşitli streslere karşı bitki tepki mekanizmalarını ve HSP'nin edinilmiş stres toleransındaki rolünü çözmek, strese duyarlılık modülünün bir parçası olarak spesifik işlevlerini tanımlamak için son derece önemlidir (Mishra vd., 2018). Örneğin; HSP70 geninin induksiyonu normalde metal kirliliği ile ilişkili toksisitenin saptanması için bir kriter olarak kabul edilmiş (Ai't-Ai'ssa vd., 2003), ve bu nedenle HSP70, çevresel kirlenmeyi ve toksik kimyasalların kara ve suda yaşayan hayvanlar ile bazı bitki türleri üzerindeki zararlı etkilerini izlemek için biyolojik belirteç olarak kullanılmıştır (Cajaraville vd., 2000; Cruz-Rodriguez ve Fu-Lin, 2002; Radenac vd., 2001; Triebkorn vd., 2002; Wang vd., 2008).

Ağır metallerin topraktan arındırılması için bazı uygulamalar da söz konusudur. Bunlar; toprağın kazılıp başka bir atık alanına gömülmesi, camlaştırma (vitrifikasyon), kimyasal uygulamalar, elektrokinetik arıtım ve fitoremediasyon uygulamalarıdır.

Bu uygulamaların çoğu, yüksek miktarlarda maliyet gerektirirken, toprağın yerinde arıtılacağı bir arıtım teknolojisi olan fitoremediasyonun kullanımı ise çok daha ekonomik bir yol olarak görülmektedir (Esringü, 2012).

Çevredeki ağır metal gibi kirleticileri bünyesine alarak, kök ve toprak üstü organlarda biriktirmek ya da bunların zararsız hale getirilmesi amacıyla yeşil bitkilerin kullanıldığı tekniğe fitoremediasyon (bitkisel iyileştirme) denilmektedir (Ashraf vd., 2010). İlk defa Chaney (1983) tarafından önerilen fitoremediasyon terimi, Yunanca “bitki” anlamına gelen “phyto” ile Latince “iyileştirme” veya “düzeltme” anlamına gelen “remedium” kelimelerinden gelmektedir (Laghlimi vd., 2015, Khalid vd., 2017). Bu teknoloji son zamanlarda, tehlikeli atık sahalarında kullanılan daha gelişmiş arıtma yöntemlerine yenilikçi ve uygun maliyetli bir alternatif olarak dikkat çekmektedir (EPA, 2000)

Fitoremediasyonda kullanılan bitkiler, toprakta var olan metal miktarından çok daha fazlasını toprak üstü kısımlarında biriktirebilen hiperakümülatör bitkilerdir (Baker ve Walker 1990) Hiperakümülatör bitkiler toprak üstü aksamlarına, topraktaki metal yoğunluğunun 50 ile 500 kat daha fazlasını depolayabilen bitki grubudur (Clemens, 2006). Ayrıca, bu bitkiler diğer bitki türlerine göre ağır metalleri herhangi bir toksisite semptomu göstermeksizin toprak üstü aksamlarında, 100-1000 kat daha fazla biriktirebilme yeteneğine sahiptirler (Brooks, 1998). Hiperakümülatör özellikte ortalama 450 bitki türü (angiospermilerin sadece %0,2’si) belirlenmiştir (Reeves, 2006). *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Euphorbiaceae*, *Balsaminaceae* familyaları hiperakümülatör olarak tanımlanmış başlıca familyalardandır (Assunção, vd., 2003).

Dış mekân süs bitkileri genellikle, parklarda, bahçelerde, yollarda ve çevre düzenlenmesinde kullanılan bitkilerdir. Bu bitkiler; kullanıldıkları alanı güzelleştirmenin dışında sosyal, kültürel, insan ve çevre sağlığı ve turizm açısından çok büyük öneme sahiptirler (Hocagil vd., 2012). Son yıllarda, diğer remediasyon bitkilerinin aksine, peyzaj tasarım projelerinde kullanılan ve bahçelerde dekoratif amaçlı yetiştirilen süs bitkileri remediasyonda önemli bir kaynak haline gelmiştir.

Bazı süs bitkileri, çevreyi güzelleştirmenin yanı sıra, aynı zamanda ağır metaller veya organik kirleticilerle kirlenmiş toprakta büyürken kirletici maddeleri biriktirebilir veya yapısını bozabilirler (Liu vd., 2019).

Daha önce yapılmış çalışmalarda, *Tagetes erecta*, *Salvia splendens*, *Abelmoschus manihot* (Wang ve Zhou, 2005), *Impatiens balsamina*, *Calendula officinalis*, *Althaea rosea* (Liu vd., 2008), *Lonicera japonica* (Liu vd., 2009), *Chlorophytum comosum* (Wang vd., 2012), *Mirabilis jalapa*, *Tagetes erecta L.* (Miao ve Yan, 2013), *Quamolit pennata*, *Antirrhinum majus L.* ve *Celosia critata pyramidalis* (Cui vd., 2013) ve *Brassica oleraceae* (Akın ve Kahraman, 2018) gibi süs bitkilerinin fitoremediasyon amacıyla kullanıldığı belirtilmiştir.

Bu tür bitkileri kullanmanın en önemli avantajı, bu bitkilerin çoğunun canlıların besin zincirine girmemesidir. Özellikle kirli kentsel alanlarda, süs bitkilerinin fitoremediasyonda kullanılması gelecekte büyük önem kazanacaktır. Bu tür iyileştirmeler, tarımsal olarak kullanılmayan arazilerin temizlenerek kullanılmasına da katkı sağlayabileceklerdir (Miao ve Yan, 2013; Liu vd., 2019).

Impatiens balsamina L. ‘Pink Single’, *Balsaminaceae* familyasının *Impatiens* cinsi içerisinde yer almaktadır. Mevsimlik, tek yıllık bitkilerdendir, bahçe ve balkonlarda yetiştirilebilir, güneşli ve yarı gölge ortamları sever. Kenarları ince dişli yeşil yaprakları ve yapraklarının dibinden çıkan renk renk katmerli ve katmersiz olmak üzere pek çok renkte açan çiçekleri vardır (Anonim, 2019).

Brassica oleracea L. var. Acephala ‘Nagoya Purple’, bir dış mekan süs bitkisi olup, *Brassicaceae* familyasının *Brassica* cinsi içerisinde yer almaktadır. Tek yıllık veya iki yıllık, 10-30 cm boyunda otsu bir bitki olan süs lahanasının yaprakları dumanlı yeşil, ortadaki yapraklar kırmızı, mor, beyaz veya sarı renklidir (Hatipoğlu ve Gülgün, 1999; Zhu vd., 2017). Soğuğa karşı oldukça dayanıklı olduğundan sonbahar sonundan ilkbahar başlangıcına kadar park, bahçe ve kavşaklar gibi alanlarda güzel görüntü oluşturmak için kullanılmaktadır (Ren vd., 2019; Weishu vd., 2019).

Impatiens balsamina L. ve *Brassica oleracea* L. var. *Acephala*'nın fitoremediasyonda etkili bir şekilde kullanılabilmesine yönelik pek çok çalışma bulunmaktadır (Liu vd., 2008; Cai vd., 2010; Nawahwi vd., 2014; Yavari vd., 2015; Akın ve Kahraman, 2018; Wang vd., 2019; Eman Gökseven, 2019).

Fitoremediasyon için uygun hiperakümülatör bitkilerin seçimi başarıda önemli bir etkidir (Subhashini ve Swamy, 2014). Bu nedenle, bitkileri niceliksel ve niteliksel olarak iyileştirmek için yeni yöntemler bulmak amacıyla bitkilerin bu tür stres faktörlerine, özellikle ağır metallerle verdiği yanıtları anlamak önemlidir.

Fitoremediasyonda etkin bir şekilde kullanılan ve hiperakümülatör özelliği olan *Brassica oleracea* L. var. *Acephala* ve *Impatiens balsamina* L. türlerinde HSP'ler ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan bu tez çalışmasında, kurşun stresinin *Impatiens balsamina* L. 'Pink Single' ve *Brassica oleracea* L. var. *Acephala* 'Nagoya Purple'ın protein metabolizmasına etkileri incelenerek kurşun temizliğinde kullanılabilirlik potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Elde edilen veriler, kurşun stresine toleransın artırılmasına yardımcı olabilecek, yeni ve istenen tarımsal özelliklere sahip bitkilerin geliştirilmesini amaçlayan ıslah ve mühendislik programlarında kullanılacak bilgiler sağlayacaktır. Ayrıca bitkiler tarafından toplanabilen metal miktarlarını arttırmak amacıyla yapılacak transgenik bitkilerin geliştirilmesine yönelik yapılacak çalışmalara katkıda bulunacaktır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Günümüzde endüstriyel gelişimin de etkisiyle bilhassa yirminci yüzyılın ikinci yarısında oluşan ve giderek artan çevre kirliliği bütün ekosistemdeki organizmaların yaşamı için büyük bir tehlike haline gelmiştir ve bu durumun etkisi bitkiler üzerinde daha fazla görülmektedir (Munzuroğlu ve Gür, 2000). Bitkiler doğada abiyotik ve biyotik stresler ile sürekli karşı karşıya kalmaktadır (Levitt,1980). Bazı ağır metaller toprakta doğal yollarla bulunabilsede, büyük bir kısmı farklı endüstriyel ve antropojenik faaliyetler sebebi ile çevreye hızla yayılmaktadır (Urano vd., 2010).

Kullanımı M.Ö. 3000 yılına dayanan ve pek çok kullanım alanına sahip olan Pb, günümüzde de çeşitli faaliyetler sonucunda doğaya ve ekolojik dengeye en çok zararı veren metallere biridir (Vural, 2005). Amerika'da Toksik Madde ve Hastalık Kayıt Ajansı (ATSDR) tarafından 2015' de yayınlanan bir çalışmada 275 öncelikli tehlikeli kirlenmeler arasında Pb'un ikinci sırada yer aldığı bildirilmiştir (Anonim, 2017). Çizelge 2.1'de kurşun metali ile ilgili genel bilgiler verilmiştir.

Çizelge 2.1. Kurşun metali ile ilgili genel bilgiler

Sembol	Pb
Atom numarası	82
Atom ağırlığı	207.2 g/ mol
Element serisi	Metaller
Maddenin hali	Katı
Yoğunluk	11.34 g/cm ³
Atom yarıçapı	180 pm
Kaynama noktası	1749°C
Buharlaşma ısısı	179.5 kJ/mol
Kristal yapısı	Yüzey merkezli kübik
Yükseltgenme seviyeleri	(4 ⁺), (2 ⁺) amfoter oksit
Görünüş	Mavimsi beyaz

Kurşun, önemli toksik etkisi olan, bitki büyümesi ve gelişmesi için gerekli olmayan, ağır metallere biridir (Tchounwou vd., 2012; Rahman vd., 2012). Endüstriyel ve tarımsal faaliyetlerde geniş bir kullanım alanı olması nedeniyle çevrede çok rastlanılan bir elementtir. Özellikle yapısında Pb barındıran pestisitlerin kullanılması, otomobil endüstrisi, tetraetil ve tetrametil katkıları olarak batarya ve benzin içeriğinde kullanılması sonucu toprağı kirletmektedir. Benzine katılan bu bileşikler yanma sonucunda egzoz gazlarıyla, kurşun halojenür ve kurşun oksit gibi çeşitli Pb bileşikleri olarak atmosfere yayılmaktadırlar (Vural, 2005; Steffan vd., 2018).

Toprakta genellikle 10-50 ppm konsantrasyonunda Pb metali bulunmakta ve bu metal konsantrasyonu 150 ppm'i aştığında potansiyel olarak hem insan hem de bitki sağlığı açısından tehlike arz etmeye başlamaktadır (Dürüst vd., 2004; Angima ve Sullivan, 2008). Pb seviyesi bu kritik sınırı aştığında bitkide tüm morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal süreçleri ciddi şekilde etkilemektedir (Kushwaha vd., 2018).

Kurşunun sayısız bitki türü üzerindeki toksik etkisi hakkında yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Alkorta vd., 2004, Sharma ve Dubey, 2005; Zhera vd., 2009). Kurşun taşınımı ile ilgili yapılan çalışmalar çoğu bitki türü için köklerin önemli miktarlarda Pb alma yeteneğine sahip olduğunu ve bitkinin toprak üstü aksamına taşınmasını büyük ölçüde kısıtladığını göstermiştir (Lane ve Martin, 1977; Pourrut vd., 2011a). Bu durum, bitkilerin kök gelişiminin azalması nedeniyle katyon ve anyon alımını azaltmakta olup besin elementi alımını da olumsuz etkilemektedir (Sharma ve Dubey, 2005). Malar vd. (2016) Pb'in büyük ölçüde köklerde biriktiğini ve daha sonra yaprak sapı ve yaprak dokularına taşındığını belirtmişlerdir. Toprakların yüzey katmanlarında biriken Pb'nin kullanılabilirliği büyük ölçüde toprak koşullarına bağlıdır (Davies, 1987). Toprakta bulunan Pb neredeyse her zaman organik veya kolloidal materyal olarak çökelmiş bir formda bulunur ve bu durum bitki kökleri tarafından Pb alımını azaltmaktadır (Morel vd., 1986).

Köklerde Pb birikimi, Pb'nin hücre duvarı üzerindeki iyon değiştirilebilir bölgelere bağlanmasına, hücre dışı çökelmeye ve esas olarak hücre duvarında biriken kurşun karbonat formuna dayanır.

Hidroksi etilen diamin triasetik asit (H-EDTA) veya etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) gibi sentetik şelatların eklenmesi, düşük pH ile birlikte, hücre duvarında Pb'nin tutulmasını etkili bir şekilde önler ve sürgünlere translokasyon için kullanılabilir hale getirir (Jarvis ve Leung, 2001).

Kurşun ağırlıklı olarak kök apoplastına ve dolayısıyla kabuk boyunca radyal bir şekilde hareket eder ve endodermisin yakınında birikir. Endodermis, Pb'nin kök ve sürgün arasındaki hareketinde kısmi bir bariyer görevi görmektedir (Jones vd., 1973; Verma ve Dubey, 2003). Kurşunun köklerden diğer organlara sınırlı miktarda taşınması, kök endodermisin bariyerinden kaynaklanmaktadır. Kurşun maruziyetine yanıt olarak kökler, yanıl köklerin üretimi veya inhibisyonu ile hacim ve çaptaki değişiklikler yoluyla da yanıt verebilmektedir. Pirinçte kök hücrelerinin canlılığı Pb²⁺ iyonlarından etkilenmiş ve farklı Pb konsantrasyonlarında hücre ölümünün gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Zeng vd., 2006).

Seregin vd. (2002), hücre duvarlarından ziyade plazmalemmanın yüzeyinde önemli miktarda Pb bulunduğunu göstermiştir. Çeşitli bitki organlarındaki Pb içeriği kökler, yapraklar, gövde, çiçek ve tohum sırasına göre azalma eğilimindedir. Ancak bu sıralama bitki türlerine göre değişebilmektedir (Antosiewicz, 1992). Yapraklar yaşa bağlı olarak Pb biriktirme yeteneklerinde farklılık gösterir. Maksimum Pb içeriği yaşlanan yapraklarda ve en az genç yapraklarda bulunur (Godzik, 1993).

Yüksek miktarlarda Pb, bitkilerde azalmış büyüme, fotosentetik içeriklerin azaltılması ve ilerleyen seviyelerde inhibe edilmesi, bozulmuş mineral beslenmesi, köklerin kararması gibi toksik semptomlara neden olabilir (Ashraf vd., 2017; Hadi, 2015). Diğer toksisite semptomları arasında hücre turgoru ve hücre duvarı stabilitesinin ve stoma hareketlerinin olumsuz etkilenmesi, yaprak biyokütlesinde azalma, yaprak boyutunda azalma, kloroplastın parçalanması, protein, lipid ve nükleik asitlerde değişiklikler yer almaktadır (Islam vd., 2008; Pena vd., 2008; Ali vd., 2014). Kurşunun deoksiribo nükleik aside (DNA) verdiği zararın etkisini değerlendiren bir çalışmada, tütün ve acı bakla bitkilerinin kök çekirdeklerinde DNA hasarında bir artış bildirilmiştir (Rucińska vd., 2004; Gichner vd., 2008).

Kurşun toksisitesinin spesifik olmayan semptomları arasında bodur büyüme, kloroz ve kök uzunluklarında azalma görülmektedir.

Kurşun'un hücreye girdikten sonra hormonal sistemleri değiştirir, sülfhidril grubu içeren çeşitli enzimlerin inhibisyonuna ve mineral beslenmesinde bozulmalara neden olmaktadır. Bitkiler Pb toksisitesine maruz kaldıktan sonra fizyolojik ve biyokimyasal süreçler bu metalden direkt veya dolaylı olarak etkilenmektedir (Azmat vd., 2006). Ayrıca Calvin döngüsünü ve elektron taşıma zincirini bloke ederek ve stoma gözeneklerini kapatarak karbondioksit açığı meydana getirmektedir (Sharma ve Dubey, 2005; Mishra vd., 2006).

Bitkiler genellikle ağır metallerin varlığına karşı çok az tolerans gösterirler ve bu tür metalleri dokularında genellikle kayda değer miktarlarda biriktirmezler, ancak bazı bitkiler yüksek konsantrasyonlardaki kirletici varlığının neden olduğu kısıtlamaların üstesinden gelmek için direnç mekanizmaları geliştirmişlerdir. Ağır metal ile kirlenmiş arazilerin temizlenmesi için bitki tolerans stratejilerinin kapsamlı bir şekilde çalışılması çok önemlidir (Cutright vd., 2012; Dickinson, 2016). Bitkiler için Pb toleransı ve birikimi için farklı mekanizmalar rapor edilmiştir (Kumar ve Prasad, 2018). En toleranslı türlerde, emilen Pb'nin yaklaşık %95'i köklerde birikir ve yalnızca küçük bir kısmı bitkinin toprak üstü kısımlarına aktarılır (Ruiz vd., 2009; Gupta vd., 2009; Whitacre, 2015).

Bitkilerde toksisite oluştuğunda ve serbest metal taşınımı ortaya çıktığında, kritik toprak konsantrasyonuna ulaşıncaya kadar ağır metal konsantrasyonunun sabit, düşük bir seviyede tutulduğu dışlayıcı ve alıkoyma mekanizması homeostasinin ve ağır metal detoksifikasyonunun sağlanmasında oldukça önemli bir yeri olduğu bilinmektedir (Maestri vd., 2010). Bu durumda Pb iyonları bazı organik maddelere bağlanarak vakuol, diktiyozom ve endoplazmik retikulum vesikülleri gibi bölgelerde alıkonulmaktadır (Piechalak vd., 2002; Vadas ve Ahnar, 2009; Wierzbicka vd., 2007). Phytochelatin (PC) sentezi, Pb'nin vakuoldeki metalleri nötralize etmek ve biriktirmek için indüklediği bir mekanizmadır (Andra vd., 2009; Wojas vd., 2010; Fischer vd., 2014; García vd., 2017).

Alternanthera bettzickiana bitkisinde Cd ve Pb'nin farklı konsantrasyonları (0, 0,5, 1,0 ve 2,0 mM) uygulanmış ve bitkinin yaprak ve köklerde iyon sızıntısı miktarının düşük metal seviyelerinde ($\leq 1,0$ mM) azalırken, yüksek seviyelerde arttığı belirlenmiştir. Fotosentetik pigmentler, toprakta artan metal konsantrasyonları ile 1,0 mM'a kadar artmış ve daha sonra yüksek metal seviyeleri ile azalma meydana gelmiştir. Protein miktarı ise yapraklarda köklere göre daha yüksek olup, konsantrasyona bağlı olarak 1,0 mM'a kadar önemli ölçüde artmış ve daha yüksek metal seviyelerinde ise azalma gözlemlenmiştir (Tauqeer vd., 2016).

Khan vd. (2019) *Petunia hybrida* L. bitkisinde Cd, Cr, Cu, Ni ve Pb'nin etkilerini ayrı ayrı (50 ve 100 μ M) ve EDTA (2,5 mM) ile birlikte uygulayarak yaptıkları çalışmada metal alımının bitkide biyokimyasal stres göstergelerinde değişikliklere neden olduğu ve klorofil a, klorofil b, toplam klorofil ve karotenoid içeriğinde azalmalar olduğunu gözlemlenmiştir. Pb uygulamasında artan konsantrasyonla birlikte kontrole göre bitkideki toplam klorofil miktarında azalmalar belirtilmiştir. Tüm metal uygulamalarında iyon sızıntısında artışlar gözlemlenmiştir.

Balouchi vd. (2017) fasulyede, 50 mg/kg konsantrasyonuna sahip Cd, Pb, Ni ve Cu gibi ağır metaller ile yaptıkları bir çalışmada bu metallerin bitkide kontrole kıyasla fotosentez oranını düşürdüğünü ve iyon sızıntısı ile prolin miktarını arttırdığını bildirmişlerdir.

Sorgum bitkisine (*Sorghum bicolor* L. Moench) farklı konsantrasyonlarda (100, 200, 300, 400, 500 μ M) beş farklı ağır metal (As, Ni, Cd, Pb ve Cu) uygulaması yapılmış ve ağır metal uygulamalarının bitkilerin büyüme, toplam biyokütle, klorofil miktarı ve bağıl su içeriklerinde azalmalara neden olduğu belirtilmiştir. İyon sızıntısının ise konsantrasyon artışıyla arttığı saptanmıştır. Ayrıca toplam protein ve prolin miktarında da kontrole göre konsantrasyonun artması ile bir artış gözlemlenmiştir (Pandian vd., 2020).

Alzahrani vd. (2020) yıldız çiçeğinde yaptıkları bir çalışmada Pb (0, 100, 500 ve 5000 mg/kg) ve Cd (0, 10, 25, ve 100 mg/kg) stresi altında bitkilerin büyüme, pigment içeriği ve yaprak oransal su kapsamı (YOSK) kontrole göre önemli bir azalma görüldüğünü bildirmişlerdir.

Yıldırım vd. (2019) rokada (*Eruca sativa* L.) yaptıkları bir çalışmada bitkiye Cd (0, 100, 150 ve 200 mg/kg) ve Pb (0, 1000, 1500 ve 2000 mg/kg) uygulamış ve her iki ağır metalin de bitki büyümesini, fotosentetik aktiviteyi ve klorofil içeriğini olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir. Konsantrasyon artışının YOSK'u da azalttığı belirtilmiştir. Ayrıca stres uygulanmış bitkilerde kontrole göre daha fazla miktarda prolin içeriği bulunmuştur.

