



DERLEME/REVIEW

BİTKİLERDE AĞIR METAL BAĞLAYAN PEPTİDLER **Nuray ERGÜN¹, Işıl ÖNCEL**

ÖZ

Günümüzde atmosfer kirliliği, madencilik, yoğun trafik, fabrika ve tarımsal atıklar çevresel kirlenmeye sebep olan etmenlerdir. Bu etmenlere bağlı olarak kurşun, kadmiyum, bakır, civa, nikel, alüminyum gibi metaller doğada toksik seviyelerde ortaya çıkmakta, kök ve yapraklar aracılığı ile bitki bünyesinde biriktirilmektedir. Ağır metaller, meydana getirdikleri zehirli etkiden dolayı, bitkilerde gelişimi engellemekte ve hatta aşırı miktarda metal birikimi sonucu bitkilerde ölüme neden olmaktadır. Aşırı miktarda metale maruz kalan bitkiler, toksik etkinin giderilmesi amacıyla fitokelatin adı verilen metal bağlayan peptidleri sentezlemektedirler. Bu peptidlerin sentezi, ağır metaller ve ısı şoku proteinleri gibi bazı ajanlar tarafından uyarılmaktadır. Fitokelatinler hücre içerisinde sitoplazma ve vakuolde bulunmakta ve bitkilerin metallerle toleransında oldukça önemli bir rol oynamaktadırlar.

Bu derlemede, fitokelatinlerin yapısı, sentezinin uyarılması, biyosentezi, fitokelatinlerin geri dönüşümü , hücredeki yeri ve biyoyileştirmedeki rolü hakkında bilgi verilmektedir.

Anahtar kelimeler: Bitki, Ağır metal, Fitokelatin, γ -glutamil peptid, Glutasyon, Biyoyileştirme.

THE HEAVY METAL-BINDING PEPTIDES OF PLANTS

ABSTRACT

Today atmospheric pollution, mining, heavy traffic, industrial and agricultural wastes are factors that cause environmental pollution. In relation to these factors, metals such as lead, cadmium, copper, mercury, nickel, aluminium are found in nature at toxic levels and accumulated in plant via roots and leaves. Due to their toxic effect, the heavy metals inhibit plant growth and even excess amount of metal accumulation causes plant death. Plants that are exposed to high level of metal synthesize a metal-binding peptide called phytochelatin to reduce toxic effect. Synthesis of these peptides are induced by agents such as heavy metals and heat-shock proteins. Phytochelatins are found in the cell within cytoplasm and vacuoles and play very important roles in heavy metal tolerance in plants.

This review is concerned with structure of phytochelatins, induction of phytochelatin synthesis, biosynthesis, turnover of phytochelatins, the place of phytochelatins in the cells and bioremediation.

Key words: Plant, Heavy metal, Phytochelatin, γ -Glutamyl peptide, Glutathione, Bioremediation.

¹ Nuray Ergün. Ankara Üni. Fen Fak. Biyoloji Bölümü **Fax:** 0.312. 223 23 95 **E-posta:** nergun@science.ankara.edu.tr.

1. GİRİŞ

Gelişen endüstri ve yoğun trafik sonucu çok miktarda duman, zehirli gaz ve diğer kirleticiler atmosfere bırakılmaktadır. Günümüzde hava kirliliği, toprak ve su kirliliği ile beraber gittikçe artan bir öneme sahiptir. Havada asılı partiküller halinde bulunan ağır metallere muhtemelen çapı 5µ'dan büyük partiküller çabucak çökelmekte daha küçük partiküller ise yükselen hava ile uzaklaşmaktadırlar. Atmosferde asılı kalan bu partiküller ancak yağışlarla çökelmektedir. Partiküller karakterli olan kurşun, çinko, bakır, kadmiyum, kobalt, nikel gibi ağır metallere bitkiler üzerine çökerek etkili olmakta ve bitkiler bu metallere kök ve yaprakları ile alıp biriktirmektedirler. Atmosfer kirliliğinin artması sadece endüstrileşmenin sonucu olmayıp baca gazları, sanayi ve evsel atıklar, binlerce ton kentsel atığın yakılarak yok edilmesi gibi olaylar kirliliğin artmasına yardım etmektedir. Atmosfer kirliliğinin yanısıra madencilik, yoğun trafik, tarımsal ve fabrika atıkları doğal alanlarda çevresel kirlenmeye neden olmakta ve kurşun, kadmiyum, bakır, nikel, civa, alüminyum gibi metallere toksik seviyelerde ortaya çıkmaktadır (Öncel vd., 2000). Bazı tarımsal ve doğal topraklarda bu ağır metallere bitkiler üzerinde toksik etki gösterdiği ileri sürülmektedir (Steffens, 1990).

Ağır metal tanımı disiplinler arası farklılık göstermektedir. Örneğin X ışını ile çalışanlar atom numarası 13'den büyük elementler için ağır metal tanımını kullanmaktadırlar. Fakat, X ışını ile çalışan bilim adamlarına göre ağır metal olan demir, kobalt, bakır gibi metallere jeolog, kimyacı gibi temel bilimcilere göre ağır metal değildir. Temel bilimcilere göre ise civa, kurşun, bizmut, altın, platin gibi atom ve kütle numaraları büyük olan metallere ağır metal sınıfına girmektedir. Ancak bunlardan altın gibi kimyasal olarak pasif olan metallere biyolojik yapıda birikime sebep olmamaktadır. Uranyum atom numarası çok büyük olmasına ve radyoaktif tehlikesine rağmen dünya yüzeyinde çok yaygın olmadığı için ağır metal sınıfından sayılmamaktadır. Bunun yanında kadmiyum, civa, kurşun gibi bazı metallere organizmaya girdikten sonra kolay kolay atılamazlar ve bazı fizyolojik aktiviteler üzerinde inhibitör etkisine sahiptirler. Bu metallere gerek sanayi gerekse şehirselleşmenin (pil, akü, termometre, kurşun tetraetil gibi benzine katılan maddeler vs.) içinde bol miktarda bulunarak çevre kirliliğine neden olmaktadır. Fizyologlar için ağır metallere bakır, kobalt, civa, kurşun, kadmiyum, nikel, çinko, alüminyum, gümüş gibi fizyolojik açıdan tehlikeli olan metallere dır. Topraktaki kirleticiler besin zinciri yoluyla doğrudan doğruya insan sağlığını etkilemektedirler. Bu yolla vücuda alınan çinko, kadmiyum, civa, kurşun gibi ağır metallere de metil ve etil gruplarıyla bağ yapma suretiyle yağda çözünebilir hale gelmekte ve bir çok dokuda birikmektedirler. Oysa altın, platin ve uranyumun bu türde bileşikler çok fazla bilinmemekte ve biyolojik süreçlerde bu tür bileşikler oluşturulmamaktadır.

Bitkilerin normal gelişimi için karbon, hidrojen, oksijen, azot, fosfor, kükürt, potasyum, kalsiyum,

magnezyum, demir gibi elementlere "makro metabolik elementler"; bor, bakır, çinko, molibden, klor gibi elementlere "mikro metabolik elementler" ve bütün bunlara ek olarak bir de bazı türler için çok az miktarda sodyum, alüminyum, silisyum, kobalt gibi "iz elementler'e" ihtiyaç vardır (Bozcuk, 1997). Esasen ağır metallere bitkiler için mikrobeyinler olmasına rağmen yüksek konsantrasyonlarda canlı organizma için toksik etkilere sahiptirler (Kinnersley, 1993). Bitkilerde ölüm sebebinin toksik metabolik aktiviteyi önemli derecede inhibe eden ağır metal konsantrasyonları için "toksik konsantrasyon" deyimini kullanılmaktadır (Rubio vd., 1994).

Ağır metallere, bitkiler tarafından kolaylıkla asimile edilmekte ve meydana getirdikleri zehirli etkiden dolayı bitki gelişimini engellemektedirler. Aşırı miktarda metal birikimi sonucunda bitkide ölüm görülmektedir (Clijsters ve Van Assche, 1985).

