

Ağır Metaller ve Fitoremediasyon: Fizyolojik ve Moleküler Mekanizmalar

Hakan Terzi ve Mustafa Yıldız

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 03200, Afyonkarahisar
e-posta: *biyolokum@yahoo.com ve mustafa_yildizus@yahoo.com*

Geliş Tarihi: 28 Ekim 2011; Kabul Tarihi: 20 Aralık 2011

Özet

Ağır metal kirliliği, tarım ve insan sağlığı üzerinde olumsuz potansiyel etkisi olan önemli bir çevre sorunudur. Toksik elementlerin uzaklaştırılması ve parçalanması için fiziksel remediasyon teknolojileri kullanılmaktadır. Bununla birlikte, çevreyi tahrip edici fiziksel remediasyon yöntemlerine alternatif olarak fitoremediasyon tekniği görülmektedir. Ağır metallerin uzaklaştırılması için bitkilerin kullanıldığı fitoremediasyon tekniği etkin, çevre dostu ve ucuz bir metottur. Bazı bitkiler ağır metal detoksifikasyonu ile ilişkili potansiyel mekanizmalara sahip olup; metal stresi altında canlılıklarını sürdürebilmektedir. Metal hiperakümülatörü bitkiler, gövde dokularında oldukça yüksek konsantrasyonlarda metal iyonlarını biriktirmekte ve detoksifiye edebilmektedir. Ağır metal toksisitesine karşı yüksek tolerans, bir genotip ile çevresi arasındaki etkileşime bağlı olarak metal alınımındaki azalma ve içsel alıkonmadaki artışa bağlı olarak gerçekleşmektedir. Moleküler genetik teknolojileri bitkilerde ağır metal toleransı ve birikimi ile ilgili mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına neden olmuştur. Metal alınımı, taşınımı ve içsel alıkonma ile ilgili olarak bitkilerin modifiye edilmesi için genetik mühendisliğinin kullanımı fitoremediasyon etkinliğinin artırılması için yeni yollar açabilmektedir. Metal şelatlayıcıları, metal taşıyıcıları, metallothionein ve fitoşelatin genleri metal alınımı ve içsel alıkonma kapasitesinin artırılması için bitkilere transfer edilmektedir. Hiperakümülatör bitkilerde ağır metal alınımı, taşınımı ve alıkonma mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, üstün fitoremediasyon özelliklerine sahip yeni transjenik bitkilerin geliştirilmesine yol açmaktadır. Bu derlemede, üstün fitoremediasyon yeteneğine sahip bitkilerin geliştirilmesinde rol oynayan fizyolojik ve moleküler mekanizmalar tartışılmıştır.

Anahtar kelimeler
Ağır metal alınımı ve taşınımı;
Hiperakümülasyon;
Fitoremediasyon;
Ağır metal toleransı

Heavy Metals and Phytoremediation: Physiological and Molecular Mechanisms

Abstract

Heavy metal pollution is a significant environmental problem with a negative potential impact on agriculture and human health. The physical remediation technologies have been in use to remove and destroy toxic elements. However, phytoremediation is widely viewed as the alternative to the environmentally destructive physical remediation methods. Phytoremediation, the use of plants to remove heavy metals, is an effective, environmentally friendly and cheap method. Some plants possess a range of potential mechanisms that may be involved in the detoxification of heavy metals, and they manage to survive under metal stress. Metal hyperaccumulator plants can accumulate and detoxify extraordinarily high concentrations of metal ions in their shoots. High tolerance to heavy metal toxicity could rely either on reduced uptake or increased plant internal sequestration, which is manifested by an interaction between a genotype and its environment. The molecular genetic technologies have led to an increased understanding of mechanisms of heavy metal tolerance/accumulation in plants. The use of genetic engineering to modify plants for metal uptake, transport and sequestration may open up new avenues for enhancing efficiency of phytoremediation. Metal chelators, metal transporters, metallothionein and phytochelatin genes have been transferred to plants for improved capacity of metal uptake and sequestration. A better understanding of the mechanisms of uptake, transport and sequestration of metals in hyperaccumulator plants will lead to designing novel transgenic plants with superior phytoremediation traits. In this review, the molecular and physiological mechanisms involved in the improving plant with superior phytoremediation capability are discussed.

Key words
Heavy metal uptake and transport;
Hyperaccumulation;
Phytoremediation;
Heavy metal tolerance

1. Giriş

Ağır metaller madencilik, enerji ve yakıt üretimi, aşırı pestisit ve gübre kullanımı gibi endüstriyel aktiviteler sonucu önemli miktarlarda çevreye yayılmaktadır (Halim vd., 2003; Samarghandi vd., 2007). Topraktaki metal konsantrasyonu tipik olarak 1 ila 100.000 mg kg⁻¹ arasında değişmektedir. Ağır metallerin yüksek seviyeleri toprak kalitesinin bozulmasına, ürün verim ve kalitesinde azalmaya neden olmakta (Long vd., 2002) ve dolayısıyla insan ve diğer organizmalar için önemli tehlikelere yol açmaktadır (Blaylock ve Huang, 2000).

Ağır metallerle kirlenmiş alanların iyileştirilmesinde (remediasyon) kullanılan geleneksel mühendislik yöntemleri pahalı olmaktadır (Salt vd., 1995; Glass, 2000). Bu nedenle, mevcut remediasyon teknikleri yerine düşük maliyetli ve çevre dostu olan fitoremediasyon tekniği üzerinde yoğunlaşmıştır (Arshad vd., 2008; Shi vd., 2009).

Toprak üstü organlarında topraktaki metal konsantrasyonundan 50 ila 500 kat daha fazla metal biriktirebilen bitkiler hiperakümülatör olarak adlandırılmaktadır (Clemens, 2006). Diğer bir ifadeyle, hiperakümülatör bitkiler ağır metalleri herhangi bir toksisite semptomu göstermeksizin toprak üstü organlarında diğer bitki türlerine göre 100 ila 1000 kat daha fazla biriktirebilmektedir (Brooks, 1998). Yaklaşık 450 bitki türü (angiospermlerin sadece %0.2'si) hiperakümülatör olarak tanımlanmıştır (Baker ve Brooks, 1989; Ellis ve Salt, 2003; Reeves, 2006; Milner ve Kochian, 2008). Birçok araştırmada, *Thlaspi caerulescens*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica juncea* (Brassicaceae), *Lycopersicon esculentum* (Solana-ceae), *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa* (Poaceae), *Pisum sativum* (Fabaceae), *Sedum alfredii* (Crassulaceae) gibi birçok bitkinin farklı ağır metaller bakımından fitoremediasyon potansiyelleri değerlendirilmiştir (Sun ve Zhou, 2005; Pilon-Smits, 2005; LeDuc vd., 2006; Lindblom vd., 2006; Kassis vd., 2007; Klein vd., 2008; Lebaudy vd., 2008; Mendoza-Cózatl vd., 2008). Bununla birlikte, birçok hiperakümülatör türün fitoremediasyon potansiyeli yavaş büyüme hızı, düşük biyokütle ve genellikle belirli bir habitatla sıkı bir ilişki nedeniyle

sınırlanmaktadır (Chaney vd., 2005). Bu nedenle derin kök sistemi, hızlı büyüme oranı ve ağır metal toleransı gibi fitoremediasyon için gerekli özelliklere sahip bitkilerin geliştirilmesi gerekmektedir. Gelişmiş büyüme karakteristikleri ve yüksek seviyede metal biriktirme kapasitesinin birleştirilmesi ile ağır metal alınımı, translokasyonu ve toleransının geliştirilmesi için yapılan genetik düzenlemelerdeki ilerlemeler transjenik yaklaşımların birçok bitki türünde gerçekleştirilmesine olanak sağlamıştır (Meyers vd., 2010). Mobilizasyon ve topraktan metal iyonlarının alınımı, metal-ligand komplekslerinin oluşumu ve vakuollerde detoksifikasyon, simplastik veya apoplastik yol ile gövde dokusuna translokasyon, hücrelerde alıkonma ve ağır metallerin metabolik açıdan daha az aktif hücrelere aktarılması ile ilişkili işlevler genetik değişikliklerin hedefini oluşturmaktadır (Clemens vd., 2002). Bu bağlamda, bitkilerde hiperakümülasyonu sağlayan moleküler ve genetik mekanizmaların anlaşılması, fitoremediasyon yeteneğine sahip bitkilerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.

Metal birikimi ve detoksifikasyonunun fizyolojik mekanizmaları ve bu özellikleri kontrol eden moleküler ve genetik olaylar birçok organizmada tespit edilmiştir. Bu derlemede, bitkilerde fitoremediasyon potansiyelinin artırılması temelinde fitoremediasyonun fizyolojik ve moleküler mekanizmaları ile ilgili bilgilerin özeti verilmiştir.

2. Fitoremediasyon

Fitoremediasyon tekniğinde çevresel kirleticileri absorbe eden, dokularında yüksek seviyelerde biriktiren (hiperakümülatör) ve fiziksel, kimyasal ve biyolojik süreçler aracılığıyla detoksifiye eden bitkilerin kullanımı tercih edilmektedir.

2.1. Fitoremediasyon Tipleri

Fitoremediasyon teknolojisi temel süreç ve uygulanabilirliği temelinde farklı gruplara ayrılabilir.

2.1.1. Fitoekstraksiyon

Bitki kökleri tarafından kirleticilerin alınımı ve

sonrasında toprak üstü organlarda biriktirilmesini takiben bitkilerin hasat edilerek yok edilmesini içermektedir. Bu teknik Cu ve Zn gibi aktif olarak alınan mikrobese elementleri ve Cd, Ni ve Pb gibi besin elementi olmayan ağır metallerin uzaklaştırılmasında kullanılabilir. Fitoekstraksiyon teknolojisi sadece metal kirliliğinin düşük veya orta seviyede olduğu alanlar için uygulanabilir. Çünkü çok fazla kirlenmiş alanlarda bitki büyümesi sürdürülemezdir (Padmavathamma ve Loretta, 2007). Bu teknolojiye doğal hiperakümülatör bitki türleri kullanılmaktadır (Baker vd., 1994). Bununla birlikte, toprak çözeltisinde düşük çözünürlüğe sahip metallerin çözünürlüğünü arttırmak için şelatlayıcı ajanlar eklenebilir (Evangelou vd., 2007). Bir şelatlayıcı ajan olan EDDS (etilen diamin disüsnik asit)'nin *Helianthus annuus* bitkilerinde Cu birikimini arttırdığı bildirilmiştir (Meers vd., 2005). Bununla birlikte, EDTA (etilen diamin tetraasetik asit) uygulamasının *Brassica napus* bitkilerinde Zn, Mn ve Pb alınımı ve translokasyonunu arttırdığı belirtilmiştir (Zaier vd., 2010). Başarılı bir fitoekstraksiyon, bitkilerin hızlı bir şekilde biyokütle üretmesine ve alınan metalleri gövde dokularında yüksek miktarlarda biriktirme yeteneğine bağlıdır (Blaylock ve Huang, 2000). Hiperakümülatör aday bitkilerin taranması, bitki ıslahı ve genetik yöntemler kullanılarak hiperakümülatör bitkilerin geliştirilmesi fitoremediasyon teknolojilerinin geliştirilmesinde kullanılan önemli stratejilerdir.

