

Nikel ile Kirlenmiş Toprakların Fitoekstraksiyonu için Transgenik ve Transgenik Olmayan Tütün Bitkisinin Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi

Hatice DAGHAN^{1*}, Nurcan KOLELİ²

¹Mustafa Kemal University, Faculty of Agriculture, Department of Soil Science and Plant Nutrition 31040, Hatay- TURKIYE

²Mersin University, Faculty of Engineering, Department of Environmental Engineering 33342, Mersin- TURKIYE

*Corresponding author: hdaghan@mku.edu.tr

Özet

Nicotiana tabacum L. cv Petit Havana SR-1 çeşidi ve aynı çeşidin metal bağlayan Metallothionein II (MTII) geni aktarılmış transgenik tütün (p-S-ScMTII) çeşidi, nikel (Ni) biriktirme yeteneği ve fitoekstraksiyon potansiyeli açısından 14 gün boyunca 0, 5 ve 10 mg L⁻¹ Ni uygulanmış besin çözeltisinde yetiştirilmiştir. Artan dozlarda Ni uygulamasının kuru madde üretimi, Ni birikimi, klorofil ve glutatyon içeriği üzerine etkileri araştırılmıştır. Nikel uygulaması ile her iki tütün bitkisinde de başlangıçta gözlenen orta derecede solgunluk, pörsüme ve sararma, hasat döneminde şiddetlenmiş, kökler gelişmemiş ve koyu kahverengi bir renk almıştır. Transgenik tütün bitkisinin, transgenik olmayan tütün bitkisine kıyasla kuru madde miktarı azalmıştır. Artan dozlarda Ni uygulaması ile transgenik ve transgenik olmayan tütün bitkilerinin Ni konsantrasyonu, klorofil düzeyi ve -SH (indirgenmiş glutatyon) konsantrasyonu artış göstermiştir. Yapılan araştırmada, 10 mg L⁻¹ Ni dozu uygulamasında, transgenik tütün bitkisinin gövdesinde (128 mg kg⁻¹), transgenik olmayan tütün bitkisinden yaklaşık 1,47 kat (87 mg kg⁻¹) daha fazla Ni biriktirdiği belirlenmiştir. Sonuçta MTII geni aktararak, fitoekstraksiyonda kullanılacak bitkilerinin Ni biriktirme kabiliyetlerinin artırılmasının mümkün olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Fitoekstraksiyon, metallothionein, nikel, transgenik tütün.

Comparative Evaluation of Transgenic and Non Transgenic Tobacco for the Phytoextraction of Nickel-Contaminated Soils

Abstract

Nickel (Ni) accumulation ability and phytoextraction potential of *Nicotiana tabacum* L. cv Petit Havana SR-1 and Metallothionein II (MTII) gene transferred transgenic plants (p-S-ScMTII) of the same cultivar were grown in hydroponic culture containing 0, 5 and 10 mg L⁻¹ Ni for 14 days. The effects of increasing Ni concentrations on plant dry matter production, Ni accumulation, chlorophyll and glutathione concentration were investigated. Moderate wilting and wrinkling were observed upon Ni treatments at the early stage of the growth, these symptoms severely increased at the harvest in both plant types. In addition, poor root growth and dark brown colour were observed. Dry matter content of transgenic tobacco was lower than that of the non-transgenic one. With the increasing Ni doses, Ni concentration, chlorophyll level and -SH (glutathione) concentration increased. Results showed that transgenic tobacco (128 mg kg⁻¹) accumulated about 1.47-fold more Ni than that of non-transgenic one in shoots (87 mg kg⁻¹) at 10 mg L⁻¹ Ni treatment. Consequently, transferring the MTII gene into the plants to be used for phytoextraction may be regarded as promising in improving Ni accumulation ability of plants.

Keywords: Metallothionein, nickel, phytoextraction, transgenic tobacco.

Daghan H, Koleli N (2012) Comparative Evaluation of Transgenic and Non Transgenic Tobacco for the Phytoextraction of Nickel-Contaminated Soils. Ekoloji 21 (84): 90-97.

GİRİŞ

Nikel (Ni), bitkiler için çok az miktarda da olsa gerekli olan ve bitki gelişimi için mutlak gerekliliği en son keşfedilen bitki besin elementidir (Marschner 1995, Chen ve ark. 2009). Azot metabolizması için gereksinim duyulan temel bir element olan Ni, bitkilerde üreaz ve hidrogenaz enzimlerinin yapısında ve aktivitesinde rol alır (Chen ve ark. 2009, Akıncı ve Akıncı 2011, Akıncı ve

Öngel 2011). Ancak bitki, hayvan ve insan bünyesinde yüksek konsantrasyonlarda bulunduğunda kanserojen etkiye sahip olabilir (Marschner 1995, Grimsrud ve Andersen 2010).