Ağır metallere toksik etkileri bitkinin fotosentez (Clijsters ve Van Assche, 1985), solunum (Lamoureux ve Chaney, 1978), su (Poschenrieder vd., 1989) ve karbohidrat metabolizması (Greger ve Lindberg, 1986) üzerinde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bunun yanında, ağır metallere bir çok enzimin aktivitesini, normal metabolik olayları ve çeşitli fotosentetik fonksiyonları bozduğu da bildirmiştir (Alia-Saradhi, 1991).

Ağır metallere yüksek konsantrasyonlarda bitkide fotosentez ürünlerinin taşınmasını engelleyerek yapraklarda sakkaroz, nişasta ve indirgen şekerlerin birikimine sebep olmaktadır (Samarakoon ve Rausser, 1979). Greger ve Lindberg (1986) kadmiyum uygulanan bitkilerde şeker içeriğinin köklerde ve gövdede azaldığını belirtmişlerdir. Moya vd. (1993) nikel ve kadmiyum uygulanan *Oryza sativa*'da kuru ağırlık/taze ağırlık oranının arttığını göstermişlerdir. Eroğlu ve Öncel (1997) kadmiyum, nikel, bakır, çinko, kobalt ve kurşun gibi ağır metallere farklı konsantrasyonlarının uygulandığı *Triticum aestivum* L. var. *bezostaya* sürgünlerinde glukoz+sakkaroz miktarlarında önemli artışlar olduğunu belirtmişlerdir.

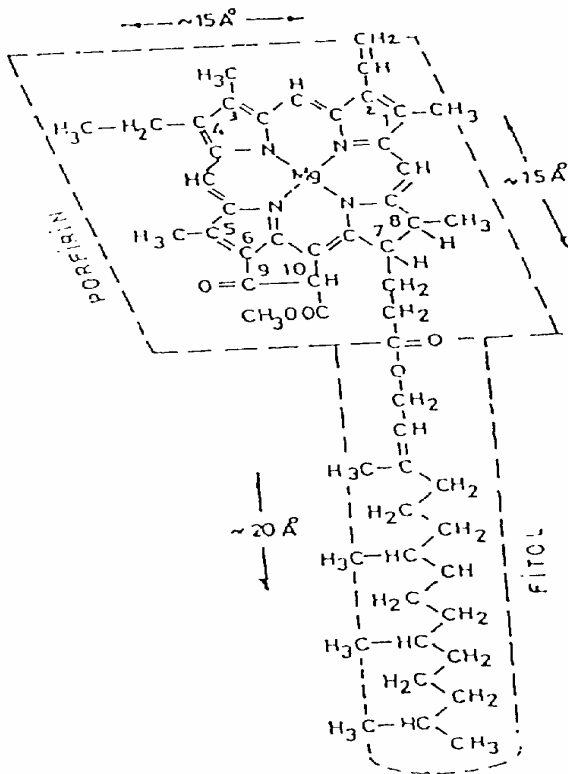
Öncel vd. (2000) yüksek kadmiyum konsantrasyonunda bitki boyu, kuru madde miktarı, klorofil, total çözünebilir fenolik bileşikler ve serbest prolin miktarlarında belirgin değişiklikler tesbit etmişlerdir. Ancak kurşun uygulaması sonucunda parametrelerde herhangi bir değişiklik belirlenmemiştir. Ayrıca ağır metal toksisitesinin sıcaklığa paralellik göstermediğini de ifade etmişlerdir.

Kalimuthu ve Sivasubramanian (1990) *Zea mays*'a 20, 50, 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarda civa klorür ve kurşun asetat uygulamışlar ve bitkilerde tohum çimlenme yüzdesi, fide büyümesi ve protein içeriğinin azaldığını, karbohidrat, serbest amino asit ve karotenoid içeriğinin arttığını ve sürgünlerde RNA düzeyinin azaldığını belirtmişlerdir.

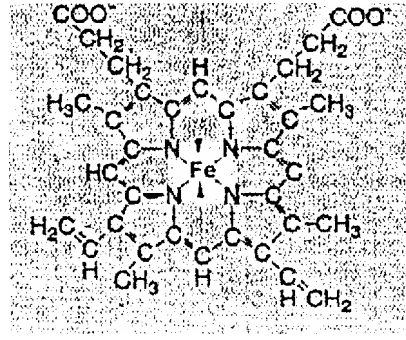
Çinko ve bakır gibi ağır metaller biyolojik sistemlerde mikrobesein olarak proteinlerin ve enzimlerin yapısal bileşiminde bulunmaktadır. Bu elementler normal büyüme ve gelişme olaylarında kofaktör olarak görev yapmaktadırlar. Bitkiler, büyüme periyotları sırasında ağır metaller tarafından değişik şekillerde etkilenmektedirler. Ağır metallerin öldürücü dozlarına karşı nadiren bazı bitkiler hızlı adaptasyon ve tolerans geliştirme yeteneğine sahiptirler.

1.1. Fitokelatinlerin Yapısı

Bitkiler metallerle kelat bileşikleri meydana getirirler. Kelat oluşumu biri organik, diğeri inorganik iki farklı kimyasal yapıya sahip maddenin bir araya gelecek bileşik meydana getirmesidir. Kelat bileşiklerinin meydana getirdiği yeni bileşik kendini oluşturan bileşenlerinden tamamen farklı özellik (fotokimyasal vs.) gösterir (Steffens, 1990). Canlı sistemlerde magnezyumun klorofilde (Şekil 1), demirin hemoglobinin hem grubunda (Şekil 2) kelat bileşikleri oluşturması bu duruma örnek olarak verilebilir. Kelat bileşiklerinde iyonun yükü ve yarıçapı uygun olduğu sürece benzer iyonlar (Fe^{++} ile Cu^{++} gibi) yer değiştirebilir. Bu olaya 'metal yerdeğiştirme' denir. (Bertini vd., 1994). Örneğin hemoglobinde Cu^{++} ve Zn^{++} kolaylıkla Fe^{++} 'nin yerine geçebilmektedir. Bu olay, bitki gelişimi için gerekli olan elementlerin fazlasının neden zehir etkisi yaptığını da açıklamaktadır.



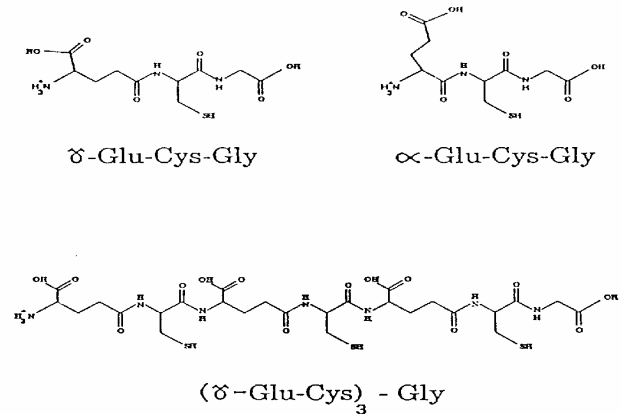
Şekil 1. Klorofil molekülünün açık kimyasal yapısı (Bozcuk, 1997).



Şekil 2. Hemoglobinde hem grubunun açık kimyasal yapısı (Champe ve Harvey, 1997).

Bitkiler aşırı miktarda metal etkisine maruz kaldıkları zaman toksik etkinin giderilmesi amacıyla metal bağlayan peptidleri sentezlemektedirler. Bu peptidlerin sentezinin başarısızlığa uğraması bitki büyümesinin engellenmesi veya bitkinin ölümü ile sonuçlanmaktadır. Ağır metal bağlayan bu peptidler "fitokelatinler" olarak bilinmektedir.

Fitokelatin terimi ilk kez Grill vd. (1985) tarafından ağır metal stresine maruz kalan bitkilerde değişmeden sentezlenen küçük ve sistince zengin peptidleri tanımlamak için kullanılmıştır. Bu peptidlerin genel yapıları $(\gamma\text{-glutamilsisteinil})_n\text{-glisin}$ [$(\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly}$] şeklindedir ($n=2-11$), (Şekil 3).