2.1.2. Rizofiltrasyon

Bitki kökleri tarafından sıvı büyüme ortamlarından fazla miktardaki besin elementlerinin veya metal kirlenmelerin alınımı ve alıkonmasını kapsamaktadır. *Brassica juncea*, *Phaseolus vulgaris* ve *Helianthus annuus* gibi hidroponik ortamda büyütülen birçok bitki türünün kökleri Cu, Cd, Cr, Ni, Pb, Zn ve U gibi toksik metallerin sıvı çözeltilerinden uzaklaştırılmasında kullanılabilir (Dushenkov vd., 1995; Raskin ve Ensley, 2000; Lee ve Yang, 2010). Rizofiltrasyon için ideal bitki önemli miktarda kök biyokütlesi veya yüzey alanı üretmeli, yüksek miktarda hedef metali biriktirebilmeli ve tolere edebilmeli, düşük maliyetli olmalı ve minimum

düzye de sekonder atık üretmelidir (Dushenkov ve Kapulnik, 2000).

2.1.3. Fitostabilizasyon

Bu teknikte, erozyonun önlenmesi, yeraltı sularına kirlenmelerin sızmasının azaltılması ve toprakla doğrudan temasın önlenmesi için toprak yüzeyi bitkiler ile örtülmektedir (Bert vd., 2005). Bu teknikte bitki kökleri fiziksel ve kimyasal olarak kirlenmelerini immobilize etmektedir (Berti ve Cunningham, 2000). Bu teknik, kirlenmiş topraklarda büyüyen ve toksik metalleri daha az toksik formlara dönüştürmek için toprağın fizyolojik, kimyasal ve biyolojik özelliklerini değiştirebilen bitkilere gereksinim duymaktadır. Fitostabilizasyon için kullanılacak bitkiler geniş bir kök sistemine sahip olmalı, yüksek konsantrasyonlardaki ağır metallerin varlığında yüksek oranda biyokütle üretebilmeli ve ağır metalleri gövdeye en az seviyede transloke etmelidir (Rizzi vd., 2004).

2.1.4. Fitovolatilizasyon

Bu teknolojiye, bitkiler tarafından absorbe edilen ağır metaller daha az toksik uçucu formlara dönüştürülerek transpirasyon ile atmosfere verilmektedir. As, Hg ve Se gibi metaller doğada gaz formunda bulunabilmektedir. Doğal olarak oluşan veya genetiği değiştirilmiş *Brassica juncea* ve *Arabidopsis thaliana* gibi bazı bitkilerin ağır metalleri absorbe ettikleri ve gaz formuna dönüştürerek atmosfere verebildikleri bildirilmiştir (Ghosh ve Singh, 2005). Bununla birlikte, *Populus* ve *Salix* gibi ağaç türleri etkin fitoremediasyon özelliklerinden dolayı sıklıkla bu teknikte kullanılmaktadır (Pulford ve Watson, 2003). Selenyum içeren besi ortamında büyüyen *Arabidopsis thaliana* ve *Brassica juncea* bitkilerinin dimetilselenit ve dimetildiselenit formunda uçucu Se üretebildikleri gösterilmiştir (Banuelos, 2000). Fitovolatilizasyon hidrojenin radyoaktif bir izotopu olan ve helyuma dönüştürülen trityumun (^3H) uzaklaştırılmasında da kullanılmaktadır (Dushenkov, 2003). İyonik formdaki cıvayı (Hg^{+2}) daha az toksik olan forma (Hg^0) dönüştüren cıva redüktaz genini içeren *Nicotiana tabacum* ve *Arabidopsis*

thaliana bitkileri genetik olarak modifiye edilmiştir (Meagher vd., 2000).

2.1.5. Fitodegradasyon (Fitotransformasyon)

Bu metotta, bitkilerdeki metabolik işlevler ve toprak mikroorganizmaları arasındaki rizosferik birliktelikle organik kirleticiler parçalanmaktadır. Organik kirleticilerin fitodegradasyonu bitki içerisinde veya rizosferde gerçekleşebilmektedir. Yeraltı sularındaki çözücüler, topraktaki petrol ve aromatik bileşikler ve havadaki uçucu bileşikler gibi birçok farklı kirletici bu metot ile uzaklaştırılabilmektedir (Newman ve Reynolds, 2004). Kirleticileri metabolize eden dehalojenaz, nitroredüktaz, peroksidaz, lakkaz ve nitrilaz gibi bitki enzimleri, kirleticilerin transformasyonunda aktif rol oynadıkları rizosfere salınmaktadır. Trinitrotolueni (TNT) daha az zararlı bileşiklere indirgeyen iki bakteriyel enzim (PETN redüktaz ve nitroredüktaz) bütün bitkilerinde TNT toleransının artırılması için kullanılmıştır. *Onr* ve *nfs* genlerinin, yabani tip bitkilerin gelişimini ciddi şekilde etkileyen TNT konsantrasyonuna karşı transjenik bitkilerin tolerans göstermesini sağladığı bildirilmiştir (Hannink vd., 2001). Bununla birlikte, Banks vd. (2003), polisiklik aromatik hidrokarbonlarla (PAH) kirlenmiş alanların remediasyonunda *Sorghum bicolor* bitkilerinin oldukça etkin olduğunu bildirmişlerdir. Toprak ya da su ortamında bulunan metal kirleticilerin fitoremediasyonunda kullanılan teknolojiler ve bitkiler Çizelge 1’de listelenmiştir.

3. Ağır Metal Alınımı ve Taşınımı

Bitkiler tarafından metal iyonlarının alınımı; metal iyonlarının kök yüzeyine tutunması, kök içine alınımı ve kütle akışı ve difüzyon aracılığıyla gövdeye translokasyonunu kapsamaktadır. Toprak partiküllerine bağlı halde bulunan metallerin alınımı köklerden rizosfere salgılanan metal şelatlayıcı moleküller, plazma membranına bağlı metal redüktaz ve proton salınımıyla sağlanmaktadır (Salt vd., 1995). Bitki türüne ve metal tipine bağlı olarak, metal iyonları kökler tarafından ya simplast (interselüler) ya da apoplast

(ekstraselüler) yolla alınmaktadır. Apoplastik taşınım hücre çeperinin katyon değişim kapasitesi ile sınırlandırılmaktadır (Raskin vd., 1997).

Çizelge 1. Metallerin fitoremediasyonunda kullanılan bazı bitki türleri (Jabeen vd., 2009’dan değiştirilerek)

Metal	Ortam	Metot	Bitki
As	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Pteris vittata</i>
		Fitostabilizasyon	<i>Piricum sativum</i>
B	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Gypophila sphaerocephala</i>
Cd	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Oryza sativa</i>
		Fitostabilizasyon	<i>Vetiveria zizanioides</i>
	Su	Rizofiltrasyon	<i>Lemna minor</i>
Co	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Berkheya coddii</i>
Cr	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Brassica juncea</i>
	Su	Rizofiltrasyon	<i>Brassica juncea</i>
Cu	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Elsholtzia splendens</i>
		Fitostabilizasyon	<i>Festuca rubra</i>
	Su	Rizofiltrasyon	<i>Lemna minor</i>
Hg	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Marrubium vulgare</i>
	Su	Rizofiltrasyon	<i>Pistia stratiotes</i>
Mn	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Phytolacca americana</i>
Ni	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Alyssum lesbiacum</i>
		Fitostabilizasyon	<i>Agropyron elongatum</i>
	Su	Rizofiltrasyon	<i>Lemna minor</i>
Pb	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Chenopodium album</i>
		Fitostabilizasyon	<i>Vetiveria zizanioides</i>
	Su	Rizofiltrasyon	<i>Hemidesmus indicus</i>
Se	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Brassica rapa</i>
		Fitovolatilizasyon	<i>Brassica spp.</i>
Zn	Toprak	Fitoekstraksiyon	<i>Cynodon dactylon</i>
	Su	Rizofiltrasyon	<i>Brassica juncea</i>

Simplastik taşınımında, metal iyonları yaklaşık 170 mV’luk negatif potansiyele sahip plazma membranından geçmektedir. Bu membran potansiyeli, metal iyonlarının hücre içine hareketi için kuvvetli bir elektrokimyasal gradient sağlamaktadır (Ghosh ve Singh 2005). Metal iyonlarının çoğu enerji gerektiren bir işlemle

spesifik veya genel iyon taşıyıcıları veya kanalları aracılığıyla bitki hücrelerine girmektedir (Bubb ve Lester, 1991).

Bitkilerde birkaç protein sınıfı ağır metal taşınımında fonksiyon görmektedir. Bitkilerde ağır metal toleransı ile ilişkili olarak metal iyonu homeostazisi ve toleransında fonksiyon gören ağır metal (veya CPx-tip) ATPaz'ları (Williams vd., 2000), doğal dirençle ilişkili makrofaj protein (Nramp) ailesi, katyon-difüzyon hızlandırıcı (CDF) protein ailesi ve çinko-demir permeaz (ZIP) ailesi (Guerinot, 2000) gibi metal taşıyıcıların birkaç sınıfı belirlenmiştir.

CPx-tip ağır metal ATPaz'ların Cu, Zn, Cd ve Pb gibi toksik metallerin hücre membranlarından geçişinde rol aldığı bildirilmiştir (Williams vd., 2000). Korunmuş bir membran içi sistein-prolin-sistein, sistein-prolin-histidin veya sistein-prolin-serin (CPx) motifine sahip oldukları için tip IB olarak sınıflandırılan ağır metal taşıyıcıları CPx-ATPaz'lar olarak adlandırılmaktadır. *Arabidopsis* P-tip ATPaz (PAA1) yüksek bitkilerde teşhis edilen ilk CPx-ATPaz'dır (Belouchi vd., 1997). Bu proteinlerin plazma membranında bulunduğu ve sitoplazmadan toksik metallerin uzaklaştırılmasında pompalar olarak fonksiyon gördüğü veya çeşitli hücre içi membranlarda bulunabildiği ve ağır metallerin kompartımanlaşmasından sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür (Yang vd., 2005).

