

Kadmiyum İle Kirlenmiş Toprakların Fitoekstraksiyonla Arıtımında Transgenik Tütün Bitkisinin Kullanımının Araştırılması

H. Dağhan¹, N. Köleli², V. Uygur¹, M. Arslan³, D. Önder⁴, V. Göksun⁴, N. Ağca¹

¹Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü, Hatay

²Mersin Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü, Mersin

³Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Hatay

⁴Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Yapılar ve Sulama Bölümü, Hatay

Özet: Kadmiyum topraklarda yüksek hareketliliği, bitkiler tarafından kolay ve hızlı alınması ve düşük konsantrasyonlarda bile toksik olması nedeniyle çevresel açıdan en tehlikeli ağır metallerden biridir. Bu nedenle kadmiyumla kirlenmiş toprakların temizlenmesi önem arz etmektedir. Kadmiyum, topraklardan yüksek maliyetli arıtım teknolojileriyle veya daha düşük maliyetli, kolayca uygulanabilir bir yöntem olan fitoekstraksiyon yöntemiyle arıtılabilmektedir. Bu çalışmada daha hızlı ve fazla miktarda metalin topraktan uzaklaştırılması için mayadan (*Saccharomyces cerevisiae*) izole edilen ve metal bağlayan Metallothionein II (MTII) geni tütün bitkisine aktarılmıştır. Bitki tarafından alınan metalin hücrenin atık deposu olan vakuolde biriktirmesi için ScMTII genine, tatlı patatesten izole edilen *Sporamin vacuolar targeting signal* eklenmiştir. Deneme üç tekerrürlü olarak tesadüf parsellerinde bölünmüş parseller deneme desenine göre kurulmuştur. Gen aktarılmamış tütün (*Nicotiana tabacum* L.) çeşidi Petit Havana (SR-1) ve aynı tütün çeşidinin gen aktarılmış formu (p-S-ScMTII) 0, 0,2, 0,4, 0,8 ve 1,6 mg/kg Cd uygulanmış toprakta çiçeklenme dönemine kadar yetiştirilmiştir. Kadmiyum ilavesiyle büyümede çok az gerileme gözlenmiş, fakat Cd toksisitesi semptomu gözlenmemiştir. Kuru ağırlık ve Cd konsantrasyonu açısından bitkiler arasında istatistiki bir fark gözlenmemiştir. Ancak her iki bitki grubunda da Cd dozu arttıkça bitkilerde Cd konsantrasyonu artmıştır. 1,6 mg/kg Cd uygulamasında kontrole göre bitkilerin Cd konsantrasyonu sırası ile gen aktarılmış ve gen aktarılmamış tütünde 13,8-32,9 katlık bir artış göstermiştir. Araştırma sonuçları ScMTII geni aktarılmış transgenik tütün bitkisinin uygulanan doz oranlarında Cd ile kirlenmiş toprakların temizlenmesinde etkili olmadığı bu nedenle daha yüksek Cd konsantrasyonlarında deneyerek Cd biriktirme kapasitesinin araştırılması gerektiğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Fitoekstraksiyon, kadmiyum, metallothionein, transgenik tütün

Investigation of the Use of Transgenic Tobacco Plant in the Treatment of Cd-Contaminated Soils by Phytoextraction

Abstract: Cadmium is one of the environmentally problematic heavy metals, because of its high mobility in soils, its ease and fast uptake by plant and very high toxic potential even at very low concentration. Thus its extraction from the polluted sites is environmentally important. Cadmium can be extracted from the soils either any of expensive remediation methods or phytoextraction which is a method with easy application, natural, and increasing usage. In this study, for fast and efficient removal of heavy metals, including Cd, Metallothionein II (MTII) gene isolated from *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) and *Sporamin vacuolar targeting signal* gene isolated from sweet potatoes were added for bearing transgenic plant. The experiment was set up in split-plot in completely randomized design with three replications. Then the non-transgenic (*Nicotiana tabacum* L. cv Petit Havana SR1) and transgenic tobacco plants (p-S-ScMTII) were grown in pots containing 0, 0.2, 0.4, 0.8 and 1.6 mg/kg Cd up to flowering stage. Cadmium addition resulted in a slight decrease in growth but no toxicity symptoms were observed. There were no statistical differences in transgenic and non-transgenic plants for dry biomass and Cd concentration. However, Cd concentrations of shoots of both plants were increased upon increasing Cd concentration of soil. For 1.6 mg/kg Cd treatment, Cd concentration of transgenic and non-transgenic plants increased 13.8-32.9 fold, respectively comparing to the control. Results suggested that S-ScMTII gene bearing transgenic plant did not improve Cd uptake in the studied range of soil Cd concentration. The efficiency of ScMTII gene for accumulation of Cd in shoots should be investigated at higher Cd concentration.