Şekil 3. Glutasyon ve metal bağlayan polipeptid $(\gamma\text{-glutamilsisteinil})_3\text{-glisin}$ yapıları (Steffens, 1990).

Bitkilerde ağır metal bağlayan polipeptidler değişik şekillerde isimlendirilmişlerdir. Bunlar kadistinler, fitokelatinler, $\gamma\text{-glutamil}$ peptid, poli- $(\gamma\text{-glutamilsisteinil})$ glisinler ve kadmiyum-peptid'dir. Reese ve Wagner (1987) *Nicotiana tabacum* yapraklarından ve *Lycopersicon esculentum* hücre süspansiyon kültüründen kadmiyum bağlayan peptidleri izole etmişler, bu peptidlerin fiziksel ve kimyasal karakteristiklerini belirlemişler ve bu özellikleri sıçan karaciğeriindeki kadmiyum ve çinko-tioneinleriyle karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar kadmiyum-peptidlerinin izoelektrik noktasının (pI) 3.5 olduğunu ve bu noktanın metalotioneinlerin izoelektrik noktasından ($pI \geq 4$) daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. *Nicotiana*

tabacum'da sentezlenen kadmiyum peptidleri ile kadmiyum-tioneinleri ve çinko-tioneinleri karşılaştırıldığına, kadmiyum peptidleri ile kadmiyum ve çinko-tioneinlerinin metal ilgisi ve seçiciliğinin oldukça farklı olduğunu açıklamışlardır. Bu konu ile ilgili olarak yapılan nomenklatur çalışmaları ile bu değişik isimler "fitokelatinler" olarak genelleştirilmiştir. Bu terim moleküllerin kelatlaşma fonksiyonu ile uygunluk göstermektedir.

Hayvan sistemlerinde de hücre içinde aşırı miktarda metal bulunması "metallotioneinler" olarak bilinen proteinlerin sentezine neden olmaktadır. Funguslar, omurgalılar, böcekler ve memelilerin metallotioneinleri molekül ağırlıkları düşük ve sistein bakımından zengin olan (yaklaşık %30'u Cys) proteinlerdir. Sistein (Cys) birikimleri proteinde Cys-X-Cys şeklinde veya Cys-Cys grupları arasında mevcuttur. Burada "X", Cys dışında bir amino asittir. Metallotioneinler yapısal olarak iki tiptir. I. tip atların böbrek metallotioneinlerine benzemektedir. *Neospora* ve *Agaricus* gibi bazı fungal metallotioneinler de I. tip metallotioneinlere dahildir. Lolkema vd. (1984) *Silene cucubalus* ile yaptıkları çalışmada, bakıra toleranslı populasyonda bakır uygulaması sonucu köklerde metallotioneinlere benzeyen bakırı bağlayan proteinleri izole etmişlerdir. *Agaricus bisporus*'dan da bakır metallotioneinleri izole edilmiş ve bu metallotioneinin her molekülünde 25 amino asit içerdiği, karakteristik olarak yüksek sistein oranına sahip olduğu (%28) ve 6 mol bakır molekülünü bağladığı bulunmuştur (Munger ve Lerch,1985).

II. tip metallotioneinler için *Saccharomyces cerevisiae*'daki metallotioneinler örnek olarak verilebilir. Bunlar, amino asit dizisi bakımından I. tip ile benzerlik göstermekte ve yüksek miktarda sistein içermektedirler. II. tip metallotioneinler de birinci tipte olduğu gibi metalleri sistein-tiolat bağları ile bağlamaktadırlar. Metallotionein sentezi transkripsiyon seviyesinde uyarılmaktadır. Omurgalılarda metallotionein sentezi dışsal metal uygulamalarında olduğu gibi, gelişimin kontrolü altında gerçekleşmektedir ve kortikosteroidler gibi çok sayıda ajan tarafından teşvik edilmektedir.

Bitkilerde ağır metallerin aşırı miktarlarının oluşturduğu zehirin etkisiz hale getirilmesi işleminin anlaşılmasında büyük oranda metallotionein modeli örnek alınmıştır. İleri organizmalarda, metallotionein yapılarının ve düzenleyici etkilerinin gösterilmesi, bitkilerde de metallotioneinlerin yapı ve fonksiyonuna benzer proteinlerin oluştuğunun anlaşılmasını sağlamıştır.

Ağır metale maruz kalmış bitkiler üzerinde yapılan ilk çalışmalarda metallotionein benzeri proteinler ortaya çıkarılmıştır. Bu proteinlerin metalleri uyarması *Nicotiana tabacum* yapraklarında (Wagner ve Trotter, 1982) ve *Zea mays* köklerinde (Rauser ve Glover, 1984) gösterilmiştir. Konu ile ilgili olarak Wagner (1984) *Brassica oleracea* yapraklarında kadmiyum bağlayan komplekslerin biriktirildiğini belirtmiş, daha sonra bu komplekslerle hayvan metallotioneinlerini ve çeşitli organizmalardan aldığı bakır-bağlayan protein-

leri karşılaştırmıştır. Jel filtrasyon sistemi ile *Brassica oleracea*'da doğal olarak meydana gelen kadmiyum bağlayan komplekslerin yaklaşık 10.000 dalton ağırlığında olduğunu ifade etmiştir. Bu çalışmalar metallotionein benzeri proteinlerin bitkilerin ağır metal metabolizmaları tarafından geliştirildiğini göstermektedir.

Bitkilerdeki metal bağlayan polipeptidler, hayvan sistemlerindeki tersine ribozomlar dışında sentezlenen polipeptidlerden meydana gelmektedir (Kolter ve Moreno, 1992). Bu polipeptidler yapı ve biyosentez bakımından farklılık göstermesine karşın görev bakımından metallotioneinlerle analoglardır. Steffens vd. (1986) hayvan hücrelerinin yüksek konsantrasyonlarda ağır metale maruz bırakıldıklarında, düşük molekül ağırlığına sahip, sistein bakımından zengin metallotioneinleri sentezlediklerini ve bu sentezin ilgili genler tarafından yönetildiğini açıklamışlardır. Buna karşın bitkilerin ağır metale maruz kalmaları durumunda ribozomlar dışında sistein bakımından zengin polipeptidleri sentezlediğini ve bu polipeptidlerin hücreler içinde biriktirildiğini ifade etmişlerdir.

Bitkilerdeki ağır metal bağlayan polipeptidler az rastlanır tipte ve $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ yapısındadır ($n=2-11$). Fitokelatinlerle karşılaştırıldığında glutatyon (GSH), $\gamma\text{-Glu-Gys-Gly}$ yapısına sahiptir, peptid α -karboksiltan ziyade glutamik asidin yan zincir karboksilatı ya da γ -glutamik asitle bağlanarak oluşmaktadır. Bu sentez ribozom destekli olarak meydana gelmektedir (Şekil 3). Bu peptidler ilk kez *Schizosaccharomyces pombe*'nin bölünmesi sırasında tanımlanmış ve kadmiyum ile uyarılabilen bu peptidlere "kadistin" adı verilmiştir. *Schizosaccharomyces pombe*'de tanımlanan bu peptidin kadistin-A ve kadistin-B bileşenlerinden oluştuğu belirlenmiştir. Daha sonra bitki kültürleriyle çalışan Grill vd. (1985) metal bağlayan polipeptidlerin benzeri bir serisini $(\gamma\text{-Glu-Cys})_{3-7}\text{-Gly}$ bulmuşlardır. Fitokelatin terimi ise, bu peptidlerin bitkilerde yaygın olarak bulunduğunun ve metal iyonlarının bu peptidlere bağlandığının belirlenmesi sonucu ortaya çıkmıştır. Fitokelatinler dışında tiol bakımından zengin %1 civarında olduğu tahmin edilen ağır metal bağlayan bileşiklerin varlığı da bildirilmiştir (Steffens, 1990).