Nramp gen ailesi, demir taşınımına aracılık eden integral zar proteinini kodlamaktadır (Belouchi vd., 1997). Bununla birlikte, bitkilerde toksik metal iyonlarının taşınımında Nramp proteininin fonksiyonu tam olarak açıklanmamıştır. Divalent metal iyonlarının taşınımı ile ilişkili Nramp proteinini kodlayan genlerin homologları pirinç bitkilerinde teşhis edilmiştir (Belouchi vd., 1997). *Nramp* genine homoloji gösteren iki *Arabidopsis* geni teşhis edilmiştir (Alonso vd., 1999). Tütün bitkilerinde *Thlaspi caerulescens Nramp3* (*TcNramp3*) geninin aşırı ekspresyonunun Cd hassasiyetine neden olduğu ve *TcNramp3* taşıyıcısının bitkilerde katyon homeostazisinde rol oynadığı ileri sürülmüştür (Wei vd., 2009). Benzer olarak, *AtNramp1*, *AtNramp3*, *AtNramp4* ve *AtNramp6* taşıyıcılarını eksprese eden mayada ve

AtNramp3, *AtNramp4* ve *AtNramp6* genlerini aşırı eksprese eden *Arabidopsis* bitkilerinde aşırı Cd hassasiyetinin görüldüğü belirtilmiştir (Thomine vd., 2000; Lanquar vd., 2004; Cailliatte vd., 2009). Bununla birlikte, *A. thaliana* bitkilerinde *AtNramp3* ve *AtNramp4* genlerinin inaktivasyonunun aşırı Cd ve Zn hassasiyetine neden olduğu bildirilmiştir (Oomen vd., 2008).

Elektrokimyasal gradiyente karşı metal iyonlarının ATP hidrolizi ile taşınması önemlidir. *Arabidopsis* ve *Oryza sativa* bitkileri sekiz HMA (ağır metal ATPaz) genine sahip olup (Baxter vd., 2003); ağır metal taşıyıcı ATPaz4 (HMA4) olarak da adlandırılan P_{1B}-tip ATPaz'lar metal transportunda önemli bir rol oynamaktadır. *Arabidopsis* bitkilerinde yapılan genom analizleri, HMA'ların bir grubu olan HMA1-4'ün Zn, Co, Cd ve Pb taşınımı ve diğer grubu olan HMA5-8'in ise Cu ve Ag taşınımından sorumlu olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, *Arabidopsis* bitkilerinde HMA4 taşıyıcılarının Zn homeostazisi ve Cd detoksifikasyonu ile bu metallerin kökten gövdeye translokasyonunda rol aldığı bildirilmiştir (Mills vd., 2005; Hussain vd., 2004; Verret vd., 2005; Courbot vd., 2007).

Bitkilerde ABC taşıyıcıları arasında sadece *AtMRP3* (Bovet vd., 2003) ve *AtATM3* (Kim vd., 2006) taşıyıcılarının Cd transportunda fonksiyon gördüğü ileri sürülmüştür. Mitokondriyal ABC taşıyıcı *AtATM3*'ün *Arabidopsis* bitkilerinde Cd ve Pb toleransında artışa neden olduğu bildirilmiştir (Kim vd., 2006). Demir, Zn, Mn ve Cd iyonlarının taşınımında rol oynayan ZIP gen ailesine ait birçok gen ve ZIP gen homologu olan *ZNT1* hiperakümülatör *Thlaspi caerulescens* bitkilerinde teşhis edilmiştir (Pence vd., 2000). Yang vd. (2005), *Thlaspi caerulescens* bitkilerinde metal birikim kapasitesi ve ZIP protein ailesine ait proteinlerin aşırı birikimi arasında bir korelasyonun olduğunu bildirmişlerdir. Zn stresi koşulları altında, hiperakümülatör olmayan *T. arvense* aksesyonlarına göre *T. caerulescens* aksesyonlarının köklerinde iki ZIP cDNA'sının (*ZNT1* ve *ZNT2*) önemli düzeyde daha yüksek seviyede eksprese olduğu bildirilmiştir (Pence vd., 2000, Assunção vd., 2001). Ayrıca *ZNT1*, *ZNT5* ve *MTP1* genlerinin

hücrel ekspresyonlarındaki Cd-teşvikli değişimlerin Cd toksisitesine *T. caerulea* bitkilerinin uyumu ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Küpper ve Kochian, 2010).

Hiperakümülatör bitkilerin köklerinde metal bağlayıcı ligandlar olarak fonksiyon görebilen birçok küçük organik molekül bulunmaktadır (Rascio ve Navari-Izzo, 2011). Ağır metal hiperakümülasyonunda histidin ve nikotinamin gibi bivalent katyonlarla kararlı kompleksler oluşturan amino asitler fonksiyon görmektedir. Serbest histidin (His) Ni hiperakümülasyonunda fonksiyon gören önemli bir ligand olduğu bildirilmiştir (Callahan vd., 2006). Nikel hiperakümülatörü *Alyssum lesbiacum* köklerinde *TP-PRT1* geninin (histidin biyosentez yolunun ilk basamağında fonksiyon gören ATP-fosforibozil transferaz enzimini kodlayan gen) aşırı ekspresyonunun His konsantrasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Kerkeb ve Krämer, 2003; Ingle vd., 2005). Farklı Ni hiperakümülatörü *Thlaspi* türlerinin köklerinde histidin yüksek seviyelerde bulunması, bu amino asidin diğer hiperakümülatör bitkilerde de aynı fizyolojik yolda fonksiyon görebileceğini göstermektedir (Assunção vd., 2003).

MATE (Multidrug And Toxin Efflux) protein ailesi, hiperakümülatör bitkilerde ağır metallerin translokasyonunda aktif olarak fonksiyon gören diğer bir membran proteindir. Bu protein ailesinin bazı üyeleri, toksik bileşikler veya sekonder metabolitlerin sitosolden hücre dışına çıkartılması veya vakuollerde alıkonulmasında rol alan katyon antiportörleri olarak fonksiyon gördükleri bildirilmiştir (Delhaize vd., 2007). MATE protein ailesinin bir üyesi olan FDR3 kök dokularında sitratın vaskular dokulara salınmasında fonksiyon görmektedir. *FDR3* geninin *Thlaspi caerulea* ve *Arabidopsis halleri* köklerinde yapısal olarak aşırı eksprese edildiği bildirilmiştir (Talke vd., 2006; van de Mortel vd., 2006). Perisikl plazma membranında lokalize olmuş FDR3 proteinin Fe taşınımı için gerekli bir ligand olan sitratın ksileme salgılanmasında fonksiyon gördüğü bildirilmiştir (Durret vd., 2007). Bununla birlikte, hiperakümülatör bitkilerde bu genin aşırı eksprese olması FDR3 proteininin Zn gibi diğer metallerin de translokasyonunda bir rol oynayabileceğini ileri

sürmektedir (Krämer vd., 2007).

4. Metal Toleransı Mekanizması

Bir bitkinin herhangi bir ağır metale olan tolerans mekanizmasının anlaşılması, kirlenmiş alanların fitoremediasyonu için uygun bitkilerin geliştirilmesi için oldukça önemlidir. Bitkilerde ağır metal toleransı birbiriyle ilişkili fizyolojik ve moleküler mekanizmalar tarafından belirlenmektedir. Toksik metallerin artan seviyelerine tolerans, toksik elementlerin bitki dışında tutulması (exclusion) veya metabolik toleranstan kaynaklanmaktadır (Singh vd., 2003).

Detoksifikasyon ve içsel alıkoyma, toprak üstü organlarında herhangi bir fitotoksik etki göstermeksizin yüksek miktarlarda ağır metalleri biriktirebilen hiperakümülatör bitkiler için önemli bir özelliktir. Hiperakümülatör bitkilerin toprak üstü organlarında detoksifikasyon ve alıkoyma mekanizmaları genel olarak ağır metallerin ligandlar ile kompleks oluşturulmasını veya ağır metallerin metabolik olarak aktif sitoplazmadan vakuol ve hücre duvarı gibi inaktif bölgelere taşınımını kapsamaktadır (Rascio ve Navari-Izzo, 2011). Hiperakümülatör ve hiperakümülatör olmayan bitkiler arasında yapılan karşılaştırmalı transkriptom analizleri içsel alıkoyma mekanizmasının, en azından tonoplast ve/veya plazma membranından ağır metallerin taşınımını sağlayan proteinleri kodlayan genlerin aşırı ekspresyonuna bağlı olduğunu göstermiştir.

4.1. Ağır Metallerin Vakuolde Alıkonulması

Bitkilerde vakuol genellikle metal iyonları için ana depo bölgesi olarak kabul edilmekte ve fitoşelatin (PC)-metal kompleksleri vakuollere pompalanmaktadır (Salt vd., 1995). Tütün mezofil protoplastları, Cd ile muamele edildiklerinde Cd ve PC'lerin büyük bir çoğunluğunun vakuolde biriktiği belirtilmiştir (Tong vd., 2004). Vakuolde metal iyonlarının kompartımanlaştırılması bazı hiperakümülatör bitkilerde tolerans mekanizmasının bir parçasını oluşturmaktadır (Tong vd., 2004). ABC-tip taşıyıcı protein ailesinin bir üyesi olan vakuolar membran proteinini (HMT1) kodlayan *hmt1* geni

yüksek moleküler ağırlıklı PC-Cd komplekslerini oluşturamayan mutant *S. pombe*'den izole edilmiştir (Ortiz vd., 1992). Ortiz vd. (1995), HMT1 proteinin düşük moleküler ağırlıklı PC-Cd komplekslerinin ATP'ye bağımlı olarak sitosolden vakuollere taşınımına aracılık ettiğini bildirmişlerdir. PC-Cd kompleksinin taşınımı, vakuolar-ATPaz inhibitörleri tarafından engellenmediği için bu taşınımın pH gradyentinden bağımsız olduğu belirtilmiştir. Benzer olarak, PC'ler ve PC-Cd komplekslerinin taşınımı için HMT1'in ATP bağımlı ve proton gradyentinden bağımsız aktivitesi yulaf köklerinde de belirlenmiştir (Salt ve Rauser, 1995). Diğer taraftan, *abcc1 abcc2* çift mutantına sahip *Arabidopsis* bitkilerinin As stresine aşırı hassas olduğu ve yabancı tip bitkilere göre PC-As komplekslerini daha az oranda vakuole aldığı bildirilmiştir (Song vd., 2010). İlginç olarak, ABCC1 ve ABCC2 taşıyıcıları glutatyon-konjugat komplekslerini vakuole taşıyan ABC taşıyıcıları olarak tanımlanmıştır (Liu vd., 2001; Rea, 2007).