Kontamine olmamış doğal topraklardaki Ni konsantrasyonu 100 mg kg⁻¹'dan düşüktür. Ancak, serpantin gibi minerallerce zengin, ultra bazik püskürük kayalarından oluşan topraklarda Ni konsantrasyonu 5000 mg kg⁻¹'a kadar ulaşabilir

Geliş: 28.12.2011 / Kabul: 20.04.2012

(Kacar ve Katkat 2006). Nikel bakımından zengin toprak çözeltilerinde ise 3,3 mg L⁻¹ Ni olarak saptanmıştır. Diğer yandan antropojenik faaliyetler, maden aktiviteleri, tarımsal ve endüstriyel faaliyetler, fosil yakıtlar, vb. toprakların her geçen gün daha fazla Ni ve diğer ağır metallerce kirlenmesine yol açmaktadır (Yusuf ve ark. 2011).

Nikel gibi toksik metallere kirlenmiş topraklar çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler ile arıtılabilmektedir. Biyolojik temizleme yöntemleri içinde yer alan ve son yıllarda ucuz ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle ilgi çeken fitoekstraksiyon yöntemi, toprak kirliliğine neden olan ağır metallerin, bitki kökleri tarafından alınarak bitkinin gövdesine (yeşil aksamına) taşınması ve biriktirilmesi işlemidir (Ghosh ve Sing 2005). Ağır metallere kirlenmiş toprakların temizlenmesinde kullanılacak bitkilerin bol yeşil aksam üretebilen, derin köklü, hızlı gelişen, kolay hasat edilebilen ve yeşil aksamında yüksek miktarda ağır metal biriktirme yeteneğine sahip olması gerekmektedir (Daghan 2004).

Doğada dokularında yüksek miktarda metal biriktiren 'hiperakümülatör' adı verilen özel bitkiler bulunmaktadır. Dünya çapında taksonomik olarak bilinen hiperakümülatör bitki türlerinin yaklaşık dörtte üçü (317 takson ve 17 familya) Ni hiperakümülatörüdür (Baker ve ark. 2000, Reeves ve Baker 2000, Ingle ve ark. 2005). Nikel hiperakümülatörü bitkiler, kuru ağırlık esasına göre % 0,1-3 oranında Ni içerebilirler (Prasad 2005). *Sebertia acuminata* bitkisi, kuru kütlesinin % 25'ine ulaşabilen Ni içeriğiyle bilinen en iyi Ni hiperakümülatörü bitkidir (Prasad 2005). Ancak, *Sebertia acuminata* gibi hiperakümülatör bitkilerin pek çoğu güçlü ve zengin bir kök sistemine ve hızlı bir büyüme yeteneğine sahip olmadıklarından (Watanabe 1997, Reeves ve Baker 2000) toprakların derinlemesine temizlenmesinde kullanılamamaktadır. Bu nedenle genetik çalışmalarla, farklı canlılardan alınan ve metal bağlayan genler, bol yeşil aksam ve derin köklü bitkilere aktararak bitkilerin metal biriktirme yetenekleri artırılmaya çalışılmaktadır (Ghosh ve Sing, 2005). Yapılan bir çalışmada, AtSAP (stres ilişkili protein) 10 geninin aktarıldığı transgenik *Arabidopsis* bitkisinin transgenik olmayan *Arabidopsis* bitkisine kıyasla Ni, Mn ve Zn gibi ağır metallere ve yüksek sıcaklık stresine karşı dayanıklılığı arttırdığı ve yeşil aksamla kök dokularında oldukça yüksek miktarlarda Ni ve

Mn biriktirdiği tespit edilmiştir (Dixit ve Dhankher 2011). *Nicotiana tabacum* kalmodulin bağlayıcı protein (NtCBP4) geni aktarılan transgenik tütün bitkisinin, 200 mM NiCl₂'e tolerans gösterirken, yüksek Pb konsantrasyonlarına karşı hassas olduğu saptanmıştır (Arazi ve ark. 1999). Freeman ve ark. (2004), serine asetil transferaz (SAT) genini *Thalassia goesingense*'den izole ederek *Arabidopsis* bitkisine aktarmışlardır. Çalışmada, 100 mM Ni uyguladıkları ortamda, transgenik *Arabidopsis* bitkisinin transgenik olmayan *Arabidopsis*'e göre, yeşil aksamda 5 kat, kökte ise 1,5 kat daha fazla Ni biriktirebildiği tespit edilmiştir.