Chara fragilis ve *Callitriche palustri* gibi su bitkileri kullanılarak yapılan bir çalışmada bitkiler çeşitli (Cu, Fe, Ni, Fe, Zn, Cr, Pb, Cd) ağır metallere maruz bırakılmış ve bu metallerin bitkiler üzerinde toksik etkileri görülürken turgor kaybını da azalttığı bildirilmiştir (Poklonov vd., 2018).

Zengin ve Munzuroğlu (2005), farklı konsantrasyonlarda Pb (1,5, 2,0 ve 2,5 mM), Cu (0,1, 0,2 and 0,3 mM), Cd (0,05, 0,06 ve 0,08 mM) ve Hg (0,02, 0,04 ve 0,06 mM) uygulamalarının fasulyede bitki gelişimi üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada toplam klorofil içeriğinin ağır metal konsantrasyonlarının artmasıyla kademeli olarak azalma gösterirken prolin miktarının ise artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

Khalid vd. (2017) kadife çiçeğinde (*Tagetes erecta*) 5 farklı Pb (2500, 1000, 1500, 2000 ve 2500 mg/kg) konsantrasyonu kullanarak yaptıkları bir çalışmada toplam protein içeriğinin konsantrasyon artışıyla birlikte bir azalma gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar protein içeriğindeki azalmanın, artan proteaz aktivitesinin bir sonucu olarak protein yıkım sürecinin artmasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Klorofil içeriğinin ise 1500 mg/kg'a kadar arttığını ancak, 2000 mg/kg'da düşmeye başladığını ve 2500 mg/kg'da ise kontrolün altına indiğini belirtmişlerdir.

Kurşun fitoksisitesi, enzim aktivitelerinin azalmasına, bozulmuş mineral beslenmesine, su dengesizliğine, hormonal denge ve zar geçirgenliğindeki değişikliklere neden olmaktadır (Sharma vd., 2005).

Bitki hücrelerindeki serbest amino asit artışı, proteinlerin yapısının bozulmasına bağlanabilir, ağır metallere maruz kalan birçok bitkide proteaz gibi proteoliz enzimlerin miktarında da önemli artışlar olduğu ve bunun da toplam çözünebilir proteinleri azaltmaya ve serbest amino asitleri artırmaya yol açtığı bilinmektedir (Hsu ve Kao, 2003; Vassilev vd., 2012).

Süs lahanasında (*Brassica oleracea* var. *Acephala*) salisilik asitin (SA) Pb ve Zn stresi altında tolerans ve iyileştirme yeteneğinin araştırıldığı bir çalışmada tohumlar önce 6 saat salisitik asit uygulaması yapılmış sonra farklı konsantrasyonlarda (0, 50, 100 ve 200 mg/L) çinko sülfat ($ZnSO_4$) ve kurşun nitrat ($Pb(NO_3)_2$) ile 14 gün boyunca muamele edilmiştir. Tohumlardan elde edilen 14 günlük fidelerde klorofil içeriğinin tüm konsantrasyonlarda kontrole göre belirgin bir şekilde azaldığı, yine yaş ve kuru ağırlıkta da tüm bitkilerde konsantrasyon artışıyla bir azalma olduğu bildirilmiştir (Taghizadeh vd., 2018). Bitkilerin toksisite sınırlarının üstünde metal birikiminin, bitki biyokütlesinin ve klorofil içeriğini azalmasının nedenlerinden biri olabileceği bildirilmiştir (Kabata ve Pendias, 2010).

Eren ve Dağhan (2014) transgenik olmayan tütün çeşidi (*Nicotiana tabacum* L., cv. Petite Havana SR-1) ve aynı çeşidin genetik olarak modifiye edilmiş soyunu (yapısal bir promoter altında ChMTII genini taşıyan) kullanarak yaptıkları bir çalışmada 0, 25, 50, 100, 200, ve 400 mg/kg kurşunu $Pb(NO_3)_2$ formunda toprağa çözeltili halinde uygulamış ve 6 hafta sonra bitkileri hasat etmişlerdir. Kurşun uygulamalarının her iki bitkinin de sürgün kuru ağırlığı üzerinde etkisi olduğu gözlemlenmiş olup Sr-1 tütün bitkisinde daha yüksek büyüme performansı gözlemlenmiştir. Ayrıca SR-1 tütün bitkisinde 200 mg/kg ve üzerindeki konsantrasyonlarda kuru ağırlık farkının daha yüksek olduğu ifade edilmiştir.

Yapılan araştırmalar, bitkilerde ağır metal zararının ilk etkisinin köklerde görüldüğünü ve ağır metal alımı devam ettikçe gövde uzamasının da etkilendiğini bildirmişlerdir (Tester ve Leigh, 2001; Verma ve Dubey, 2003). Çoğu bitki türü için, Pb %95 veya daha fazla miktarlarda köklerde birikir ve bu metalin sadece küçük bir kısmı sürgünlere ulaşabilir. Diğer ağır metaller için köklerden sürgünlere translokasyon kısıtlaması olsa da, bu fenomen Pb için daha spesifik ve yoğundur (Pourrut vd. 2011b). Genel olarak, Pb sürgün büyümesini önemli ölçüde engellemez ve bitki de görünür herhangi bir morfolojik değişikliğe neden olmamaktadır.

Bunun nedeni, Pb'nin sürgünlere translokasyonunun sınırlı olmasıdır (Cseh vd. 2000; Krzesłowska 2011; Rabęda vd. 2015). Małkowski vd'nin (2002) yaptığı bir çalışmada mısır fidelerinde kök büyümesi, tüm kurşun konsantrasyonları (10, 100, 1000 uM) tarafından inhibe edildiği gözlemlenmiştir.

Dallı darı (*Panicum virgatum*) bitkisinde Pb, Cd ve Cr ağır metallerinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada yetiştirme ortamına 0, 30, 60, 90, 120 mg/kg Pb; 0, 2,5, 5, 10, 20 mg/kg Cd ve 0, 40, 80, 120, 160 mg/kg Cr eklenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre uygulanan her metalin düşük konsantrasyonlarında yaş ve kuru ağırlık değerleri kontrole göre daha düşük miktarda gerileme göstermiş, artan konsantrasyonlarda bu oran artmış ancak bitki ölümleri olmamıştır. Ayrıca Pb metalinin düşük konsantrasyonlarda kontrole benzer büyüme gösterdiği gözlenmiştir (Alacabey ve Zorer Çelebi, 2020).

Büyüme, ağırlık artışının bir göstergesi olarak bilinmektedir. Metal stresinin bitkilerde ağırlık artışını azalttığı birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Ouzounidou vd., 1997; Vitoria vd., 2001).

Sinha vd. (2006) *Brassica oleracea* L. var. Golden Aker bitkisine 0,1, 0,2, 0,4, 0,5 ve 1,0 mM Pb uygulaması yaptıkları çalışmada uygulamadan 34 gün sonra 1,0 mM Pb konsantrasyonunda bitki büyümesinin kısıtlandığını, 0,5 mM'da bu semptomların oldukça düşük olduğunu bildirmişlerdir. Uygulamadan 43 gün sonra ise bitkinin kuru ağırlığının kontrol bitkileriyle karşılaştırıldığında, konsantrasyon artışıyla birlikte %23 ila %55 arasında değiştiğini belirtmişlerdir. 1,0 mM'lık uygulamada Pb konsantrasyonunun köklerde en yüksek ve baş kısmında ise en düşük olduğunu ifade etmişlerdir.

Kadife çiçeğinde farklı kurşun konsantrasyonlarıyla (0, 20, 40 ve 80 ppm) yapılan bir çalışmada konsantrasyon artışıyla bitkinin yaş ve kuru ağırlığında azalmalar olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, çalışma bitkilerin kök kısmında üst aksama göre daha fazla Pb biriktiğini göstermiştir (Eid vd., 2018). Köklerdeki yüksek Pb konsantrasyonu, bitki gelişiminin daha erken aşamalarında Pb'nin alım ve translokasyon oranının yavaş olduğu, ancak bitki olgunlaştığında daha hızlı olması ile ilişkilendirilmiştir (Kratovalieva ve Cvetanovska, 2001).

Farklı kurşun uygulamalarının *Triticum aestivum* L. cv. Ceyhan 99'daki fizyolojik ve morfolojik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada buğday fidelerine uygulanan Pb çözeltilisi, kurşun nitrat tuzundan $[Pb(NO_3)_2]$ hazırlanmış ve fideler 15 gün boyunca farklı Pb derişimleri (kontrol, 10, 100 mg/L) altında yetiştirilmiştir. Kurşunun artan derişimleri ile kök ve otsu gövdede toplam protein miktarları azalırken, protein olmayan SH gruplarının ve prolin miktarlarının arttığı belirlenmiştir. Kurşun uygulamasının köklerdeki prolin miktarlarında sırasıyla %8,6 ve %34,3, otsu gövdelerde ise sırasıyla %55,1 ve %73,9 oranında artışa neden olduğu belirlenmiştir.

Kurşun birikiminin artması ile artan protein olmayan SH gruplarının ve prolinin Pb toksisitesinde rollerinin olabileceği, (Çolak ve Doğan, 2011) bu durumun, bitkide Pb stresinden kaynaklanan reaktif oksijen türlerinin temizlenmesi veya Pb'nin şelatlanarak detoksifikasyonunda prolinin oynadığı rolden ileri gelebileceği bildirilmiştir (Farago ve Mullen, 1979; Sharmila ve Pardha Saradhi, 2002). Ağır metal stresinde prolinin, proteinlerin denaturasyonunda, hücre içi pH ve $NAD(P)^+/NAD(P)H$ oranlarının düzenlenmesinde, karbon ve azot kaynağı olarak kullanılmasında ve reaktif oksijen türlerinin ortadan kaldırılmasında görev alabileceği belirtilmiştir (Sharmila ve Pardha Saradhi, 2002).

Dere ve Doğan (2020) yerfıstığı (*Arachis hypogaea* L.)'nda farklı kurşun uygulamalarının (10, 100 ve 1000 mg/L) fizyolojik etkilerini araştırdığı bir çalışmada toprak üstü aksam ve köklerdeki yaş ağırlıkların artan Pb derişimi ile azaldığını göstermiştir. Fidelerin kök, gövde ve yapraklarında prolin miktarının Pb toksisitesine göre değişkenlik gösterdiği; kök ve gövdede prolin miktarının Pb stresinde genelde azalma gösterdiği, yapraklarda ise artan konsantrasyonla birlikte arttığı belirlenmiştir. Yerfıstığı fidelerinin 10 mg/L derişiminde köklerin protein miktarları kontrole göre %8,2 seviyesinde artmış, 100 ve 1000 mg/L'lik derişimlerinde ise %11,7 ve %15,9 seviyesinde azalma göstermiştir. Gövde ve yapraklardaki protein miktarı ise artan Pb derişimleri ile kontrole göre azalma göstermiştir. Bu durumun, toplam proteinlerdeki kalitatif ve kantitatif derişimlerin ayrıntılı bir şekilde analizini gerektirmekle birlikte, genelde Pb'nin bitkideki protein sentezini engellemesinde ya da oksidatif streste üretilen reaktif oksijen türlerinin tetiklediği proteolisizten kaynaklanmış olabileceği bildirilmiştir (Nagoor, 1999).

Güvercin bezelyesinde (*Cajanus cajan* Mill) 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 ve 1,0 mM konsantrasyonlarında Pb uygulaması yapılmış ve prolin seviyesinde önemli artış gözlemlenmiştir. Yapraklardaki prolin miktarındaki artışın 1,0 mM'da kontrole göre yaklaşık 2,5 kat olduğu bildirilmiştir. Prolin birikimi bitkilerdeki stresin bir sonucu olarak kabul edilir ve ayrıca güvercin bezelyesinde ağır metal stresine tolerans mekanizmasının bir göstergesidir (Nautiyal ve Sinha, 2012). Prolin, bir ozmoprotektan, protein stabilizatörü, metal şelatör, lipid peroksidasyon inhibitörü ve serbest radikal temizleyici olarak işlev görür (Sharma ve Dubey 2005).

Bitkilerde ağır metal toleransı birbiriyle ilişkili fizyolojik ve moleküler mekanizmalar tarafından belirlenmektedir. Toksik metallerin artan seviyelerine tolerans, toksik elementlerin bitki dışında tutulması (exclusion) veya metabolik değişikliklerden kaynaklanmaktadır (Singh vd., 2003). Bitkiler ağır metal zararını önlemek veya tolere etmek için gelişmiş ve birbiriyle bağlantılı bir savunma stratejileri ağına sahiptir (Hall, 2002).

Metabolik değişikliklerin en belirgin göstergelerinden biri de protein yapısında meydana gelen değişikliklerdir. Proteinler, canlı hücrelerin ana iş yüklerini oluşturan fonksiyonel olarak çok yönlü makro moleküllerdir. Hücreler arası sinyalizasyon, düzenleme, kataliz, besin maddelerinin ve diğer moleküllerin hücre dışı ve hücre içi hareketi, membran füzyonu, yapısal destek ve korumada işlev görürler (Amm vd., 2014).

Aşırı sıcaklıklar, reaktif moleküller, ağır metal iyonları sadece yeni sentezlenmiş bir proteinin katlanma sürecini bozmakla kalmaz, aynı zamanda mevcut proteinlerin yanlış katlanmasını da tetikleyen diğer fiziksel ve kimyasal koşulları da değiştirebilir (Goldberg, 2003; Amm vd., 2014; Zhou vd., 2016).

Kolyoz çiçeğinde (*Coleus blumei*) yapılan bir çalışmada bitkiler farklı kurşun konsantrasyonlarıyla (200 mg/ kg, 400 mg/kg, 600 mg/kg ve 800 mg/kg) 80 gün muamale edilmiş ve deneme sonunda protein miktarının 400 mg/kg uygulamasında artarken diğer uygulamalarda kontrole göre azaldığı gösterilmiştir (Bihola vd., 2020). Bu durumun, ağır metallerin, polipeptit moleküllerine bağlanarak doğal yapıyı değiştirmelerinden ve böylece

proteinlerin biyolojik fonksiyonlarını engellemelerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Hossain ve Komatsu, 2013). Ağır metal stresi genellikle hücrede gerekli enzimleri etkisiz hale getirerek ve fonksiyonel proteinleri baskılayarak hücrel homeostazı bozar (Hossain vd., 2012).

Bitkilerin abiyotik stres koşulları altında hayatta kalabilmesi için proteinlerin doğal konformasyonunun korunması ve doğal olmayan proteinlerin birikiminin azaltılması zorunludur. Bu tür stresler protein agregasyonuna yol açarak metabolik işlev bozukluğuna neden olur. Bitkiler, tolerans mekanizmalarının bir parçası olarak farklı streslere duyarlı biyomolekülleri indükler. Bu tür biyomoleküllerin en önemlilerinden biri, hücrelerdeki stresin olumsuz etkilerini azaltmada görev yapan moleküler şaperonlardır. Isı şoku proteinleri (HSP), diğer biyotik streslerin yanı sıra, aşırı sıcaklık, dehidrasyon, tuzluluk, oksidatif stres, ağır metaller, radyasyonlar ve yaralanmalar gibi çeşitli abiyotik streslere tepki olarak hareket eden önemli moleküler şaperon sınıflarındandır (Swindell vd., 2007; Akerfelt vd., 2010; Al-Whaibi 2011; Xu vd., 2011).

HSP'ler, abiyotik stres toleransı sağlanmasında anahtar rol oynar. Bitkiler, strese duyarlı bazı proteinlerin yanı sıra HSP'leri indükleyerek kendilerini çok sayıda stresten korurlar. HSP'lerin biyolojik işlevi, hücredeki diğer proteinlerin kalite kontrolünü sürdürmek ve proteinin yaşam, yaşlanma, hastalık ve ölüm sürecinde önemli bir rol oynamaktır. HSP'lerin rolü biyotik ve abiyotik streslerden korumanın ötesine uzandığı için genel olarak bitki yaşam döngüsünde önemlidir (Hartl ve Hayer-Hartl, 2002). Bu nedenle, çeşitli streslere karşı bitki tepki mekanizmalarını ve HSP'lerin edinilmiş stres toleransındaki rolünü çözmek, strese duyarlılık modülünün bir parçası olarak spesifik işlevlerini tanımlamak için son derece önemlidir (Mishra vd., 2018).

HSP'ler tahmini moleküler ağırlıklarına, amino asit dizilerine ve fonksiyonlarına göre HSP 100, HSP 90, HSP 70, HSP 60 ve sHSP (small HSP)'ler olmak üzere başlıca beş ana gruba ayrılmıştır (Wang vd., 2004; Al-Whaibi 2011).

HSP 100 ailesi şaperonları, yanlış katlanma, denatürasyon veya agregasyondan kaynaklanan işlevsel olmayan ancak potansiyel olarak zararlı polipeptitlerin uzaklaştırılması, hücrel homeostazın sürdürülmesi için önemlidir (Gottesman vd., 1990).

HSP 90 şaperonları çoğu organizmada yapısal olarak ifade edilmelerine rağmen, bunların ekspresyonu hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda strese yanıt olarak artmaktadır (Krishna ve Gloor, 2001). HSP 90'ın ana rolü, protein katlanmasını yönetmektir, ancak aynı zamanda sinyal iletim ağlarında, hücre döngüsü kontrolünde, protein parçalanmasında ve protein yolağında da önemli bir rol oynamaktadır (Frydman, 2001; Young vd., 2001; Pratt vd., 2001).

HSP 70'in çok çeşitli bitki türlerinde çevresel stres faktörlerine yanıt olarak biriktiği ortaya konmuştur (Gupta vd., 2010). Bu ailenin spesifik üyeleri yapısal olarak ifade edilir ve hücrel homeostazı sürdürmek için düzenlenir. Sıklıkla de novo sentezlenmiş polipeptitlerin katlanmasına ve öncü proteinlerin içe aktarılmasına veya yer değiştirmesine yardımcı olur (Wang vd., 2004).

HSP 60'lar, bazı literatürde şaperonlar olarak adlandırılmakta ve ökaryotlarda ağırlıklı olarak mitokondri ve plastidlerde bulunmaktadır. Genellikle Rubisco gibi plastid proteinlerine yardımcı olmada önemli oldukları kabul edilmektedir (Wang vd., 2004). Bazı çalışmalar, bu sınıfın, kloroplastlar ve mitokondri gibi organellere taşınan birçok proteinin katlanmasına ve toplanmasına katılabileceğine işaret etmiştir (Lubben vd., 1989). HSP 60'lar, farklı protein türlerinin kümelenmelerini önlemek için katlanmadan önce onlara bağlanarak, transkripsiyon sonrası düzenleyici olarak görev yapmaktadır (Parsell ve Lindquist, 1993; Jackson-Constan vd., 2001). Proteom hakkındaki artan bilgi birikimi ile, HSP 60'ın metal stresi de dahil olmak üzere stres ortamlarında ve normal koşullarda hücrel işlevler için gerekli olduğu anlaşılmıştır. İlginç bir şekilde, proteomik analizi, HSP 60 şaperonlarının indüksiyonunun, sitoplazmada metal iyonları varlığında bile proteinlerin denatürasyonunu engellediğini ortaya çıkarmıştır (Sarry vd., 2006; Rodríguez-Celma vd., 2010).

sHSP ailesi şaperonları tüm canlı organizmalarda bulunur ve 12-42 kDa arasında değişen moleküler ağırlığa sahiptirler. sHSP'lerin çoğunun moleküler ağırlığı 15–22 kDa aralığında olduğu için HSP 20 olarak da adlandırılırlar. Bu proteinler, α -kristalin C-terminal alanları (ACD) olarak bilinen 80-100 amino asit kalıntısı içerdikleri için diğer HSP'lere göre farklıdırlar (Sun ve MacRae, 2005; Haslbeck vd., 2005). Bu sHSP'leri diğer şaperon sınıflarından ayıran özellik, aktivitelerinin ATP'den bağımsız olmasıdır. Bu sınıfın karakteristik işlevlerinden biri, yanlış katlanmış proteinlerin parçalanması ve çeşitli çevresel stresörlerin neden olduğu geri dönüşü olmayan protein birikimini önleyerek hücrel korumada çok önemli bir rol oynamalarıdır (Muthusamy vd., 2017). Ayrıca sHSP, bitkilerdeki farklı gelişim süreçleri için belirleyici bileşenlerdendir (Siddique vd., 2008; Al-Whaibi 2011; Koo vd., 2015).

HSP'lerin rolleri, diğer streslerle karşılaştırıldığında, daha çok yüksek sıcaklık stresine yanıt olarak görülmektedir, ancak bunların ısı toleransını artırmak için nasıl çalıştığı henüz tam olarak anlaşılmamıştır (Singh vd., 2016).

Isı stresi ile ağır metal stresi arasındaki etkileşim de çok önemli ve ilgi çeken bir konudur. Bu, yalnızca ısı stresi genlerinin indüklenmesinde yer alan sinyal-transdüksiyon mekanizmalarının ortak kısımlarıyla değil (Nover, 1991), ayrıca HSP'lerin ağır metal toleransındaki olası rolü ile de ilgilidir.

Birçok çalışma, HSP 70 genlerinin aşırı ekspresyonunun, ağır metaller de dahil olmak üzere çeşitli streslere tolerans kazanılması ile ilişkili olduğunu göstermesine rağmen, stres durumu altında HSP 70 fonksiyonunun hücrel mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır (Wang vd., 2004). HSP 70, metal iyonlarının toksik semptomlarını sınırlandırmakta ve bu iyonların metalloproteinler tarafından tutulmasına ve detoksifikasyonuna yardımcı olmaktadır (Haap vd., 2016; Al-Whaibi, 2011).

Kadmiyum ve Al stresine maruz bırakılan arabidopsis (Sarry vd., 2006), domates (Neumann vd., 1994), kavak (Yang vd., 2015), gazelboynuzu (Navascués vd., 2012) ve soya fasulyesinde (Duressa vd., 2011) HSP 70'in aktive olduğu gözlemlenmiştir. Zamana bağlı gen ekspresyon analizleri, Cd stresi altında yetiştirilen çeltikte yüksek miktarda HSP 80 ve HSP 17,9

olduğunu ortaya çıkarmıştır (Ogawa vd., 2009). Czarnecka vd. (1988), Cd'nin soya fasulyesinde HSP 26 ekspresyonunu indüklediğini göstermiştir.