Katyon difüzyon kolaylaştırıcı (CDF) protein ailesinin üyesi olan metal tolerans proteinleri (MTP'ler), Zn, Mn, Fe, Ni, Cd ve Co gibi metal iyonlarının sitoplazmadan hücre dışına veya vakuole taşınımında fonksiyon görmektedir (Montanini vd., 2007). Bitkilerde teşhis edilen ilk MTP geni *Arabidopsis thaliana* bitkilerinden izole edilen *AtMTP1* genidir (van der Zaal vd., 1999). *AtMTP1* geninin tüm organlarda teşhis edildiği, keza Zn uygulamasından etkilenmediği bildirilmiştir (van der Zaal vd., 1999; Kobae vd., 2004). Diğer taraftan, *AtMTP1* geni transfer edilmiş transjenik bitkilerin köklerinde Zn konsantrasyonunun ve toleransının arttığı ve bu gen susturulmuş bitkilerin aşırı Zn hassasiyeti gösterdiği bildirilmiştir (Desbrosses-Fonrouge vd., 2005). *AtMTP1* homologu olan *AhMTP1* geni, bir Zn hiperakümülatörü olan *Arabidopsis halleri* bitkisinde teşhis edilmiştir (Drager vd., 2004). Diğer bir MTP geni metal hiperakümülatörü *Thlaspi goesingense* bitkilerinden izole edilen *TgMTP1* genidir. *T. goesingense* bitkilerinde vakuolar metal-iyon taşıyıcısının (TgMTP1) yüksek seviyedeki ekspresyonunun gövde vakuollerinde Ni iyonlarının birikimini arttırdığı bildirilmiştir. Bununla birlikte,

Thlaspi goesingense membran MTP proteinini aşırı eksprese eden mayada Cd, Co, Ni ve Zn iyonlarına toleransın arttığı bildirilmiştir (Persans vd., 2001).

Bitki hücrelerinde, glutatyon (GSH) ve PC'ler tarafından oluşturulan PC-metal kompleksleri tonoplastta bulunan bir ABC-tip taşıyıcı protein tarafından vakuole alınmaktadır (Lu vd., 1997). Cd-fitoşelatin kompleksleri konsantrasyon gradyentine zıt yönde spesifik taşıyıcılar ile tonoplasttan taşınmakta ve tonoplast vezikülleri içinde birikmektedir (Salt ve Rauser 1995). Ayrıca, multidrug direnç proteinleri (MRP), PC-Cd veya GSH-Cd komplekslerinin tonoplasttan geçişinde fonksiyon görmektedir (Rea vd., 1998). Antosiyaninler de ağır metallerle bağlanabilmekte (Pilon-Smits ve Pilon 2002) ve ağır metallerin alıkonulmasında rol oynayabilmektedirler. Bugüne kadar, metal toleransı ile ilişkili vakuolar taşıyıcı ve kanalların en iyi karakterize edileni *Saccharomyces cerevisiae*'den izole edilen YCF1 (maya kadmiyum faktör 1)'dir. Transjenik *Brassica juncea* bitkilerinde YCF1 geninin aşırı ekspresyonunun Cd ve Pb birikimi ve toleransında artışa neden olduğu bildirilmiştir (Bhuiyan vd., 2011). Bu gibi vakuolar taşıyıcı proteinlerin aşırı ekspresyonu, güvenli hücresel bölgelerde ağır metalleri biriktirebilme yeteneği arttırılmış bitkilerin üretilmesinde kullanılabilir.

4.2. Ağır Metal Bağlayıcı Ligandlar

Ağır metaller hücre-içi olarak fitoşelatinler (PC'ler) veya metalotiyoneinler (MT'ler) gibi ligandlarla kompleksler oluşturabilmektedir.

4.2.1. Fitoşelatinler

Fitoşelatinler (PC'ler) genel yapısı $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ olan ve sistince zengin küçük polipeptitlerdir (Cobbet, 2000). Bu peptitler, birçok metali metal-tiyolat kompleksleri şeklinde alıkoyabilmekte ve ağır metal detoksifikasyonunda önemli rol oynamaktadır (Cobbett ve Goldsbrough, 2002; Clemens, 2006). Gen ürünleri olan MT'lerin aksine PC'ler, PC sentaz enziminin fonksiyon gördüğü bir transpeptidasyon reaksiyonu ile glutatyon (GSH) enzimatik olarak

sentezlenmektedir (Pal ve Rai, 2010). Glu-Cys birimlerinin sayısına bağlı olarak PC'ler PC₂, PC₃, PC₄, PC₅ ve PC₆ olarak sınıflandırılmaktadır (Rausser, 1995). Bitkilerde ağır metal birikimi PC'lerin üretimini teşvik etmektedir (Ramos vd., 2007; Mendoza-Cozatl vd., 2008). Bitki dokularında PC üretiminin ağır metal birikimi ile pozitif korelasyon göstermesi PC'lerin ağır metal stresi tarafından teşvik edildiğini göstermektedir. Iglesia-Turino vd. (2006), Hg stresine maruz bırakılan *Brassica napus* bitkilerinde Hg birikiminin PC₂ konsantrasyonu ile kuvvetli bir şekilde ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Fitoşelatin sentezi metal türüne bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Vestergaard vd. (2008), Mg⁺², Mn⁺², Ca⁺² ve Na⁺² uygulamalarının PC sentezini etkilemediğini, buna karşın Cd⁺² ve Zn⁺² uygulamalarının PC üretimine neden olduğunu bildirmişlerdir. Benzer olarak, Zhang vd. (2008), *Sedum alfredii* bitkilerinde Cd ve Pb stresinin PC üretimini arttırdığını, buna karşın Zn stresinin etki göstermediğini belirtmişlerdir.

Bitkilerde glutatyon (GSH) γ -glutamil-cis sentaz (γ -ECS) ve glutatyon sentetaz (GS) tarafından kataliz edilen iki basamaklı bir reaksiyonla sisteinden sentezlenmektedir. γ -glutamil-cis sentaz aktivitesi sistenin kullanılabilirliğine bağlıdır ve glutatyon tarafından geri-bildirim regülasyonu ile kontrol edilmektedir (Mejare ve Bullow, 2001). Bu enzimi kodlayan gen *Arabidopsis thaliana* ve *Triticum aestivum* gibi bitkilerde teşhis edilmiştir (Clemens vd., 1999). Bakteriyel γ -ECS ve GS genlerini aşırı eksprese eden *Brassica juncea* bitkilerinde yüksek oranda GSH ve PC'lerin biriktiği ve Cd toleransı ve birikiminde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Reisinger vd., 2008). Benzer olarak, *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde γ -ECS veya GS genlerinin aşırı ekspresyonunun yabancı tip bitkilere göre daha yüksek seviyede GSH, PC₂, PC₃ ve PC₄ birikimine ve Hg ve As toleransında artışa neden olduğu bildirilmiştir (Li vd., 2006). Diğer taraftan, *Brassica juncea* bitkilerinde PC sentazın aşırı ekspresyonunun yüksek oranda GSH ve PC birikimine neden olarak As, Cd ve Zn toleransının artmasına neden olduğu bildirilmiştir (Gasic ve Korban, 2007). Clemens vd. (1999), yabancı tip mayalarda Cd toleransında artışa neden olan bir

buğday cDNA'sı (TaPCS1) teşhis etmişlerdir. Vakuol eksik mutantlarda AtPCS1 ve TaPCS1 proteinlerinin toleransa neden olması, PC'lerin sitosolde lokalize olduğunu ve tolerans mekanizmasında önemli rol oynadığını göstermektedir. Gisbert vd. (2003), tütün bitkilerde buğday *TaPCS1* geninin aşırı ekspresyonunun Pb ve Cd stresine toleransı büyük ölçüde arttırdığını ve yabancı tip bitkilere göre kök büyümesinde %160 artışa neden olduğunu bildirmiştir. Kurşun içeren toprakta (1.572 mg/kg) büyütülen transjenik fidelerin yabancı tip fidelere göre iki kat daha fazla Pb ve Cd biriktirdiği belirtilmiştir. Ağır metal detoksifikasyonunda yüksek PC seviyelerinin pozitif bir rolünün olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, *A. thaliana* bitkilerinde aşırı PC sentazı kodlayan *AtPCS1* geninin ekspresyonunun Cd hassasiyetine neden olduğu bildirilmiştir (Lee vd., 2003). Benzer olarak, tütün bitkilerinde *AtPCS1* geninin aşırı ekspresyonunun Cd hassasiyetine neden olduğu belirtilmiştir (Wojas vd., 2008). Lee vd. (2003), Cd hassasiyetinin supraoptimal seviyelerdeki fitoşelatinlerin ve glutatyon tüketiminin neden olduğu toksisiteden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

4.2.2. Metalloitiyoneinler

Metalloitiyoneinler (MT'ler) düşük moleküler ağırlıklı, sisteince zengin ve metal şelasyonu için tiyol gruplarına sahip bir grup metal bağlayıcı proteindir. Sistein kalıntılarının sayısı ve düzenlenişine bağlı olarak tüm bitki MT'leri sınıf II'ye aittir ve amino asit sekanslarına göre dört farklı tipe ayrılmaktadır (Cobbett ve Goldsbrough, 2002). Ekspresyon analizleri tip 1 MT'lerin genel olarak köklerde (Hudspeth vd., 1996), tip 2 MT'lerin çoğunlukla yapraklarda (Zhou ve Goldsbrough, 1995; Hsieh vd., 1995), tip 3 MT'lerin olgunlaşmış meyveler ve *Arabidopsis* yapraklarında (Guo vd., 2003) ve tip 4 MT'lerin ise sadece gelişmekte olan tohumlarda eksprese olduğunu göstermiştir (Chyan vd., 2005). MT'lerin metal bağlayıcı özellikleri onların metal homeostazisi ve detoksifikasyonunda rol oynayabileceğini göstermektedir. Bitkilerde MT'ler sadece Cu ve Zn gibi mikro besin elementlerinin homeostazisinin sürdürülmesinde değil, aynı zamanda Cd ve As gibi toksik metallerin

detoksifikasyonunda da fonksiyon görebilmektedir (Lee vd., 2004; Merrifield vd., 2004; Zimeri vd., 2005). Sucul *Azolla filiculoides* bitkilerinde tip 2 MT gen (*AzMT2*) ekspresyon seviyesinin Cd, Cu, Zn ve Ni uygulamalarına cevap olarak arttığı bildirilmiştir (Schor-Fumbarov vd., 2005). Wang vd. (2011), *Medicago sativa* bitkilerinde *MsMT2a* geninin kontrol ve Cd uygulamalarında, *MsMT2b* geninin ise sadece Cd uygulamalarında eksprese olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, MT'lerinin oksidatif stresten bitkileri koruyucu özelliklere de sahip olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (Akashi vd., 2004; Brkljacic vd., 2004; Wong vd., 2004). Pamuk *GhMT3a* genini aşırı eksprese eden transjenik tütün bitkilerinde abiyotik stres koşullarına karşı toleransın arttığı ve *GhMT3a* proteininin reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde fonksiyon görebildiği bildirilmiştir (Xue vd., 2009).