Yüksek bitkilerde, kırmızı, yeşil ve kahverengi alglerde fitokelatinler ağır metaller tepki olarak sentezlenmektedir. Birçok fungus türü ise metallotioneinleri metallerin zehirli etkilerini gidermek amacıyla kullanmaktadır. *Schizosaccharomyces pombe* ve *Turoloopsis (Candida) glabrata* adındaki funguslar istisna olarak fitokelatinleri sentezlemektedirler (Steffens, 1990). Ayrıca *Turoloopsis glabrata*'da metal direncinin düzenlenmesi oldukça ilginçtir. *Turoloopsis glabrata* yüksek konsantrasyondaki bakıra tepki olarak %30 sistein (Cys) içeren ve metallotioneinlerin tipik Cys-X-Cys motifinin iki tekrarına sahip metallotionein benzeri bir proteini sentezlemektedir. Bununla birlikte *Turoloopsis glabrata*'da kadmiyuma tepki olarak $(\gamma\text{-Glu-Cys})_2\text{-Gly}$ ve $(\gamma\text{-Glu-Cys})_2$ sentezlenmektedir. Bu

şekilde farklı bir düzenleme sadece *Turoloopsis glabrata*'da gözlenmiştir, diğer organizmalarda fitokelatinler kadmiyum ve bakır ile tipik olarak uyarılmaktadır (Steffens, 1990).

Metalle oluşmuş fitokelatin kompleksi asidik doğası nedeniyle yüksek çözünürlüğe sahiptir ve hücreden kolayca izole edilebilir yapıdadır. Saflaştırılmaları anyon değişim kolon kromatografisi ile Sephadex G50 veya benzeri kolonlarla gerçekleştirilmektedir. Peptid bileşenleri seyreltik asit ile (0.1 N HCl veya %1'lik triflorasetik asit) denatüre edilip ters faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) kolonunda saflaştırılmaktadır. Steffens vd. (1986) kadmiyuma dayanıklı *Lycopersicum esculentum* hücrelerinde metal bağlayan (γ -glutamil-sisteinil)_n-glisin polipeptidini HPLC ile floresans özellikteki monobromobiman türevleri kullanarak saflaştırmışlardır.

1.2. Fitokelatinlerin Uyarılması

Memeli sistemlerinde metallotionein sentezi ağır metaller tarafından uyarılmaktadır. Ayrıca metallotionein sentezi büyüme ve gelişme sırasında kortikosteroidler, oksidatif stress ve diğer ajanlar tarafından da uyarılmaktadır (Steffens, 1990).

Bitkilerde ise fitokelatinleri indükleyen primer uyarıcılar özellikle ağır metallerdir. Kadmiyum, çinko, kurşun, gümüş, nikel, civa, kalay, altın, bizmut, vanadyum fitokelatin sentezine neden olmaktadır. Fitokelatin sentezi için ağır metallerin yüksek konsantrasyonları gerektiğinde, ağır metaller arasında kadmiyumun çinkoya göre daha kuvvetli bir uyarıcı olduğu görülmüştür (Steffens, 1990), (Tablo 1).

Tablo 1. Fitokelatinlerin ağır metal iyonları ile uyarılması (Steffens, 1990).

Tuz		Fitokelatin ^a ($\mu\text{mol/g}^b$)			Fitokelatinde toplam γ -glutamil-sistein (μM) ($\mu\text{mol/g}^b$)
Formül	Konsantrasyon μM	n=2	n=3	n=4	
Cd(NO ₃) ₂	100	1.27	2.91	2.30	20.5
Pb(NO ₃) ₂	1000	1.78	2.28	0.25	11.4
ZnSO ₄	1000	1.51	1.68	0.12	8.5
SbCl ₃	200	0.94	1.72	0.37	8.5
Ag(NO ₃)	50	1.07	1.90	0.08	8.2
Ni(NO ₃) ₂	100	1.53	0.82	0.07	5.8
Hg(NO ₃) ₂	10	1.28	0.55	0.02	4.3
Na ₂ HAsO ₄	20	1.40	0.34	0	3.8
CuSO ₄	50	0.88	0.41	0.04	3.1
SnSO ₄	100	0.86	0.33	0.03	2.8
NaSeO ₃	100	0.75	0.22	0.07	2.4
AuCl	50	0.71	0.17	0.03	2.0
Bi(NO ₃) ₃	100	0.69	0.18	0	1.9
TeCl ₄	10	0.58	0.13	0.05	1.8
WCl ₆	100	0.42	0.09	0	1.1
Yok	-	0	0	0	0

a= 1gr. kuru ağırlıkta n sayıda γ -glutamilsistein içeren fitokelatinler

b= kuru ağırlık

Buna ilave olarak arsenat (AsO₄³⁻) ve selenat (SeO₃²⁻) anyonları da fitokelatin sentezine sebep olabilmektedir. Bir fitokelatin uyarıcısı olan kadmiyum ısı şoku proteinlerini uyarmasına rağmen, ısı şoku proteinleri fitokelatin sentezini uyarmamaktadır (Steffens, 1990). Grill vd. (1987) ısı şoku yada soğuk uygulamalarında spesifik proteinlerin sentezi indüklenirken metal bağlayan peptidlerin sentezinin meydana gelmediğini ifade etmişlerdir. Ayrıca bakır sülfat (CuSO₄) uygulaması ile fitoaleksinler ve fitokelatinler etkin bir şekilde uyarılmasına rağmen, UV ışını ve fungus ile inokule etmek gibi uygulamalar fitokelatinleri uyarmamaktadır. Bununla birlikte karakteristik olarak ağaç ve çalılarda bulunan *mycorrhiza*'lar özellikle *ectomycorrhiza*'lar konak bitkide metal toksisitesini iyileştirici etki meydana getirebilmektedir. Fungusların hücresel düzeyde ağır metal toleransı sağlanmak amacıyla oluşturdukları mekanizmalar muhtemelen yüksek bitkilerdeki metallerin hücre dışı materyallerle bağlanması yada vakuolar bölümlerde tutulması şeklinde mekanizmalara benzemektedir (Hall, 2002). Soğuk şoku, hormon seviyelerinin değişimi ve oksidatif stresler hücre kültüründe fitokelatin sentezini uyarmamaktadır (Steffens, 1990).

1.3. Fitokelatinlerin Biyosentezi

Fitokelatinler ve glutatyon (GSH) biyosentezleri bakımından benzerlik göstermektedir. Bu benzerlikleri (Şekil 3) onların primer gen ürünü olamayacağını göstermektedir. Fitokelatinlerin ve GSH'nin biyosentezinde aynı enzimler rol oynamaktadır.

GSH sentezinde ilk basamak, Glu+Cys→ γ -Glu-Cys oluşumdur. Bu basamak γ -glutamil sistein sentetaz enzimi tarafından (EC.6.3.2.2) ATP hidrolizi ile katalizlenmektedir. Bu enzim bir geçiş analogu olan inhibitör buthionin sülfoksimin (BSO) tarafından inhibe edilmektedir. GSH biyosentezinde γ -Glu-Cys+Gly→ γ -Glu-Cys-Gly bileşiği ATP ve glutatyon sentetaz tarafından sentezlenmektedir. Fitokelatin sentezi BSO tarafından inhibe edilmektedir. Steffens vd. (1986) fitokelatin sentezinin kadmiyuma dayanıklı *Lycopersicum esculentum* hücrelerinde spesifik bir γ -glutamil sistein sentetaz inhibitörü olan BSO tarafından inhibe edildiğini ifade etmişlerdir. Scheller vd. (1987) *Lycopersicum esculentum* hücre kültürlerinde kadmiyum uygulaması sonucu fitokelatinlerin oluşumunu, BSO'nun fitokelatin sentezinde substrat olan glutatyon sentezini inhibe ettiğini göstermişlerdir. BSO uygulanan hücreler fitokelatinleri sentezlememektedirler. BSO tarafından fitokelatin biyosentezinin inhibe edildiğinin gösterilmesiyle fitokelatinlerin ağır metallerin zehirli etkilerinin giderilmesindeki gerekliliği kanıtlanmıştır.