Kurşun ve As stresi altında havuçta HSP 17,7 ifadesinin arttığı görülmüştür (Lee ve Ahn, 2013). Kavaklarda proteomik analizleri sonucunda ağır metallerin, sHSP 20, 22 ve 23,1 gibi çeşitli sHSP'lerin ekspresyonunu indüklediği belirlenmiştir (Yang vd., 2015).

Vigna mungo bitkisinde yapılan bir çalışmada Cd uygulamasıyla molekül ağırlığı 23 kDa olan bir bant gözlemlenmiş ve ayrıca 24,0 ve 21,1 kDa olan iki bantın Cd uygulamasıyla yoğunlaştığı bildirilmiştir (Kochhar vd., 2004).

Rau vd. (2007) su yosununa (*Fontinalis antipyretica*) Cd ve Cu metallerinin uygulanmasının HSP 70'te önemli bir artışa neden olduğunu gözlemlemişlerdir.

Yoncada As stresine karşı gelişmiş tolerans sağladığı belirlenen MsHSP23 geninin klonlanmasıyla oluşturulan transgenik tütün bitkilerinde HSP 23'ün yüksek ifadesi sonucu mitokondride ROS'un etkilerini azaltarak daha iyi bir tolerans sağladığı bildirilmiştir (Lee vd., 2012).

Ireland vd. (2004), *Fucus serratus* ve *Lemna minör* ile yaptıkları bir çalışmada bitkilere 0, 5, 10, 25, 50 ve 100 mM Cd uygulamıştır. *Fucus serratus* bitkisinde 25 mM'da, HSP 70' deki artışın kontrol değerinden fazla olduğu, 50 mM'da azalma olduğu 100 mM'da ise kontrol değerinin altına düştüğü bildirilmiştir. *Lemna minör* bitkisinde ise 25 mM konsantrasyonunda kontrole göre önemli bir artış gözlemlenmiş ve konsantrasyonun artmasıyla bu oranın düştüğü belirtilmiştir.

Wang vd. (2008), HSP 70'in biyolojik belirteç olarak kullanılmasını araştırdıkları bir çalışmada, domates bitkisine topraktan 12,5, 25, 50, 250, 500 mg/kg konsantrasyonlarda Pb uygulaması yapmış ve ekimden iki ay sonra yapraklar hasat edilmiştir. Kontrole göre tüm uygulamalarda HSP 70 ifadesinin arttığı belirlenirken, en yüksek değer 25 mg/kg kurşun uygulamasında görülmüş ve ardından azalma eğilimi göstermiştir.

Ancak yine de kontrol seviyesinin üzerinde kalmıştır. Araştırmacılar, muamele edilmiş tüm gruplarda HSP 70 ifadesinin artmasının, bitkiyi oksidatif hasardan korumak amaçlı olduğunu bildirmişlerdir. HSP 70'in biyomarker olarak kullanımının şiddetli stresörler için uygun olmadığını, çünkü yüksek Pb konsantrasyonlarının HSP 70'in ekspresyonunu inhibe edebileceğini de belirtmişlerdir.

Wang vd. (2011) ıspanak bitkisinde Pb stresinin biyokimyasal tepkilerini inceledikleri bir çalışmada fideler 12,5, 25, 125, 250, 500 mg/kg konsantrasyonlarında Pb uygulamasına maruz bırakılmış ve 30 günün sonunda tüm uygulamalarda kontrole kıyasla karbonil gruplarının üretimi ile HSP 70 ve HSP 60'ın önemli miktarda arttığı tespit edilmiştir. Oksitlenmiş protein birikiminin, HSP genlerinin ekspresyonunu indüklediğini, bu nedenle, karbonlanmış proteinlerin birikmesini takiben HSP 70 ve HSP 60 üretiminin artmış olabileceğini belirtmişlerdir. Artan HSP 70 ve HSP 60'ın denatüre proteinlerin yeniden biçimlendirilmesi veya yıkımını kolaylaştırmak için birlikte çalışabileceğini belirtmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu araştırma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'ne ait serada ve bölüm laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.1. Materyal

Yürütülen araştırmada bitki materyali olarak kına çiçeği, (*Impatiens balsamina* L. 'Pink Single') ve süs lahanası (*Brassica oleracea* var. *Acephala* 'Nagoya Purple') kullanılmıştır (Şekil 3.1).

Bitkiler kontrollü sera koşullarında ortalama 22/18 °C sıcaklıkta (gündüz/gece) ve ≈ %65 nemde yetiştirilmiştir.



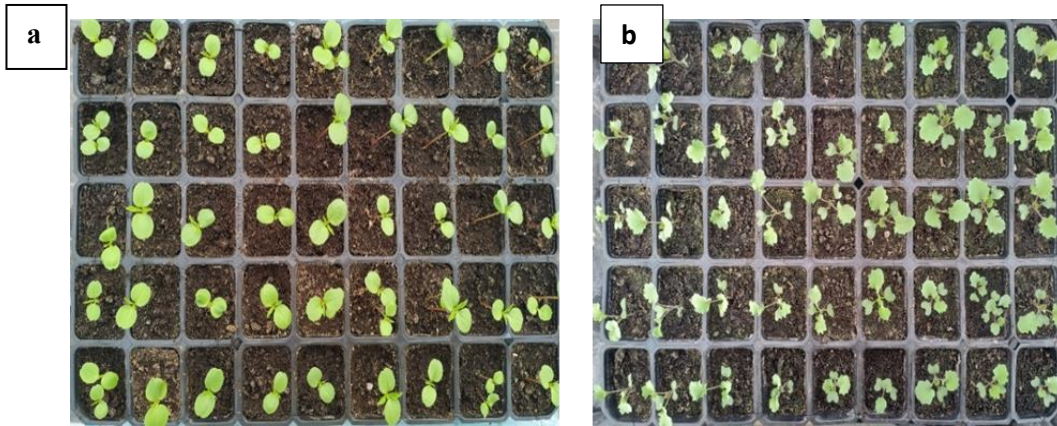
Şekil 3.1. Kına çiçeğinin genel görünümü (a) ve süs lahanasının genel görünümü (b)

3.2. Yöntem

3.2.1. Kurşun nitrat [Pb (NO₃)₂] uygulamaları

İçerisinde torf bulunan 45'lik viyollere süs lahanası ve kına çiçeği tohumları ekilmiştir. Tohumlar fide elde edilinceye dek düzenli olarak çeşme suyu ile sulanmıştır (Şekil 3.2). Her iki bitki türü de fide haline geldikten sonra çapı 17 cm, yüksekliği 18 cm olan plastik saksılara şaşırtılmıştır (Şekil 3.3). Saksı ortamı olarak torf, toprak ve perlit (1:1:1) karışımı kullanılmıştır. Deneme, tesadüf parselleri deneme desenine göre her uygulamada 10 bitki olacak şekilde düzenlenmiştir. Her iki türe ait fideler 6 haftalık olduklarında üç farklı konsantrasyonda kurşun nitrat [Pb (NO₃)₂] çözeltisi (100 ppm, 200 ppm ve 400 ppm) sulama suyu olarak iki günde bir 150 ml olacak şekilde 6 hafta boyunca uygulanmıştır (Dürüst vd., 2004; Eid vd., 2018). Kontrol bitkileri ise saf su ile sulanmıştır (Şekil 3.4). Ayrıca bitkilere haftada bir düzenli olarak NPK (5:5:5) gübresi (RootStar) kurşun nitrat çözeltisine karıştırılarak uygulanmıştır.

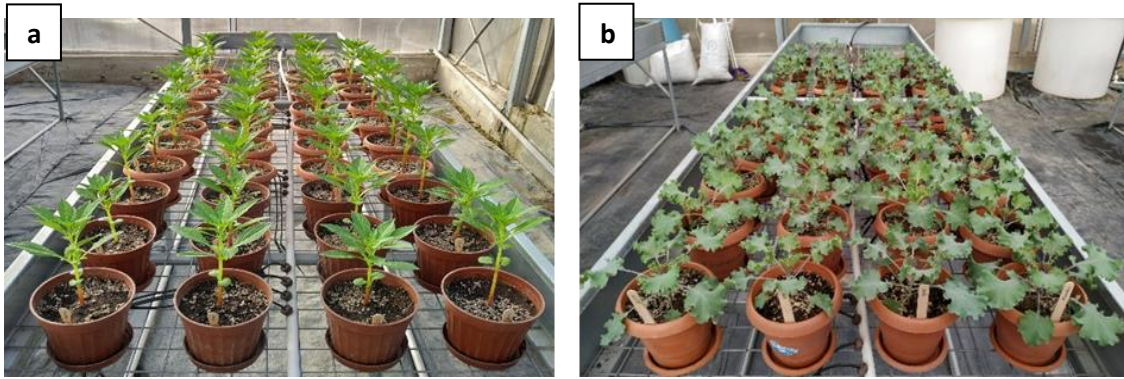
Kurşun nitrat uygulamasından sonra bitkiler sökülerek laboratuvara getirilmiştir. Kök ve gövdeleri ayrıldıktan sonra, yaprak örneklerinin bir kısmı hücre zarı zararlanması ve klorofil miktarının belirlenmesinde kullanılmış geri kalan kısımlar ise sıvı azot içerisinde dondurularak moleküler analizler için -80°C'de dondurularak saklanmıştır. Kökler temizlenip yıkandıktan sonra yaş ve kuru ağırlık tespitinde kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Fidelerin çıkış aşamasındaki görünümü. Kına çiçeği (a), süs lahanası (b)



Şekil 3.3. Şaşırtma işlemi sonrası bitkilerin görünümü. Kına çiçeği (a), süs lahanası (b)



Şekil 3.4. Kurşun nitrat uygulamaları başlangıcında bitkilerin görünümü. Kına çiçeği (a), süs lahanası (b)

3.2.2. Hücre membran zararlanma oranı

Hücre membran zararlanması Arora vd. nin (1998) yöntemi esas alınarak hesaplanmıştır. Bitki yapraklarından 1,5 cm çapında diskler alınıp cam deney tüplerine konulmuştur, üzerine 15 ml saf su ilave edilmiştir. Örnekler 4 saat boyunca oda sıcaklığında 100 rpm'de çalkalayıcıda çalkalandıktan sonra, hücre membran zararlanmasını belirlemek için EC metre (Mettler Toledo, SevenEasy S30, Columbus Ohio, USA) ile iyon sızıntısı miktarı ölçülmüştür. Daha sonra otoklavda 121°C'de 15 dak tutularak dokuların ölmesi sağlanmıştır. Örnekler otoklavdan çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığına gelmesi beklenip yine EC metre ile ikinci okumalar yapılmıştır. Bu yöntem ile bitki türlerinde meydana gelen hücre membran zararlanmaları aşağıda belirtilen formül ile yüzde (%) olarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ İyon Sızıntısı} = (O.D_1 / O.D_2) \times 100$$

O.D₁ = 1. Okuma Değeri, O.D₂ = 2. Okuma Değeri

$$\% \text{ Zararlanma} = [(\% \text{ İyon Sız. (U.)} - \% \text{ İyon Sız. (K.)}) / 100 - \% \text{ İyon Sız. (K.)}] \times 100$$

U = Uygulama, K = Kontrol

3.2.3. Yaprak oransal su kapsamı (YOSK) ve turgor kaybı (TK)

Yaprak oransal su kapsamı ve turgor kaybı, Gulen ve Eriş'in (2003) yöntemine göre hesaplanmıştır. Yaprak örneklerinden her uygulamadan 3 tekerrür olacak şekilde 1,5 cm çaplı 3'er disk alınmıştır. Bu disklerin önce taze ağırlıkları, 4 saat saf suda bekletildikten sonra turgor ağırlıkları ve 70°C'deki etüvde 24 saat bekletildikten sonra kuru ağırlıkları kaydedilmiştir. Elde edilen veriler ile YOSK ve TK değerleri aşağıda belirtilen formül kullanılarak % olarak hesaplanmıştır.

$$YOSK = (Y. A. - K.A.) / (T.A. - K.A.) \times 100$$

$$T.K = (T.A. - Y.A.) / T.A. \times 100$$

YOSK = Yaprak Oransal Su Kapsamı, Y.A. = Yaş Ağırlık, TK = Turgor Kaybı, K.A. = Kuru Ağırlık, T.A. = Turgor Ağırlığı

3.2.4. Toplam klorofil miktarı

Klorofil miktarını belirlemek için Moran ve Porath'ın (1980) yöntemi esas alınmıştır. Her bir uygulamadan alınan yapraklardan 0,5 cm çaplı 3 adet disk tartıldıktan sonra cam tüplere konulmuştur. Her bir örnek üzerine 5 ml DMF (Dimetil formamid) konulup alüminyum folyo ile sarılarak +4°C'de buzdolabında 72 saat bekletilmiştir. Okuma yapılmadan önce örneklerin oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir ve daha sonra spektrofotometrede (Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS, ABD) 652 nm dalga boyunda absorbans okunmuştur. Elde edilen veriler ile klorofil miktarı aşağıda belirtilen formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{KM (mg/ gTA)} = \text{O.D}_{652\text{nm}} \times 29 \times \text{seyreltme faktörü} / \text{mg TA}$$

mg /gTA= 1 gram taze ağırlıktaki mg cinsinden klorofil miktarı, O.D_{652nm} = 652nm'deki okuma değeri, TA= Taze Ağırlık

3.2.5. Gövde ve kök yaş-kuru ağırlığı

Deneme sonunda her tekerrürden üçer adet bitki sökülüp, gövde ve kökleri birbirinden ayrılmış ve kökler iyice temizlenip, yıkandıktan sonra fazla nemi almak için havlu kağıtla kurularak ardından yaş ağırlıkları tartılmıştır. Gövde örneklerinde de yaş ağırlıklar tartıldıktan sonra kök ve gövde örnekleri 70°C'ye ayarlı etüvde sabit ağırlığa gelene kadar kurutulmuş ve kuru ağırlıkları belirlenmiştir (Cook ve Stubbendieck, 1986).

3.2.6. Prolin miktarı

Prolin ekstraksiyonu ve prolin miktarının belirlenmesinde Bates vd.'nin (1973) geliştirdiği yöntem bazı modifikasyonlar dikkate alınarak kullanılmıştır. Renk maddesi olarak asit-ninhidrin karışımı kullanılmıştır. İlk olarak, daha önceden -80'de muhafaza edilen yaprak örneklerinden 200 mg alınarak, 1 ml %3'lük sülfosalisilik asit ile homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler 5 000g, 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra, 200 µl supernatant, 400 µl ninhidrin reaktifi, 400 µl asetik asit ve 200 µl %3 sülfosalisilik asit cam tüplere aktarıldıktan sonra 100°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan çıkan örnekler buzun üstüne alınarak reaksiyon sonlandırılmış ve oda sıcaklığına geldiğinde üzerine 2 ml toluen eklenip, 20 saniye vortekslenmiştir. Daha sonra 4 000 g'de 20 saniye santrifüjlenen örneklerden üst faz alınarak spektrofotometrede 520 nm'de absorbans okumaları gerçekleştirilmiştir. Kör örnek olarak 1 ml toluen kullanılmıştır. Standart olarak farklı konsantrasyonlardaki L-Prolin solüsyonu kullanılmıştır ve çizilen standart eğriden örneklerin prolin miktarları hesaplanmıştır.

3.2.7. Toplam çözünebilir protein analizi

Toplam çözünebilir protein ekstraksiyonu Shen vd. nin (2003) yöntemi dikkate alınarak yapılmıştır. Ekstraksiyon çözeltisi (pH 7,8) hazırlamak için;

- 25 mM Tris base
- 275 mM Sakkaroz
- 2 mM EDTA
- 10 mM DTT
- 0,5 mM PMSF
- %1 PVP kullanılmıştır.

-80'de muhafaza edilen her bir uygulamadan, alınan 250 mg yaprak örneğine 1 ml ekstraksiyon çözeltisi eklenmiş ve havan yardımı ile homojenize edilmiştir. Homojenat, santrifüj tüplerine alınıp 10 000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Toplam çözünebilir protein miktarı Bradford (1976) yöntemine göre belirlenmiştir. Bu amaçla, santrifüjden sonra süpernatanttan 7,5 µL alınarak 50 µL'ye saf su ile tamamlandıktan sonra üzerine 1 mL Bradford boya çözeltisi ilave edilmiştir. Toplam çözünebilir protein miktarının hesaplanmasında 0, 4, 8, 10, 20, ve 40 µg/µL'lik BSA standartları kullanılmıştır. Absorbans okumaları 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede gerçekleştirilmiştir.

3.2.8. SDS-PAGE analizi

Kurşun uygulamalarının türlerin protein profillerine olan etkisi SDS-PAGE (Sodyum dodesilsülfat- Poliakrilamid Jel Elektroforezi) yöntemi ile belirlenmiştir (Lim vd., 1999; Gülen 2000). Toplam çözünebilir protein analizinde açıklandığı gibi ekstrakte edilen toplam protein çözeltisinden her bir örnek için 10 µg protein içerecek şekilde alınarak üzerlerine toplam hacmin 1/6'sı kadar 6X örnek yükleme çözeltisi eklenmiş ve bütün örneklerin hacmi saf su ile eşitlenmiştir. Daha sonra protein denatürasyonunu sağlamak amacıyla örnekler 3 dakika kaynar suda bekletilerek proteinlerin denatürasyonu sağlanmıştır. Kısa bir süre vortekslenen örnekler 5 sn santrifüjlendikten sonra SDS-PAGE analizi için yüklenmeye hazır hale getirilmiştir.

6X örnek yükleme çözeltisi bileşenleri

• 1 M Tris pH 6,8	3,5 ml
• Glyserol	1,8 ml
• Sodyum dodesilsülfat (SDS)	0,5 g
• Dithiothreitol (DTT)	0,465 g
• Bromophenol Blue	0,0006 g

SDS-PAGE analizinde elektroforez sistemi olarak Mini PROTEAN Tetra (Bio-Rad) kullanılmıştır. SDS-PAGE jelinde %12,5'lük ayırma jeli ve %4'lük yükleme jeli kullanılmıştır. Kullanılan jellerin kalınlığının 0,75 mm olmasını sağlayan jel kasetleri kullanılmıştır.

%12,5 ayırma jeli bileşenleri

• Saf su	1000 µL
• 1 M Tris-HCl pH 8,8	2200 µL
• %1 SDS	600 µL
• %36 Acrylamide/Bis (29:1)	2100 µL
• %3 Amonyum persülfat	100 µL
• TEMED	4 µL

Bu kimyasallar sırasıyla karıştırıldıktan sonra yükleme yapılacak olan jel kasetine bir mikro pipet kullanarak dökülmüştür. Jelin tam olarak polimerize olabilmesi için hava ile temasını engellemek gerektiğinden, döktüğümüz jelin üzerine yine bir mikro pipet ile 200 µL ultra saf su eklenerek 45 dakika boyunca polimerize olması için beklemeye bırakılmıştır.

%4 örnek yükleme jeli bileşenleri

• Saf su	1662 µl
• 1 M Tris-HCl ph 6,8	310 µl
• %36 Acrylamide/Bis (29:1)	250 µl
• %3 Amonyum persülfat	25 µl
• TEMED	4 µl

Polimerizasyonu gerekleŒmiŒ olan ayırma jelinin üzerindeki fazla su bir filtre kağıdı yardımı ile uzaklaŒtırdıktan sonra yukarıda verilen yükleme jeli bileŒenleri karıŒtırılıp, ayırma jelinin üzerine bir mikro pipet kullanılarak dklmŒtr. Bu iŒlemin ardından taraklar hava boŒluęu kalmayacak Œekilde yerleŒtirilmiŒtir. Jel 45 dakika boyunca polimerize olması için bırakılmıŒtır ve bu iŒlemin sonunda kasetler elektroforez için tankın içerisine yerleŒtirilmiŒtir.

Elektroforezde yürütme tamponu olarak aŒaęıda bileŒimi verilen Tris-Glisin-SDS zltisi kullanılmıŒtır (1L, 10X), hazırlanan zlti kullanım sırasında 1X' e seyreltilmiŒtir.

10X'lik yürütme tamponu bileŒenleri

- 250 mM Tris-base 30 g
- 1,92 M Glycine 144 g
- %0,5 SDS 5 g

Hazırlanan zlti, elektroforez tankı içerisine yerleŒtirilmiŒ jellerin üzerini örtecek Œekilde boŒaltılmıŒtır. Önceden hazırlanan örnekler her bir kuyucuğa 10 µg protein alacak Œekilde mikro pipet yardımıyla yklenmiŒtir.

Güç kaynağı olarak Thermo EC 1000-900 kullanılmıŒtır ve rnekler, 150 V'da akım serbest bırakılarak jelin sonuna kadar yrtlmŒtr.

Elektroforez iŒleminin sona ermesiyle kasetten çıkarılan jeller 3 kez ultra saf su ile yıkandıktan sonra saf su ile seyreltilmiŒ Commasie Brilliant Blue G-250 (Commasie Brilliant Blue G-250: dH₂O; 4:1) zltisine alınmıŒtır. Jeller gece boyunca 30 rpm'de alıŒan çalkalayıcı üzerinde bırakılarak protein bantları mavi renkli olarak görünür hale getirilmiŒtir. Jel zerindeki fazla boyanın giderilmesi için %25'lik metanol içerisinde çalkalayıcı üzerinde 5 dakika bekletildikten sonra 3 defa saf su ile yıkanmıŒtır. Bu aŒamadan sonra protein bantları florasan ıŒık altında grntlenmiŒtir.

Örneklerin, molekül ağırlıklarının belirlenmesinde SDS-PAGE moleküler ağırlık standardı kullanılmıştır (BioRad, Precision Plus Protein Standards). Bu şekilde molekül ağırlıkları bilinen bantlar temel alınır, örneklere ait protein bantlarının molekül ağırlıkları hesaplanmıştır.

3.2.9. İmmünblot (Western Blot) analizi

HSP'lerin immünoblot tekniği ile belirlenmesinde Arora ve Wisniewski'nin (1994) önerdiği yöntem Ergin (2012)'in yaptığı modifikasyonlar ile uygulanmıştır. Bu sebeple daha önce açıklandığı gibi bitkilerden ekstrakte edilen protein örnekleri SDS-PAGE'de yürütülmüştür.

Elektroforez işleminden sonra jellerdeki proteinlerin membrana aktarılması işlemi için, Bio-Rad Trans-Blot Turbo transfer sistem cihazı kullanılarak blotlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Sandviç sisteminin hazırlanması için süngerler ve nitroselüloz membran (Nitrocellulose membranes BioRad) önceden transfer tamponunda bekletilerek ıslatılmışlardır. Daha sonra sünger-membran-jel-sünger olacak şekilde ve aralarında hava boşluğu bırakılmayarak sandviç sistemi hazırlanmış ve kasetlere yerleştirilmiştir.