Metal şelatörlerinin sentezi ile ilişkili genlerin aşırı ekspresyonu metal alınımının artmasına veya azalmasına, metallerin translokasyonuna ve/veya alıkonulmasına neden olabilmektedir (Cherian ve Oliveira, 2005). Örneğin, metalicolous (bir ağır metali normal konsantrasyonun üzerinde içeren topraklarda büyümeye adapte olmuş populasyon, tür ya da aksesyon) olmayan bitkilere göre metalicolous bitkilerde *MT2b* ortologlarının (farklı türlerde bulunan benzer işlevli proteini kodlayan genler) aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir (Mengoni vd., 2003; van de Mortel vd., 2006; Jack vd., 2007; Hassinen vd., 2009). *Brassica oleracea* bitkilerinde bir MT geninin (*CUP1*) aşırı ekspresyonunun 16 kat daha fazla Cd toleransına neden olduğu belirtilmiştir (Hesegawa vd., 1997). Benzer olarak, bezelye MT genini aşırı eksprese eden *Arabidopsis thaliana* bitkisinde Cu birikiminin arttığı bildirilmiştir (Pan vd., 1994). Transjenik tütün bitkilerinde *AtMT2b* ve *AtHMA4* genlerinin birlikte ekspresyonunun Cd toleransını ve gövde dokusuna Cd ve Zn translokasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Grispen vd., 2011). Kloroplastik *mt1* genini aşırı eksprese eden tütün bitkilerinde Hg toleransının arttığı ve herhangi bir olumsuz etki olmaksızın bitki dokularında daha fazla seviyede Hg biriktiği bildirilmiştir (Ruiz vd., 2011). Diğer taraftan, *Arabidopsis AtMT2b* genini eksprese eden

transjenik tütün hatlarında As birikiminin kök dokusunda azaldığı, gövde de ise arttığı ve yabancı tip bitkilere göre As toleransının azaldığı bildirilmiştir (Grispen vd., 2009). Metallotiyonein-metal komplekslerinin glutatyonlanabildiği (Brouwer vd., 1993), bu kompleksin uzun süreli alıkonma için vakuollere taşınabildiği ileri sürülmüştür (Jabeen vd., 2009). Bununla birlikte, *OsMT1a* genini aşırı eksprese eden çeltik bitkilerinde kuraklık toleransının arttığı bildirilmiştir (Yang vd., 2009). Yüksek sıcaklık stresi ve alüminyum gibi diğer stres koşullarının MT'lere ait genlerin ekspresyonunu teşvik ettiği için genel bir stres cevabı olarak eksprese oldukları ileri sürülmüştür (Cobbett ve Golsbrough, 2002).

5. Fitoremediasyon İçin Bitkilerin Geliştirilmesi

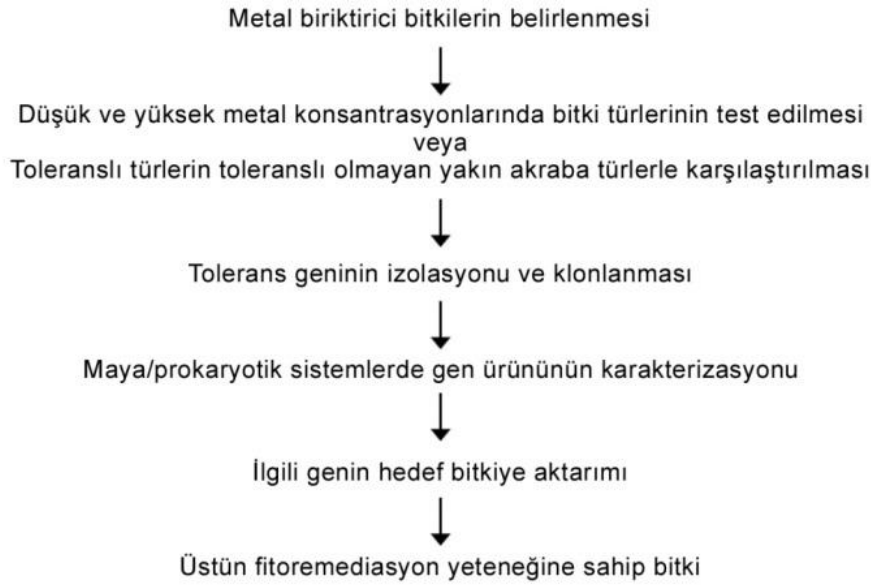
Bitkilerin ağır metalleri biriktirebilme kapasiteleri genetik düzenlemeler veya şelatlama stratejileri ile arttırılabilmektedir.

5.1. Genetik Stratejiler

Hiperakümülatör bitkilerin teşhisi, kirlenmiş alanların temizlenmesinde bu bitkilerin genetik bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Hiperakümülatör bitkilerin küçük boyutlara ve düşük büyüme oranlarına sahip olmaları, fitoremediasyon potansiyelini olumsuz etkilemekte ve mekanik hasat gibi tarımsal uygulamaları sınırlamaktadır (Tong vd., 2004). Bu dezavantajların üstesinden gelebilmek için yavaş büyüyen ve düşük biyokütleli bitkilerden yüksek biyokütleli çeşitlerin geliştirilmesi temelinde klasik ıslah yöntemleri kullanılmaktadır (Li vd., 2004). Diğer bir yaklaşım ise bitkilerin ağır metalleri şelatlayarak ile sitoplazmada detoksifiye etme, toksik iyonların daha az toksik formlara dönüştürme ya da kompartımanlaştırma kapasitelerinin arttırılmasını hedeflemektedir. *Arabidopsis* genom projesinin tamamlanmasını takiben birçok diğer bitkinin genom taraması ile ağır metal homeostazisi ve birikimi ile ilişkili olan bir dizi genin teşhisi sağlanmıştır (Dhankher vd., 2002). İyonmik taramalar değişken element içerikli mutantların teşhis edilmesi için *A. thaliana* mutant

populasyonlarında yapılan multi-element profillemeyi içeren fitoremediasyon ilişkili araştırmalarda başlamıştır (Lahner vd., 2003; Salt, 2004). Metal alınımı, taşınımı ve birikiminin genetik ve biyokimyasının anlaşılması fitoremediasyon

kapasitesi yüksek transjenik bitkilerin geliştirilmesine neden olabilmektedir (Salt ve Kramer, 2000; Baker vd., 2000). Metal biriktirici bitkilerin geliştirilmesi için gerekli strateji Şekil 1'de verilmiştir (Karenlampi vd., 2000).



Şekil 1. Fitoremediasyon yeteneğine sahip bitkilerin elde edilme stratejisi (Karenlampi vd., 2000'den değiştirilerek).

Bitkilerde esansiyel metallerin plazma veya organel membranlarından primer veya sekonder aktif taşıyıcılar ile taşınımı metal homeostazisinde önemli rol oynamaktadır. Tütün bitkilerinde, plazma membranına lokalize olmuş NtCBP4 (kalmodulin bağlayıcı protein) taşıyıcısının aşırı ekspresyonunun Pb alınımını ve gövde dokularına translokasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Arazi vd., 1999). *A. thaliana* metal iyonu/H⁺ antiportörleri olan CAX2 ve CAX4'ü aşırı üreten transjenik tütün bitkilerinin etkin şekilde Cd, Zn ve Mn metallerini detoksifiye edebildikleri belirtilmiştir (Hirschi vd., 2000; Korenkov vd., 2007).

Bitkilerdeki konsantrasyonu 2-3 mM olan glutatyon (GSH), sadece PC'lerin öncüsü değil aynı zamanda ağır metal cevabında rol alan diğer mekanizmaların önemli bir bileşenidir (Noctor vd., 2002). Bir antioksidant molekül olarak GSH hücrelerde ağır metal iyonları tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerinin direkt olarak temizlenmesinde fonksiyon görmekte (Schützendübel ve Polle, 2002) ve metabolizma, sinyal iletimi ve gen ekspresyonu için redoks homeostazisinin sürdürülmesi için askorbat-

glutatyon döngüsünde indirgeyici eşdeğer güç sağlamaktadır (Foyer ve Noctor, 2005). Ağır metal hiperakümülatörü *Thlaspi goesigense* bitkilerinde GSH'un aşırı üretiminin Cd ve Ni tarafından oluşturulan oksidatif strese karşı toleransı arttırdığı bildirilmiştir (Boominathan ve Doran, 2003; Freeman ve Salt, 2007). Bununla birlikte, Cd hiperakümülatörü *S. alfredii* bitkilerinin kirlenmiş alanlara adaptasyonunun PC'lerden ziyade aşırı GSH üretimine bağlı olduğu belirtilmiştir (Sun vd., 2007). GSH ve PC sentezi ile ilişkili enzimlerin modifikasyonu ve aşırı ekspresyonu ağır metal toleransının ve dolayısıyla fitoremediasyon potansiyellerinin artırılması için iyi bir yaklaşım olabilmektedir. Maya *GSH1* ve *Allium sativum* *AsPCS1* genlerini aşırı eksprese eden *A. thaliana* bitkilerinin daha yüksek seviyede arsenit ve arsenat toleransı ve birikimi gösterdiği belirtilmiştir (Guo vd., 2008). Zhu vd., (1999), *E. coli* γ -ECS ve GS genlerini aşırı eksprese eden *Brassica juncea* bitkilerinin yabani tip bitkilere göre daha fazla Cd biriktirdiğini bildirmiştir.