Key Words: Phytoextraction, cadmium, metallothionein, transgenic tobacco

GİRİŞ

Kadmiyum, insan, hayvan ve bitkiler için toksik etkili bir elementtir. Bitki bünyesinde azot ve karbonhidrat metabolizmalarını değiştirmesi nedeniyle birçok fizyolojik değişikliğe neden olmaktadır. Ayrıca, proteinlerin -SH gruplarındaki enzimleri inaktive etmekte, fotosentezi engellemekte, stomaların kapanmasına, transpirasyon ile su kaybının azalmasına ve klorofil biyosentezinin bozulmasına neden olmaktadır (Sheoran ve ark., 1990). Kadmiyumla kirlenmiş toprakların temizlenmesi için fiziksel, kim-

yasal ve biyolojik yöntemler kullanılabilir. Biyolojik yöntemlerden ucuz, etkili ve uygulanabilir olanı fitoremediasyon yöntemidir. Fitoremediasyon üç ana gruptan oluşmaktadır; 1) fitostabilizasyon, 2) rizofiltrasyon, 3) fitoekstraksiyon. Fitoakümülyasyon olarak da adlandırılan fitoekstraksiyon yöntemi, toprakta kirliliğe neden olan metalin, bitki kökleri yolu ile alınarak bitkinin yeşil aksamına taşınması ve biriktirilmesidir. Fitoekstraksiyonda kullanılacak bitkinin; hasat edilebilir aksamında yüksek oranda metal

biriktirmesi, biriken ağır metale tolerans göstermesi, hızlı büyü-yebilen, derin köklü ve kolayca hasat edilebilir olması gerekmektedir (Karenlampi ve ark., 2000). Doğada hiperakümülatör adı verilen yeşil aksamında normal bitkiden daha fazla metal akümü-le eden bitkiler bulunmaktadır. Hiperakümülatör bitkiler, genellikle yavaş büyümekte ve oldukça az yeşil aksam üretmektedir. Günümüzde, genetik çalışmalarla farklı kaynaklardan alınan ve metal bağlayan genler bol yeşil aksamli bitkilere aktararak metal biriktirme yetenekleri artırılmaya çalışılmaktadır. Bu genlerden biri olan Metalloitiyonein (MT), düşük molekül ağırlıklı, sisteince zengin ve ağır metal bağlayan bir proteindir. Fareden izole edilen MTI, insandan izole edilen MTII geni, mayadan izole edilen CUPI geni ve bezelyeden izole edilen PSMTA geni gibi çeşitli MT genleri, tütüne (*Nicotiana sp.*), kolzaya (*Brassica sp.*) ve *Arabidopsis thaliana* gibi farklı bitkilere aktarılmıştır. İlk olarak Lefebvre ve ark. (1987), Çin kobay faresinden izole ettiği MTII (ChMTII) genini bitkiye aktararak bitkinin Cd toksisitesini önleme çalışması yapmıştır. Liu ve ark. (2000), *Nicotiana glutinosa* MT cDNA'yı agrobakteri yoluyla tütün bitkisine aktarmışlardır. MT geni aktarılan tütün bitkisinin 200 µM Cd'a tolerans gösterdiği, transgenik olmayan kontrol bitkisinin ise 50 µM CdSO₄ koşullarında yapraklarında sararmalar görüldüğü ve gelişemediği tespit edilmiştir. Daghan (2004), Çin kobayından izole edilen MTII genini tütün bitkisine (*Nicotiana tabacum L. cv Petit Havana SR-1*) agrobakteri yoluyla aktararak yeşil aksam Cd konsantrasyonunun, kontrol bitkisine kıyasla % 70-90 oranında daha fazla olduğunu bildirmiştir.