Fitokelatin uyarılması esnasında GSH fitokelatinlerin sentezini etkilemektedir. *Schizosaccharomyces pombe* ve *Lycopersicum esculentum* hücre kültürleriyle yapılan çalışmalarla kadmiyum uygulamasından sonra fitokelatin biyosentezi GSH düzeyinde hızlı bir azalma ile meydana gelmektedir. Nitekim araştırmacılar *Lycopersicum esculentum* hücre kültürlerinde kadmi-

yum uygulaması ile GSH'nin fitokelatin sentezinde bir substrat olduğunu açıklamışlardır. Kadmiyum uygulanmış *Zea mays* tohumlarıyla yapılan çalışmalarda da benzer etkiler gözlenmiştir. Kadmiyum uygulanan köklerde GSH'nin tüketimi gövdeden daha hızlı olmaktadır. Kadmiyum uygulamasından iki saat sonra kökte GSH yarı yarıya azalmakta ve tekrar başlangıç düzeyine aşağı yukarı 24 saatte dönmektedir. Bunun tam tersine gövdede ise GSH sadece kadmiyum uygulandıktan 2 saat sonra azalmakta ve 24 saat içerisinde eski haline dönmektedir (Steffens, 1990).

Bitki hücrelerinde GSH uygulaması fitokelatin sentezinin doğrudan bir habercisi olarak iş görmektedir. BSO tarafından inhibe edilen fitokelatin sentezi dıştan uygulanan GSH'dan etkilendiği halde sistemin tarafından etkilenmemektedir. Scheller vd. (1987) poli[γ -glutamilsisteinil]glisin peptidinin biyosentezinin BSO tarafından inhibe edildiğini, aynı şekilde BSO'nun GSH sentezini de inhibe ettiğini ifade etmişlerdir. Araştırmacılar bitkilerde fitokelatin sentezinin bitkinin aşırı miktardaki metalin etkisine maruz kalmasından sonraki 10-15 dakika içerisinde gözlendiğini ve birikmiş GSH tükenene kadar fitokelatin sentezinin yapıldığını açıklamışlardır.

In vivo çalışmalarda fitokelatin sentaz ile çalışan biyosentetik mekanizmayı ayırt etmek güç olsa da bu mekanizma γ -glutamil sistein'in GSH'dan diğer bir GSH molekülüne transferini katalizleyerek (γ -Glu-Cys)₂-Gly'yi oluşturan spesifik bir γ -glutamilsistein transpeptidaz enziminin bulunması ile anlaşılabilir (Steffens, 1990). Buna ilaveten γ -Glutamil sisteinin GSH'dan diğer bir GSH molekülüne transfer edilmesiyle (γ -Glu-Cys)₂-Gly'den (γ -Glu-Cys)₅-Gly şeklinde fitokelatin oligomerleri meydana gelmektedir. Zamanla kadmiyum tarafından fitokelatin sentaz aktivitesinin uyarılmasıyla hazır bulunan GSH, hemen (γ -Glu-Cys)₂-Gly ve 20 dakika sonra ardı ardına (γ -Glu-Cys)₃-Gly ve (γ -Glu-Cys)₄-Gly'nin oluşumunu sağlamaktadır. Benzer şekilde enzimin saflaştırılması ile (γ -Glu-Cys)₂-Gly, GSH veya kadmiyum ile inkube edilmesi sonucu (γ -Glu-Cys)₃-Gly ve ardından da (γ -Glu-Cys)₄-Gly sentezlenmektedir. Ortamda bulunan kadmiyum yeni sentezlenen fitokelatinlerle kompleks oluşturduğu zaman sentez durmakta, kadmiyum ilavesi ise sentezi uyarır. GSH yokluğunda γ -Glutamilsistein'in (γ -Glu-Cys)₂-Gly'den başka bir (γ -Glu-Cys)₂-Gly molekülüne transferi fitokelatin sentaz tarafından gerçekleştirilmektedir ve bu durumda da (γ -Glu-Cys)₃-Gly ve ardından da (γ -Glu-Cys)₄-Gly meydana gelmektedir.

In vivo çalışmalar sonucu fitokelatin sentazın bitki yapısında bulunan bir enzim olduğu gösterilmiştir. Fitokelatin sentaz kadmiyum, gümüş, bizmut, kurşun, çinko, bakır, magnezyum ve altın gibi ağır metal kationlarıyla aktive edilmekte ve bunların yokluğunda tamamen inaktif olmaktadır. Huang vd. (1987) kadmiyuma toleranslı *Lycopersicon esculentum* hücrelerinde kadmiyumun fitokelatin sentazı aktive edip fitokelatin sentezini sağladığını ve fitokelatin birikimini uyardığını ifade etmişlerdir. *Saccharomyces*

cerevisiae'de kadmiyum toleransının artışından sorumlu Ta PCS1'i bir buğday cDNA'sında belirlemiş tir. Aynı fungusda metal toleransında rol oynayan enzim genlerini klonlanmış ve karakterizasyonu yapılmıştır (Clemens vd., 1999).

Fitokelatinler, ağır metal iyonlarının varlığında fitokelatin sentaz tarafından glutatyondan enzimatik olarak sentezlenmektedir. *Arabidopsis*'de fitokelatinin yetersiz ve Cd'a duyarlı olan *cad1* mutantları kullanılarak, fitokelatin sentazı şifreleyen CAD1 geni tanımlanmıştır (Ha vd.,1999).

Fitokelatin sentaz genleri *Arabidopsis*' de izole edilmiştir. Brewer's mayasının Cd-duyarlı *yap1* ve *ycf1* mutantlarına ilgili genler klonlanmış ve bu mutantlarda Cd toleransı meydana geldiği görülmüştür (Vatamaniuk vd. 1999).

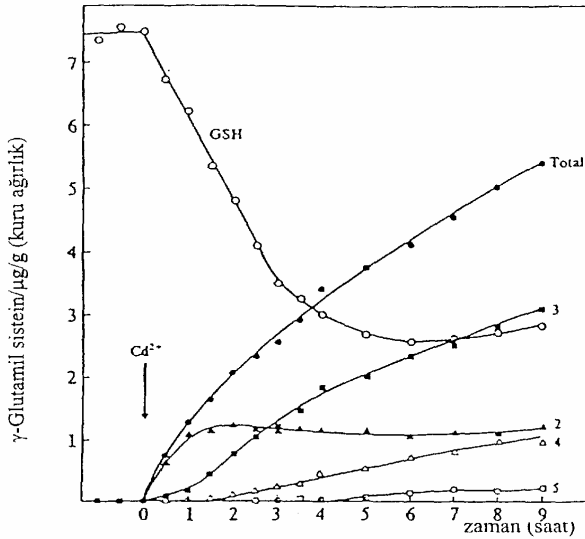
Selenat ve arsenat gibi *in vitro* anyonik uyarıcıların fitokelatin sentaz aktivitesini arttırdığı konusunda herhangi bir bilgi yoktur. Fitokelatin sentezi EDTA ile veya ağır metal bağlı olmayan fitokelatin sentezinden hemen sonra kesilmektedir. EDTA, fitokelatin-metal kompleksindeki metali kendi bünyesine bağlamaktadır. Bu şekilde EDTA fitokelatin-metal kompleksindeki metali ayırmaktadır.

1.4. Fitokelatinlerin Dönüşümü

Fitokelatinlerin dönüşümü konusunda ilk bulgular Grill vd. (1988) tarafından açıklanmıştır. Normal doku kültürü ortamına hücre kültürleri atıldığında fitokelatinlerin uyarılması ve biriktirilmesi ortamdaki serbest bakır veya çinkonun tükenmesi ile sona ermektedir. Aynı şekilde fitokelatinlerin miktarı, hücre aşırı miktarda kadmiyuma maruz kaldığında artmakta ve birikimi bir süre sabit olarak devam etmektedir (Şekil 4). Daha sonra fitokelatin düzeyi hızlı bir şekilde azalmaktadır (Şekil 5).