Hiperakümülatasyonun genetik temelleriyle ilişkili kapsamlı bilgi, etkin fitoremediasyon kapasitesine sahip transjenik bitkilerin geliştirilme-

sinde oldukça önemlidir. Doğal metal hiperakümülatörü bitkilerde metal alınımlı, translokasyonu, birikimi ve toleransı mekanizmalarının kritik analizleri metal bağlayıcı protein veya peptitlerin sentezinden sorumlu genlerin teşhisine yardım edecektir. Metalloitiyoninleri ve PC sentezi ile ilişkili enzimleri kodlayan genlerin teşhisi, fitoremediasyonun moleküler mekanizmasının aydınlatılmasında ilk basamağı oluşturmaktadır. Transjenik *Nicotiana tabaccum*, *Brassica oleracea* ve *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde fare *MT-1*, insan *hMT-1A* ve *hMT-II* genlerinin ekspresyonunun Cd toleransını arttırdığı, buna karşın gövde dokularındaki metal birikiminde %20 ila 70 azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Eapen ve D'Souza, 2005; Cherian ve Oliveira, 2005). *HisCUP1* genini aşırı eksprese eden tütün bitkilerinde Cd için fitoekstraksiyon potansiyelinin arttığı belirtilmiştir (Macek vd., 2002; Pavlíková vd., 2004). *A. thaliana* köklerinde buğday *TaPCS1* geninin aşırı ekspresyonunun gövde dokularına Cd translokasyonunu arttırdığı ve yabancı tip bitkilere göre kök dokularında metal birikimini azalttığı rapor edilmiştir (Gong vd., 2003). Bununla birlikte, *Nicotiana glaucum* bitkilerinde *TaPCS1* geninin aşırı ekspresyonunun Pb ve Cd toleransını (Gisbert vd., 2003) ve gövde dokusunda Cu, Zn, Pb ve Cd birikimini (Martínez vd., 2006) arttırdığı bildirilmiştir. Zıt olarak, *A. thaliana* bitkilerinin yapraklarında (Peterson ve Oliver, 2006) ve kloroplastlarında (Picault vd., 2006) aşırı *AtPCS1* üretiminin sadece Cd toleransını arttırdığı, buna karşın gövde dokusunda metal birikime bir etkisi olmadığı belirtilmiştir. Bununla birlikte, tütün bitkilerinde *AtPCS1* geninin aşırı ekspresyonunun PC seviyesini 14 kat arttırdığı, köklerde Cd toleransı ve birikimini arttırdığı, ancak gövde dokusuna translokasyonu etkilemediği bildirilmiştir (Pomponi vd., 2006).

Ağır metallerin temizlenmesi için transjenik bitkilerin geliştirilmesi, mikroorganizmaların araştırılması ve tarla denemeleri fitoremediasyon teknolojisini daha etkili ve uygulanabilir hale getirmektedir. Bakteriler birkaç ağır metali daha az toksik formlara indirgeyebilmektedir (Lovely, 1993). Gram-negatif bakterilerde cıva toleransı cıva-iyon

redüktaz (*merA*) genini içeren bir operon tarafından kodlanmaktadır. MerA enzimi toksik Hg^{+2} 'yi daha az toksik cıvaya (Hg^0) dönüştürmektedir. Rugh vd. (1996), *merA* genini içeren transjenik *Arabidopsis thaliana* fidelerinin kontrol fidelerine göre 2-3 kat daha fazla Hg^0 ürettiklerini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, metilcıva liyaz organik cıva detoksifikasyonu için bitki potansiyelini arttırabilmektedir (Bizily vd., 2003). *A. thaliana* (Yang vd., 2003), *N. tabacum* (Ruiz vd., 2003), *Oryza sativa* (Heaton vd., 2003), *Spartia alterniflora* (Czakó vd., 2006) ve *Populus deltoides* (Lyyra vd., 2007) gibi bitki türlerinde *merA*, *merB* veya her iki genin birlikte aşırı ekspresyonunun Hg toleransı ile sonuçlandığı belirtilmiştir. Bununla birlikte, Hg^{+2} 'nin sitoplazmaya aktarılması ve sonrasında metalik cıvaya indirgenmesini kapsayan bakteriyel Hg direnci, metal iyonlarını MerT, MerC veya MerF taşıyıcılarına kanalize eden periplazmik Hg^{+2} -bağlama proteini MerP'ye bağlı gerçekleşmektedir (Silver ve Phung, 2005). Bitki hücre membranlarında ve veziküllerinde lokalize olmuş MerP'nin transjenik *A. thaliana* bitkilerinde aşırı üretiminin Hg toleransını ve birikimini arttırdığı bildirilmiştir (Hsieh vd., 2009).

Dhankher vd. (2002), kirlenmiş alanlardan As'in temizlenmesi için *E. coli* *AsrC* geni (arsenat redüktazı kodlayan) ve *E. coli* γ -ECS genini aşırı eksprese eden transjenik *Arabidopsis* bitkileri geliştirmişlerdir. Gövde ve yaprak dokusunda yüksek seviyede eksprese olan *AsrC* proteini arsenatın arsenite indirgenmesini katalizlerken, PC biyosentez yolunun ilk enzimi olan γ -ECS bitkilerde PC havuzunun artışına neden olmaktadır. *AsrC* ve γ -ECS proteini içeren transjenik bitkilerin yabancı tip bitkilere göre 4-17 kat daha fazla gövde taze ağırlığına sahip olduğu ve dokularında 2-3 kat daha fazla As biriktirdiği bildirilmiştir (Dhankher vd., 2002). Selenyum hiperakümülatörü *Astragalus bisulcatus* bitkisinden izole edilen selenosistein metiltransferaz (*SMT*) genini aşırı eksprese eden transjenik *A. thaliana* bitkilerinin selenit (SeO^{-3}) ile kirlenmiş topraklarda yetiştirdiklerinde yabancı tip bitkilere göre 8 kat daha fazla Se biriktirdikleri bildirilmiştir (Ellis vd., 2004). Transjenik *B. juncea* bitkilerinde Se toleransı, birikimi ve volatizasyon

kapasitesinin artırılması için *SMT* geninin kullanımı, tarımsal gereksinimler için bir hiperakümülatör geni ile modifiye edilen ilk bitki örneğini temsil etmektedir (LeDuc vd., 2006; Bañuelos vd., 2007).

Metal homeostazisi ile ilişkili genlerin karakterizasyonu ile bu genlerin fonksiyonları ve fitoremediasyonda kullanılabilme potansiyelleri hakkında önemli bilgiler sağlanmıştır (Song vd., 2004). *A. thaliana*'da yüksek afiniteli demir alım sistemi (*IRT1*) (Connolly vd., 2002; Vert vd., 2002; Verret vd., 2003) ve köklerden gövdeye Zn^{+2} ve Cu^{+2} taşınımında fonksiyon gören iki P_{1B} -tip Zn^{+2}/Cu^{+2} -ATPaz'lar (*HMA2* ve *HMA4*) (Eren & Arguello, 2004; Hussein vd., 2004; Papoyan ve Kochian, 2004; Verret vd., 2004) bu genlerden en önemlileridir. Kurşun akümülatörü *B. juncea* ve Zn ve Ni hiperakümülatörü olarak bilinen *Thlaspi caerulescens* arasında yapılan somatik hücre hibridlerinin Pb, Ni ve Zn stresine artan tolerans gösterdiği ve yüksek oranda Pb'ü fitoekstrakte ettiği rapor edilmiştir (Gleba vd., 1999; Dushenkov vd., 2002). Böylece, yüksek ve düşük biyokütleli metal hiperakümülatör bitkiler arasında yapılan somatik hücre hibridizasyonu, yüksek biyokütleli ve hiperakümülatör kapasitesine sahip hibridlerin geliştirilmesine olanak sağlayabilmektedir.

5.2. Şelat-Temelli Stratejiler

Kirlenmiş alanlarda ağır metalleri yüksek oranlarda biriktirebilen ve yüksek biyokütleli bitkilerin geliştirilmesi fitoremediasyonun etkinliğini belirleyen bir faktördür. Herhangi bir ürün kaybı olmaksızın yüksek biyokütleli bitkilerde ağır metal birikiminin artırılması fitoremediasyon gelişiminde en uygun strateji olarak ortaya çıkmaktadır. Hiperakümülatör olmayan bitkilerde metal alım kapasitesinin ve alım hızının artırılması için şelatlayıcı ajanların kullanılabilmesi belirtilmiştir. Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) gibi aminopolikarboksilik asitler (APCA'lar) birçok fitoekstraksiyon denemelerinde kullanılmıştır. Etilen diamin disüksinat (EDDS) ve nitrilo triasetik asit (NTA) gibi biyolojik olarak degrade edilebilen APCA'lar EDTA ve diğer kalıcı APCA'lara alternatif olarak kullanılmaktadır. Sentetik şelatörlerin

kullanımı birçok ağır metalin alınımı ve köklerden gövde translokasyonunu arttırmakta ve böylelikle metallerin fitoekstraksiyonunu kolaylaştırmaktadır (Meers vd., 2008; Luo vd., 2008; Petra vd., 2009; Zaier vd., 2010). Bununla birlikte, birçok çalışmada düşük moleküler ağırlıklı organik asitler ağır metal alınımını arttırmada kullanılmıştır (Evangelou vd., 2007). Bu şelatörler birçok farklı ağır metal için kuvvetli bir afinite göstermekte (Meers vd., 2005; Lotte vd., 2007) ve oluşan ağır metal-şelatör kompleksleri köklerden gövde dokusuna kolaylıkla transloke olabilmektedir (Wenger vd., 2003; Tandy vd., 2006). Böylelikle, şelatörler ağır metallerin alınımı ve translokasyonunu arttırmakla kalmaz (Wu vd., 2004; Tandy vd., 2006), aynı zamanda serbest metal iyonlarının fotosentetik organlara zarar vermesini de engellemektedir (Hernandez-Allica vd., 2003).

Tarımsal alanlarda kullanılan şelatlayıcı ajanlar, toprağın katı fazından metallerin ayrılmasını sağlayarak veya çökelmiş metal iyonlarını daha çözünür hale getirerek toprak çözeltisi içerisinde metal iyonlarının bitkiler tarafından kullanılabilirliğini arttırmaktadır (Prasad, 2003). Akümülatör olmayan bir bitkide toksik metallerin şelatör aracılığıyla birikimi şelat-destekli hiperakümülatör olarak adlandırılmaktadır (Huang vd., 1997). Şelat-destekli hiper-akümülatörde, mısır gibi tarımsal bitkilerin hızla büyümesine izin verecek şekilde kirlenmiş alanlardaki metallerin önceden immobilize edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, şelat-destekli hiperakümülatör bitkilerin toprak çözeltisindeki toksik olmayan seviyelerdeki metallere maruz bırakıldığı ve bitki büyümesiyle birlikte kademeli olarak metal birikiminin gerçekleştiği normal fitoekstraksiyon yönteminden farklılık göstermektedir. Bununla birlikte, sentetik şelatörlerin kullanımı ağır metallerin mobilizasyonunu arttırmasına karşın önemli çevresel sorunlara neden olabilmektedir (Blaylock vd., 1997). Wenzel vd. (2003), metal mobilizasyonundaki artış sonucu yeraltı sularının kirlenme riskinden dolayı şelat-destekli fitoekstraksiyonun sınırlı etkinliğe sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle, şelatlayıcı ajanlar tarafından mobilize edilen metaller ile yeraltı sularının kirlenmesinin

önlenmesi için sentetik şelatör uygulamasının topraktan sızacak suyu toplayabilecek bir sistem ile birleştirilmesi gerekmektedir (Navari-Izzo ve Quartacci, 2001).