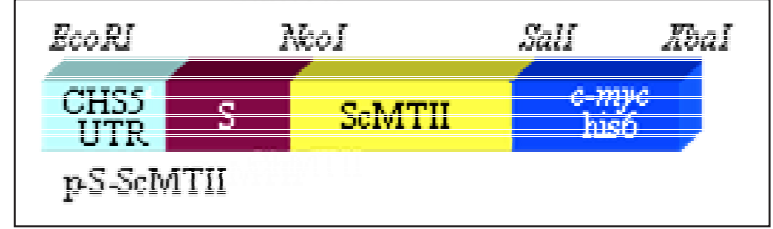
Bu çalışma ile *Saccharomyces cerevisiae*'dan izole edilen MTII geni aktarılmış transgenik tütün (p-S-ScMTII) ve transgenik olmayan tütün bitkilerinin (*Nicotiana tabacum L. cv Petit Havana SR-1*) toprak koşulunda artan dozlarda Cd uygulamalarına tolerans ve birikim düzeyleri belirlenmiş ve karşılaştırılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Bitki Materyali: Transgenik (p-S-ScMTII) ve transgenik olmayan (*Nicotiana tabacum L. cv Petit Havana SR-1*) tütün bitkileri denemede kullanılmıştır.

Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)'dan izole edilen

Şekil 1. *Saccharomyces cerevisiae* Metalloitiyonein II geninin pTRA-kc (p) bitki ekspresyon vektöründeki aktarılmış durumu. CHS 5: chalcone synthase 5'in translate edilmeyen bölge; S: Patates'den izole edilen Sporamin A Vacuolar Targeting Signal; ScMTII: *Saccharomyces cerevisiae* Metalloitiyonein II; c-myc: myc epitope markör; His 6: his-6 tag markör



Metallothionein II (MTII) geni polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılarak klonlanmış ve tütün bitkisine (*Nicotiana tabacum L. cv Petit Havana SR-1*) agrobakteri yoluyla aktarılmıştır. Metallothionein II genine, metali bağlandıktan sonra bitki hücrelerinin vakuolünde depolanması amacı ile patatesten izole edilen Sporamin A vacuolar targeting signal geni ilave edilmiştir. Ayrıca ScMTII geninin bitki yaprak hücrelerindeki yerini tespit amacıyla cymc-His eklenmiş ve bitkiye pTRA-kc (p) vektörü ile aktararak p-S-ScMTII transgenik tütün bitkisi elde edilmiştir (Şekil 1). Transgenik bitki, önce geçici transforman olarak test edilmiş (Fo), sonra yapılan analiz ve testler sonucu kalıcı transgenik tütün bitkisi olarak F₂ generasyonuna kadar çoğaltılmıştır (Daghan, 2004).

Toprak Materyali: Denemede Amik Ovası'nın en yaygın serisi olan Topboğazı serinden 0-30 cm derinlikten alınan toprak kullanılmıştır. Laboratuvara getirilen toprak örnekleri kurutulularak 2mm'lik elekten elenmiş ve analize hazır hale getirilmiştir. Deneme toprağının bazı fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları Çi 1'de verilmiştir.

Saksı Denemesi

Topboğazı serisinden alınan ve 4 mm'lik elekten elenmiş hava kuru toprak örneklerinden 2.5 L'lik saksılara 2kg (fırın kuru toprak) doldurulmuştur. Toprakta homojen bir dağılım sağlamak için saksılara ekim öncesinde artan dozlarda Cd, 0, 0.2, 0.4, 0.8 ve 1.6 mg/kg (CdSO₄ formunda) olacak şekilde çözelti halinde verilmiş ve tarla kapasitesinin %60-80'ine getirilerek 3 hafta

Çizelge 1. Araştırmada kullanılan deneme toprağının bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri

Parametreler	Değerler	Kaynaklar
Tekstür Sınıfı	C (Killi)	Bouyoucus, 1952
Toprak Reaksiyonu (pH) (CaCl ₂ 'de)	7,65±0,01	Kacar, 1995
Tuz (%)	0,039	Soil Survey Staff, 1951
Kireç (CaCO ₃) (%)	24,8	Loeppert ve ark., 1996
Organik Madde (%)	2,43	Kacar, 1995
Tarla Kapasitesi (%)	23,7	Alpaslan ve ark., 1998
Toplam N (%)	0,11±0,00	Bremner, 1965
Yarıyışlı P (mg/kg P ₂ O ₅)	9,34±0,27	Olsen ve ark, 1954
Alınabilir K (mg/kg K ₂ O)	153,89±0	Richards, 1954
Toplam Cd (mg/kg)	0,33±0,06	EPA, 1995
Yarıyışlı Cd (mg/kg)	0,01±0,00	Lindsay ve Norvell, 1978