Transfer tampon çözeltisi bileşenleri:

- 25 mM Tris baz 3,03 g
- 192 mM Glisin 14,4 g
- %20 Metanol 200 ml

Proteinlerin nitroselüloz membrana aktarılması için blotlama işlemi 25 V'da 30 dk'da gerçekleştirilmiştir.

Bloklama işlemi gerçekleştirilmek üzere, blotlama işleminden sonra nitroselüloz membran çıkarılmış ve TBS'de 10 dakika yıkanmıştır.

TBS çözeltisi bileşenleri (1 l)

- Tris baz 6,05 g
- Sodyum klorür 8,76 g
- pH 7,5

Membranlar %5'lik BSA içeren TBST (Tris Buffer Saline Tween-20) çözeltisinde oda sıcaklığında gece boyunca inkübe edilerek membran yüzeyinin tamamen proteinle kaplanması sağlanmıştır. Blokaj işleminden sonra membranlar, fazla proteinleri gidermek amacıyla TBST (Tris Buffer Saline Tween-20) çözeltisi ile 2'şer kez 2'şer dakika çalkalanarak yıkanmıştır.

TBST çözeltisi bileşenleri (1 l)

- Tris baz 6,05 g
- Sodyum klorür 8,76 g
- %0,1 Tween-20 100 µl
- pH 7,5

Birinci antikor, 1:1500 oranında HSP 60 [Monoclonal Anti-Heat Shock Protein 60 Clone LK-2 (mouse)] %1 BSA (Bovine serum albumin) içeren TBST'de çözülerek hazırlanmıştır. Membranlar, birinci antikorda oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra, TBST'de 2'şer kez 10'ar dakika çalkalanarak yıkanmıştır. Aynı işlem HSP 23 [Monoclonal Anti-Heat Shock Protein 23 (rabbit)] antikoruna için de aynı şekilde gerçekleştirilmiştir. Yıkama işleminden sonra, %1 BSA içeren TBST'de çözülerek hazırlanan, 1:5000 oranındaki ikinci antikorda [Anti mouse IgG (Fc) AP Conjugate] oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyondan sonra membran TBST'de 4'er kez 10'ar dakika çalkalanarak yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından membran substrat (alkalin fosfataz enzimi) içerisinde yaklaşık 10-15 dakika kadar tutularak bantların renklenerek görünür hale gelmesi sağlanmıştır. Substrattan alınan membran saf su ile yıkanıp kurutulduktan sonra ortaya çıkan bant görüntüleri bir tarayıcı yardımıyla dijital ortama aktarılmıştır. Bantların densitometrik analizleri ise "Image J" programı yardımıyla yapılmıştır.

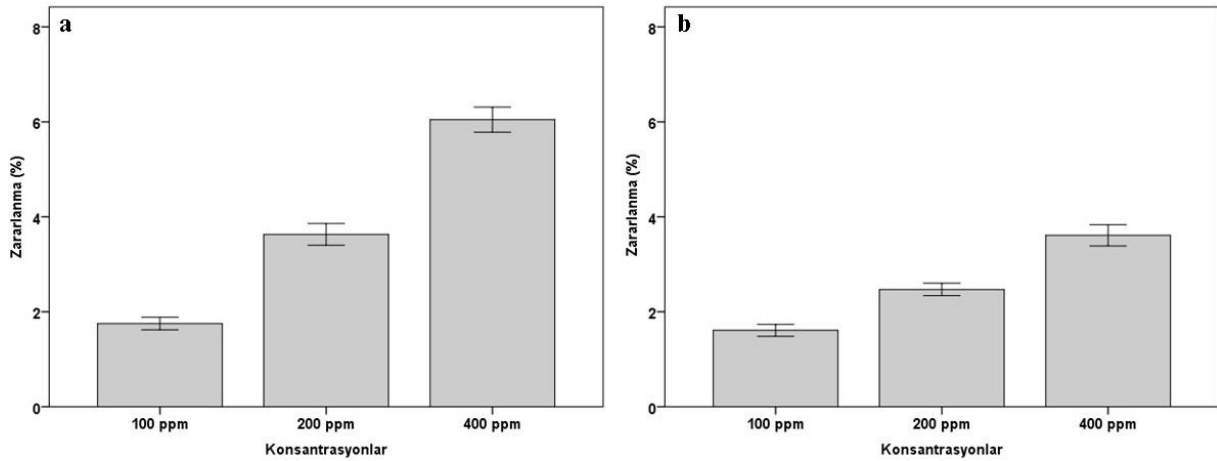
3.3. Verilerin Değerlendirilmesi

Elde edilen veriler ‘‘IBM SPSS STATISTICS 20 for Windows’’ istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Uygulamalar arasındaki farklılık ‘Duncan’ testi ile 0.05 önem seviyesinde ortaya konulmuştur.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Hücre Membran Zararlanma Oranı

Tez kapsamında, yaygın ağır metal kirleticileri sınıfından olan Pb metalinin hiperakümülatör özelliği olan iki tür süs bitkisinin protein metabolizması üzerine etkisi araştırılmıştır. Şekil 4.1’de Pb (NO₃)₂ uygulamalarına bağlı olarak kına çiçeği ve süs lahanası bitkilerinin yapraklarında hücre membran zararlanma oranları verilmiştir. Buna göre kına çiçeğinde 100 ppm de %1,8 200 ppm de %3,6 400 ppm de %6,0 oranında zararlanma belirlenmiştir. Süs lahanasında ise 100 ppm de %1,6 200 ppm de %2,5 400 ppm de %3,6 oranında zararlanma olduğu görülmüştür. Her iki türde de konsantrasyon arttıkça zararlanma oranının arttığı görülmüştür. Konsantrasyonlar arasındaki fark her iki tür içinde istatistikî olarak önemli bulunmuştur (p<0,05) (Ek Açıklamalar-A-B).



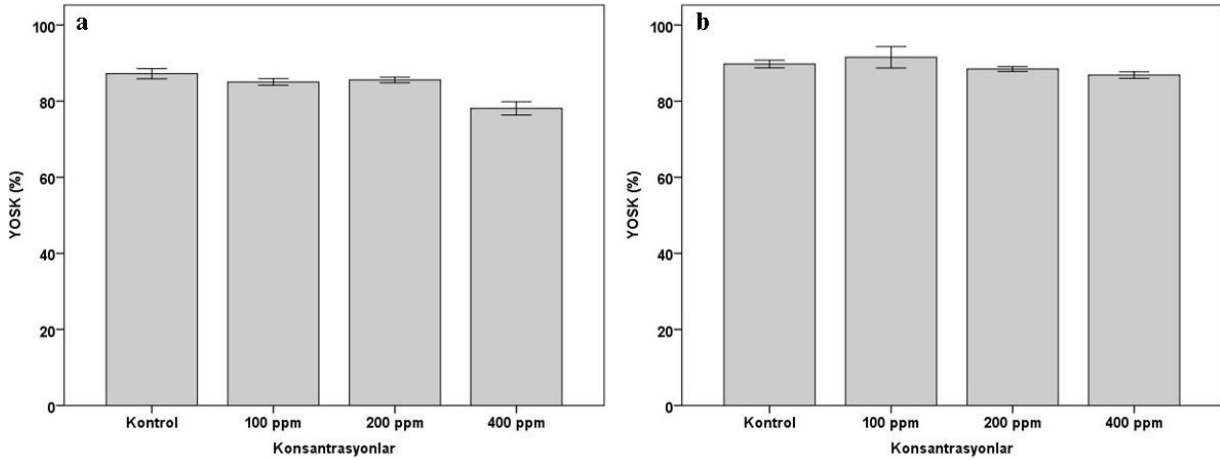
Şekil 4.1. Kurşun nitrat uygulamalarına bağlı olarak (a) kına çiçeği ve (b) süs lahanası bitkilerinin yapraklarındaki hücre membran zararlanması. Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS'lerini göstermektedir.

Membranların zarar görmesi sonucu su ve besin alınımında dengesizlikler meydana gelmekte, bu durum stoma iletkenliğinde azalma ve sonuç olarak fotosentez oranının düşmesi ile sonuçlanmaktadır. Yapılan çalışmadakine benzer şekilde, yulafta As metalinin bitkinin membran yapısını bozduğu ortaya konmuştur (Stoeva ve Bineva, 2003).

Benzer şekilde *Petunia hybrida* L. bitkisinde Cd, Cr, Cu, Ni ve Pb'nin etkilerinin incelendiği bir çalışmada tüm uygulamalarda iyon sızıntısında artışlar gözlemlenmiştir (Khan vd., 2019). Balouchi vd.nin (2017) fasulye de uyguladığı çeşitli ağır metallerin bitkide iyon sızıntısını arttırdığını gözlemlemiştir.

4.2. Yaprak Oransal Su Kapsamı (YOSK) ve Turgor Kaybı (TK)

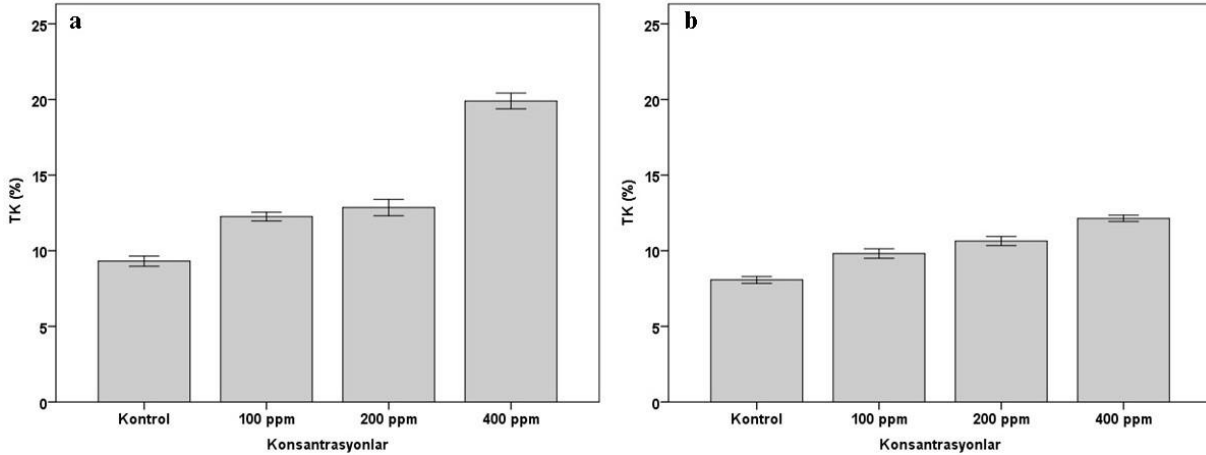
Kurşun uygulamasına bağlı olarak kına çiçeği ve süs lahanası bitkilerinin yapraklarındaki YOSK Şekil 4.2' de verilmiştir. Kına çiçeğinin YOSK oranına bakıldığında, kontrolde %87,22 100 ppm'de %85,04 200 ppm'de %85,57 iken, 400 ppm'de ise bu oran %78,10 ile en düşük seviyede gözlemlenmiştir. Süs lahanasında kontrolde %89,76 100 ppm'de %91,53 olarak belirlenen YOSK 200 ve 400 ppm uygulamalarında azalarak sırasıyla %88,46 ve %86,86 olarak belirlenmiştir. Konsantrasyonlar arası fark kına çiçeği için önemli bulunurken süs lahanası için istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur ($p < 0,05$) (Ek Açıklamalar-C-D).



Şekil 4.2 Kurşun nitrat uygulamasına bağlı olarak (a) kına çiçeği ve (b) süs lahanası bitkilerinin yapraklarındaki yaprak oransal su kapsamı (YOSK). Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS' larını göstermektedir.

Kurşun uygulamalarının süs lahanası ve kına çiçeği bitkilerinin yapraklarındaki TK üzerindeki etkisi Şekil 4.3' de gösterilmiştir. Genel olarak konsantrasyon arttıkça her iki türde de TK oranının arttığı, bu artışın kına çiçeğinde özellikle 400 ppm uygulamasında dikkat çekici olduğu belirlenmiştir.

Kına çiçeğinin TK, kontrol %9,31 100 ppm %12,25 ve 200 ppm %12,85 uygulamaları arasında küçük farklılıklar gösterirken, 400 ppm uygulamasında %19,90 ile en yüksek değere ulaşmıştır. Süs lahanasının TK oranları da kontrolde %8,07 100 ppm'de %9,81 200 ppm'de %10,64 olup, 400 ppm'de %12,13 ile en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Buna göre konsantrasyonlar arasındaki fark her iki tür için istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$) (Ek Açıklamalar-E-F).



Şekil 4.3. Kurşun nitrat uygulamalarına bağlı olarak (a) kına çiçeği ve (b) süs lahanası bitkilerinin turgor kaybındaki (TK) değişimi. Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS' larını göstermektedir.

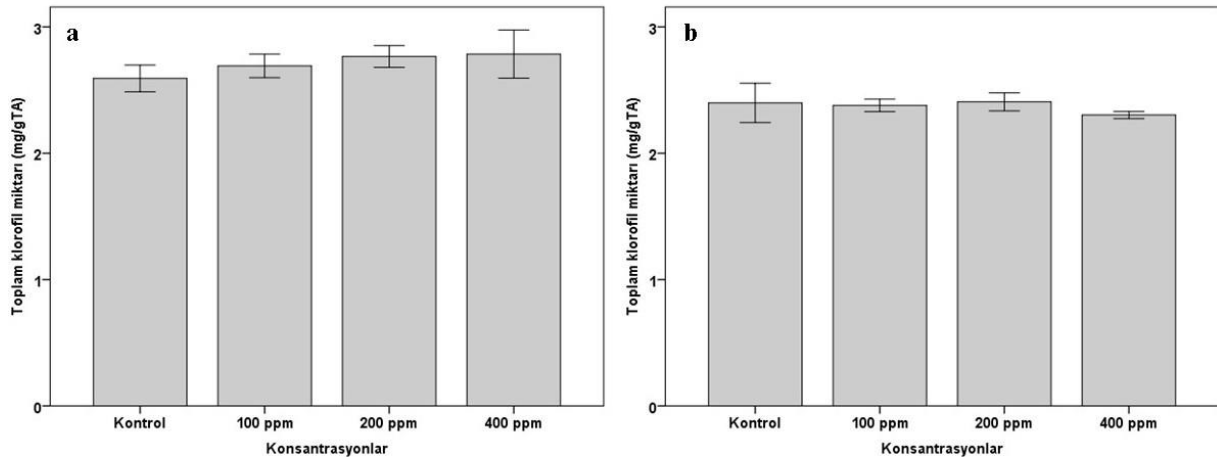
Yaprak oransal su kapsamı ve TK bitkinin su dengesini belirlemede önemli bir belirteçtir (Siddiqui vd., 2015). Turgor basıncında meydana gelen değişim stoma hareketlerini etkilemekte ve bitkiler kurşun toksisitesi durumunda turgor basıncını korumak için prolin gibi ozmolitleri sentezlemektedirler (Qureshi vd., 2007).

Alzahrani vd. (2020) yıldız çiçeğinde yaptıkları bir çalışmada kurşun stresi altında bitkilerin YOSK'unda kontrole göre bir azalma görüldüğünü kaydetmişlerdir. Sorgum bitkisine (*Sorghum bicolor* L. Moench) farklı konsantrasyonlarda, farklı ağır metal uygulamaları yapılmış ve bitkilerin artan konsantrasyona bağlı olarak YOSK'unda azalmalar olduğu bildirilmiştir. Yıldırım vd. (2019) rokada (*Eruca sativa* L.) yaptıkları bir çalışmada bitkide Cd uygulamalarının konsantrasyon artışı ile YOSK'u azalttığını bildirmişlerdir.

Chara fragilis ve *Callitriche palustri* gibi su bitkilerinde yapılan bir çalışmada bitkiler çeşitli ağır metaller ile muamele edilmiş ve bu metallerin toksik etkilerinin yanı sıra bitkilerin turgor kaybını da azalttığı gözlemlenmiştir (Poklonov vd., 2018).

4.3. Toplam Klorofil Miktarı

Kurşun uygulamalarına bağlı olarak kına çiçeği ve süs lahanası bitkilerinin toplam klorofil miktarı Şekil 4.4' de verilmiştir. Kına çiçeğinin klorofil miktarı kontrol 2,59 mg/g TA, 100 ppm 2,69 mg/g TA, 200 ppm'de 2,77 mg/g TA ve 400 ppm'de ise 2,78 mg/g TA ile konsantrasyon artışı ile bir artış belirlenmiştir. Süs lahanasının klorofil miktarı kontrolde 2,40 100 ppm'de 2,38 200 ppm'de 2,41 400 ppm'de ise 2,30 mg/g TA olarak belirlenmiştir. Toplam klorofil miktarı bakımından konsantrasyonlar arasındaki fark iki tür için de önemsiz bulunmuştur ($p < 0,05$) (Ek Açıklamalar-G-H).



Şekil 4.4. Kurşun nitrat uygulamalarına bağlı olarak (a) kına çiçeği ve (b) süs lahanası bitkilerinde toplam klorofil miktarı. Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS' larını göstermektedir.

Ağır metaller bitki hücresinde oksidatif hasarı tetiklediğinden, metaller klorofil sentezinde rol oynayan belirli enzimlerin sentezini engelleyebilmekte ve bu nedenle, klorofil konsantrasyonu ağır metal stresi altında azalma gösterebilmektedir.

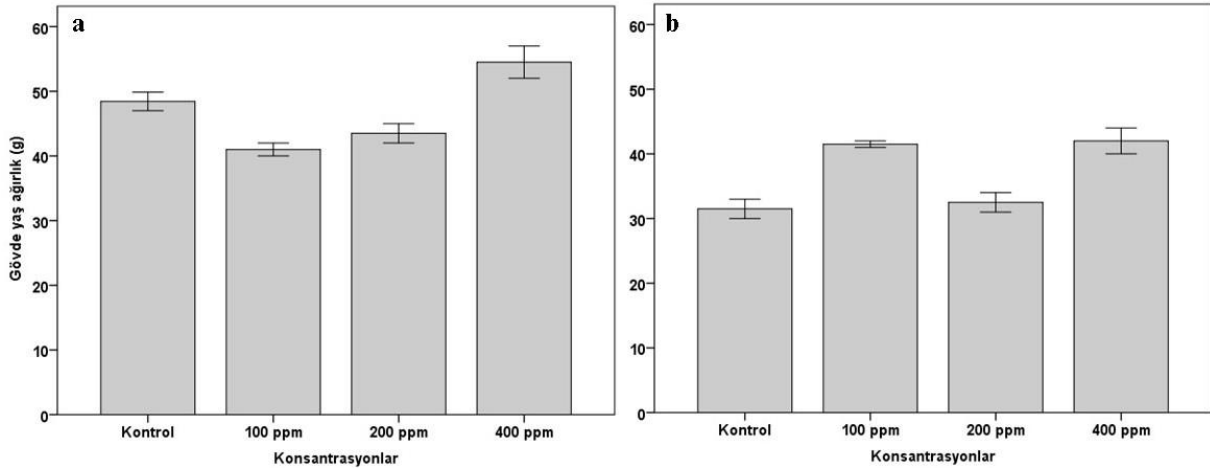
Mısır bitkisinde yapılan çalışmalarda çeşitli ağır metal (Cd, Cr, Ni ve Cu) uygulamaları yapılmıştır ve ağır metal konsantrasyonu arttıkça bitkilerdeki toplam klorofil miktarının azaldığı bildirilmiştir (Barbosa vd., 2010; Rizvi ve Khan, 2019). Yine mısır bitkisinde yapılan bir çalışmada, düşük Pb konsantrasyonlarında (195 mg/kg ve 390 mg/kg) klorofil miktarının değişmediği ancak, yüksek konsantrasyonlarda (585 mg/kg) azaldığı rapor edilmiştir (Rizvi ve Khan, 2018).

Kadmiyum stresi uygulanan *Bacopa monnieri* L. ve petunya bitkisinde yapılan çalışmalarda da klorofil miktarının düşük Cd konsantrasyonlarından etkilenmediği, konsantrasyon artışı durumunda ise azaldığı belirtilmiştir (Singh vd., 2006; Khan vd., 2019).

Yapılan bu çalışmada da klorofil miktarı bakımından, konsantrasyonlar önemli olmaması, yapılan Pb uygulamalarının her iki türde de klorofil miktarını etkileyecek düzeyde olmadığını göstermektedir. Bu durumun, her iki bitki türünün hiperakümülatör olmasından ve bu bitkilerde kurşunun köklerden sürgünlere taşınmasının kısıtlanmasından da kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

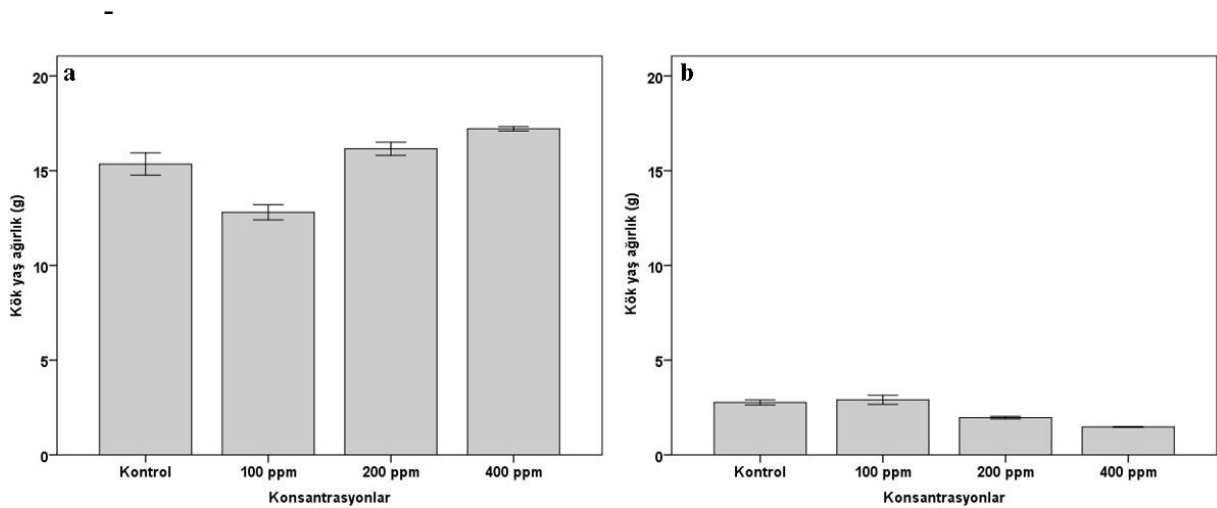
4.4. Gövde ve Kök Yaş-Kuru Ağırlığı

Şekil 4.5' de Pb uygulamalarının kına çiçeği ve süs lahanası bitkilerinin gövde yaş ağırlığı üzerindeki etkisi gösterilmiştir. Uygulamalara göre gövde yaş ağırlığı değerlendirildiğinde, kına çiçeğinde en düşük gövde yaş ağırlığı 41,16 g ile 100 ppm uygulamasında elde edilirken, en yüksek gövde yaş ağırlığı (54,69 g) ise 400 ppm uygulamasından elde edilmiştir. Süs lahanasının kontrol grubu 31,38 g ile en düşük gövde yaş ağırlığına sahip olurken, 400 ppm uygulamasında ise 42,25 g ile en yüksek gövde yaş ağırlığı değerine sahip olmuştur. Gövde yaş ağırlığı bakımından istatistiksel olarak konsantrasyonlar arasındaki fark her iki tür için de önemli bulunmuştur ($p < 0,05$) (Ek Açıklamalar-F-G).