6. Sonuç

Fitoremediasyon teknolojisi, ağır metallerle kirlenmiş toprak ve su kaynaklarının iyileştirilmesi için kullanılmaktadır. Hiperakümülatör bitkiler, ağır metallerle kirlenmiş alanların fitoremediasyonu için bu bitkilerin potansiyel kullanımlarından dolayı son yıllarda artan ilgi görmektedir. Bununla birlikte, bu teknolojinin kullanımındaki sınırlamalar, teşhis edilen hiperakümülatör bitkilerin çoğunun hem düşük biyokütleyle sahip hem de olumsuz çevre koşullarına adapte olamamasından kaynaklanmaktadır. Bu sınırlamaların üstesinden gelebilmek için bitkilerdeki metal hiperakümülasyonu ile ilişkili mekanizmaların iyi şekilde anlaşılması gerekmektedir.

Metal alınımı, taşınımı ve içsel alıkoyma mekanizmaları ile ilgili bilgilerin elde edilmesi fitoremediasyon için transjenik bitkilerin geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır. Hücre içinde ağır metallerin alıkonulması ile ilgili proteinlerin (MT'ler, PC'ler ve vakuolar taşıyıcılar) aşırı üretiminin metal birikimi ve subselüler yapılarda metal depolanmasını arttırdığı bilinmektedir. Ayrıca, artan ağır metal birikimi plazma membranlarındaki taşıyıcıların aşırı üretimi ile de sağlanabilmektedir. Fitoremediasyon için aday gen veya proteinlerin proteomik ve genomik teknolojileri ile araştırılması sonucunda elde edilecek veriler sayesinde bitkilerdeki metal metabolizması ve metallerle kirlenmiş alanların remediasyonu için yeni bitkilerin geliştirilmesi önemli olacaktır.

Kaynaklar

- Akashi, K., Nishimura, N., Ishida, Y. ve Yokota, A., 2004. Potent Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Drought-Induced Type-2 Metallothionein in Wild Watermelon. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 323, 72-78.
- Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S. ve

Ecker, J.R., 1999. EIN2, A Bifunctional Transducer of Ethylene and Stress Responses in *Arabidopsis*. *Science*, 284: 2148-2152.

- Arazi, T., Sunkar, R., Kaplan, B. ve Fromm, H., 1999. A Tobacco Plasma Membrane Calmodulin-Binding Transporter Confers Ni²⁺ Tolerance and Pb²⁺ Hypersensitivity in Transgenic Plants. *Plant Journal*, 20, 171-182.
- Arshad, M., Silvestre, J., Pinelli, E., Kallerhoff, J., Kaemmerer, M. ve Tarigo, A., 2008. A Field Study of Lead Phytoextraction by Various Scented *Pelargonium* Cultivars. *Chemosphere*, 71, 2187-2192.
- Assunção, A.G.L., Martins, D., Folter, S., Vooijs, R., Schat, H. ve Aarts, M.G.M., 2001. Elevated Expression of Metal Transporter Genes in Three Accessions of the Metal Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell and Environment*, 24, 217-226.
- Assunção, A.G.L., ten Bookum, W.M., Nelissen, H.J.M., Vooijs, R., Schat, H. ve Ernst, W.H.O., 2003. Differential Metal-Specific Tolerance and Accumulation Patterns Among *Thlaspi caerulescens* Populations Originating from Different Soil Types. *New Phytologist*, 159, 411-419.
- Baker, A.J.M. ve Brooks, R.R., 1989. Terrestrial Higher Plants Which Hyperaccumulate Metallic Elements—A Review of Their Distribution, Ecology and Phytochemistry, *Biorecovery*, 1, 81-126.
- Baker, A.J.M., Reeves, R.D. ve Hajar, A.S.M., 1994. Heavy Metal Accumulation and Tolerance in British Populations of the Metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl. (Brassicaceae). *New Phytologist*, 127, 61-68.
- Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Reeves, R.D. ve Smith, J.A.C., 2000. Metal Hyperaccumulator Plants: A Review of the Ecology and Physiology of a Biological Resource for Phytoremediation of Metal Polluted Soils. In: Terry, N. ve Banuelos, G., (eds.). *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Lewis, Boca, pp. 85-107.
- Banks, M.K., Kulakow, P., Schwab, A.P., Chen, Z. ve Rathbone, K., 2003. Degradation of Crude Oil in the Rhizosphere of *Sorghum bicolor*. *International Journal of Phytoremediation*, 5, 225-234.
- Banuelos, G. S., 2000. Phytoextraction of Se from Soils Irrigated with Selenium-Laden Effluent. *Plant and Soil*, 224, 251-258.
- Banuelos, G., LeDuc, D.L., Pilon-Smits, E.A.H. ve Terry, N., 2007. Transgenic Indian Mustard Overexpressing Selenocysteine Lyase or Selenocysteine Methyltransferase Exhibit Enhanced Potential for Selenium Phytoremediation under Field Conditions.

- Environmental Science and Technology, 41, 599-605.
- Baxter, I., Tchieu, J., Sussman, M.R., Boutry, M., Palmgren, M.G., Gribskov, M., Harper, J.F. ve Axelsen, K.B., 2003. Genomic Comparison of P-type ATPase Ion Pumps in *Arabidopsis* and Rice. *Plant Physiology*, 132, 618-628.
- Belouchi, A., Kwan, T. ve Gros, P., 1997. Cloning and Characterization of The OsNramp Family from *Oryza sativa*, A New Family of Membrane Proteins Possibly Implicated in The Transport of Metal Ions. *Plant Molecular Biology*, 33, 1085-1092.
- Bert, V., Girondelot, B., Quatannens, V. ve Laboudigue, A., 2005. A Phytostabilisation of a Metal Polluted Dredged Sediment Deposit—Mesocosm Experiment and Field Trial. In: Uhlmann, O., Annokkée, G.J. ve Arendt, F. (eds.), *Proceedings of the 9th International FZK/TNO Conference on Soil–Water Systems, Remediation Concepts and Technologies*. Bordeaux, pp. 1544-1550.
- Berti, W.R. ve Cunningham, S.D., 2000. Phytostabilization of Metals. In: Raskin, I. ve Ensley, B.D. (eds.), *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean-up the Environment*. Wiley, New York, pp. 71-88.
- Bhuiyan, M.S.U., Min, S.R., Jeong, W.J., Sultana, S., Choi, K.S., Song, W.Y., Lee, Y., Lim, Y.P. ve Liu, J.R., 2011. Overexpression of a Yeast Cadmium Factor 1 (YCF1) Enhances Heavy Metal Tolerance and Accumulation in *Brassica juncea*, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 105, 85-91.
- Bizily, S. P., Kim, T., Kandasamy, M.K. ve Meagher, R.B., 2003. Subcellular Targeting of Methylmercury Lyase Enhances Its Specific Activity for Organic Mercury Detoxification in Plants. *Plant Physiology*, 131, 463-471.
- Blaylock, M.J., Salt, D.E., Dushenkov, S., Zakharova, O., Gussman, C., Kapulnik, Y., Ensley, B.D. ve Raskin, I., 1997. Enhanced Accumulation of Pb in Indian Mustard by Soil-Applied Chelating Agents. *Environmental Science and Technology*, 31, 860-865.
- Blaylock, M.J. ve Huang, J.W., 2000. Phytoextraction of Metals. In: Raskin, I. ve Ensley, B.D. (eds.), *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean-up the Environment*. Wiley, New York, pp. 53-70.
- Boominathan, R. ve Doran, P.M., 2003. Cadmium Tolerance and Antioxidative Defenses in Hairy Roots of the Cadmium Hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*. *Biotechnology and Bioengineering*, 83, 158-167.
- Bovet, L., Eggmann, T., Meylan-Bettex, M., Polier, J., Kammer, P., Marin, E., Feller, U. ve Martinoia, E., 2003. Transcript Levels of AtMRPs After Cadmium Treatment: Induction of AtMRP3. *Plant Cell and Environment*, 26, 371-381.
- Brkljacic, J.M., Samardzic, J.T., Timotijevic, G.S. ve Maksimovic, V.R., 2004. Expression Analysis of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Metallothionein-like Gene (MT3) under Different Stress and Physiological Conditions. *Journal of Plant Physiology*, 161, 741-746.
- Brooks, R.R., 1998. General Introduction. In: Brooks, R.R. (ed.). *Plants That Hyperaccumulate Heavy Metals: Their Role in Phytoremediation, Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining*. CAB International, New York, pp. 1–14.
- Brouwer, M., Hoexum-Brouwer, T. ve Cashon, R.E., 1993. A Putative Glutathione Binding Site in CdZn-Metallothionein Identified by Equilibrium Binding and Molecular-Modelling Studies. *Biochemical Journal*, 294, 219-225.
- Bubb, J.M. ve Lester, J.N., 1991. The Impact of Heavy Metals on Lowland Rivers and the Implications for Man and the Environment. *Science of The Total Environment*, 100, 207-233.
- Cailliatte, R., Lapeyre, B., Briat, J-F., Mari, S. ve Curie, C., 2009. The NRAMP6 Metal Transporter Contributes to Cadmium Toxicity. *Biochemical Journal*, 422, 217-228.
- Callahan, D.L., Baker, A.J.M., Kolev, S.D. ve Wedd, A.G., 2006. Metal Ion Ligands in Hyperaccumulating Plants. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11, 2-12.
- Chaney, R.L., Angle, J.S., McIntosh, M.S., Reeves, R.D., Li, Y.M., Brewer, E.P., Chen, K.Y., Roseberg, R.J., Perner, H. ve Synkowski, E.C., 2005. Using Hyperaccumulator Plants to Phytoextract Soil Ni and Cd. *Zeitschrift Naturforschung*, 60, 190-198.
- Cherian, S. ve Oliveira, M., 2005. Transgenic Plants in Phytoremediation: Recent Advances and New Possibilities. *Environmental Science and Technology*, 39, 9377-9390.
- Chyan, C.L., Lee, T.T., Liu, C.P., Yang, Y.C., Tzen, J.T. ve Chou, W.M., 2005. Cloning and Expression of A Seed-Specific Metallothionein-Like Protein from Sesame. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 69, 2319-2325.
- Clemens, S., Kim, E.J., Neumann, D. ve Schroeder, J.L., 1999. Tolerance to Toxic Metals by A Gene Family of Phytochelatin Synthases from Plants and Yeast. *EMBO Journal*, 18, 3325-3333.
- Clemens, S., Palmgren, M.G. ve Kramer, U., 2002. A Long Way Ahead: Understanding and Engineering Plant