Gen transferinde yaygın olarak kullanılan genlerden biri olan metallothionein (MT) geni, düşük molekül ağırlıklı (6-7 kDa), sistenince zengin, ağır metal bağlayan bir proteindir (Hamer 1986). Günümüze kadar çeşitli MT genleri (farede MTI, insanda MTII, mayada CUP1, bezelyede PSMTA) *Nicotiana* sp. (tütün), *Brassica* sp. (kolza) ve *Arabidopsis thaliana* (taksok otu) gibi farklı bitkilere aktarılmıştır (Daghan 2004, Cherian ve Oliveira 2005). Mevcut çalışmalar farklı kaynaklardan alınan MT genlerinin farklı bitkilere aktarılmasıyla bitkilerin ağır metalleri biriktirme yeteneklerini arttırdığını göstermektedir. Pavlikova ve ark. (2004) transgenik olmayan Wisconsin 38 (WSC) tütün bitkisi ile aynı bitkinin CUP1 (maya metallothionein geniyle kodlanmış), GUS (β -glukuronidaz için raportör gen), HisCUP (CUP bakır bağlayan genle kombine olmuş bir polyhistidin) ve HisGUS (β -glukuronidaz için raportör gen ile kombine olmuş bir polyhistidin) geni aktararak modifiye edilmiş transgenik tütün bitkilerinin Cd, Zn ve Ni biriktirme yeteneklerini belirlemek için test etmişlerdir. Bitkilere 0,2 mg Ni L⁻¹ uygulamasında köklerde en fazla Ni birikiminin GUS geni aktarılmış tütün bitkisinde (64,6 mg kg⁻¹ Ni), yeşil aksamda ise en fazla Ni birikiminin HisGUS geni aktarılmış transgenik tütün bitkisinde (6,5 mg kg⁻¹ Ni) tespit etmişlerdir. Literatürde MT geninin aktarıldığı bitkiler, başta Cd olmak üzere Zn, Cu ve Pb biriktirme yeteneği yönünden araştırılmış olup Ni biriktirme yeteneği yönünden yapılmış araştırma yok denecek azdır (Yang ve ark. 2005, Jewell ve ark. 2010).

Bu araştırmanın amacı, transgenik olmayan *Nicotiana tabacum* L. cv Petit Havana SR-1 çeşidi ve aynı çeşidin *Saccharomyces cerevisiae* (maya)'dan izole edilen ve metal bağlayan MTII geni aktarılmış

transgenik tütün (p-S-ScMTII) çeşidine, artan dozlarda Ni uygulamasının (0, 5 ve 10 mg L⁻¹) büyüme, Ni birikimi, klorofil ve glutasyon içeriği üzerine etkilerini su kültürü koşullarında test etmek, böylece Ni biriktirme yeteneği ve fitoekstraksiyon amacıyla kullanım potansiyeli yönünden bu iki bitkiyi karşılaştırmaktır.

MATERYAL VE METOT

Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)’dan izole edilen MTII geni, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılarak klonlanmış ve tütün bitkisine (*Nicotiana tabacum* L. cv Petit Havana SR-1) *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla RWTH Aachen Üniversitesi, Moleküler Biyoloji Bölüm’ünde Dr. Hatice Dağhan tarafından aktarılmıştır. Gen aktarım işlemlerinin detayları Daghan (2004)’de verilmiştir.

Yapılan bu çalışmada, tütün bitkisi hızlı ve kolay yetiştirilmesi, etkili kök derinliği ve saçak köke sahip olması, iklimsel ve toprak seçiciliği fazla olmayan bir bitki olması nedeniyle tercih edilmiştir. Ayrıca, tütün bitkisi sayılan bu özellikleri nedeniyle transgenik olarak değiştirilmiş ilk yüksek bitkidir (Smith 1995).

Transgenik (p-S-ScMTII) tütün bitkisinin tohumları antibiyotik içeren (kanamisin) Murashige-Skoog (MS) besi ortamında ve transgenik olmayan (SR-1) tütün bitkisinin tohumları ise torf ortamında, 16/8 saat ışık/karanlık döngüsünde, 25°C sıcaklıkta çimlendirilmiştir (Daghan 2004). Daha sonra çimlendirilmiş fideler, torf perlit karışımı (1:1) ortamda 2-3 yapraklı hale gelip hafif köklendikten sonra Hoagland besin çözeltisi ortamına (pH 5,2) aktarılmıştır. Hoagland besin çözeltisi; 3 mM KNO₃, 2 mM Ca(NO₃)₂.4H₂O, 0,25 mM MgSO₄.7H₂O, 1 mM KH₂PO₄, 0,001 mM MnSO₄.H₂O, 0,1 mM FeEDTA, 0,00025 mM CuSO₄.H₂O, 0,00025 mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 0,001 mM ZnSO₄.H₂O, 2,5 mM KCl ve 0,0125 mM H₃BO₃ (Shi ve ark, 2006) içermektedir. Bitkiler besin çözeltisinde 1 hafta yetiştirildikten sonra besin çözeltisine 0, 5 ve 10 mg L⁻¹ dozlarında Ni (NiSO₄ formunda) 7 gün boyunca uygulanmıştır. Besin çözeltisi her 3 gün de bir değiştirilmiştir. Kontrollü koşullarda (16/8 saat ışık/karanlık, 25/20°C sıcaklık, % 60-70 nem ve 10 klux ışık yoğunluğu) yapılan denemelerde bitkiler 14 gün süreyle yetiştirilmiştir. Deneme boyunca Ni toksisitesi karşısında bitkilerin uğradıkları morfolojik değişimler gözlenmiştir. Bitkilere Ni uygulamasının etkisiyle yapraklarda değişen klorofil içerikleri, hasat öncesi klorofil