Şekil 4.5. Kurşun nitrat uygulamalarına bağlı olarak (a) kına çiçeği ve (b) süs lahanası bitkilerinde gövde yaş ağırlığı. Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS' larını göstermektedir.

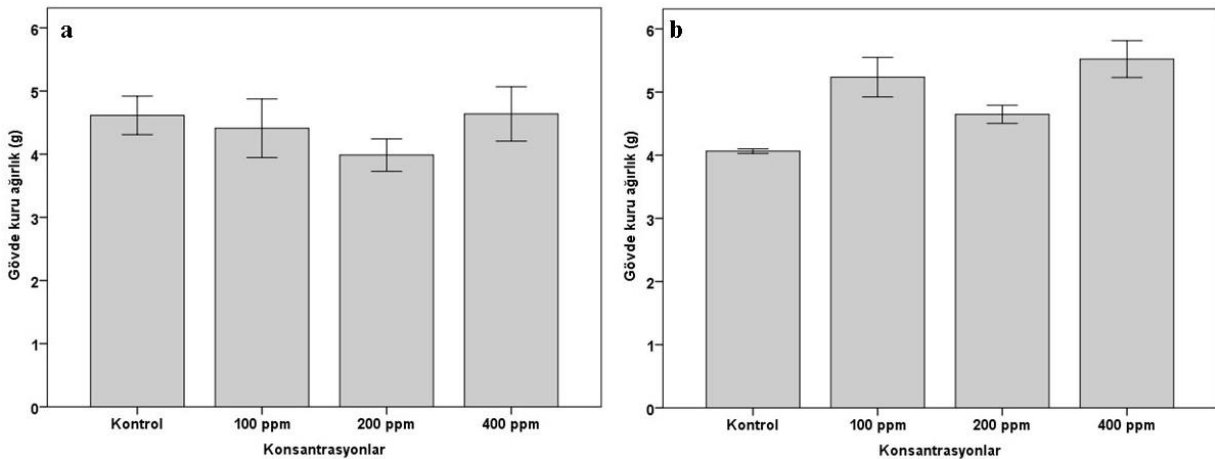
Kurşun uygulamalarına bağlı olarak kına çiçeği ve süs lahanası bitkilerinin kök yaş ağırlığındaki değişimler Şekil 4.6'da verilmiştir. Kök yaş ağırlığı bakımından kına çiçeğinde gövde yaş ağırlığındaki duruma benzer sonuçlar elde edilmiştir. Kök yaş ağırlığı 100 ppm'de en düşük değeri alırken (12,80 g), en yüksek değere (17,21 g) ise 400 ppm uygulamasında ulaşmıştır. Süs lahanasının en yüksek kök yaş ağırlığı (2,90 g) 100 ppm uygulamasında görülürken, en düşük kök yaş ağırlığı (1,47 g) değeri 400 ppm uygulamasında görülmüştür. Kök yaş ağırlığı bakımından konsantrasyonlar arasındaki fark iki tür için de istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$) (Ek Açıklamalar-H-I).



Şekil 4.6. Kurşun nitrat uygulamalarına bağlı olarak (a) kına çiçeği ve (b) süs lahanası bitkilerinde kök yaş ağırlığı. Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS' larını göstermektedir.

Şekil 4.7’de Pb uygulamasının kına çiçeği ve süs lahanası bitkilerinin gövde kuru ağırlığı üzerindeki etkisi gösterilmiştir. Kına çiçeği bitkilerinin gövde kuru ağırlığı incelendiğinde, en düşük gövde kuru ağırlığı 3,98 g ile 200 ppm’de bulunurken, en yüksek (4,63 g) gövde kuru ağırlığı ise 400 ppm’de bulunmuştur. Süs lahanasının kontrol grubunda en düşük gövde kuru ağırlığı (4,06 g) elde edilirken, en yüksek gövde kuru ağırlık değeri (5,52 g) 400 ppm uygulamasından elde edilmiştir.

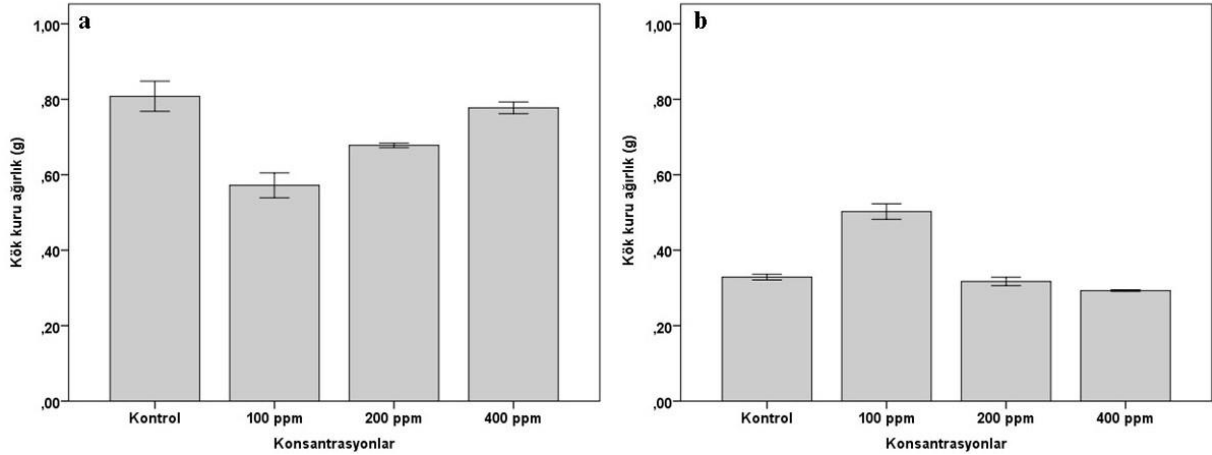
Gövde kuru ağırlığı bakımından konsantrasyonlar arasındaki fark kına çiçeğinde önemsiz iken süs lahanasında istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($p>0,05$) (Ek Açıklamalar-J-K).



Şekil 4.7. Kurşun nitrat uygulamalarına bağlı olarak (a) kına çiçeği ve (b) süs lahanası bitkilerinde gövde kuru ağırlığı. Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS' larını göstermektedir.

Kurşun uygulamalarına bağlı olarak kına çiçeği ve süs lahanası bitkilerinin kök kuru ağırlığındaki değişimler Şekil 4.8’de verilmiştir. Kına çiçeğinde en yüksek kök kuru ağırlığı (0,80 g) kontrol grubunda tespit edilirken, en düşük kök kuru ağırlığı ise 0,57 g ile 100 ppm uygulamasında tespit edilmiştir. Süs lahanasının 100 ppm uygulamasında en yüksek kök kuru ağırlık değeri elde edilirken, en düşük kök kuru ağırlık değeri (0,29 g) 400 ppm uygulamasından elde edilmiştir.

Kök kuru ağırlığı bakımından konsantrasyonlar arasındaki fark iki tür için de önemli bulunmuştur ($p<0,05$) (Ek Açıklamalar-L-M).



Şekil 4.8. Kurşun nitrat uygulamalarına bağlı olarak (a) kına çiçeği ve (b) süs lahanası bitkilerinde kök kuru ağırlığı. Dikey barlar tekrerrilerin \pm SS' larını göstermektedir.

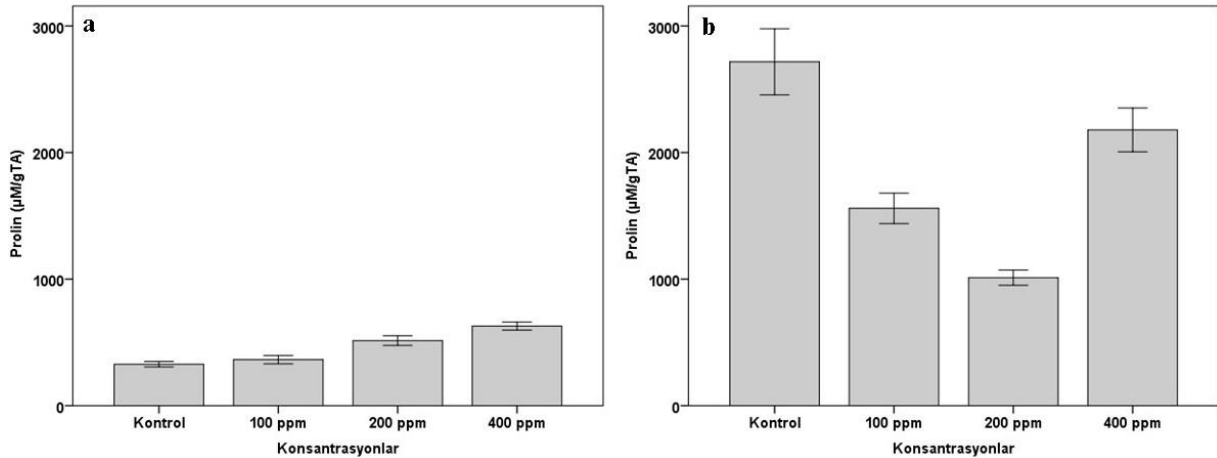
Daha önce yapılan pek çok çalışmada yüksek Pb konsantrasyonlarının bitkilerde biyokütleyi olumsuz yönde etkileyerek toprak üstü yaş-kuru ağırlığını ve aynı zamanda kök yaş-kuru ağırlığını azalttığı bildirilmiştir (Eren ve Dağhan, 2014; Dağhan, 2016; Eid vd., 2018; Alacabey ve Zorer Çelebi, 2020; Dere ve Doğan, 2020).

Yapılan bu çalışmadaki sonuçlar ise, önceki çalışmaların aksine kına çiçeği ve süs lahanası bitkilerinde Pb uygulamalarına bağlı olarak toprak üstü aksamda ya da köklerde büyüme geriliğine yol açacak önemli bir değişiklik olmadığını ortaya koymuştur.

Bu çalışmada kullanılan bitkilerin büyüme ve gelişmelerinde herhangi bir aksama görülmemesi bu bitkilerin hiperakümülatör bitki olmasından ve ayrıca uygulanan konsantrasyonların bu bitkilerde büyüme ve gelişmeyi olumsuz etkileyebilecek kadar yüksek olmamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4.5. Prolin Miktarı

Şekil 4.9'da kına çiçeği ve süs lahanası bitkilerinde kurşun uygulamalarının prolin miktarı üzerine etkisi gösterilmiştir. Kına çiçeğinde Pb konsantrasyonunun artmasına paralel olarak prolin miktarının arttığı; kontrolde 327,7 $\mu\text{M/gTA}$ olarak belirlenen prolin miktarı 100, 200 ve 400 ppm'de sırasıyla 364,1, 506,1 ve 629,1 $\mu\text{M/gTA}$ olarak belirlenmiştir. Süs lahanasında, 100 ppm (1559,6 $\mu\text{M/gTA}$) ve 200 ppm (1011,7 $\mu\text{M/gTA}$) uygulamasında prolin miktarının azaldığı 400 ppm'de (2179,2 $\mu\text{M/gTA}$) ise arttığı ancak tüm uygulamalarda prolin miktarının kontrolden (2716,9 $\mu\text{M/gTA}$) daha düşük olduğu saptanmıştır. İstatistiksel olarak konsantrasyonlar arası fark her iki tür için de önemli bulunmuştur ($p < 0,05$) (Ek Açıklamalar-N-O).



Şekil 4.9. Kurşun nitrat uygulamalarına bağlı olarak (a) kına çiçeği ve (b) süs lahanası bitkilerinde prolin miktarı. Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS' larını göstermektedir.

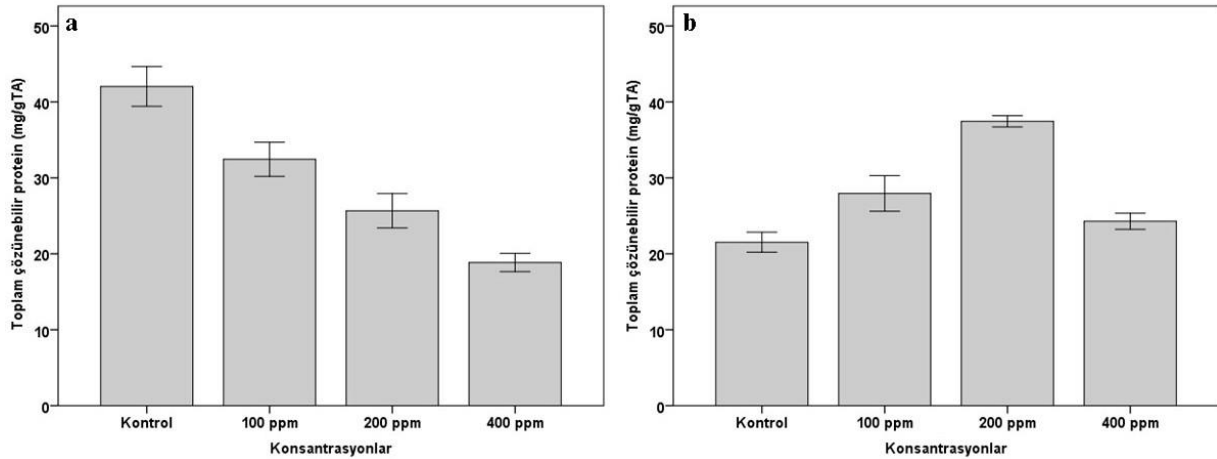
Prolin, bitkileri kuraklık, tuzluluk veya ağır metaller gibi çevresel stresler altında oluşan ROS'ların zararlı etkilerinden koruyan ozmoprotektan bir molekül görevi gören çok işlevli bir amino asittir (Singh vd., 2014). Yüksek bitkilerde bir stres belirteci olarak görev yapan prolin genellikle çevresel streslere yanıt olarak fazla miktarlarda birikir (Ashraf vd., 2010).

Yapılan çalışmalarda çeşitli bitkilerde Pb stresi koşullarında prolin miktarının arttığı bildirilmiştir (Nautiyal ve Sinha, 2012; Alzahrani vd., 2020). Prolinin stres koşullarında artan ROS'ların temizlenmesine ve hücre altı yapıların stabilize edilmesine yardımcı olduğu ve ayrıca hücre içindeki redoks homeostazını düzenlediği bilinmektedir (Wang vd., 2015). Emamverdian vd. (2015), prolinin ağır metal stresi altında bir protein stabilizatörü olarak rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir. Bazı araştırmacılar da bitkide Pb stresinden kaynaklanan ROS'ların temizlenmesinde veya Pb'nin şelatlanarak detoksifikasyonunda prolinin rol oynadığını bildirmişlerdir (Farago ve Mullen, 1979; Sharmila ve Pardha Saradhi, 2002).

Bu çalışmada, ROS'lara bakılmamakla birlikte, kına çiçeğinin prolin miktarının konsantrasyon artışına bağlı olarak artması, ROS'lara karşı bu bitkinin geliştirdiği bir savunma mekanizması olarak prolin miktarını arttırmaktan kaynaklanıyor olabilir. Malar vd. (2016) Pb'nin büyük ölçüde köklerde biriktiğini ve daha sonra yaprak sapı ve yaprak dokularına taşındığını belirtmişlerdir. Süs lahanasında ise 200 ppm'e kadar prolin miktarının azaldıktan sonra 400 ppm'de artış göstermesi, Pb'nin belli bir konsantrasyona kadar köklerde birikmesi ve bitkinin yapraklarına translokasyonunun engellenmesi ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir.

4.6. Toplam Çözünabilir Protein Miktarı

Genel olarak Şekil 4.10 incelendiğinde Pb uygulamalarının kına çiçeği bitkisinde konsantrasyon artışına bağlı olarak toplam protein miktarının kontrole (42,04 mg/gTA) göre giderek azaldığı gözlemlenmiştir. En düşük protein miktarı 18,85 mg/gTA ile 400 ppm uygulamasında görülmüş olup bunu 25,66 mg/gTA ile 200 ve 32,45 mg/gTA ile de 100 ppm uygulamaları takip etmiştir. Süs lahanasında ise kontrole (21,53 mg/gTA) göre bütün uygulamalarda bir artış gözlemlenmiştir. En yüksek protein miktarı 200 ppm (37,45 mg/gTA) uygulamasında görülürken, bunu sırasıyla 100 ppm (27,94 mg/gTA) ve 400 ppm uygulamaları takip etmiştir (24,28 mg/gTA). Çözünabilir protein miktarı bakımından konsantrasyonlar arasındaki fark her iki tür için de önemli bulunmuştur ($p < 0,05$) (Ek Açıklamalar-P-R).



Şekil 4.10. Kurşun nitrat uygulamalarına bağlı olarak (a) kına çiçeği ve (b) süs lahanası bitkilerinde toplam çözünebilir protein miktarı. Dikey barlar tekerrürlerin \pm SS' larını göstermektedir.

Abiyotik stres sırasında protein içeriklerindeki bu değişiklikler, stres koşulları altında bitki tepkilerinde ortaya çıkan anahtar sürecin belirlenmesine yönelik potansiyel biyolojik belirteçler olarak kullanılabilir (Tran ve Popova, 2013).

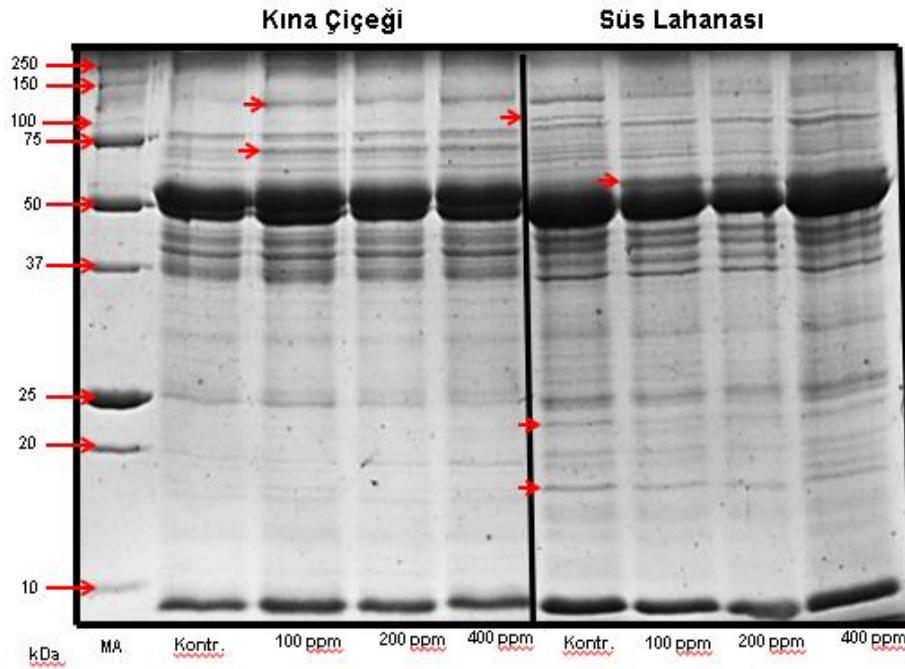
Kumar vd. (2013) *Talinum triangulare* bitkisinde yapmış oldukları bir çalışmada Pb uygulamalarının, konsantrasyon artışına bağlı olarak protein içeriğini azalttığını bildirmişlerdir. Singh vd. (2006) yaptıkları bir çalışmada Cd stresi ile muamele edilen *Bacopa monnieri* L. bitkisinin konsantrasyon artışına bağlı olarak protein içeriğinin azaldığını gözlemlemişlerdir. *B. monnieri*'nin köklerinin ve yapraklarının protein içeriğindeki bu azalmanın, proteaz veya diğer katabolik enzimlerin artan aktivitesine bağlı olarak çözünen proteinlerin parçalanmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. *Triticum aestivum* L. cv. Ceyhan 99'daki bir çalışmada buğday fidelerine uygulanan Pb çözeltisinin derişimi arttıkça kök ve otsu gövdede toplam protein miktarının azaldığı belirlenmiştir (Çolak ve Doğan, 2011). Yıldız çiçeğinde yapılan bir çalışmada ise Pb stresi altında bitkilerin toplam protein miktarında konsantrasyon artışına bağlı olarak önemli bir artış olduğu kaydedilmiştir (Alzahrani vd., 2020).

Yapılan bu çalışmada ise kına çiçeğinde konsantrasyon artışı karşısında toplam çözünebilir protein miktarının kademeli olarak azalması bu türün Pb stresine karşı hassas olduğunu göstermektedir. Buna karşılık süs lahanasında 200 ppm'e kadar çözünebilir protein miktarının artması daha sonra 400 ppm'de azalması ise süs lahanasının 200 ppm'e kadar Pb konsantrasyonundan etkilenmediğini göstermiştir.

4.7. SDS-PAGE

Şekil 4.11'de Pb uygulamasına bağlı olarak kına çiçeği ve süs lahanası bitkilerinin toplam protein profilleri gösterilmiştir. Çalışılan süs bitkilerinin profilleri incelendiğinde kına çiçeğinde 100, 200 ve 400 ppm'lik konsantrasyonlarda yaklaşık 137 kDa büyüklüğünde bir protein bandı gözlemlenirken, aynı bant kontrol uygulamasında gözlemlenememiştir. Kına çiçeğinde 75 kDa büyüklüğünde başka bir protein bandı kontrolde saptanamazken diğer tüm uygulamalarda saptanmıştır.