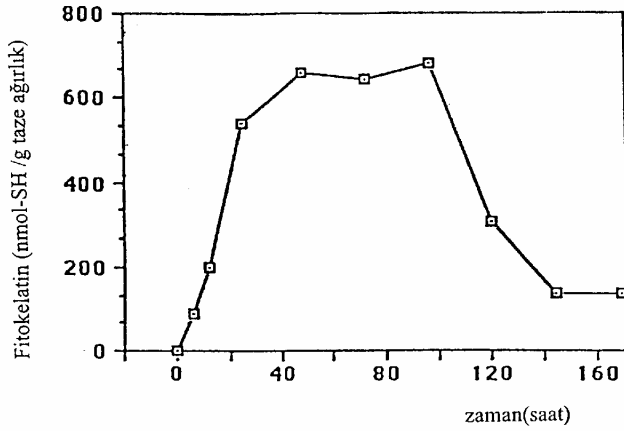
Bu durumda fitokelatinlerin metal bağlama kapasitesi ya hücrede total fitokelatinler azalırken bir artış göstermekte yada metaller fitokelatin bileşiklerini oluştururken yaptıkları bağlar dışında başka bağlarla fitokelatinlere bağlanarak sonuçta fitokelatinleri bozunmaya uğratmaktadırlar.

Fitokelatin sentezinin reaksiyon metabolizması ele alındığında des-Gly fitokelatinler (bu peptidde C-terminal Gly bulunmamaktadır) sıklıkla metal bağlayan komplekslerin bileşeni olarak bulunmakta ve fitokelatinlerin bozunma ürünleri olarak meydana gelmektedirler.



Şekil 4. *Rawolfia serpentina* hücre süspansiyon kültürüne 200µM Cd(NO₃)₂ uygulaması ile meydana gelen fitokelatin indüksiyonu ve glutasyon tüketiminin zamana bağlı değişimi (Steffens, 1990).

µ Glutasyon (GSH)
λ Toplam fitokelatin
σ (γ-glutamil sistein)₂
ν (γ-glutamil sistein)₃
Δ (γ-glutamil sistein)₄
π (γ-glutamil sistein)₅

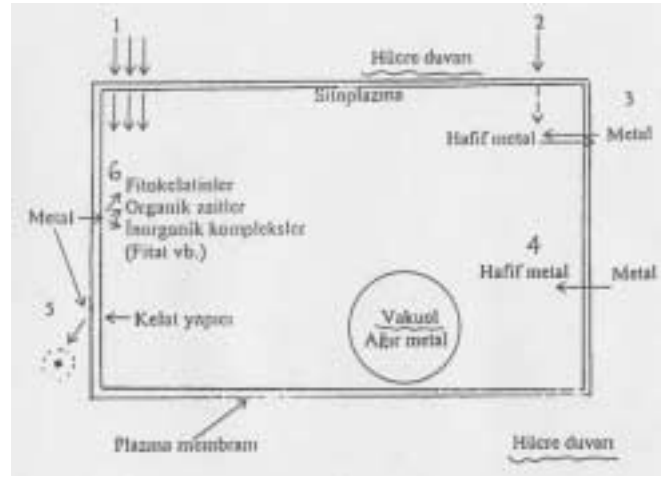


Şekil 5. 500 µM CdCl₂ uygulamasından sonra fitokelatin birikiminin zamana bağlı değişimi (Steffens, 1990).

1.5. Fitokelatinlerin Hücredeki Yeri

GSH öncelikle vakuol dışında meydana geldiği için GSH'ın biyosentetik enzimleri sitoplazma ve plastidler içinde bulunmaktadır. Nitekim Klapheck vd. (1987) *Pisum sativum* ile yaptıkları çalışmada kloroplastta toplam glutasyon sentetaz aktivitesinin %47-69 oranında gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacılar *Phaseolus coccineus* yaprakları ile yaptıkları çalışmada kloroplast içinde homoglutasyon sentetaz aktivitesinin %17'sinin meydana geldiğini belirtmişlerdir (Klapheck vd., 1988). Fitokelatin sentezinin sitoplazmada yapılabileceği tahmin edilmektedir (Steffens, 1990). Düşük kadmiyum konsantrasyonlarına maruz bırakılmış tütün yapraklarında hücreler arası

kadmiyumun hepsi taşınmaktadır. Tütün hücrelerinde yapılan çalışmalar sonucu fitokelatinlerin vakuolar olduğu belirlenmiştir (Steffens, 1990). Fitokelatinlerin vakuolde bulunma sebebi, metal iyonlarının bağlı olarak bulunmasından çok, fitokelatinlerin sitoplazmadan vakuole bu metal iyonlarının taşınmasında karşılıklı olarak gidip gelen sistemin bir bileşeni olabileceğinin düşünülmesindedir. Mayada fitokelatin-metal kompleksinin vakuol içinde taşınması ABC-tipi bir taşıyıcı olan *Hmt1* proteini tarafından sağlanmaktadır. Fakat, bitkilerde aynı görevi yapan proteinler henüz tesbit edilmemiştir (Ortiz vd., 1995). Bitkilerin ağır metallere toleransındaki muhtemel mekanizmalar 1) Hücre duvarına tutunma 2) Plazma membranından geçiş *Silene cucubalus*'un yüksek bakır toleransına sahip populasyonlarından birinde bakır alımının sınırlandırılması ve kök hücre plazma membranının zarar görmesinin önlenmesi 1, 2 ve 5 ile gösterilen mekanizmaların kombinasyonu ile sağlanmaktadır (Marschner, 1997), (Şekil 6).



Şekil 6. Bitkilerin ağır metal toleransındaki muhtemel mekanizmalar (Marschner 1997, Tomsett ve Thurman 1988'den değiştirilerek). 1) Hücre duvarına tutunma 2) Plazma membranından geçiş 3) Aktif geçiş 4) Vakuolde yerleşme 5) Hücre duvarı ile plazma membranı arasında kelatlaşma 6) Sitoplazmada kelatlaşma.

Çözünür ya da çözünmez komplekslerin sitoplazma içinde ve vakuolde yerleşmesi bakır toleransında önemli bir mekanizmadır. Çinkoya duyarlı bitkilerde çinko sitoplazmada biriktirilmektedir. Toleranslı bitkilerde ise çinko konsantrasyonu sitoplazmada düşük, vakuolde yüksektir. Toleranslı bitkilerde çinko vakuoldeki organik asitlerle (malik asit, sitrik asit gibi) kompleksler meydana getirmekte ve bu durum çinko toleransında önemli bir mekanizmayı oluşturmaktadır. Benzer şekilde nikel toleransı da özellikle malik ve sitrik asit gibi organik asitlerin nikel kompleks oluşturması sonucu meydana gelmektedir.

Vakuol pH'ı metal fitokelatin kompleksinin durumunu etkilemektedir. Peptid uzunluğu ve sülfid birleşmesinin derecesine bağlı olarak düşük pH, kompleksin gelişmesine sebep olabilmektedir. *Agrostis* köklerinde kükürtçe zengin kadmiyum granülleri fitokelat

gelişimi için bir örnek olarak alınabilmekte ancak bunların dağılımları tam anlamıyla vakuol içinde gerçekleşmemektedir (Steffens, 1990). Aynı zamanda kararsız sülfürün miktarına bağlı olarak pH=3.5-5 değerlerinde kadmiyum fitokelatin kompleksinden ayrılmaktadır. Vakuol pH'ı normalde 3.5-6 arasında bulunmaktadır. Bu pH değeri kadmiyumun fitokelatin kompleksinden ayrılmasına ve metallerin diğer bağlarla etkileşimine sebep olmaktadır (Dameron vd., 1989). Vakuollerde organik asitlerin (sitrik asit, malik asit) veya fitik asitin (inositol heksafosfat) konsantrasyonu yüksek olabilmektedir. Bu durumda metal bağlayıcılar üzerinde vakuolar pH değeri etkili olabilmektedir. Metallerin fitokelatinlere bağlanması büyük ölçüde pH'a bağlı olarak gerçekleşmektedir. Düşük pH derecelerinde fitokelatin komplekslerinde metal iyonlarının yerleri değişmektedir. Fitokelatin komplekslerinde bulunan kadmiyum iyonları pH=5 değerinde kompleksten ayrılmakta, *Schizosaccharomyces pombe*'de ise kompleksdeki bakır iyonları pH=1.3'de ayrılma göstermektedir (Steffens, 1990).