ölçüm cihazı (Konica-Minolta SPAD-502) kullanılarak belirlenmiştir.

Deneme sonunda bitkiler yeşil aksam ve kök olarak ayrı ayrı hasat edilip saf suyla yıkandıktan sonra kurutma dolabında 65°C’de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmuş ve bitkilerin kuru ağırlıkları alınarak agat taşlı bitki öğütme değirmeninde öğütülmüştür.

Öğütülmüş bitki örnekleri HNO₃ ile yaş yakma yöntemine göre mikro dalga fırında çözünürleştirilerek toplam Ni konsantrasyonu ICP-AES (İndüktif Eşleşmiş Plazma Atomik Emisyon Spektrofotometresi-Varian Series-II)’de belirlenmiştir. Üç paralelli yapılan bitki analizlerinin doğruluğu, element içeriği belli standart sertifikalı bir tütün bitkisinin (Virginia Tobacco Leaves, CTA-VTL-2) aynı yöntemle analiz edilmesi ile kontrol edilmiştir. Bitki örneklerinde -SH analizi (indirgenmiş glutasyon) Cakmak ve Marschner (1992)’ye göre yapılmıştır.

Su kültürü denemesi sonucunda elde edilen veriler, İstatistiksel Analiz Programı (SAS) kullanılarak değerlendirilmiş ve ortalamalar arasındaki fark, En Küçük Önemli Fark (LSD) testi uygulanarak gruplandırılmıştır (Anonymous 1997).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Yeşil Aksam ve Kök Büyümesi ve Kuru Madde Verimi

Kontrol (Ni uygulanmamış) uygulamasına kıyasla Ni dozlarının artması, transgenik ve transgenik olmayan tütün bitkilerinin yeşil aksam ve kök büyümesini azaltmıştır. Nikel uygulamaları, bitkide yaprak ayalarında küçülme, yapraklarda orta derecede solgunluk ve pörsüme şeklinde ortaya çıkmıştır. Denemenin başlangıcında 5 mg L⁻¹ Ni uygulanmış bitkilerde, yeşil aksamın gelişimi azalırken yapraklarda herhangi bir belirti gözlenmemiştir. Ancak, 3-4 gün sonra, yapraklarda orta derecede solgunluk ve pörsüme gözlenmiştir. Nikel dozunun 10 mg L⁻¹ uygulamasında, her iki bitkide de ilk hafta gözlenen orta derecede solgunluk ve pörsüme, hasat öncesi şiddetlenmiştir. Kökler gelişmemiş ve koyu kahverengi renk almıştır. Benzer lezyon, Boominathan ve Doran (2002) tarafından da saptanmıştır. Boominathan ve Doran (2002), tütün bitkisine 7-10 gün süreyle 0,43 mM (25 mg L⁻¹) Ni uygulamışlar ve deneme sonunda bitki büyümesinde ciddi bir gerilemenin yanı sıra köklerde koyu kahverengi lezyonlar gözlemişlerdir. Yüksek miktarda Ni’in hücrede

yarattığı deformasyon sonucunda bitkilerin kök, sürgün ve yapraklarında gelişme geriliği sonucunda ciddi verim kayıpları oluşmaktadır (Akıncı ve Akıncı 2011).