Kına çiçeğinde gözlemlenen 137 kDa büyüklüğündeki protein bandı süs lahanasında da gözlenmiştir, ancak bu bant kontrolde belirgin bir şekilde gözlemlenirken uygulamalarda belirsizleşmiştir. Büyüklüğü 111 kDa olarak tespit edilen bir protein bandı kontrol ve 400 ppm uygulamasında tespit edilirken, 100 ve 200 ppm uygulamalarında tespit edilememiştir. Yapılan tüm uygulamalarda 61 kDa büyüklüğündeki başka bir bant görülürken, aynı bant kontrol grubunda görülmemiştir. Yine süs lahanasında 23 kDa büyüklüğünde bir bant tespit edilmiş olup bu bant kontrol ve 400 ppm uygulamasında 100 ve 200 ppm'e göre daha yoğun olarak gözlemlenmiştir. Kontrol bitkilerinde yoğun olarak tespit edilen, 17 kDa büyüklüğündeki bir başka bant ise uygulamalarda yoğunluğu azalmış olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.11. Kurşun nitrat uygulamalarına bağlı olarak kına çiçeği ve süs lahanası bitkilerinde SDS-PAGE protein profilleri. MA: Moleküler ağırlık standardı (kDa).

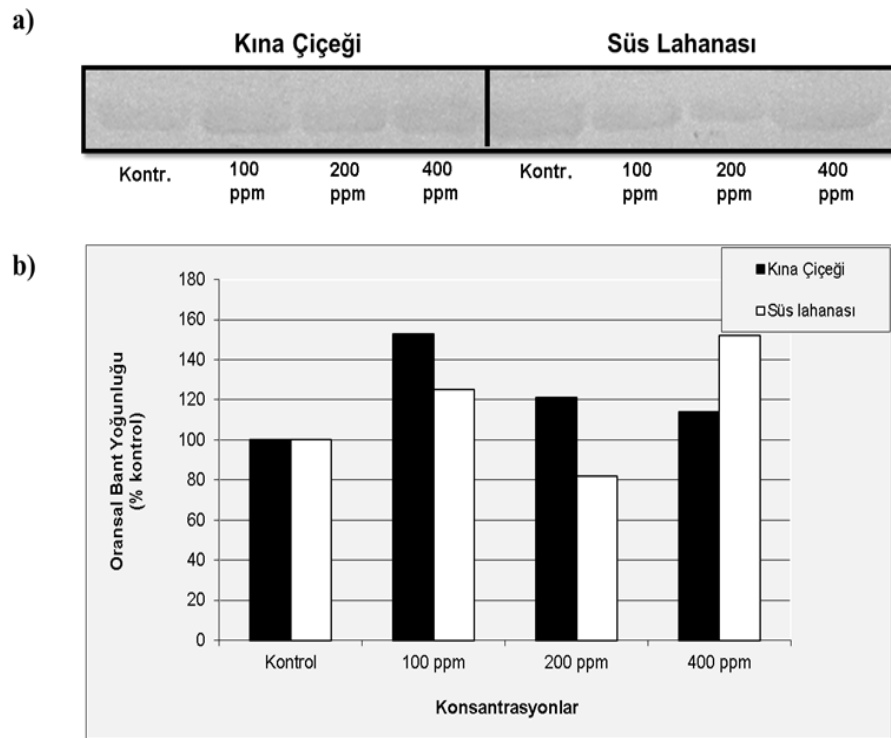
SDS PAGE yöntemi biyokimyasal teknikler arasında yer alan ve bitki koleksiyonlarının genetik yapısını tanımlamada kolay ve geçerli olması sebebi ile oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Babaoğlu vd., 2004). Hücresel süreçlerin kontrolünde proteinlerin fonksiyonel moleküller olarak önemli bir yeri olduğundan, SDS PAGE kullanarak karşıt genotipler arasında proteinlerin profil ve yapısındaki değişikliklerin araştırılması önem arz etmektedir (Arefian vd., 2014).

Pb bitki hücrelerinde sitoplazmik proteinler ile etkileşime girmekte ve toksisite bitkilerdeki protein havuzlarının boyutlarını azaltmaktadır (Garcia vd., 2006; Piotrowska vd., 2009). Yalnız bitki hücreleri toksisite durumunda tolerans için önemli bir amino asit olan prolin gibi çeşitli amino asitlerin seviyesini arttırmaktadır (Qureshi vd., 2007). Yapılan bu çalışmada da Pb stresinin neden olduğu bazı protein kayıpları saptanmıştır.

4.8. İmmünblot (Western Blot)

İmmünblot analizleri sonucunda, HSP 60 antikoru ile belirlenen 61 kDa'luk ısı şoku proteininin kına çiçeği ve süs lahanası bitkilerindeki durumu Şekil 4.12'de gösterilmiştir. Buna göre tespit edilen HSP 60'ın kına çiçeğinde 100 ppm uygulamasında kontrole göre bir artış gösterdiği, ancak artan konsantrasyonlarda yoğunluğunun düştüğü belirlenmiştir.

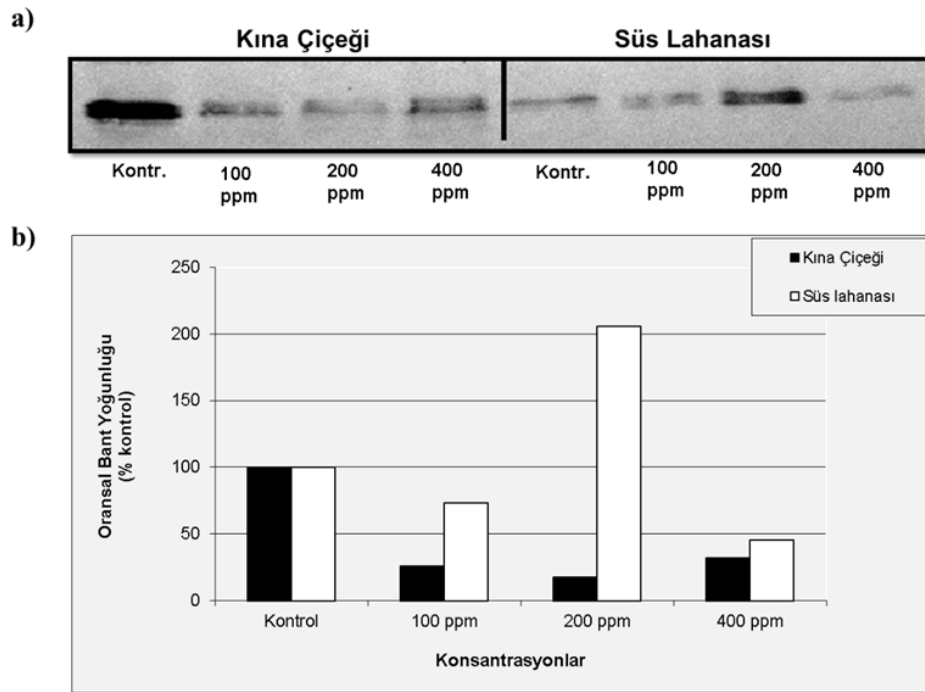
Süs lahanası bitkisinde ise HSP 60'ın kontrole göre 100 ppm uygulamasında arttığı, 200 ppm uygulamasında kontrolden daha düşük yoğunlukta olduğu, 400 ppm uygulamasında ise en yüksek seviyeye ulaştığı gözlenmiştir.



Şekil 4.12. Kurşun nitrat uygulamalarına bağlı olarak kına çiçeği ve süs lahanası bitkilerinde HSP 60 proteininin görünümü (a) ve HSP 60 proteinin bant yoğunluğu (b).

Kurşun konsantrasyonlarına bağlı olarak yoğunluğu değişen 23 kDa'luk bir HSP 23 proteini her iki bitki türünde de tespit edilmiştir (Şekil 4.13). Belirlenen HSP 23 proteini kına çiçeğinde kontrolde çok yoğun bir şekilde gözlemlenirken, Pb konsantrasyonlarında daha düşük yoğunlukta gözlemlenmiştir. En düşük yoğunluk 200 ppm uygulamasından elde edilmiştir.

Süs lahanası bitkisinde ise HSP 23 proteinin yoğunluğu 100 ppm ve 400 ppm uygulamalarında kontrole göre daha düşük bulunurken, 200 ppm uygulamasında ise kontrolün yaklaşık 2 katına çıkararak en yüksek düzeye ulaştığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.13. Kurşun nitrat uygulamalarına bağlı olarak kına çiçeği ve süs lahanası bitkilerinde HSP 23 proteininin görünümü (a) ve HSP 23 proteinin bant yoğunluğu (b).

Proteinler işlevsel olarak çok yönlü makromoleküllerdir. Hücresel sinyalizasyon, düzenleme, kataliz, moleküllerin hücre içi ve hücreler arası hareketi, membran füzyonu, yapısal destek ve korumada görev alırlar (Amm vd., 2014). Bitkilerin abiyotik stres koşulları altında hayatta kalabilmesi için proteinlerin doğal konformasyonunun korunması ve doğal olmayan proteinlerin birikiminin azaltılması zorunludur.

HSP'ler hücrelerdeki stresin olumsuz etkilerini azaltmada görev yapan moleküler şaperonlardır (Swindell vd., 2007; Akerfelt vd., 2010; Al-Wahaibi 2011; Xu vd., 2011).

HSP 60 metal stresi de dahil olmak üzere stres ortamlarında ve normal koşullarda hücresel işlevler için gereklidir, HSP 60 şaperonlarının indüksiyonunun, sitoplazmada metal iyonları varlığında bile proteinlerin denatürasyonunu engellediğini ortaya çıkarmıştır (Sarry vd., 2006; Rodríguez-Celma vd., 2010). İspanakta (*Spinacia oleraceae* L.) yapılan bir çalışmada ağır metal stresi koşullarında HSP 60'nın önemli miktarda arttığı ve Pb kontaminasyonunda erken uyarı için kullanılabilecek önemli biyomarkır olduğu bildirilmiştir (Wang vd., 2011).

sHSP ailesi şaperonları, yanlış katlanma ve çeşitli stres etkenleri nedeniyle meydana gelen protein birikimini önleyerek hücreyi korumada rol alan, 12-42 kDa arasında değişen moleküler ağırlığa sahip proteinlerdir (Haslbeck vd., 2005; Muthusamy vd., 2017). *Pisum sativum*'da sHSP 18.1'in ve *Synechocystis sp.*'de sHSP 16.6'nın *in vitro* koşullar altında katlanmamış proteinlerin katlanma sürecinde rol aldığı bildirilmiştir (Mogk vd., 2003). Çeşitli bitkilerde yapılan çeşitli ağır metal streslerinin HSP'lerin sentezini arttırdığı yönünde çalışmalar bulunmaktadır (Czarnecka vd., 1988; Ogawa vd., 2009; Lee ve Ahn, 2013).

Sonuçlar değerlendirildiğinde, HSP 60'ın kına çiçeğinde tüm uygulamalarda kontrole göre yoğunluğunun artması, strese karşı savunma mekanizmasında rol oynadığını göstermektedir. Ancak, 100 ppm'den sonra HSP 60 sentezinde bir azalma meydana gelmesi bunun yüksek seviyede kirlilik söz konusu olduğunda savunmadaki etkinliğinin azaldığı anlamına gelmektedir.

Süs lahanasında ise HSP 60 sentezinin özellikle 400 ppm uygulamasında en yüksek seviyeye ulaşması bu bitkinin Pb stresine başa çıkma potansiyelinin daha yüksek olduğunu ve yüksek kirlilik söz konusu olduğunda Pb metalini daha iyi tolere edebileceğini göstermektedir. Bu durum süs lahanasının kurşun metaline karşı hiperakümülatör özelliğini ön plana çıkarmaktadır.

Kına çiçeğinde HP 23 sentezinin kontrolde daha yüksek olup, Pb konsantrasyonlarına göre genelde azalma eğiliminde olması bu bitkide Pb stresine toleransta HSP 23'ün önemli bir rolünün bulunmadığı anlamına gelmektedir. Diğer taraftan süs lahanası bitkisinde özellikle 200 ppm uygulamasında meydana gelen önemli artış, bu bitkide Pb stresine karşı toleransta HSP 23'ün etkin bir rol oynadığını göstermektedir. Konsantrasyonun daha da artması durumunda sentezdeki azalma, daha yüksek konsantrasyonlarda HSP 23'ün etkinliğinin azalmasından ileri gelebilmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ağır metallerin neden olduğu toprak kirliliği küresel ölçekte en önemli çevre sorunlarından birisidir. Ağır metaller çevrede biyolojik olarak parçalanmadığından genellikle kolayca birikebilmekte ve toksik etkileri daha da artarak oldukça karmaşık yapılar oluşturabilmektedirler. Bitkiler farklı derecelerde toksisiteye sahip yüksek ağır metal konsantrasyonlarına maruz kaldığında, hücre ve dokularda yapısal, biyokimyasal ve moleküler düzeyde değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Ağır metallerin topraktan arındırılması için bazı uygulamalar bulunmaktadır. Toprağın yerinde arıtılacağı bir arıtım teknolojisi olan fitoremediasyon bu uygulamalardan en ekonomik olanıdır. Fitoremediasyonda kullanılan bitkiler, toprakta var olan metal miktarından çok daha fazlasını toprak üstü kısımlarında biriktirebilen hiperakümülatör bitkilerdir. Bazı süs bitkileri, çevreyi güzelleştirmenin yanı sıra, aynı zamanda ağır metaller veya organik kirleticilerle kirlenmiş toprakta büyürken kirletici maddeleri biriktirebilir veya yapısını bozabilirler. Bu tür bitkileri kullanmanın en önemli avantajı, bu bitkilerin çoğunun canlıların besin zincirine girmemesidir. Bu tür iyileştirmeler, tarımsal olarak kullanılmayan arazilerin temizlenerek kullanılmasına katkı sağlayacaktır. Fitoremediasyon için uygun hiperakümülatör bitkilerin seçimi başarıda önemli bir etkidir. Bu nedenle, bitkileri niceliksel ve niteliksel olarak iyileştirmek için yeni yöntemler bulmak amacıyla bitkilerin bu tür stres faktörlerine, özellikle ağır metallere verdiği yanıtları anlamak önemlidir. Bu çalışmada, hiperakümülatör olarak bilinen *Impatiens balsamina* L. 'Pink Single' ve *Brassica oleracea* L. var. *Acephala* 'Nagoya Purple'ın Pb stresine verdiği yanıtlar incelenerek, Pb fitoremediasyonunda kullanılabilirlik potansiyelleri belirlenmeye çalışılmıştır.

Impatiens balsamina L. 'Pink Single' ve *Brassica oleracea* L. var. *Acephala* 'Nagoya Purple'ın yaprak dokularında, Pb stresi altında meydana gelen bulgular aşağıda vurgulanmıştır:

- Her iki türde de konsantrasyon arttıkça zararlanma oranının arttığı,
- YOSK'un kına çiçeğinde Pb uygulamalarına bağlı olarak azalırken, TK'nın arttığı, ancak süs lahanasında YOSK ve TK bakımından belirgin bir değişiklik olmadığı,

- Uygulanan Pb konsantrasyonlarının her iki türde de klorofil miktarını etkileyecek düzeyde olmadığı,
- Kına çiçeği ve süs lahanası bitkilerinde Pb uygulamalarına bağlı olarak toprak üstü aksamda ya da köklerde büyüme geriliğine yol açacak önemli bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir.
- Prolin miktarının kına çiçeği bitkisinde konsantrasyon artışına bağlı olarak artmasının muhtemelen ROS'ların artışı ile ilgili olabileceği, diğer taraftan süs lahanasında ise konsantrasyon artışı ile prolin miktarının azalmasının bu bitkide belli bir konsantrasyona kadar Pb birikiminin daha çok köklerde yapılmış olmasıyla ilgili olabileceğini göstermektedir.
- Kına çiçeğinde konsantrasyon artışı karşısında toplam çözünebilir protein miktarının kademeli olarak azalması bu türün muhtemelen Pb stresine karşı süs lahanasına göre daha hassas olmasından kaynaklanabileceğini göstermektedir.
- İmmunblot analizleri sonucunda, her iki türde de HSP 60'ın Pb stresine karşı savunmada rol oynadığı,
- Kına çiçeğinde HSP 23'ün Pb stresine karşı toleransta önemli bir rolünün bulunmadığı ancak, süs lahanasında ise toleransta etkin bir rolünün bulunabileceği belirlenmiştir.

HSP ile ilgili çalışmalar daha çok yüksek sıcaklık stresi konularında yapılmış olup, ağır metal stresi ile ilgili oldukça az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen HSP'ler ile ilgili sonuçlar Pb kirliliğinde markır olarak kullanılabilir niteliktedir. Elde edilen veriler, Pb stresine toleransın artırılmasına yardımcı olabilecek, yeni ve istenen tarımsal özelliklere sahip bitkilerin geliştirilmesini amaçlayan ıslah ve mühendislik programlarında kullanılabilir bilgiler edinilmesine katkı sağlamıştır. İleride bu konu ile ilgili olarak Pb stresinin moleküler mekanizmasını daha iyi anlayabilmek amacıyla gen düzeyinde araştırmalara yönelinerek, Pb stresine toleranslı süs bitkileri geliştirilebileceği gibi, topraktan toplanan ağır metal miktarını arttırmak amacıyla transgenik bitkilerin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar yapılabilir.