1.6. Fitokelatin Kompleksinin Metallerle Oluşturdukları Yapılar

Birçok farklı metalin fitokelatin sentezini teşvik ettiği belirtildiği halde fitokelatinlerin metalleri bağladığı sadece bakır, çinko ve kadmiyum için gösterilmiştir (Reese ve Wagner, 1987). Çinko iyonları zayıf bağlar yaptığı için bu bağlar güçlükle gösterilebilmektedir. Nitekim Reese ve Wagner (1987), *Nicotiana tabacum* süspansiyon kültüründen elde ettikleri fitokelatinlerle, sıçan karaciğerinden elde ettikleri kadmiyum- ve çinko-tioneinlerini karşılaştırarak, kadmiyum bağlanmasının güçlü, çinko bağlanmasının ise zayıf bir şekilde meydana geldiğini belirtmişlerdir. (γ -Glu-Cys)₂₋₇-Gly kompleksi heterojen bir yapıya sahiptir. Bu heterojen yapıdan dolayı kompleksin çok sayıda kombinasyonu ortaya çıkmaktadır.

1.7. Metale Toleranslı Bitkiler ve Hücrelerde Fitokelatinlerin Rolü

Fitokelatin sentezi, bitkilerin metal stresine verdiği cevabın güzel bir örneğidir. Metale toleranslı bitkilerin metalle kirlenmiş yerlerdeki veya ağır metal toleransı için seçilmiş hücre kültürlerindeki toleransının tespiti tam anlamıyla yapılamamış ve açıklanamamıştır. Steffens vd. (1986) yaptıkları bir çalışmada kadmiyuma dayanıklı (Cd^D) *Lycopersicum esculentum* hücrelerinde (γ -glutamil-sisteinil)_n-glisin birikiminin (n=3-4) yüksek miktarlarda olduğunu belirtmişlerdir. Kadmiyum yokluğunda kadmiyuma toleranslı *Lycopersicum esculentum* hücrelerinde BSO, büyümeyi inhibe etmekte γ -glutamil-sistein sentetaz enzim aktivitesi normal hücrelerden 4 kat daha fazla olmaktadır. BSO, γ -glutamil-sistein sentetazın aktif bölgesine kuvvetli bir şekilde bağlanarak bu enzimin daha fazla üretilmesini sağlamaktadır. Ayrıca BSO fitokelatinlerde γ -glutamil-sistein kullanımını artırabilmektedir.

Metale toleranslı bitkilerin çeşitli metallerle karşı tolerans geliştirdiği ancak bütün metallerle karşı tole-

ransın sadece fitokelatinlerden kaynaklanmadığı yapılan araştırmalarla tesbit edilmiştir (Huang vd., 1987). Bununla beraber *Lycopersicum esculentum*'un kadmiyuma duyarlı hücrelerinde [poli(γ -glutamil-sistein)glisin]'in sentez ve biriktirilmesinin kadmiyum uygulamasından sonra arttığını, BSO uygulaması ile fitokelatin sentezi inhibe edilen hücrelerde kadmiyum alım ve birikiminin etkilenmediğini, kadmiyuma toleranslı hücrelerin bakıra yüksek tolerans göstermesine rağmen, civa, kurşun, çinko ve gümüşe göstermediğini ifade etmişlerdir (Huang vd., 1987).

Metal kompleksinin oluşum derecesi, toleransın belirlenmesinde önemli bir göstergedir. Fitokelatinler, ağır metallerle tolerans geliştirmiş bitkilerde bulunmaktadır. Delhaize vd. (1989) kadmiyuma toleranslı ve duyarlı *Datura innoxia* hücrelerinde fitokelatinlerin aynı oranda biriktirildiğini, metal kompleksi oluşumunun toleranslı türde daha yüksek oranda olduğunu belirtmişlerdir.

Günümüzde hayvanlarda metal toksisitesinin etkisizleştirilmesinde kullanılan metalotioneinlerin varlığı bitkilerde bilinmesine rağmen, hayvan türlerinde fitokelatinlerin varlığı bildirilmemiştir. Ancak, fitokelatin sentaz genleri ile ilgili veriler incelendiğinde benzer genlerin nematodlarda, bir salyangoz türü olan *Dictyostelium discoideum*, sucul titrensinek (*Chironomus oppositus*) ve yersolucanı türlerinde bulunduğu belirlenmiştir. Fakat henüz bu genlerin fitokelatin sentaz aktivitesini kodladığına dair bir ant bulunamamıştır (Cobbett, 2000).

2. SONUÇ

Bitkilerde aşırı miktardaki metal zehirinin etkisizleştirilmesinde fitokelatinlerin önemli rol oynadığı ispatlanmıştır. Bitkilerde fitokelatin sentezi enzim katalizli gerçekleşmektedir. Fitokelatinler eser element homeostasisinde de görevlidirler ve aşırı miktardaki metal zehirinin etkisiz hale getirilmesi bu homeostatik fonksiyonların sonuçlarından bir tanesi olabilir (Cobbett, 2000).

Fitokelatinlerin metale toleranslı bitki dokularında bulunduğu bilinmektedir. Bu durum metal toleransının oluşturulması gerekli olan temel fitokelatinlerin fazla üretilmesi gibi basit bir mekanizma ile açıklanamamaktadır. Fitokelatinlerin peptid kompozisyonları heterojen bir yapı göstermektedir. Metal bağlayan bileşiklerin hayvanlarda metalotioneinler, bitkilerde de fitokelatinler olarak ayrılması oldukça zordur. Bitkilerde de metalotioneinler bulunmaktadır. Birçok metalotioneinler transjenik bitkilere aktarılarak ifade edilmişlerdir (Mejare ve Bülow, 2001).

Bitkiler tüm diğer organizmalar gibi homeostatik mekanizmaları kullanarak bitki gelişiminde temel metal iyonlarını değişik hücre bölümlerinde doğru konsantrasyonlarda ve gerekli olmayan iyonların zararını en az düzeyde tutmaya çalışırlar. Metallerin dağılımı, kelatlaşması, taşınımı ve etkisizleştirme fonksiyonları ile metal iyonlarının alım, dağıtım ve detoksifikasyonu

hücre içerisinde bir mekanizma ile düzenlenmektedir. Bu ağın bazı parçaları tanımlanmıştır. Buna göre, vakuolde metalleri tutan taşıyıcılar, kelat yapıcılar, şaperonlar ve hücre içi metal trafiği belirlenerek bitkilerde metal homeostasisi ve toleransının moleküler basamakları açıklanmıştır (Clemens, 2001).

Bilindiği gibi günümüzde ağır metal kirliliği giderek artmaktadır. Bulaşmanın olduğu yerlerde bazı bitkiler ağır metallere hızlı bir şekilde tolerans geliştirebilmekte, bazıları ise geliştirememektedir. Dolayısıyla, toksik metaller tarımsal üretimi de ciddi bir şekilde sınırlamaktadır. Bu alanda yapılacak çalışmalar sonucu ağır metal direncinin moleküler temellerinin daha iyi bilinmesiyle, tarım bitkilerinin ağır metallere dayanıklı varyetelerinin seçilmesi mümkün olabilecektir. Günümüzde biyolojik iyileştirme stratejileri yüksek etkinlik ve düşük maliyetlere sahip olması nedeniyle biyolojik iyileştirme araştırmaları metalle kirlenmiş atıkların arıtımında cazip bir alternatif olmaktadır (Mejare ve Bülow, 2001).