Kloroz (sarma), bitkilerde Ni dahil ağır metallerin en yaygın toksisite belirtisidir (Pandey ve Sharma 2002). Kontrol uygulamasına göre Ni uygulamalarında bitkilerin kloroz düzeyinde herhangi bir fark olmadığı hatta Ni uygulanan bitkilerde, pörsüme nedeniyle yaprakların çok az da olsa daha koyu renkli olduğu görülmüştür. Bu gözlemler klorofil düzeyini ölçen SPAD metre okumalarıyla desteklenmiştir. Kontrol uygulamasında transgenik bitkinin SPAD değeri 30,03 iken Ni'nin 5 ve 10 mg L⁻¹ uygulamalarında aynı değerler sırasıyla 35,60 ve 38,00 olduğu belirlenmiştir. Ancak klorofil içeriğindeki artış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Tablo 1). Benzer bulgular transgenik olmayan bitkide de elde edilmiştir (Tablo 1). Somey ve ark. 2007'nin yaptığı bir çalışmada, Ni uygulanmış *Arabidopsis* bitkisinin klorofil içeriğinin kontrol bitkisine göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Klorofildeki bu artış, Ni toksisite stresine karşı yaprakların antosiyanin maddesi üretmesi (Somey ve ark. 2007) ya da yapraklardaki pörsümelerden kaynaklanmış olabilir. Elde edilen bulguların aksine, Pandey ve Sharma (2002), aşırı Ni'nin (500 µM) klorofil içeriğini azalttığını rapor etmişlerdir. Benzer şekilde Dubey ve Pandey (2011), *Vigna mungo* (kara fasulye) ile yaptıkları su kültüründe 10 ve 25 gün süreyle 0, 20, 40, 60, 80 ve 100 µM Ni uygulamışlar ve Ni'nin klorofil içeriğini azalttığını rapor etmişlerdir.

Kopittke ve ark. (2010) besin çözeltilerinde yetiştirilen bitkilerin köklerinin uygulanan ağır metal miktarı ve uygulama süresinin metalin bitkideki toksik etki şiddetini etkilediğini, bazı metallerin dakikalar ya da saatler içinde toksik etki gösterebildiğini bildirmişlerdir. Nitekim bu çalışmada yüksek dozlarda ve uzun süre Ni toksisitesine maruz kalan transgenik ve transgenik olmayan tütün bitkilerinin kökleri şiddetli bir şekilde deforme olmuş, gelişmemiş ve sonuçta yeterince besin elementi ve su alamayan yapraklarda solgunluk oluşmuştur. Sun ve Wu (1998) 1 hafta boyunca 0,085-0,255 mM (5-15 mg L⁻¹) Ni uygulaması sonucunda bitkinin yeni gelişen yapraklarında damarlar boyunca kloroz ve nekrozlar tespit etmişlerdir. Ancak 0,5 mM Ni uygulamasında ise ana damarlar boyunca koyu kahverengi

kurumalar, transpirasyon hızı ve potansiyelindeki azalmalar sonucunda bitkinin dış yapraklarında solmalar meydana geldiğini belirtmişlerdir. Denemede elde edilen bulgular Sun ve Wu (1998)'nın bulgularıyla uyumludur.

Artan Ni konsantrasyonu, her iki tütün bitkisinin yeşil aksam ve kök kuru madde veriminde istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p < 0,05$) azalmaya neden olmuştur. Örneğin kontrol uygulamasında transgenik bitkide yeşil aksam kuru madde verimi 5,17 g bitki⁻¹ iken transgenik olmayan bitkide aynı değerin 6,00 g bitki⁻¹ olduğu bulunmuştur. Nikelin 5 mg L⁻¹ dozunda söz konusu bitkilerin yeşil aksam kuru madde verimleri transgenik ve transgenik olmayan bitkiler için sırasıyla 2,44 ve 3,34 g bitki⁻¹ olduğu saptanmıştır. Nikel uygulamasıyla yeşil aksam kuru madde verim azalması transgenik bitki için yaklaşık %53, transgenik olmayan bitki için aynı değerin yaklaşık %44 olduğu görülmüştür. Nikel uygulamasıyla bitkinin yeşil aksam kuru madde verim azalmasının 10 mg L⁻¹ dozunda da artarak devam ettiği gözlenmiştir. (Tablo 1). Kontrol uygulamasına göre Ni uygulamalarıyla daha dramatik azalmaların yeşil aksamdan ziyade kökte gerçekleştiği ve bu azalışların % 80-86 düzeyinde gerçekleştiği bulunmuştur. Elde edilen bu bulgular fenolojik gözlemleri desteklemektedir. Benzer şekilde Setia ve ark. (1998) ve Alam ve ark. (2007) toksik konsantrasyonlarda Ni içeren besin ortamlarında yetiştirilen buğday bitkilerinin yaş ve kuru ağırlıklarında bir azalma ve bitkilerde bodurlaşma oluştuğunu bildirmişlerdir.