Ayrıca, bu çalışmadan edindiğimiz bilgilere göre, Pb ile kirlenmiş tarım arazilerinin fitoremediasyonunda süs lahanası (*Brassica oleracea* L. var. *Acephala* 'Nagoya Purple') bitkisinin etkin bir şekilde kullanılabilme potansiyelinin olduğu ortaya çıktığından, böyle arazilerin iyileştirilmesi amacıyla bu bitkinin yetiştirilmesi tavsiye edilebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ai't-Ai'ssa, S., Pandard, P., Magaud, H., Arrigo, A.P., Thybaud, E., et al., 2003, Evaluation of an in vitro hsp70 induction test for toxicity assessment of complex mixtures: comparison with chemical analyses and ecotoxicity tests, *Ecotoxicology Environmental Safety*, 54, p.92–104.
- Akerfelt, M., Morimoto, R.I., Sistonen, L., 2010, Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 545- 555.
- Akın, F., Kahraman, Ö., 2018, Atık su arıtma çamurunun süs lahanası yetiştiriciliğinde kullanılabilirliği, *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 33, 177-183.
- Alacabey, İ., Çelebi, Ş.Z., 2020, Dalı Darı (*Panicum virgatum*)'nın kurşun, kadmiyum, krom toleransı ve akümülyasyon potansiyelinin belirlenmesi, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 10, 3, 2199-2206.
- Al-Whaibi, M.H., 2011, Plant heat-shock proteins: a mini review, *Journal of King Saud University-Science*, 23, 139-150.
- Ali, B., Song, W.J., Hu, W.Z., Luo, X.N., Gill, R.A., Wang, J., Zhou, W.J., 2014, Hydrogen sulfide alleviates lead-induced photosynthetic and ultrastructural changes in oilseed rape, *Ecotoxicol Environmental Safety*, 102:25–33.
- Alzahrani, Y., Alharby, H.F., Hakeem, K.R., Alsamadany, H., 2020, Modulating effect of EDTA and SDS on growth, biochemical parameters and antioxidant defense system of *Dahlia variabilis* grown under cadmium and lead-induced stress, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 48, 2, 906-923.
- Amm, I., Sommer, T., Wolf, D.H., 2014, Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin–proteasome system, *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1843, 182–196.
- Andra, S.S., Datta, R., Sarkar, D., Makris, K.C., Mullens, C.P., et al., 2009, Induction of lead-binding phytochelatins in vetiver grass [*Vetiveria zizanioides* (L.)], *Journal of Environmental Quality*, 38, p.868-877.
- Angima, S. D., Sullivan, D. M., 2008, Evaluating and reducing lead hazard in gardens and landscapes, Oregon State University Extension publication, EC 1616-E.
- Antosiewicz, D.M. ,1992, Adaptation of plants to an environment polluted with heavy metals, *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 61:281-299.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Arefian, M., Vessal, S., Bagheri, A., 2014, Biochemical changes and SDS-PAGE analyses of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes in response to salinity during the early stages of seedling growth, *Journal of Biological & Environmental Sciences*, 8 (23), 99-109.
- Arora, R., Pitchay, D.S., Bearce, B.C., 1998. Water-Stress-Induced Heat Tolerance in Geranium Leaf Tissues: A Possible Linkage Through Stress Proteins. *Physiologica Plantarum*, 103:24-34.
- Ashraf, M., Ozturk, M., Ahmad, M.S.A., 2010, Toxins and Their Phytoremediation (Ashraf, M., Ozturk, M., Ahmad, M.S.A. eds), *Plant Adaptation and Phytoremediation*, Springer, New York, p. 1-32.
- Assunção, A.G., Schat, H., Aarts, M.G., 2003, *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants, *New Phytologist*, 159, 2, 351-360.
- Anonim, 2017, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)'s Substance Priority List., <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>, Erişim Tarihi: 25.03.2018.
- Azmat, R., Haider, S., Askari, S., 2006, Phytotoxicity of Pb: I Effect of Pb on germination, growth, morphology and histomorphology of *Phaseolus mungo* and *Lens culinaris*, *Pakistan Journal Biological Sciences*, 9: 979-984.
- Alkorta, I., Hernández-Allica, J., Becerril, J.M., Amezaga, I., Albizu, I., Garbisu, C., 2004, Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead and arsenic, *Reviews Environmental Science Bio-Technology*, 3, 71–90.
- Ashraf, U., Kanu, A. S., Deng, Q., Mo, Z., Pan, S., Tian, H., Tang, X., 2017, Lead (Pb) toxicity; physio-biochemical mechanisms, grain yield, quality, and pb distribution proportions in scented rice. *Frontiers in plant science* 8, 259.
- Babaoğlu, S., Açık, L., Çelebi Keskin, A., Adıgüzel, N., 2004, Molecular analysis of *Turkish Alyssum L. (Brassicaceae)* species by RAPD-PCR and SDS-PAGE methods, *Gazi University. Journal of Science*, 17, 3, 25-33.
- Baker, A.J.M., Walker, P.L., 1990, Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants (Shaw A.J. ed.), *Heavy Metal Tolerance In Plants: Evolutionary Aspects*, CRC Press, Boca Raton, 155-177.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Balouchi, H., Amini, F., Movahhedi, D.M., Attarzadeh, M., 2017, Effect of different growing substrates on physiological and biochemical traits of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under heavy metals stress. *Journal of Plant Process and Function*, 6, 21, 27-40.
- Barbosa, J., Cabral, T., Ferreira, D., Agnez-Lima, L., Batistuzzo de Medeiros, S., 2010, Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 3, 320–325.
- Bates, L.S., Walden, R.P., Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies, *Plant Soil* 39:205-207.
- Bihola, D., Pandya, D., Mankad, A.U., 2020, Effect of lead and cadmium on the growth parameters and protein content of *Coleus blumei* benth and heavy metal extraction capacity, *International Journal of Science and Research*, 9, 10, 426 – 430.
- Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brooks, R.R., 1998, *Plants That Hyperaccumulate Heavy Metals: Their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining*, Wallingford: CAB International, New York, pp. 381.
- Cai, Z., Zhou, Q., Peng, S., Li, K., 2010, Promoted biodegradation and microbiological effects of petroleum hydrocarbons by *Impatiens balsamina* L. with strong endurance, *Journal of Hazardous Materials*, 183, 1, 731–737.
- Anonim, 2019, *Impatiens Balsamina*, In: *Invasive Species Compendium*, Wallingford, UK: CABI, <https://www.cabi.org/ISC/datasheet/28766>, Erişim tarihi: 12.11.2020.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., et al., 2000, The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach, *Science of the Total Environment*, 247, p.295–311.
- Carrier, P., Baryla, A., Havaux, M., 2003, Cadmium distribution and microlocalization in oilseed rape (*Brassica napus*) after long-term growth on cadmium-contaminated soil, *Planta* 216(6): p.939–950.
- Clemens, S., 2006, Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants, *Biochimie*, 88, 1707-1719.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cook, C.W., Stubbendieck J., 1986, Range research: basic problems and techniques. Society for Range Management, Colorado, p.317.
- Cruz-Rodriguez, L.A., Fu-Lin, E.C., 2002, Heat shock protein (HSP70) response in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and suspended field contaminated sediments, *Aquatic Toxicology*, 60, p.157–168.
- Cseh, E., Fodor, F., Varga, A., Záray, G., 2000, Effect of lead treatment on the distribution of essential elements in cucumber, *Journal of Plant Nutrition*, 23, 8, 1095-1105.
- Cui, S., Zhang, T., Zhao, S., Li, P., Zhou, O., Zhang, Q., Han, Q., 2013, Evaluation of three ornamental plants for phytoremediation of Pb-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*, 15:299–306.
- Cutright, T.J., Senko, J., Sivaram, S., York, M., 2012, Evaluation of the phytoextraction potential at an acid-mine-drainage-impacted site, *Soil and Sediment Contamination*, 21, p.970-984.
- Czarnecka, E., Nagao, R.T., Key, J.L., Gurley, W.B., 1988, Characterization of Gmhsp26-A, a stress gene encoding a divergent heat shock protein of soybean: Heavy-metal-induced inhibition of intron processing, *Molecular and Cellular Biology*, 8, 1113-1122.
- Çolak, U., Doğan, M., 2011, Kurşun uygulamasının *Triticum aestivum* L. cv. Ceyhan 99'daki bazı fizyolojik etkileri, *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 4, 2, 49-53.
- Dağhan, H., 2016, *Tagetes patula* L. bitkisinin fitoremediasyon amaçlı kullanım potansiyelinin su kültürü koşullarında araştırılması, *Toprak Su Dergisi*, 5, 2, 25-31.
- Dalcorso, G., Farinati, S., Furini, A., 2010, Regulatory networks of cadmium stress in plants, *Plant Signal Behav*, 5(6): p.1–5.
- Davies, K.J., 1987, Protein damage and degradation by oxygen radicals, I. General aspects *Journal of Biological Chemistry*, 262, 20, 9895-9901.
- de Abreu, C.A., de Abreu, M.F., de Andrade, J.C., 1998, Distribution of lead in the soil profile evaluated by DTPA and Mehlich-3 solutions, *Bragantia*, 57, 1, 185-192.
- Dere, S., Doğan, M., 2020, Kurşun uygulamasının yerbıstığı (*Arachis hypogaea* L.)'ndaki morfolojik ve fizyolojik etkileri, *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 7, 3, 233-245.
- Dickinson, N., 2016, Phytoremediation, *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 3, p.327-331.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dubey, R.S., 2011, Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: Gupta SD (ed) Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, pp 177–203.
- Duressa, D., Soliman, K., Taylor, R., Senwo, Z., 2011, Proteomic analysis of soybean roots under aluminum stress, International Journal of Plant Genomics, 2011, 1–12.
- Dürüst, N., Dürüst, Y., Tugrul, D., Zengin, M., 2004, Heavy metal contents of *Pinus radiata* trees of Izmit (Turkey), Asian Journal of Chemistry, 16, 2, 1129-1134.
- Eid, R.A., Mazher, A.A.M., Shaaban, S.H.A., Khalifa, R.K.M., 2018, Influence of different lead concentrations on growth and chemical constituents of *Tagetes erecta* L. plants, Sciences, 8, 3, 996-1001.
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdorani, F., Xie, Y., 2015, Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response, Scientific World Journal, 2015, 1-18.
- Eman Gökseven, Ş.B., 2019, Süs lahanasının (*Brassica oleraceae* var. *capitata*) topraktaki bor elementinin giderilmesi amacıyla fitoremediasyonda hiper toplayıcı bitki olarak kullanılma potansiyelinin araştırılması, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 149 s.
- EPA., 2000, Contaminants and Remedial Options at Select Metals-Contaminated Sites, EPA, 540, R-955, 512, 6.
- Eren, A., Daghan, H., 2014, Transgenic tobacco-bearing p- cV-ChMTIIGFP gene accumulated more lead compared to wild type, Polish Journal of Environmental Studies, 23, 2, 569-571.
- Ergin, S., 2012, Yüksek sıcaklık stresinin çilek bitkisinde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar ile protein metabolizmasına etkileri, Doktora tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 92 s.
- Esringü, A., 2012, Toprakta kurşun (Pb), kadmiyum (Cd) ve bor (B) elementlerinin şelatör desteğiyle kolza (*Brassica napus* L.) bitkisi kullanılarak fitoremediasyon yöntemiyle giderilmesi, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 142 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Islam, E., Liu, D., Li, T., Yang, X., Jin, X., et al., 2008, Effect of Pb toxicity on leaf growth, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*, Journal of Hazardous Materials, 154(1-3), 914–926.
- Farago, M.E., Mullen, W.A., 1979, Plants which accumulate metals, Part IV, A possible copper-proline complex from the roots of *Armeria maritima*, Inorganica Chimica Acta, 32, 93-94.
- Fischer, S., Kühnlenz, T., Thieme, M., Schmidt, H., Clemens, S., 2014, Analysis of plant Pb tolerance at realistic submicromolar concentrations demonstrates the role of phytochelatin synthesis for Pb detoxification, Environmental Science & Technology, 48, p.7552-7559.
- Frydman, J., 2001, Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones, Annual Review of Biochemistry, 70, pp.603-647.
- Gamalero, E., Lingua G., Berta, G., Glick B.R., 2009, Beneficial role of plant growth promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on plant response to heavy metal stress, Can J Microbiol 55: p.501–514.
- García, S., Zornoza, P., Hernandez, L.E., Esteban, E., Carpena, R.O., 2017, Response of *Lupinus albus* to Pb–EDTA indicates relatively high tolerance, Toxicological & Environmental Chemistry, 99(9-10): 1378-1388.
- Godzik, B., 1993, Heavy metal contents in plants from zinc dumps and reference area, Polish Botanical Studies, 5:113-132.
- Goldberg, A.L., 2003, Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins, Nature, 426, 895-899.
- Gottesman, S., Squires, C., Pichersky, E., Carrington, M., Hobbs, M., et al. ,1990, Conservation of the regulatory subunit for the Clp ATP-dependent protease in prokaryotes and eukaryotes, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87, pp.3513-3517.
- Gulen, H., Eris, A., 2003, Some Physiological Changes in Strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Camarosa) Plants Under Heat Stres, Journal. Horticulture Science. Biotechnology 78: 894-898.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gupta, D., Nicoloso, F., Schetinger, M., Rossato, L., Pereira, L., et al., 2009, Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown *Zea mays* seedlings under moderate lead stress, *J Hazard Mater*, 172(1): p.479–484.
- Gupta, S.C., Anurag, S., Mishra, M., Mishra, R.K., Chowdhuria, D.K., 2010, Heat shock proteins in toxicology: how close and how far?, *Life Sciences*, 86, 377- 384.
- Gülen, H., 2000, Ayva ve armutlarda anaç/kalem ilişkilerinin izoenzim analizleriyle araştırılması, Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 136 s.
- Gichner, T., Znidar, I., Száková, J., 2008, Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants, *Mutation Research Genetic Toxicology Environmental Mutagenesis*, 652(2):186–190.
- Haap, T., Schwarz, S., Köhler, H.R., 2016, Metallothionein and Hsp70 trade-off against one another in *Daphnia magna* cross-tolerance to cadmium and heat stress, *Aquatic Toxicology*, 170, 112-119.
- Hall, J.L., 2002, Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance, *Journal of Experimental Botany*, 53, 366, 1-11.
- Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M., 2002, Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein, *Science*, 295, 5561, 1852-1858.
- Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurter, D., Buchner, J., 2005, Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins, *Nature Structural and Molecular Biology*, 12, 842–846.
- Hatipoğlu, A., Gülgün, B., 1999, Tek ve Çok Yıllık Mevsimlik Çiçekler, Kent Matbaası, 1. Baskı, 207 s.
- Hocagil, M.M., Aydın, A., Yeler, O., 2012, Süs Bitkileri Sektörü Yatırım El Kitabı, Mersin Flora Süs Bitkileri Projesi.
- Hossain, Z., Komatsu, S., 2013, Contribution of proteomic studies towards understanding plant heavy metal stress response, *Frontiers in Plant Science*, 3, 310.
- Hossain, Z., Makino, T., Komatsu, S., 2012, Proteomic study of β -aminobutyric acid-mediated cadmium stress alleviation in soybean, *Journal of Proteomics*, 75, 4151-4164.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hsu, Y.T., Kao, C.H., 2003, Changes in protein and amino acid contents in two cultivars of rice seedlings with different apparent tolerance to cadmium, *Plant Growth Regulation*, 40, 147-155.
- Hadi, F., 2015, A mini review on lead toxicity in plants, *Journa of Biology Life Science*, 6, 91-101.
- Ireland, H.E., Harding, S.J., Bonwick, G.A., Jones, M., Smith, C.J., Williams, H., 2004, Evaluation of heat shock protein 70 as a biomarker of environmental stress in *Fucus serratus* and *Lemna minor*, *Biomarkers*, 9, 2, 139-155.
- Jackson-Constan, D., Akita, M., Keegstra, K., 2001, Molecular chaperones involved in chloroplast protein import, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1541, 102-113.
- Jarvis, M.D., Leung, D.W.M., 2001, Chelated lead transport in *Chamaecytisus proliferus* (L.f.) link ssp. *Proliferus* var. *Palmensis* (H. Christ): an ultrastructural study, *Plant Science*, 161:433-441.
- Jewell, M.C., Campbell, B.C., Godwin, I. D., 2010, Transgenic Plants for Abiotic Stress Resistance, *Transgenic Crop Plants*, 67-132.
- Jiang, W., Liu, D., 2010, Pb-induced cellular defense system in the root meristematic cells of *Allium sativum* L, *BMC Plant Biolgy*, 10: p.40-40.
- Jones, L.H.P., Clement, C.R., Hopper, M.J., 1973, Lead uptake from solution by perennial ryegrass and its transport from roots to shoots, *Plant Soil*, 38:403-414.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2010, Trace Elements In Soil and Plants, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 507.
- Khalid, S., Shahid, M., Niazi, N.K., Murtaza, B., Bibi, I., Dumat, C., 2017, A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils, *Journal of Geochemical Exploration*, 182, 247-268.
- Khan, A.H.A., Butt, T.A., Mirza, C.R., Yousaf, S., Nawaz, I., Iqbal, M., 2019, Combined application of selected heavy metals and EDTA reduced the growth of *Petunia hybrida* L., *Scientific Reports*, 9, 1, 1-12.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kochhar, S., Kochhar, V.K., 2004, Expression of antioxidant enzymes and heat shock proteins in relation to combined stress of cadmium and heat in *Vigna mungo* seedlings, *Plant Science*, 168, 4, 921-929.
- Koo, H.J., Park, S.M., Kim, K.P., Suh, M.C., Lee, M.O., Lee, S.K., Xinli, X., Hong, C.B., 2015, Small heat shock proteins can release light dependence of tobacco seed during germination, *Plant Physiology*, 167, 1030-1038.
- Kratovalieva, S., Cvetanovska, L., 2001, Influence of different lead concentrations to some morphophysiological parameters at tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in experimental conditions, *Macedonian Agriculture Review*, 48, 35-41.
- Krishna, P., Gloor, G., 2001, The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana* cell stress chaperones, 6, pp. 238-246.
- Krzyszowska, M., 2011, The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy, *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 35-51.
- Kumar, A., Prasad, M.N.V., 2018, Plant-lead interactions: transport, toxicity, tolerance and detoxification mechanisms, *Ecotoxicology and environmental safety*, 166, p.401-418.
- Kumar, A., Prasad, M.N.V., Achary, V.M.M., Panda, B.B., 2013, Elucidation of lead induced oxidative stress in talinumtriangularare roots by analysis of antioxidant responses and DNA damage at cellular level, *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 7, 4551-4561.
- Kushwaha, A., Hans, N., Kumar, S., Rani, R., 2018, A critical review on speciation, mobilization and toxicity of lead in soil-microbe-plant system and bioremediation strategies, *Ecotoxicology Environmental Safety*, 147, p.1035–1045.
- Laghlimi, M., Baghdad, B., El Hadi, H. and Bouabdli, A., 2015, Phytoremediation Mechanisms of Heavy Metal Contaminated Soils: A Review, *Open Journal of Ecology*, 5, 375-388.
- Lane, S.D., Martin, E.S., 1977, A histochemical investigation of lead uptake in *Raphanus sativus*, *New Phytol*, 79:281-286.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lee, J., Ahn, Y.J., 2013, Heterologous expression of a carrot small heat shock protein increased *Escherichia coli* viability under lead and arsenic stresses, *Hortscience*, 48, 1323-1326.
- Lee, K.W., Cha, J.Y., Kim, K.H., Kim, Y.G., Lee, B.H., Lee, S.H., 2012, Overexpression of alfalfa mitochondrial HSP23 in prokaryotic and eukaryotic model systems confers enhanced tolerance to salinity and arsenic stress, *Biotechnology Letters*, 34, 1, 167-174.
- Levitt, J., 1980, *Responses of Plants to Environmental Stresses*, Academic Press, p. 497.
- Lim, C.C., Krebs, S.L., Arora, R.A., 1999, 25-kDa dehydrin associated with genotype and age-dependent leaf freezing-tolerance in *Rhododendron*: a genetic marker for cold hardiness?, *Theoretical and Applied Genetics*, 99, 912-920.
- Liu, J., Xin, X., Zhou, Q., 2019, Phytoremediation of contaminated soils using ornamental plants, *NRC Research Press*, 26, 1, 43-54.
- Liu, J.N., Zhou, Q.X., Sun, T., Ma, L.Q., Wang, S., 2008, Growth responses of three ornamental plants to Cd and Cd-Pb stress and their metal accumulation characteristics, *Journal of Hazardous Materials*, 151, 1, 261-267.
- Liu, Z., He, X., Chen, W., Yuan, F., Yan, K., Tao, D., 2009, Accumulation and tolerance characteristics of cadmium in a potential hyperaccumulator *Lonicera japonica* Thunb., *Journal of Hazardous Materials*, ;169(1-3):170-5.
- Lubben, T.H., Donaldson, G.K., Viitanen, P.V., Gatenby, A.A., 1989, Several proteins imported into chloroplasts form stable complexes with the GroEL-related chloroplast molecular chaperone, *Plant Cell*, 1, 1223-1230.
- Maestri, E., Marmioli, M., Visioli, G., Marmioli, N., 2010, Metal tolerance and hyperaccumulation: costs and trade-offs between traits and environment, *Environmental and Experimental Botany*, 68(1): p.1–13.
- Małkowski, E., Kita, A., Galas, W., Karcz, W., Kuperberg, J.M., 2002, Lead distribution in corn seedlings (*Zea mays* L.) and its effect on growth and the concentrations of potassium and calcium, *Plant Growth Regulation*, 37, 1, 69-76.
- Miao, Q., Yan, J., 2013, Comparison of three ornamental plants for phytoextraction potential of chromium removal from tannery sludge, *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 15(1), 98–105.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mishra, D., Shekhar, S., Singh, D., Chakraborty, S., Chakraborty, N., 2018, Heat Shock Proteins and Abiotic Stress Tolerance in Plants (Asea, A., Kaur, P., eds.), Regulation of Heat Shock Protein Responses, Heat Shock Proteins, 13, Springer, pp. 41-69.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R., Kumar, R., Seth, C., Gupta, D., 2006, Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation, Chemosphere, 65(6): p.1027–1039.
- Mogk, A., Schlieker, C., Friedrich, K.L., Schönfeld, H.J., Vierling, E., Bukau, B., 2003, Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK, Journal of Biological Chemistry, 278, 31033- 31042.
- Moran, R., Porath, D., 1980, Chlorophyll Determination in Intact tissues Using n,n-Dimethylformamide. Plant Physiol. 65:478-479.
- Morel, J.L., Mench, M., Guckert, A., 1986, A measurement of Pb, Cu, Cd binding with mucilage exudates from maize (*Zea mays* L.) roots, Biol. Fertil. Soils 2:29-34.
- Munzuroğlu, Ö., Gür, N., 2000, The Effects of Heavy Metals on the Pollen Germination and Pollen Tube Growth of Apples (*Malus sylvestris* Miller cv. Golden), Turkish Journal of Biology, 24 (3), 677-684.
- Muthusamy, S.K., Dalala, M., Chinnusamy, V., Bansal, K.C., 2017, Genome-wide identification and analysis of biotic and abiotic stress regulation of small heat shock protein (HSP20) family genes in bread wheat, Journal of Plant Physiology, 211, 100-113.
- Malar, S., Shivendra Vikram, S., JC Favas, P., Perumal, V., 2016, Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)], Botanical Studies ,55, 54.
- Nagoor, S., 1999, Physiological and biochemical responses of cereal seedlings to graded levels of heavy metals, II. Effects on protein metabolism in maize seedlings, Advances in Plant Sciences, 12, 425- 433.
- Nautiyal, N., Sinha, P., 2012, Lead induced antioxidant defense system in pigeon pea and its impact on yield and quality of seeds, Acta Physiologiae Plantarum ,34, 977-983.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Navascués, J., Pérez-Rontomé, C., Sánchez, D.H., Staudinger, C., Wienkoop, S., Rellán-Álvarez, R., Becana, M., 2012, Oxidative stress is a consequence, not a cause, of aluminum toxicity in the forage legume *Lotus corniculatus*, *The New Phytologist*, 193, 625-636.
- Nawahwi, M.Z., Khadijah, M.A., Siti, M.M., Syazuani, M.S, Nor, A.H., Ahmad, T.A.R., Haslinda, A.M., Muhamad, I.R., Mohamad, N.A.M.T., Mohd, A.A., 2014, Phytoremediation potential of *Impatiens balsamina* towards naphthalene contaminated soil in different parts of plant, *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 14, 7, 610-614.
- Neumann, D., Lichtenberger, O., Günther, D., Tschiersch, K., Nover, L., 1994, Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants, *Planta*, 194, 360–370.
- Nover, L., 1991, *Heat Shock Response*, CRC Press, Boca Raton, p55.
- Ogawa, I., Nakanishi, H., Mori, S., Nishizawa, N.K., 2009, Time course analysis of gene regulation under cadmium stress in rice, *Plant and Soil*, 325, 97.
- Ouzounidou, G., Moustakas, M., Eleftheriou, E.P., 1997, Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum*) leaves, *Environmental Contamination and Toxicology*, 32, 154-160.
- Öktüren A. F., Sönmez. S., 2006, Ağır metal toksisitesinin bitki metabolizması üzerine etkileri, *Derim*, 23, 2, 36-45.
- Önder, S., 2012, Atık sular ile sulanan zirai alanlardaki ağır metal kirliliğinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 182s.
- Pandian, S., Rakkammal, K., Rathinapriya, P., Sagina Rency, A., Satish, L., et al., 2020, Physiological and biochemical changes in sorghum under combined heavy metal stress: An adaptive defence against oxidative stress, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, elsevier.
- Parsell, P.A., Lindquist, S., 1993, The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins, *Annual Review of Genetics*, 27, 437-496.
- Pena, L.B., Zawoznik, M.S., Tomaro, M.L., Gallego, S.M., 2008, Heavy metals effects on proteolytic system in sunflower leaves, *Chemosphere* 72:741–746.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Piechalak, A., Tomaszewska, B., Baralkiewicz, D., Malecka, A., 2002, Accumulation and detoxification of lead ions in legumes, *Phytochemistry*, 60(2): p. 153–162.
- Poklonov, V.A., Shestakova, T.V., Ostroumov, S.A., 2018, Phytotoxic Effect of Heavy Metal Mixture on Macrophytes, *Russian Journal of General Chemistry*, 88,13, pp.2879–2883.
- Pourrut, B., Jean, S., Silvestre, J., Pinelli, E., 2011a, Lead-induced DNA damage in *Vicia faba* root cells: potential involvement of oxidative stress, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 726, 123-128.
- Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P., Pinelli, E., 2011b, Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 213, 113-136.
- Pratt, W.B., Krishna, P., Olsen, L.J., 2001, Hsp90-binding immunophilins in plants: the protein movers, *Trends in Plant Science*, 6, pp.54-58.
- Qureshi, M., Abdin, M., Qadir, S., Iqbal, M., 2007, Lead-induced oxidative stress and metabolic alterations in *Cassia angustifolia Vahl*, *Biol ogia Plantarum*, 51(1): p. 121–128.
- Rabęda, I., Bilski, H., Mellerowicz, E.J., Napieralska, A., Suski, S., Woźny, A., Krzesłowska, M., 2015, Colocalization of low-methylesterified pectins and Pb deposits in the apoplast of aspen roots exposed to lead, *Environmental Pollution*, 205, 315-326.
- Radenac, G., Fichet, D., Miramand, P., 2001, Bioaccumulation and toxicity of four dissolved metals in *Paracentrotus lividus* seaurchin embryos, *Marine Environmental Research*,51, p.151–166.
- Rahman, S.H., Khanam, D., Adyel, T.M., Islam, M.S., Ahsan, M.A., Akbor, M.A., 2012, Assessment of heavy metal contamination of agricultural soil around Dhaka Export Processing Zone (DEPZ), Bangladesh: implication of seasonal variation and indices, *Applied Sciences* 2(3): p.584–601.
- Rau, S., Miersch, J., Neumann, D., Weber, E., Krauss, G.J., 2007, Biochemical responses of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* to Cd, Cu, Pb and Zn determined by chlorophyll fluorescence and protein levels, *Environmental and Experimental Botany*, 59, 3, 299-306.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Reeves, R., 2006, Hyperaccumulation of trace elements by plants. In: Morel, J. L., Echevarria, G., Goncharova, N., Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils, NATO Science Series, vol 68, Springer, Dordrecht
- Ren, J., Liu, Z. Chen, W., Xu, H., Feng, H., 2019, Anthocyanin degrading and chlorophyll accumulation lead to the formation of bicolor leaf in ornamental kale, International Journal of Molecular Sciences, 20, 603.
- Rizvi, A., Khan, M.S., 2019, Heavy metal-mediated toxicity to maize: oxidative damage, antioxidant defence response and metal distribution in plant organs, International Journal of Environmental Science and Technology, 16, 4873–4886.
- Rodríguez-Celma, J., Rellán-Álvarez, R., Abadía, A., Abadía, J., López-Millán, A.F., 2010, Changes induced by two levels of cadmium toxicity in the 2-DE protein profile of tomato roots. Journal of Proteomics, 73, 9, 1694-1706.
- Ruiz, E., Rodríguez, L., Alonso-Azcarate, J., Rincon, J., 2009, Phytoextraction of metal polluted soils around a Pb-Zn mine by crop plants, International Journal of Phytoremediation, 11, p.360-384.
- Rucińska, R., Sobkowiak, R., Gwózdź, E.A., 2004, Genotoxicity of lead in lupin root cells as evaluated by the comet assay, Cellular Molecular Biology Letters, 9(3):519–528.
- Sarı, T., 2009, Edirne ve çevresinde otoban kenarlarındaki topraklarda bazı ağır metal kirliliğinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ, 53 s.
- Sarry, J.E., Kuhn, L., Ducruix, C., Lafaye, A., Junot, C., Hugouvieux, V., Jourdain, A., Bastien, O., Fievet, J.B., Vailhen, D., Amekraz, B., Moulin, C., Ezan, E., Garin, J., Bourguignon, J., 2006, The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses, Proteomics, 6, 7, 2180-2198.
- Seregin, I.V., Pekhov, V.M., Ivanow, V.B., 2002, Plasmolysis as a tool to reveal lead localization in the apoplast of root cells, Russian Journal of Plant Physiology 49:283–285
- Seven, T., Can, B., Darende, B.N., Ocak, S., 2018, Hava ve toprakta ağır metal kirliliği, Ulusal Çevre Bilimleri Araştırma Dergisi, 1, 2, 91-103.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S., 2005, Chromium toxicity in plants, *Environment International*, 31, 739-753.
- Sharma, P., Dubey. R., 2005, Lead toxicity in plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 1, 35-52.
- Sharmila, P., Pardha, S.P., 2002, Proline accumulation in heavy metal stressed plants: an adaptive strategy (Prasad, M.N.V., Strazlka, K. eds), *Physiology And Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*, Kluwer, Dordrecht, pp.179-199.
- Shen, S., Jing, Y., Kuang, T., 2003, Proteomics approach to identify wound- response related proteins from rice leaf sheath, *Proteomics*, 3, 4, 527-535.
- Siddique, M., Gernhard, S., von Koskull-Döring P., Vierling, E., Scharf, K.D., 2008, The plant sHSP superfamily: Five new members in *Arabidopsis thaliana* with unexpected properties, *Cell Stress and Chaperones*, 13, 183–197.
- Siddiqui, M.H., Al-Khaishany, M.Y., Al-Qutami, M.A., Al-Whaibi, M.H., Grover, A., et al., 2015, Morphological and Physiological Characterization of Different Genotypes of Faba Bean under Heat Stres, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22: p.656-663.
- Singh, K., 2016, Pollution and vegetable contamination: a review of the impact of various pollutants, *Health*, 5, 7, 2314–2316.
- Singh, M., Kumar, J., Singh, V.P., Prasad, S.M., 2014, Proline and salinity tolerance in plants, *Biochemical Pharmacology*, 3, 6, 1000170.
- Singh, O.V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R., Jain, R. K., 2003, Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 405-412.
- Singh, R., Tripathi, R.D., Dwivedi, S., Kumar, A., Trivedi, P.K., et al., 2010, Lead bioaccumulation potential of an aquatic macrophyte *Najas indica* are related to antioxidant system, *Bioresour Technolgy*, 101: p.3025–3032.
- Singh, S., Eapen, S., D'souza, S.F., 2006, Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri L.*, *Chemosphere*, 62, 2, 233-246.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sinha P., Dube, B.K., Srivastava, P., Chatterjee, C., 2006, Alteration in uptake and translocation of essential nutrients in cabbage by excess lead, *Chemosphere*, 65, 651-656.
- Steffan, J.J., Brevik, E.C., Burges, L.C., Cerda, A., 2018, The effect of soil on human health: an overview, *European Journal of Soil Science*, 69: p.159-171.
- Stoeva, N., Bineva, T., 2003, Oxidative Changes and Photosynthesis in Oat Plants Grown in As-Contaminated Soil, *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 29, 87-95.
- Subhashini, V., Swamy, A.V.V.S., 2014. Phytoremediation of metal (Pb, Ni, Zn, Cd and Cr) contaminated soils using *Canna indica*, *Current World Environment*, 9, 3, 780-784.
- Sun, Y., MacRae, T.H., 2005, Small heat shock proteins: Molecular structure and chaperone function, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 2460-2476.
- Swindell, W.R., Huebner, M., Weber, A.P., 2007, Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways, *BMC Genomics*, 8, 125.
- Taghizadeh, M., Solgi, M., Karimi, M., Sanati, MH., Khoshbin, S., 2018, Heavy metals effects on *Brassica Oleracea* and elements accumulation by salicylic acid, *Archives Hygiene Sciences* ;7(1):1-11.
- Tauqeer, H.M., Ali, S., Rizwan, M., Ali, Q., Saeed, R., Iftikhar, U., Ahmad, R., Farid, M., Abbasi, G.H., 2016, Phytoremediation of heavy metals by *Alternanthera bettzickiana*: growth and physiological response, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126, 138-146.
- Tchounwou, PB., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J., 2012, Heavy metal toxicity and the environment, In *Molecular, clinical and environmental toxicology*, Springer, Basel, p.133-164.
- Tester, M., Leigh, R.A., 2001, Partitioning of nutrient transport processes in roots, *Journal of Experimental Botany*, 52, 445- 457.
- Tran, T.A., Popova, L.P., 2013, Functions and toxicity of cadmium in plants: recent advances and future prospects, *Turkish Journal of Botany*, 37, 1-13.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Triebkorn, R., Adam, S., Casper, H., Honnen, W., Pawert, M., et al., 2002, Biomarkers as diagnostic tools for evaluating effects of unknown past water quality conditions on stream organisms, *Ecotoxicology*, 11, p.451–465.
- Urano, K., Kurihara, Y., Seki, M., Shinozaki, K., 2010, ‘Omics’ analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses, *Current Opinion in Plant Biology*, 13(2), 132–138.
- Vadas, T.M., Ahner, B.A., 2009, Cysteine- and glutathione-mediated uptake of lead and cadmium into *Zea mays* and *Brassica napus* roots, *Environmental Pollution*, 157(8–9): p.2558–2563.
- Van Assche, F., Clijsters, H., 1990, Effects of metals on enzyme activity in plants, *Plant and Cell Environment*, 13, 3, 195-206.
- Vassilev, A., Lidon, F., 2012, Cd-induced membrane damages and changes in soluble protein and free amino acid contents in young barley plants, *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 23, 2, 130-136.
- Verma, S., Dubey, R.S., 2003, Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science*, 164, 645-655.
- Villiers, F., Ducruix, C., Hugouvieux, V., 2011, Investigating the plant response to cadmium exposure by proteomic and metabolomic approaches, *Proteomics* 11(9), p.1650–1663.
- Vitoria, A.P., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2001, Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues, *Phytochemistry*, 57, 5, 701-710.
- Vural, N., 2005. Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 73, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, s. 120.
- Wang, B., Xie, H.L., Ren, H.Y., Li, X., Chen, L., Wu, B.C., 2019, Application of AHP, TOPSIS, and TFNs to plant selection for phytoremediation of petroleum-contaminated soils in shale gas and oil fields, *Journal of Cleaner Production*, 233, 13-22.
- Wang, C., Gu, X., Wang, X., Guo, H., Geng, J., Yu, H., Sun, J., 2011, Stress response and potential biomarkers in spinach (*Spinacia oleracea* L.) seedlings exposed to soil lead. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 1, 41-47.
- Wang, C., Wang, X., Tian, Y., Xue, Y., Xu, X., Sui, Y., Yu, H., 2008, Oxidative stress and potential biomarkers in tomato seedlings subjected to soil lead contamination, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 3, 685-691.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, H., Tang, X., Wang, H., Shao, H.B., 2015, Proline accumulation and metabolism related genes expression profiles in *Kosteletzkya virginica* seedlings under salt stress, *Frontiers in Plant Science*, 6, 792.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A., 2004, Role of plant heat shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response, *Trends in Plant Science*, 9, 244-252.
- Wang, X., Zhou, Q., 2005, Ecotoxicological effects of cadmium on three ornamental plants, *Chemosphere*, 60(1):16-21.
- Wang, Y., Yan, A., Dai, J., 2012, Accumulation in *Chlorophytum comosum*: a popular ornamental plant and potential Cd hyper accumulator, *Environmental Monitoring and Assessment.*, 184(2): 929-937.
- Weishu, C., Yun, Z., Jie, R., Yuying, M., Zhiyong, L., Feng, H., 2019, Effects of methylene blue on microspore embryogenesis and plant regeneration in ornamental kale (*Brassica oleracea var. acephala*), *Scientia Horticulturae*, 248, 1-7.
- Whitacre, D.M., 2015, Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants, In: *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* D.M. Whitacre (ed.), 233, 113-136.
- Wierzbicka, M.H., Przedpelska, E., Ruzik, R., Ouerdane, L., PołecPawlak, K., et al., 2007, Comparison of the toxicity and distribution of cadmium and lead in plant cells, *Protoplasma*, 231(1): 99–111.
- Wojas, S., Ruszczyńska, A., Bulska, E., Clemens, S., Antosiewicz, D.M., 2010, The role of subcellular distribution of cadmium and phytochelatins in the generation of distinct phenotypes of AtPCS1- and CePCS3-expressing tobacco, *J Plant Physiol*, 167, p.981-988.
- Wuana, R.A., Okieimen, F.E., 2011, Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation, *ISRN Ecology*, 2011, 1–20.
- Xu, Y., Zhan, C., Huang, B., 2011, Heat shock proteins in association with heat tolerance in grasses, *International Journal of Proteomics*, 529648.
- Yang, Y., Li, X., Yang, S., Zhou, Y., Dong, C., Ren, J., Sun, X., Yang, Y., 2015, Comparative physiological and proteomic analysis reveals the leaf response to cadmium-induced stress in poplar (*Populus yunnanensis*), *PLoS One*, 10, 9, e0137396.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yavari, S., Malakahmad, A., Sapari, N.B., 2015, A review on phytoremediation of crude oil spills, *Water, Air, & Soil Pollution*, 226, 279, 1-18.
- Yıldırım, E., Ekinci, M., Turan, M., Agar, G., Örs, S., vd., 2019, Impact of cadmium and lead heavy metal stress on plant growth and physiology of rocket (*Eruca sativa L.*), *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 22 (6), p.843-850.
- Young, J. C., Moarefi, I., Hartl, F.U., 2001, Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool, *Journal of Cell Biology*, 154, pp.267-273.
- Zeng, L.S., Liao, M., Chen, C.L., Huang, C.Y., 2006, Effects of lead contamination on soil microbial activity and rice physiological indices in soil-Pb-rice (*Oryza sativa L.*) system, *Chemosphere*, Oct;65(4):567-74.
- Zengin, F.K., Munzuroglu, O., 2005, Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris L.*) seedlings, *Acta Biologica Cracoviensia Series*, 47, 2, 157-164.
- Zhou, S., Okekeogbu, I., Sangireddy, S., Ye, Z., Li, H., Bhatti, S., Hui, D., McDonald, D.W., Yang, Y., Giri, S., Howe, K.J., Fish, T., Thannhauser, T.W., 2016, Proteome modification in tomato plants upon long-term aluminum treatment, *Journal of Proteome Research*, 15, 5, 1670-1684.
- Zhu, P., Tian, Z., Pan, Z., Feng, X., 2017, Identification and quantification of anthocyanins in different coloured cultivars of ornamental kale (*Brassica oleracea L. var. acephala DC*), *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 93, 5, 466-473.
- Zhera, S.S., Arshad, M., Mahmood, T., Waheed, A., 2009, Assessment of heavy metal accumulation and their translocation in plant species, *African Journal of Biotechnology*, 12, 2802-2810.