Bitki ağır metal homeostasisinde fitokelatinlerin rol aldığı bilinmekle beraber, bu konu ile ilgili daha detaylı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

KAYNAKLAR

- Alia -Saradhi, P.P. (1991). Proline accumulation under heavy metal stress. *J. Plant Physiol.* 138, 554-558.
- Bertini, I., Gray, H.B., Lippard, S.J. ve Valentine, J.S. (1994). *Bioinorganic Chemistry*. University Science Books. United States of America.
- Bozcuk, S. (1997). *Bitki Fiyolojisi*. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara.
- Champe, C.P. ve Harvey, R. A. (1997). *Biyokimya*. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul.
- Clemens, S., Kim, E.J., Neumann, D. ve Schroeder, J. I. (1999). Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *The EMBO Journal*. 18 (12) 3325-3333.
- Clemens, S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212, 475-486.
- Clijsters, H. ve Van Assche, F. (1985). Inhibition of photosynthesis by heavy metals. *Photosynth. Res.* 7,31-40.
- Cobbett, C. S. (2000). Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology* 123, 825-832.
- Dameron, C.T., Reese, R.N., Mehra, R.K., Kortan, A.R. ve Carroll, P.J. (1989). Biosynthesis of cadmium sulphide quantum semiconductor crystallites. *Nature* 338, 596-98.
- Delhaize, E., Jackson, P.J., Lujan, L. D. ve Robinson, N.J. (1989). Poly (γ -glutamylcysteinyl) glycine synthesis in *Datura innoxia* and binding with cadmium. *Plant Physiol.* 89,700-706.
- Eroğlu, A.G. ve Öncel, I. (1997). Ağır metal stresi altındaki buğday fidelerinde çözünür karbonhidrat miktarındaki değişimlerin incelenmesi. *OMÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi, Fen Dergisi*, 8(1), 152-175.
- Greger, M. ve Lindberg, S. (1986). Effects of Cd^{+2} and EDTA on young sugar beets (*Beta vulgaris*) I. Cd^{+2} uptake and sugar accumulation. *Physiol. Plant.* 66, 69-74.
- Grill, E., Winnecker, E.L. ve Zenk, M.H. (1985). Phytochelatin: the principal heavy metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230, 674-676.
- Grill, E., Winnacker E-L. ve Zenk M.H. (1987). Phytochelatin, a class of heavy metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA*. 84, 439-443.
- Grill, E., Winnecker, E.L. ve Zenk, M.H. (1988). Induction of heavy metal binding phytochelatin by inoculation of cell cultures in standard media. *Plant Cell Rep.* 7, 375-378.
- Hall, J.L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J.Experimental Botany* 53, 366, 1-11
- Ha, S., Smith, P. A., Howden, R., Dietrich, W.M., Bugg, S., O'Connell, M.J., Golsbrough, P.B. ve Cobbett, C.S. (1999). Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *The Plant Cell* 11, 1153-1163.
- Huang, B., Hatch, E. ve Goldsborough O. (1987). Selection and characterization of cadmium tolerant cells in tomato. *Plant Sci.* 52, 211-221.
- Kalimuthu, K. ve Sivasubmanian, R. (1990). Physiological effects of heavy metals on *Zea mays* (maize) seedlings. *Indian J. Plant Physiol* 13 (3), 242-244.
- Kinnersley, A.M. (1993). The role of phytochelates in plant growth and productivity. *Plant Growth Regul.* 12, 207-218.
- Klapheck, S., Latus, C. ve Bergmann, L. (1987). Localization of glutathione synthetase and distribution glutathione in leaf cells of *Pisum sativum* L. *J. Plant Physiol.* 131,123-131.
- Klapheck, S., Zopes, H., Levels, H.G. ve Bergman, L. (1988). Properties and localization of the

- homogluthatione synthetase from *Phaseolus coccineus* leaves. *Physiol Plant* 74, 733-739
- Kolter, R. ve Morero, F. (1992). Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu. Microbiol.* 46, 141-163.
- Lamoureaux, R.J. ve Chaney, W.R. (1978). The effect of cadmium on net photosynthesis transpiration and dark respiration of excised silver maple leaves. *Physiol Plant.* 4 (3),231-236.
- Lolkema, P.C., Donker, M.H., Schouteen, A.J. ve Ernst, W.H.O. (1984). The possible role of metallotioneins in copper tolerance of *Silene cucubalus*. *Planta* 162, 174-179.
- Marschner, H. (1997). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press. London
- Mejare, M. ve Bülow, L. (2001). Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. *Trends in Biotechnology* 19(2), 67-73.
- Moya, J.L., Ros, R. ve Picazo, I. (1993). Influence of cadmium and nickel on growth, net photosynthesis and carbohydrate distribution in rice plants. *Photosynth. Res.* 36, 75-80.
- Munger, K. ve Lerch, K. (1985). Copper metallotionein from the fungus *Agaricus bisporus*: Chemical and spectroscopic properties. *Biochem.* 24, 6751-6756.
- Ortiz, D. F., Ruscitti, T., McCue, K.F. ve Ow, D.W. (1995). Transport of metal-binding peptides by *Hmt 1*, a membrane protein. *J. Biol. Chem.* 270, 4721-4728.
- Öncel, I., Keleş, Y. ve Üstün, A.S. (2000). Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. *Environmental Pollution* 107, 315-320.
- Poschenrieder, C.H., Gunse, B. ve Barcelo, J. (1989). Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physio.* 90, 1365-1371.
- Rausser, W.E. ve Glover, G. (1984). Cadmium binding protein in roots of maize. *Can. J. Bot.* 62,1645-1650.
- Reese, R.N., Wagner, G.J. (1987). Properties of tobacco (*Nicotiana tabaccum*) cadmium-binding peptides. *Biochem. J.* 241,641-647.
- Reese, R. N., Winge D.R. (1988). Sulfide stabilization of the cadmium γ -Glutamyl peptide complex of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 263, 12832-12835.
- Rubio, M.I., Escrig, I., Martinez-Cortina, C., Lopez-Benet, F.J. ve Sanz, A. (1994). Cadmium and nickel accumulation in rice plants. Effects on mineral nutrition and possible interactions of abscisic and gibberellic acids. *Plant Growth Regul.* 14, 151-157.
- Samarakoon, A.B. ve Rausser, W.E. (1979). Carbohydrate levels and photoassimilate export from leaves of *Phaseolus vulgaris* exposed to excess cobalt, nickel and zinc. *Plant Physiol.* 63, 1165-1169.
- Scheller, H.V., Huang, B., Hatch, E. ve Goldsbrough, P.B. (1987). Phytochelatin synthesis and glutathione levels in response to heavy metals in tomato cells. *Plant Physiol.* 85, 1031-1035.
- Steffens, J.C., Hunt, D.F. ve Williams, B.G. (1986). Accumulation of nonprotein metal binding polypeptides (γ -glutamyl-cysteinyl)_n-glycine in selected cadmium resistant tomato cells. *J. Biol. Chem.* 261,13879-13882.
- Steffens, J.C. (1990). The heavy metal-binding peptide of plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 553-575.
- Wagner, G.J. (1984). Characterization of a cadmium binding complexes of cabbage leaves. *Plant Physiol.* 76, 797-805.
- Wagner, G.J. ve Trotter, M.A. (1982). Inducible cadmium binding complexes of cabbage and tobacco. *Plant Physiol.* 69, 804-809.
- Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lu Y-P. ve Rea P.A.(1999). AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and *in vitro* reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 7110-7115.



Işıl Öncel, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölüm'ünden 1971 yılında mezun oldu. 1979 yılında Fen Doktoru, 1990 yılında Doçent ve 2000 yılında Profesör oldu. Bitki Fizyolojisi (Stres Fizyolojisi) dalında türkçe ve yabancı dilde yayımlanmış eserleri vardır. Halen Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde öğretim üyesi olarak görev yapmaktadır.



Nuray Ergün, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 1993 yılında mezun oldu. 1995-1999 yılları arasında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde görev yaptı. 1999 yılından bu yana Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi

Biyoloji Bölümü'nde Araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.