Yeşil Aksam ve Kökte Ni Konsantrasyonu

Nikel uygulamasıyla bitkilerin yeşil aksam ve kökteki Ni konsantrasyonu beklenildiği gibi istatistiksel olarak önemli düzeyde artmıştır. Örneğin transgenik olmayan bitkide (SR-1) kontrol uygulamasında yeşil aksamdaki Ni konsantrasyonu ölçülemeyecek düzeyde iken 5 ve 10 mg L⁻¹ uygulamalarında aynı değerin sırasıyla 71 ve 87 mg kg⁻¹ olduğu saptanmıştır. Söz konusu değerlerin transgenik bitkide ise sırasıyla 72 ve 128 mg kg⁻¹ olduğu belirlenmiştir (Tablo 2). Bu değer Paplikova ve ark. (2004)'ın bulguları ile benzer bulunmuştur. Nikelin 5 mg L⁻¹ doz uygulamasında, yeşil aksamın Ni konsantrasyonu p-S-ScMTII ve SR-1 tütün bitkilerinde yaklaşık aynı miktarda bulunmuştur. Ancak 10 mg L⁻¹ Ni dozunda transgenik tütün bitkisi (128 mg kg⁻¹) transgenik olmayan tütüne (87 mg kg⁻¹) göre yeşil aksamında yaklaşık 1,47 katı daha

fazla Ni biriktirmiştir. Dixit ve Dhankher (2011), transgenik (AtSAP 10) ve transgenik olmayan *Arabidopsis* bitkisine 90 μM (5,25 mg L^{-1}) Ni uygulamaları sonucunda transgenik *Arabidopsis* bitkisinin transgenik olmayan *Arabidopsis*'e göre yeşil aksamında 2-3 kat ve kökünde ise yaklaşık 2 kat daha fazla Ni biriktirdiğini tespit etmişlerdir. Nikelin kritik toksik düzeyi duyarlı bitkilerde $>10 \text{ mg kg}^{-1}$ ve orta düzeyde duyarlı bitkilerde $>50 \text{ mg kg}^{-1}$ ve hiperakümülatör bitkilerde ise $>1000 \text{ mg kg}^{-1}$ 'dir (Yusuf ve ark. 2011). Elde edilen bulgular transgenik tütün bitkisinin yeşil aksamında kritik toksik düzeyden daha fazla Ni biriktirdiğini ortaya koymuştur. Chen ve ark. (2009), artan Ni konsantrasyonuna bağlı olarak bitkilerin yeşil aksam ve kök yaş ve kuru ağırlıklarında lineer bir azalma görüldüğünü bildirmişlerdir.

Artan dozlarda Ni uygulaması ile p-S-ScMTII ve SR-1 tütün bitkilerinin her ikisinde de Ni akümüasyonu, yeşil aksamın yaklaşık 50 katı daha fazla olmuştur (Tablo 2).

Yeşil aksam Ni konsantrasyonunun kök Ni konsantrasyonuna oranından hesaplanan translokasyon faktörü, transgenik olmayan tütünde 0,02 oranında iken transgenik tütünde 0,03 oranında bulunmuştur (Tablo 2). Brooks (1998)'a göre hiperakümülatör bitkiler için bir kriter olan translokasyon faktörünün 1'den büyük olması ya da bitkinin yeşil aksamında 1000 mg kg^{-1} 'dan fazla Ni biriktirmesi gerekir. Ancak gerek yeşil aksamda biriken Ni konsantrasyonu ($<1000 \text{ mg kg}^{-1}$), gerekse translokasyon faktörü (<1) yönünden değerlendirildiğinde, her iki bitkininde fitoekstraksiyonda kullanıma potansiyeline sahip olmadıkları görülmektedir.

Yeşil Aksam Glutasyon Konsantrasyonu

Artan Ni konsantrasyonuna karşı tütün bitkisinin glutasyon üretip üretmediğini belirlemek amacıyla hasat öncesi alınan yaprak ve kök örneklerindeki -SH grupları analiz edilmiş ve elde edilen veriler Tablo 2'de gösterilmiştir. Genel olarak her iki bitkide de yeşil aksamdaki glutasyon konsantrasyonu daha yüksek bulunmuştur (Tablo 2). Transgenik tütün bitkisinde, kontrole kıyasla 5 mg L^{-1} Ni uygulamasıyla, yeşil aksam glutasyon konsantrasyonu sırayla 156 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'den 910 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'ye yükselirken, transgenik olmayan tütün bitkisinde 175 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'den 1729 $\mu\text{g mL}^{-1}$ 'ye yükselmiştir. Beklenenin aksine artan Ni konsantrasyonuna bağlı olarak glutasyon

Tablo 1. Artan dozlarda Ni uygulamasının transgenik (p-S-ScMTII) ve transgenik olmayan (SR-1) tütün bitkilerinin yeşil aksam klorofil düzeyleri ile yeşil aksam ve kök kuru ağırlıkları üzerine çeşit doz etkilerinin etkileri.