süreye kontrollü koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Denemelerde uygulanan Cd dozları, Lindsay (1979) tarafından bildirilen Cd ortalama değerleri ve üst limit değerleri göz önünde bulundurularak belirlenmiştir. Ayrıca ekimden önce, her saksıya çözelti formunda 200 mg/kg N ((NH₄)₂SO₄ formunda), 100 mg/kg P ve 125 mg/kg K (KH₂PO₄ formunda) ve 2,5 mg/kg Fe (Fe-EDTA formunda) ilave edilmiştir. Denemeler, tesadüf parsellerinde bölünmüş parseller deneme deseninde 3 paralelli olarak kurulmuştur. Tütün genotipleri ana parsellere, ağır metallere ait dozlar ise alt parsellere yerleştirilmiştir.

p-S-ScMTII tütün bitkisinin tohumları antibiyotik içeren (kanamisin) MS (Murashige-Skoog) besi ortamında ve SR-1 tütün bitkisinin tohumları ise torf ortamında çimlendirildikten sonra 2-3 yapraklı iken saksılara transfer edilmiştir. Saksılar, tarla kapasitesi %60-80 olacak şekilde saf su ile sulanmıştır. Bitkiler, Cd uygulanmış saksılarda 6 hafta süre ile çiçeklenmeye kadar yetiştirilmiştir. Saksıda 6 hafta süre ile yetiştirilen bitkilerin alt ve üst yapraklarında klorofil ölçümleri yapıldıktan sonra bitkilerin yeşil aksamı hasat edilip yaş ağırlıkları alınmıştır. Daha sonra, bitki örnekleri saf suyla yıkanarak 65°C'de kurutulup kuru ağırlıkları belirlenmiş ve ağırlık başına bitki ögütme değirmeninde öğütülmüştür. Glutasyon (-SH) analiz sonucu yaş ağırlık üzerinden verilirken, diğer tüm analiz sonuçları fırın kuru ağırlık (65°C) olarak verilmiştir.

Fenolojik Gözlem

Denemeler boyunca bitkilerin Cd uygulamaları karşısında uğradıkları morfolojik değişimler gözlenerek değerlendirilmiştir. Bu morfolojik değişimler fotoğraflanarak görselleştirilmiştir.

Klorofil Analizi

Bitkilere Cd uygulamalarının etkisiyle yapraklarda değişen klorofil içerikleri, bitkilerin hasat edildiği gün, klorofil ölçüm cihazı (Konica-Minolta SPAD-502) kullanılarak alt ve üst yaprakta belirlenmiştir.

Bitkide Metal Analizi

Öğütülen bitki örnekleri HNO₃ ile mikro dalga fırında çözünürleştirilerek toplam metal konsantrasyonu (Cd, Zn, Cu, Fe, Mn, K) ICPA-

ES (İndüklenmiş Eşleşmiş Plazma-Atomik Emisyon Spektrometresi; Varian Series-II)'de belirlenmiştir. Üç paralelli yapılan metal analizlerinin doğruluğu, metal içeriği belli standart sertifikalı bir tütün bitkisinin (Virginia Tobacco Leaves, CTA-VTL-2) aynı yöntemle analiz edilmesi ile kontrol edilmiştir.

N ve P Analizi

Bitki örneklerinde N analizi, Kjeldahl yöntemine göre ve P analizi ise mavi renk yöntemine göre yapılmıştır (Kacar, 1984). SH Analizi (İndirgenmiş Glutasyon) Bitki örneklerinde -SH analizi (indirgenmiş glutasyon) Cakmak ve Marschner (1992)'ye göre yapılmıştır.