EK AÇIKLAMALAR

Ek açıklamalar: Kurşun stresinin bazı süs bitkilerinde protein metabolizmasına etkilerinin belirlenmesi için yapılan analizlerin istatistik sonuçları

A: Kına çiçeği Zararlanma Oranı (%)	74
B: Süs lahanası Zararlanma Oranı (%)	75
C: Kına çiçeği Yaprak Oransal Su Kapsamı (%)	76
D: Süs lahanası Yaprak Oransal Su Kapsamı (%)	77
E: Kına çiçeği Turgor Kaybı (%)	78
F: Süs lahanası Turgor Kaybı (%)	79
G: Kına çiçeği Toplam Klorofil Miktarı (mg/g TA)	80
H: Süs lahanası Toplam Klorofil Miktarı (mg/g TA)	81
F: Kına çiçeği Gövde Yaş Ağırlığı (g)	82
G: Süs lahanası Gövde Yaş Ağırlığı (g)	83
H: Kına çiçeği Kök Yaş Ağırlığı (g)	84
I: Süs lahanası Kök Yaş Ağırlığı (g)	85
J: Kına çiçeği Gövde Kuru Ağırlığı (g)	86
K: Süs lahanası Gövde Kuru Ağırlığı (g)	87

EK AÇIKLAMALAR (devam)

L: Kına çiçeği Kök Kuru Ağırlığı (g)	88
M: Süs lahanası Kök Kuru Ağırlığı (g)	89
N: Kına çiçeği Prolin Miktarı (μ M Prolin/gTA)	90
O: Süs lahanası Prolin Miktarı (μ M Prolin/gTA)	91
P: Kına çiçeği Toplam Çözünebilir Protein (mg protein/gTA)	92
R: Süs lahanası Toplam Çözünebilir Protein (mg protein/gTA)	93

EK AÇIKLAMALAR

Ek Açıklamalar-A: Kına çiçeği Zararlanma Oranı (%)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	47,395 ^a	2	23,698	54,246	,000
Kesişme	224,003	1	224,003	512,763	,000
Konsantrasyonlar	47,395	2	23,698	54,246	,000
Hata	6,990	16	,437		
Toplam	414,188	19			
Düzeltilmiş Toplam	54,385	18			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-B: Süs lahanası Zararlanma Oranı (%)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	11,183 ^a	2	5,591	32,167	,000
Kesişme	120,281	1	120,281	691,974	,000
Konsantrasyonlar	11,183	2	5,591	32,167	,000
Hata	2,781	16	,174		
Toplam	142,784	19			
Düzeltilmiş Toplam	13,964	18			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-C: Kına çiçeği Yaprak Oransal Su Kapsamı (%)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	108,318 ^a	3	36,106	10,241	,006
Kesişme	75244,118	1	75244,118	21342,174	,000
Konsantrasyonlar	108,318	3	36,106	10,241	,006
Hata	24,679	7	3,526		
Toplam	78719,322	11			
Düzeltilmiş Toplam	132,997	10			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-D: Süs lahanası Yaprak Oransal Su Kapsamı (%)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	24,393 ^a	3	8,131	1,890	,232
Kesişme	76308,713	1	76308,713	17737,699	,000
Konsantrasyonlar	24,393	3	8,131	1,890	,232
Hata	25,812	6	4,302		
Toplam	79523,722	10			
Düzeltilmiş Toplam	50,206	9			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-E: Kına çiçeği Turgor Kaybı (%)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	178,667 ^a	3	59,556	116,826	,000
Kesişme	1770,577	1	1770,577	3473,204	,000
Konsantrasyonlar	178,667	3	59,556	116,826	,000
Hata	3,059	6	,510		
Toplam	2082,233	10			
Düzeltilmiş Toplam	181,726	9			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-F: Süs lahanası Turgor Kaybı (%)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	25,506 ^a	3	8,502	53,558	,000
Kesişme	992,325	1	992,325	6251,187	,000
Konsantrasyonlar	25,506	3	8,502	53,558	,000
Hata	,952	6	,159		
Toplam	1057,619	10			
Düzeltilmiş Toplam	26,458	9			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-G: Kına çiçeği Toplam Klorofil Miktarı (mg/g TA)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	,054 ^a	3	,018	,375	,774
Kesişme	78,273	1	78,273	1630,552	,000
Konsantrasyonlar	,054	3	,018	,375	,774
Hata	,336	7	,048		
Toplam	81,739	11			
Düzeltilmiş Toplam	,390	10			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-H: Süs lahanası Toplam Klorofil Miktarı (mg/g TA)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	,020 ^a	3	,007	,278	,840
Kesişme	67,516	1	67,516	2763,175	,000
Konsantrasyonlar	,020	3	,007	,278	,840
Hata	,195	8	,024		
Toplam	67,732	12			
Düzeltilmiş Toplam	,216	11			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-F: Kına çiçeği Gövde Yaş Ağırlığı (g)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	212,959 ^a	3	70,986	12,282	,017
Kesişme	17565,940	1	17565,940	3039,294	,000
Konsantrasyonlar	212,959	3	70,986	12,282	,017
Hata	23,118	4	5,780		
Toplam	17802,017	8			
Düzeltilmiş Toplam	236,077	7			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-G: Süs lahanası Gövde Yaş Ağırlığı (g)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	191,375 ^a	3	63,792	14,581	,013
Kesişme	10878,125	1	10878,125	2486,429	,000
Konsantrasyonlar	191,375	3	63,792	14,581	,013
Hata	17,500	4	4,375		
Toplam	11087,000	8			
Düzeltilmiş Toplam	208,875	7			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-H: Kına çiçeği Kök Yaş Ağırlığı (g)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	21,196 ^a	3	7,065	22,229	,006
Kesişme	1892,509	1	1892,509	5954,327	,000
Konsantrasyonlar	21,196	3	7,065	22,229	,006
Hata	1,271	4	,318		
Toplam	1914,976	8			
Düzeltilmiş Toplam	22,467	7			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-I: Süs lahanası Kök Yaş Ağırlığı (g)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	2,754 ^a	3	,918	22,575	,006
Kesişme	41,469	1	41,469	1019,696	,000
Konsantrasyonlar	2,754	3	,918	22,575	,006
Hata	,163	4	,041		
Toplam	44,386	8			
Düzeltilmiş Toplam	2,917	7			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-J: Kına çiçeği Gövde Kuru Ağırlığı (g)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	,547 ^a	3	,182	,650	,623
Kesişme	155,735	1	155,735	555,605	,000
Konsantrasyonlar	,547	3	,182	,650	,623
Hata	1,121	4	,280		
Toplam	157,403	8			
Düzeltilmiş Toplam	1,668	7			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-K: Süs lahanası Gövde Kuru Ağırlığı (g)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	2,514 ^a	3	,838	8,186	,035
Kesişme	189,540	1	189,540	1851,768	,000
Konsantrasyonlar	2,514	3	,838	8,186	,035
Hata	,409	4	,102		
Toplam	192,463	8			
Düzeltilmiş Toplam	2,923	7			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-L: Kına çiçeği Kök Kuru Ağırlığı (g)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	,068 ^a	3	,023	15,389	,012
Kesişme	4,020	1	4,020	2711,427	,000
Konsantrasyonlar	,068	3	,023	15,389	,012
Hata	,006	4	,001		
Toplam	4,094	8			
Düzeltilmiş Toplam	,074	7			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-M: Süs lahanası Kök Kuru Ağırlığı (g)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	,055 ^a	3	,018	61,261	,001
Kesişme	1,038	1	1,038	3452,171	,000
Konsantrasyonlar	,055	3	,018	61,261	,001
Hata	,001	4	,000		
Toplam	1,095	8			
Düzeltilmiş Toplam	,056	7			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-N: Kına çiçeği Prolin Miktarı (μM Prolin/gTA)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	198174,282 ^a	3	66058,094	15,249	,000
Kesişme	3017029,020	1	3017029,020	696,451	,000
Konsantrasyonlar	198174,282	3	66058,094	15,249	,000
Hata	47652,054	11	4332,005		
Toplam	3386178,140	15			
Düzeltilmiş Toplam	245826,336	14			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-O: Süs lahanası Prolin Miktarı (μM Prolin/gTA)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	5024651,261 ^a	3	1674883,754	19,215	,000
Kesişme	44609767,658	1	44609767,658	511,782	,000
Konsantrasyonlar	5024651,261	3	1674883,754	19,215	,000
Hata	784490,531	9	87165,615		
Toplam	49976111,311	13			
Düzeltilmiş Toplam	5809141,792	12			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-P: Kına çiçeği Toplam Çözünabilir Protein (mg protein/gTA)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	1324,091 ^a	3	441,364	18,003	,000
Kesişme	16340,542	1	16340,542	666,526	,000
Konsantrasyonlar	1324,091	3	441,364	18,003	,000
Hata	367,740	15	24,516		
Toplam	19577,887	19			
Düzeltilmiş Toplam	1691,831	18			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)

Ek Açıklamalar-R: Süs lahanası Toplam Çözünabilir Protein (mg protein/gTA)

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Toplamı	F	Ö.D.
Düzeltilmiş Model	667,102 ^a	3	222,367	19,985	,000
Kesişme	13740,560	1	13740,560	1234,930	,000
Konsantrasyonlar	667,102	3	222,367	19,985	,000
Hata	155,772	14	11,127		
Toplam	15284,899	18			
Düzeltilmiş Toplam	822,874	17			

Ö.D: Önem Derecesi (%5)