Bitki	Ni Dozları (mg L^{-1})	Klorofil		Kuru Ağırlık	
		Yaşlı Yaprak	Genç Yaprak	Yeşil Aksam	Kök
		(SPAD)		(g bitki $^{-1}$)	
p-S-ScMTII	0	24,57	30,03	5,17	0,36
	5	27,43	35,60	2,44	0,07
	10	29,23	38,00	1,52	0,06
SR-1	0	26,83	31,13	6,00	0,45
	5	20,53	36,23	3,34	0,11
	10	30,80	36,20	1,66	0,06
LSD (p<0,05)		1,22	2,89	3,32	0,03

Tablo 2. Artan dozlarda Ni uygulamasının transgenik (p-S-ScMTII) ve transgenik olmayan (SR-1) tütün bitkilerinin yeşil aksam ve kök Ni konsantrasyonları ile -SH (glutasyon) konsantrasyonları üzerine çeşit doz etkilerinin etkileri.

Bitki	Ni Dozları	Ni Konsantrasyonu		TF*	-SH (Glutasyon)	
		Yeşil Aksam	Kök		Yeşil Aksam	Kök
	(mg L ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)			(μg mL ⁻¹ YA)	
p-S-ScMTII	0	**	**	0,00	156	130
	5	72	3638	0,02	910	556
	10	128	4573	0,03	629	293
SR-1	0	**	**	0,00	175	138
	5	71	4119	0,02	1729	189
	10	87	4203	0,02	603	339
LSD (p<0,05)		7	407		81	39

*TF: translokasyon faktörü= (yeşil aksam Ni konsantrasyonu/ kök Ni konsantrasyonu)

** : Belirlenememiştir.

konsantrasyonu transgenik tütünden yaklaşık 2 katı yüksek bulunmuştur. Ancak 10 mg L^{-1} Ni uygulamasıyla transgenik ve transgenik olmayan tütün bitkisinde sırayla 623 ve 603 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonuna gerilemiştir. Tablo 2'de de görüldüğü üzere artan dozlarda Ni uygulaması ile p-S-ScMTII ve SR-1 tütün bitkilerinin -SH konsantrasyonları artış göstermiş ve bu etki p<0,05 düzeyinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Beklendiği üzere transgenik p-S-ScMTII tütün bitkisinin daha fazla -SH konsantrasyonuna sahip olduğu saptanmıştır. Organizmanın bütün hücrelerinde bulunan ve hücrelerin protein yapısı dışındaki sülfidril grubunun yaklaşık % 90'ını oluşturan -SH bileşikler (glutasyon), toksik bileşiklerin etkisizleştirilmesinde (detoksifikasyonda) önemli role sahiptir (Noctor ve Foyer 1998). Toksik bileşiklerin etkisizleştirilmesinde önemli role sahip olan -SH bileşikler, bitkileri radikal kaynaklı hasara karşı koyarken antioksidan enzimlere substrat olarak görev yapar ve bir radikal tutucusu gibi davranır (Noctor ve Foyer 1998).

Su kültürü, çözeltiliden metal iyonlarını absorblayacak bitkilerin yeteneklerini test etmede yararlı araçlardır. Böylece bitkinin kirlenmiş bir toprağı remediye edebilme yani iyileştirebilme yeteneğini değerlendirmek olasıdır. Bu araştırmada Ni ile kirlenmiş toprakların remediasyonunda transgenik ve transgenik olmayan tütün bitkilerinin Ni biriktirme yetenekleri fitoekstraksiyon açısından test edilmiş ve Ni'in yeşil aksamdan ziyade köklerde biriktiğı ve yeşil aksam üretimini sınırlandırdığı tespit edilmiştir. Nikel birikimi yönünden

transgenik ve transgenik olmayan tütün bitkileri arasında önemli bir fark belirlenememiştir. Su kültürü denemesi, toprak kültürü denemeleri ile de test edilmelidir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından (108-O-161) desteklenmiştir. Maddi desteğinden dolayı TÜBİTAK'a, tütün tohumlarını sağladığı için RWTH Aachen Üniversitesi, Moleküler Biyoloji Bölüm'ünden Prof. Dr. Rainer Fischer'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Akinci IE, Ongel O (2011) Amelioration of Nickel Toxicity by Humic Acid on Bean (*Phaseolus vulgaris*) Seedling Growth Ekoloji 20 (79): 29-37.
- Akinci S, Akinci IE (2011) Effect of Nickel on Germination and Some Seedling Growth Parameters in Spinach (*Spinacia oleracea*). Ekoloji 20 (79): 69-76.
- Alam MM, Hayat S, Ali B, Ahmad A (2007) Effect of 28 homobrassinolide treatment on nickel toxicity in *Brassica juncea*. Photosynthetica 45: 139-142.
- Anonymous (1997) Base SAS (Statistical Analysis System) Software Reference Card. Version 6.12. SAS Institute Inc, New York.
- Arazi T, Sunkar R, Kaplan B, Fromm H (1999) A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants. The Plant Journal 20: 171-182.
- Baker AJM, McGrath, SP, Reeves, RD, Smith, JAC (2000) Metal Hyperaccumulator Plants: A Review of the Ecology and Physiology of a Biological Resource for Phytoremediation of Metal-Polluted Soils. In: Terry N and Banuelos G (eds), Phytoremediation of Contaminated Soil and Water, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 85-107.
- Boominathan R, Doran PM (2002) Nickel induced oxidative stress in roots of Ni hyperaccumulator *Alyssum bertolonii*. New Phytologist 156: 205-215.
- Brooks RR (1998) Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals: Their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology Mineral Exploration and Phytomining. CAB International, Wallingford.
- Cakmak I, Marschner H (1992) Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. Plant Physiology 98:1222-1227.
- Chen C, Huang D, Liu J (2009) Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects. Clean 37: 304-313.
- Cherian S, Oliveira MM (2005) Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities. Environmental Science Technology 39: 9377-90.
- Daghan H (2004) Phytoextraction of heavy metal from contaminated soils using genetically modified plants. PhD thesis, Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften Fakultät der RWTH-Aachen.
- Dixit AR, Dhankher OP (2011) A novel stress-associated protein 'AtSAP10' from *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to nickel, manganese, zinc, and high temperature stress. PLoS One 6: 1-13.
- Dubey D and Pandey A (2011). Effect of nickel (Ni) on chlorophyll, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activities in black gram (*Vigna mungo*) leaves. International Journal of Science and Nature 2: 395-401.