İstatistiksel Analiz

Toprak kültürü sonucunda elde edilen veriler SAS istatistiksel analiz programı (SAS, 1997) kullanılarak değerlendirilmiş ve ortalamalar arasındaki fark en küçük önemli fark (LSD) testi uygulanarak gruplandırılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

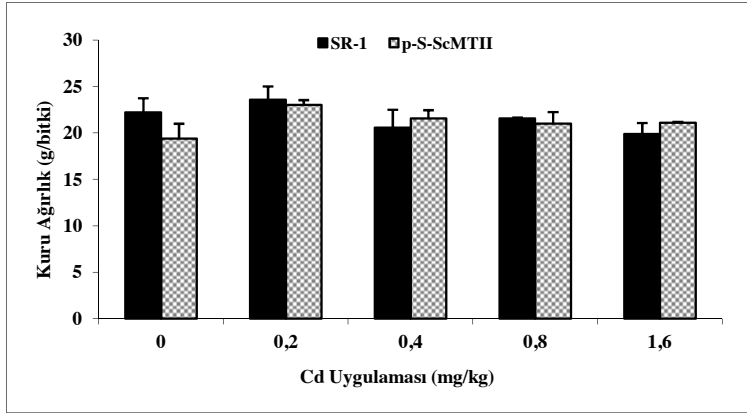
Belirtilen dozlarda uygulanan Cd'un (0, 0,2, 0,4, 0,8 ve 1,6 mg/kg) 6 hafta süresince transgenik ve transgenik olmayan tütün bitkisinin gelişimine etkisi gözlenmiştir. Bitkilerde deneme süresince Cd toksisitesinden kaynaklanan herhangi bir simptom gözlenmemiştir. Bu sonuç, klorofil değerleri ile paralellik göstermektedir (Çizelge 2). Kadmiyumun bezelye bitkisinin fizyolojik parametreleri ve antioksidatif enzimler üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada 50 µM Cd'un yapraklardaki terleme, fotosentez oranı ve klorofil sentezini azalttığı bildirilmektedir (Sandalo ve ark., 2001). Toksik düzeyde Cd klorofil biyosentezinde görev yapan protoklorofil reduktaz ile aminolevulinik asit sentezini engelleyerek klorofil sentezinin azalmasına neden olmaktadır (Zengin ve Munzuroğlu, 2005). Ancak denemede uygulanan en yüksek Cd dozunda (1,6 mg/kg) toksik bir etki görülmediği için klorofilde bir azalma gözlenmemiştir (Çizelge 2).

Kadmiyum dozu arttıkça büyümede ve bitkilerin kuru ağırlıklarında önemsiz derecede bir azalma gözlenmiştir (Çizelge 2, Şekil

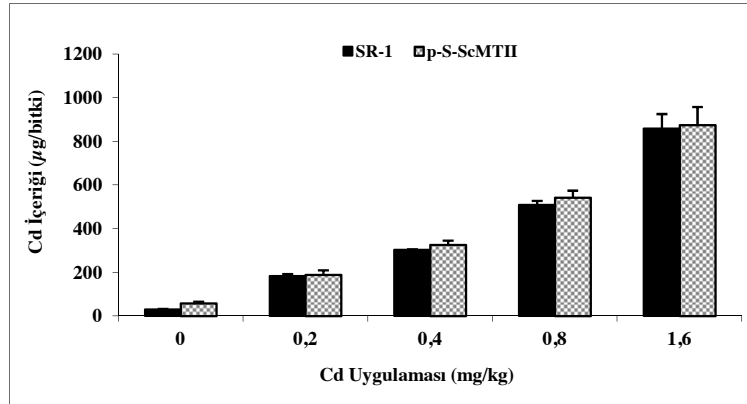
Çizelge 2. Farklı Cd dozu uygulamalarının transgenik p-S-ScMTII tütün bitkisi ve transgenik olmayan SR-1 tütün bitkileri yeşil aksamlarının kuru ağırlıklar, element konsantrasyonları (Cd, Cu, Fe, Mn, Zn, N, P, K), Cd içeriği, -SH konsantrasyonlarına ve klorofil düzeyleri üzerine çeşit-doza etkileşiminin etkileri.

Çeşit	Doz (mg/kg)	Kuru Ağırlık (g/bitki)	Cd (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Fe (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Cd (µg/bitki)	N (%)	P (%)	K (%)	-SH (µg/mL)*	Klorofil Alt Yaprak	Klorofil Üst Yaprak
p-S-ScMTII	0	19,38	3,01	21,37	83,12	52,07	9,38	58	1,74	0,14	2,87	903	29,97	43,17
p-S-ScMTII	0,2	23,01	8,23	22,74	121	51,56	9,97	189	1,47	0,14	3,08	421	27,70	41,13
p-S-ScMTII	0,4	21,56	15,18	22,27	86,42	50,65	9,67	326	1,66	0,12	3,36	455	29,50	40,83
p-S-ScMTII	0,8	21,00	25,86	19,83	75,34	48,43	9,80	542	1,56	0,12	3,36	531	24,87	39,80
p-S-ScMTII	1,6	21,09	41,49	17,98	78,57	47,91	10,17	875	1,59	0,11	2,87	557	29,33	39,33
SR-1	0	22,20	1,32	18,01	77,31	40,32	7,17	29	1,45	0,12	2,97	946	29,07	43,43
SR-1	0,2	23,58	7,73	21,79	80,56	49,32	9,60	182	1,37	0,13	2,85	992	26,87	37,47
SR-1	0,4	20,55	14,80	22,95	76,33	51,78	11,26	303	1,53	0,14	3,46	954	31,10	42,60
SR-1	0,8	21,55	23,58	19,35	67,91	46,62	12,45	508	1,49	0,12	3,15	792	29,53	40,20
SR-1	1,6	19,87	43,41	17,68	86,22	49,40	9,73	858	1,57	0,12	3,21	690	29,93	40,47
LSD 0,05		1,02	2,00	1,80	13,17	3,29	0,92	31	0,10	0,01	0,25	145	2,12	1,41

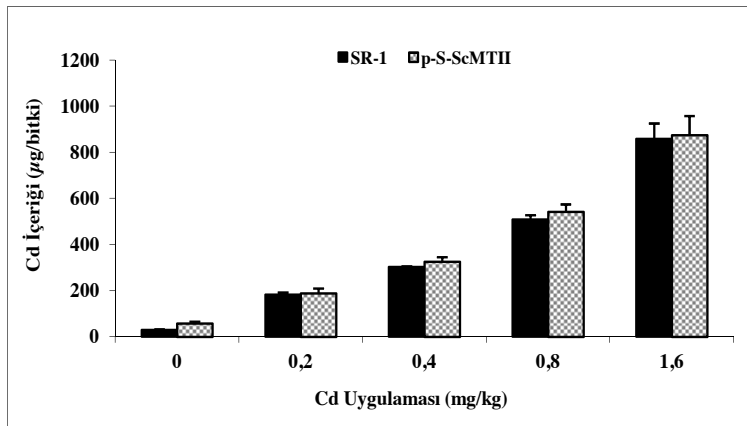
*(YA): Bitki Yaş Ağırlığı Üzerinden



Şekil 2. Artan dozlarda Cd uygulamasının transgenik p-S-ScMTII tütün bitkisi ve transgenik olmayan (*Nicotiana tabacum* L. cv Petit Havana SR-1) tütün bitkilerinin kuru ağırlığı üzerine etkisi.



Şekil 3. Artan dozlarda Cd uygulamasının transgenik (p-S-ScMTII) tütün bitkisi ve transgenik olmayan (*Nicotiana tabacum* L. cv Petit Havana SR-1) tütün bitkilerinin Cd konsantrasyonları üzerine etkisi.



Şekil 4. Artan dozlarda Cd uygulamasının transgenik (p-S-ScMTII) tütün bitkisi ve transgenik olmayan (*Nicotiana tabacum* L. cv Petit Havana SR-1) tütün bitkilerinin Cd içeriği üzerine etkisi

2). Ancak bu azalma istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Artan dozlarda Cd uygulaması ile dokulardaki Cd konsantrasyonu artış göstermiştir. En yüksek Cd konsantrasyonu transgenik olmayan bitkide 43.41mg/kg iken, transgenik bitkide 41,49 mg kg olarak 1.6 mg kg Cd uygulamasında ölçülmüştür (Çizelge 2, Şekil 3). Büyüme koşulları, gelişme dönemleri, Cd konsantrasyonu ve Cd'a

maruz kalma süresi, büyüme ortamında Cd ve diğer elementler arasındaki denge ve bitkilerin yaşı gibi faktörler metallerin bitkideki konsantrasyonlarını etkileyebilir (Gothberg ve ark., 2004).

Diğer yandan transgenik tütün bitkisi (875 µg/bitki) transgenik olmayan tütün bitkisinden (858 µg/bitki) fazla Cd biriktirmiştir (Çizelge 2, Şekil 4). Transgenik bitkilerde yüksek miktarlarda Cd içeriği, yeşil aksamda yüksek Cd translokasyonu ve içeriğinin bir kanıtıdır. Yapılan çalışmalar MTII geninin bitkilerin metallere toleransını geliştirici bir etkisinin olabileceği ve bu amaçla genin bitkilere aktarılabilirliği önerilmiştir (Hasegawa ve ark., 1997; Karenlampi ve ark., 2000).