- Freeman JL, Persans MW, Nieman K, Albrecht C, Peer W, Pickering IJ, Salt DE (2004) Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thalasspi* nickel hyperaccumulators. *The Plant Cell* 16: 2176-2191.
- Ghosh M, Singh SP (2005) A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. *Applied Ecology and Environmental Research* 3: 1-8.
- Grimsrud T, Andersen A (2010) Evidence of carcinogenicity in humans of water-soluble nickel salts. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 5: 1-7.
- Hamer DH (1986) Metallothionein. *The Annual Review of Biochemistry* 55: 913-951.
- Ingle RA, Mugford ST, Rees JD, Campbell MM, Smith JA (2005) Constitutively high expression of the histidine biosynthetic pathway contributes to nickel tolerance in hyperaccumulator plants. *The Plant Cell* 17: 2089-2106.
- Jewell MC, Campbell BC, Godwin I D (2010) Transgenic Plants for Abiotic Stress Resistance. In: Kole C, Michler C, Abbott AG, Hall TC (eds), *Transgenic Crop Plants*, Springer-Verlag, Berlin, 67-132.
- Kacar B, Katkat V (2006) Bitki Besleme. Nobel Yayınları, Ankara.
- Kopittke PM, Blamey FPC, Asher CJ, Menzies NW (2010). Trace metal phytotoxicity in solution culture: a review. *Journal of Experimental Botany* 61: 945-954.
- Marschner H (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd ed. Academic Press, New York.
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279.
- Pandey N, Sharma CP (2002). Effect of heavy metals Co^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} on growth and metabolism of cabbage. *Plant Science* 163: 753-758.
- Pavlikova D, Macek T, Mackova M, Sura M, Szakova J, Tlustos P (2004) The evaluation of cadmium, zinc and nickel accumulation ability of transgenic tobacco bearing different transgenes. *Plant and Soil Environment* 50: 513-517.
- Prasad MNV (2005) Nickelophilous plants and their significance in phytotechnologies. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 113-128.
- Reeves RD, Baker AJM (2000) Metal Accumulating Plants. In: Raskin I, Ensley BD (eds), *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean-up the Environment*, John Wiley and Sons, New York, 193-230.
- Setia RC, Kaila J, Malik CP (1998) Effects of NiCl_2 toxicity on stem growth and ear development in *Triticum aestivum* L. *Phytomorphology* 38:21-27.
- Shi Q, Li C, Zhang F (2006) Nicotine synthesis in *Nicotiana tabacum* L. induced by mechanical wounding is regulated by auxin. *Journal of Experimental Botany* 57: 2899-2907.
- Smith H (1995) Physiological and ecological functions within the phytochrome family. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46: 289-315.
- Someya N, Sato Y, Yamaguchi I, Hamamoto H, Ichiman Y, Akutsu K, Sawada K, Tsuchiya K (2007) Alleviation of nickel toxicity in plants by a Rhizobacterium strain is not dependent on its siderophore production. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 38: 1155-1162.
- Sun EJ, Wu FY (1998) Along-vein necrosis as indicator symptom on water spinach caused by nickel in water culture. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 39: 255-259.
- Watanabe ME (1997) Phytoremediation on the brink of commercialization. *Environmental Science and Technology* 31: 182-186.

Yang X, Feng Y, He Z and Stoffella PJ (2005) Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18: 339–353.

Yusuf M, Fariduddin Q, Hayat S, Ahmad A (2011) Nickel: an overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 86:1-17.