Farklı Cd dozu uygulamalarının transgenik p-S-ScMTII tütün bitkisi ve transgenik olmayan SR-1 tütün bitkileri yeşil aksamlarının kuru ağırlıkları, element konsantrasyonları (Cd, Cu, Fe, Mn, Zn, N, P, K), Cd içeriği, -SH (indirgenmiş glutatyon) konsantrasyonları ve klorofil düzeyleri üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Çizelge 2).

Artan Cd dozları p-S-ScMTII ve SR-1 bitkilerinde Cu, P konsantrasyonu ve -SH (indirgenmiş glutatyon) konsantrasyonlarında azalmalara neden olmuştur (Çizelge 2). Hatta Çizelge 2'den de görüldüğü gibi bitkilerde özellikle Zn, N ve P konsantrasyonları Jones ve ark., (1991)'nin bildirdiği değerlere göre (<20 mg kg Zn; <%3,5 N ve <%0,27 P) noksanlık düzeyinin çok altında ölçülmüştür. Bu elementlerin noksanlık düzeyinde olması bitki büyüme ve gelişmesini sınırlandırmış olabilir. Kadmiyum bitki kök büyüme ve gelişmesini engellemesi nedeniyle bitkilerin su ve iyon alımını azaltmaktadır. Kadmiyumun farklı dozlarının bezelye bitkisinin Mn ve Fe alımı üzerine etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, Cd uygulama dozlarının artmasıyla kök ve sürgünlerde tutulan Mn ve Fe konsantrasyonunun azaldığı saptanmıştır (Öktüren ve ark., 2007).

Bu denemede transgenik ve transgenik olmayan bitkiler arasında Cd akümülyasyonu bakımından önemli bir fark bulunmamıştır. Elde edilen bu bulgu, Macek ve ark. (2002) ve Pavlikova ve ark. (2004)'nin bildirdiği; Cd akümülyasyonunun transgenik bitkilerde önemli bir şekilde arttığı yönündeki bulguları ile ters düşmektedir.

SONUÇ

Elde edilen sonuçlar artan dozlarda Cd uygulamalarının transgenik (p-S-ScMTII) tütün bitkisinin transgenik olmayan (*Nicotiana tabacum* L. cv Petit Havana SR-1) tütün bitkisinden çok fazla önemli olmamakla birlikte daha fazla Cd akümüle ettiğini göstermiştir. Bitkilerde de herhangi bir toksisite simptomsu görülmemiştir. Dolayısıyla bariz bir farkın görülebilmesi için uygulanan Cd dozlarının artırılması gerekmektedir. Böylece transgenik ve transgenik olmayan bitkiler arasında Cd akümülyasyonu ve toleransı bakımından bir farklılık olup olmadığı ayrıca transgenik bitkiye aktarılan MT II geninin etkinliği belirlenmiş olacaktır.

Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenen 108-O-161 nolu proje kapsamında yapılmış ve yayınlanmamıştır. Desteğinden dolayı TÜBİTAK'a ve tütün tohumlarını bize sağladığı için RWTH Aachen Üniversitesi, Moleküler Biyoloji Bölüm'ünden Prof. Dr. Rainer Fischer'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Alpaslan M., A.Güneş ve A. İnal., (1998). Deneme Tekniği. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:1502, Ders Kitabı: 455, 437 s.
- Bouyoucus, G. J., (1952). A recalibration of hydrometer for making mechanical analysis of soils. *Agron. J.* 43, 434-438.
- Bremner, J.M., (1965). Total nitrogen. In: C.A. Black (ed). *Methods of Soil Analysis. Part 2. Agronomy* 9:1149-1178. Am. Soc. of Agron., Inc. Madison, Wisconsin, USA.
- Cakmak I. and Marschner H., (1992). Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol.* 98, 1222-1227.
- Daghan, H., (2004). Phytoextraction of heavy metal from contaminated soils using genetically modified plants. PhD thesis, Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften Fakultät der RWTH-Aachen.
- EPA, (1995). Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils, in: *Test Methods for Evaluating Solid Waste, third ed, 3rd Update*, US Environmental Protection Agency, Washington DC.
- Gothberg, A., Greger, M., Holm, K., and Bengtsson, B. E., (2004). Influence of nutrient levels on uptake and effects of mercury, cadmium and lead in water spinach. *J. Environ. Qual.*, 33 (4), 1247-1255.
- Hasegawa, I., Terada, E., Sunairi, M., Wakita, H., Schimmachi, F., Noguchi, A., Nakajima, M. and Yazaki, J., (1997). Genetic improvement of heavy metal tolerance in plants by transfer of the yeast metallothionein gene (CUP1). *Plant and Soil* 196, 277-281.
- Jones, J.B. Jr., Wolf, B., and Mills, H.A., (1991). *Plant Analysis Handbook: A Practical Sampling, Preparation, Analysis and Interpretation Guide*. Micro - Macro Publishing, Athens, GA.
- Kacar, B., (1984). Bitki ve Toprağın Kimyasal Analizleri. II. Bitki Analizleri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 453 Ank. Üniv. Basımevi Ankara.
- Kacar, B., (1995). Bitki ve Toprağın Kimyasal Analizleri, III. Toprak Analizleri. A.Ü. Ziraat Fak. Eğitim, Araştırma ve Geliştirme Vakfı Yayınları No:3, Ankara, 704 s.
- Karenlampi, S., Schat, H., Vangronsveld, J., Verkleij, J. A. C., van der Lelie, D., Mergeay, M. and Tervahauta, A. I., (2000). Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. *Environmental Pollution* 107, 225-231.
- Lefebvre, D. D., Miki, B.L. and Laliberte, J. F., (1987). Mammalian metallothionein functions in plants. *Bio/Technology* 5, 1053-1056.
- Lindsay, W.L., and Norvell, W.A., (1978). Development of a DTPA test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42, 421-428.
- Lindsay, W. L., (1979). *Chemical Equilibria in Soils*. Wiley and Sons, N.Y., 449 p.
- Liu, J. R., Suh., M. C. and Choi, D., (2000). Phytoremediation of cadmium contamination: Overexpression of metallothionein in transgenic tobacco plants. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* 43, 126-130.
- Loeppert, R. H. and Suarez, D. L., (1996). Carbonate and gypsum. In: *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods*, pp. 437-474. Edited by D.L. Sparks. Madison, Wisconsin, USA.
- Macek, T. M., Pavlikova, D., Szakova, J., Truska, M., Cundy, S., Kotrba, A., Yancey, N., and Scouten, W.H., (2002). Accumulation of cadmium by transgenic tobacco. *Acta Biotechnol.* 22, 101-106.
- Olsen, S.R., Cole, C.V., Watanabe, F.S. and Dean, L.A., (1954). Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. *US Dept. of Agric. Circ.* 939.
- Öktüren, A.F., Sönmez S. ve Çıtak, S., (2007). Kadmiyumun Çevre ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Derim* 24 (1), 32-39.

- Pavlikova, D., Macek, T., Mackova, M., Szakova, J. and Balik, J., (2004). Cadmium tolerance and accumulation in transgenic tobacco plants with a yeast metallothionein combined with a polyhistidine tail, *Int. Biodeter. Biodegr.* 54, 233–237.
- Richards, L.A., (1954). *Diagnosis and Improvement of Saline and Alkali Soils*. United States Department of Agriculture Handbook 60:94.
- Sandalio, L.M., Dalurzo H.C., Gomez M., Romero-Puertas M.C. and del Rio L.A., (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.*, 52, 2115-2126.
- Sheoran, I.S., Singal, H.R., and Singh, R., (1990). Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). *Photosynthesis Research*, 23, 345-351.
- Soil Survey Staff (1951). *Soil Survey Manual*. U.S.Dept. agr. Handbook No:18, U.S Government Print Office, Washington.
- SAS (1997). *Base SAS (Statistical Analysis System) Software Reference Card*. Version 6.12. USA: Cary, N.C., SAS Institute Inc; pp. 211-253.
- Zengin, K.F. ve Munzuroğlu, Ö., (2005). Fasulye Fidelerinin (*Phaseolus vulgaris* L. Strike) Klorofil ve Karotenoid Miktarı Üzerine Bazı Ağır Metallerin (Ni^{+2} , Co^{+2} , Cr^{+3} , Zn^{+2}) Etkileri. *F.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17 (1), 164-172.