- Metal Accumulation. Trends in Plant Science, 7, 309-315.
- Clemens, S., 2006. Toxic Metal Accumulation, Responses to Exposure and Mechanisms of Tolerance in Plants. Biochimie, 88, 1707-1719.
- Cobbett, C.S., 2000. Phytochelatins and Their Role in Heavy Metal Detoxification. Plant Physiology, 123, 825-832.
- Cobbett, C.S. ve Golsbrough, P., 2002. Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metals Detoxification and Homeostasis. Annual Reviews of Plant Biology, 53, 159-182.
- Connolly, E.L., Fett, J.P. ve Guerinot, M.L., 2002. Expression of the IRT1 Metal Transporter is Controlled by Metals at the Levels of Transcript and Protein Accumulation. Plant Cell, 14, 1347-1357.
- Courbot, M., Willems, G., Motte, P., Arvidsson, S., Roosens, N., Saumitou-Laprade, P. ve Verbruggen, N., 2007. A Major Quantitative Trait Locus for Cadmium Tolerance in *Arabidopsis halleri* Colocalizes with HMA4, A Gene Encoding a Heavy Metal ATPase. Plant Physiology, 144, 1052-1065.
- Czakó, M., Feng, X., He, Y., Liang, D. ve Márton, L., 2006. Transgenic *Spartina alterniflora* for Phytoremediation. Environmental Geochemistry and Health, 28, 103-110.
- Delhaize, E., Gruber, B.D. ve Ryan, P.R., 2007. The Roles of Organic Anion Permeases in Aluminium Resistance and Mineral Nutrition. FEBS Letters, 581, 2255-2262.
- Desbrosses-Fonrouge, A.G., Voigt, K., Schroder, A., Arrivault, S., Thomine, S. ve Kramer, U., 2005. *Arabidopsis thaliana* MTP1 is A Zn Transporter in the Vacuolar Membrane which Mediates Zn Detoxification and Drives Leaf Zn Accumulation. FEBS Letters, 579, 4165-4174.
- Dhankher, O.P., Li, Y., Rosen, B.P., Shi, J. ve Harden, P.N., 2002. Engineering Tolerance and Hyperaccumulation of Arsenic in Plants by Combining Arsenate Reductase and Gamma-Glutamylcysteine Synthetase Expression. Nature Biotechnology, 20, 1094-1095.
- Dräger, D.B., Desbrosses-Fonrouge, A.G., Krach, C., Chardonnens, A.N., Meyer, R.C., Saumitou-Laprade, P. ve Krämer, U., 2004. Two Genes Encoding *Arabidopsis halleri* MTP1 Metal Transport Proteins Co-segregate With Zinc Tolerance and Account for High MTP1 Transcript Levels. The Plant Journal, 39, 425-439.
- Durrett, T.P., Gassmann, W. ve Rogers, E.E., 2007. The FRD3-Mediated Efflux of Citrate into the Root Vasculature is Necessary for Efficient Iron Translocation. Plant Physiology, 144, 197-205.
- Dushenkov, V., Kumar, P.B.A.N., Motto, H. ve Raskin, I., 1995. Rhizofiltration: The Use of Plants to Remove Heavy Metals from Aqueous Streams. Environmental Science and Technology, 29, 1239-1245.
- Dushenkov, V. ve Kapulnik, Y., 2000. Phytofiltration of metals. In: Raskin, I. ve Ensley, B.D. (eds.). Phytoremediation of Toxic Metals - Using Plants to Clean-up The Environment. Wiley, New York, pp. 89-106.
- Dushenkov, V., Skarzhinskaya, M., Glimelius, K., Gleba, D. ve Raskin, I., 2002. Bioengineering of a Phytoremediation Plant by Means of Somatic Hybridization. International Journal of Phytoremediation, 4, 117-126.
- Dushenkov, D., 2003. Trends in Phytoremediation of Radionuclides. Plant and Soil, 249, 167-175.
- Eapen, S. ve Dsouza, S.F., 2005. Prospects of Genetic Engineering of Plants for Phytoremediation of Toxic Metals. Biotechnology Advances, 23, 97-114.
- Ellis, D.R. ve Salt, D.E., 2003. Plants, Selenium and Human Health. Current Opinion in Plant Biology, 6, 273-279.
- Ellis, D.R., Sors, T.G., Brunk, D.G., Albrecht, C., Orser, C., Lahner, B., Wood, K.V., Harris, H.H., Pickering I.J. ve Salt, D.E., 2004. Production of Semethylselenocysteine in Transgenic Plants Expressing Selenocysteine Methyltransferase. BMC Plant Biology, 4, 1-11.
- Eren, E. ve Arguello, J.M., 2004. *Arabidopsis* HMA2, A Divalent Heavy Metal-Transporting PIB-type ATPase, is Involved in Cytoplasmic Zn²⁺ Homeostasis. Plant Physiology, 136, 3712-3723.
- Evangelou, M.W.H., Ebel, M. ve Schaeffer, A., 2007. Chelate Assisted Phytoextraction of Heavy Metals from Soil: Effect, Mechanism, Toxicity and Fate of Chelating Agents. Chemosphere, 68, 989-1003.
- Foyer, C.H. ve Noctor, G., 2005. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A metabolic Interface Between Stress Perception and Physiological Responses. The Plant Cell, 17, 1866-1875.
- Freeman, J.L. ve Salt, D.E., 2007. The Metal Tolerance Profile of *Thlaspi goesingense* is Mimicked in *Arabidopsis thaliana* Heterologously Expressing Eerine Acetyltransferase. BMC Plant Biology, 7, 63.
- Gasic, K. ve Korban, S.S., 2007. Expression of *Arabidopsis* Phytochelatin Synthase in Indian Mustard (*Brassica juncea*) Plants Enhances Tolerance for Cd and Zn. Planta, 25, 1277-1285.
- Ghosh, M. ve Singh, S.P., 2005. A Review on Phytoremediation of Heavy Metals and Utilization of its Byproducts. Applied Ecology and Environmental

- Research, 3, 1-18.
- Gisbert, C., Ros, R., de Haro, A., Walker, D.J., Bernal, M.P., Serrano, R. ve Navarro-Avino, J., 2003. A Plant Genetically Modified That Accumulates Pb is Especially Promising for Phytoremediation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 303, 440-445.
- Glass, D.J., 2000. The 2000 Phytoremediation Industry. Glass Associates, Needham, MA.
- Gleba, D., Borisjuk, N.V., Borisjuk, L.G., Kneer, R., Poulev, A., Skarzhinskaya, M., Dushenkov, S., Logendra, S., Gleba, Y.Y. ve Raskin, I., 1999. Use of Plant Roots for Phytoremediation and Molecular Farming. *Proceedings of The National Academy of Science USA*, 96, 5973-5977.
- Gong, J., Lee, D.A. ve Schroeder, J.I., 2003. Long-Distance Root-to-Shoot Transport of Phytochelatins and Cadmium in *Arabidopsis*. *Proceedings of The National Academy of Science USA*, 100, 10118-10123.
- Grispen, V.M.J., Irtelli, B., Hakvoort, H.W.J., Vooijs, R., Bliet, T., ten Bookum, W.M., Verkleij, J.A.C. ve Schat, H., 2009. Expression of the *Arabidopsis* Metallothionein 2b Enhances Arsenite Sensitivity and Root to Shoot Translocation in Tobacco. *Environmental and Experimental Botany*, 66, 69-73.
- Grispen, V.M.J., Hakvoort, H.V.J., Bliet, T., Verkleij, J.A.C. ve Schat, H., 2011. Combined Expression of the *Arabidopsis* Metallothionein MT2b and the Heavy Metal Transporting ATPase HMA4 Enhances Cadmium Tolerance and the Root to Shoot Translocation of Cadmium and Zinc in Tobacco. *Environmental and Experimental Botany*, 72, 71-76.
- Guerinot, M.L., 2000. The ZIP Family of Metal Transporters. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1465, 190-198.
- Guo, W.-J., Bundithya, W. ve Goldsbrough, P.B., 2003. Characterization of the *Arabidopsis* Metallothionein Gene Family: Tissue-Specific Expression and Induction During Senescence and in Response to Copper. *New Phytologist*, 159, 369-381.
- Guo, J.B., Dai, X.J., Xu, W.Z. ve Ma, M., 2008. Overexpression of GSH1 and AsPCS1 Simultaneously Increase the Tolerance and Accumulation of Cadmium and Arsenic in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere*, 72, 1020-1026.
- Halim, M., Conte, P. ve Piccolo, A., 2003. Potential Availability of Heavy Metals to Phytoextraction from Contaminated Soils I by Exogenous Humic Substances. *Chemosphere*, 52, 265.
- Hannink, N., Roser S.J., French, C.E., Basran, A., Murray, J.A.H. Nicklin, S. ve Bruce, N.C., 2001. Phytoremediation of TNT by Transgenic Plants Expressing A Bacterial Nitroreductase. *Nature Biotechnology*, 19, 1108-1172.
- Hesegawa, I., Terada, E., Sunairi, M., Wakita, H., Shinmachi, F., Noguchi, A., Nakajima, M. ve 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.
- Hassinen, V.H., Tuomainen, M., Peraniemi, S., Schat, H., Karenlampi, S.O. ve Tervahauta, A.I., 2009. Metallothioneins 2 and 3 Contribute to the Metal-Adapted Phenotype but are not Directly Linked to Zn Accumulation in the Metal Hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany*, 60, 187-196.
- Heaton, A.C.P., Rugh, C.L., Kim, T., Wang, N.J. ve Meagher, R.B., 2003. Toward Detoxifying Mercury-Polluted Aquatic Sediments with Rice Genetically Engineered for Mercury Resistance. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 2940-2947.
- Hernandez-Allica, J., Barrutia, O., Becerril, J.M. ve Garbisu, C., 2003. EDTA Reduces the Physiological Damage of Lead on Cardoon Plants Grown Hydroponically. *Journal of Physics IV*, 107, 613-616.
- Hirschi, K.D., Korenkov, V.D., Wilganowski, N.L. ve Wagner, G.J., 2000. Expression of *Arabidopsis* CAX2 in Tobacco. Altered Metal Accumulation and Increased Manganese Tolerance. *Plant Physiology*, 124, 125-133.
- Hsieh, H.M., Liu, W.K. ve Huang, P.C., 1995. A Novel Stress-Inducible Metallothionein-Like Gene from Rice. *Plant Molecular Biology*, 28, 381-389.
- Hsieh, J.L., Chen, C.Y., Chiu, M.H., Chein, M.F., Chang, J.S., Endo, G. ve Huang, C.C., 2009. Expressing a Bacterial Mercuric Ion Binding Protein in Plant for Phytoremediation of Heavy Metals. *Journal of Hazardous Materials*, 161, 920-925.
- Huang, J.W., Chen, J., Berti, W.R. ve Cunningham, S.D., 1997. Phytoremediation of Lead Contaminated Soil: Role of Synthetic Chelates in Lead Phytoextraction. *Environmental Science and Technology*, 31, 800-805.
- Hudspeth, R.L., Hobbs, S.L., Anderson, D.M., Rajasekaran, K. ve Gula, J.W., 1996. Characterization and Expression of Metallothionein-Like Genes in Cotton. *Plant Molecular Biology*, 31, 701-705.
- Hussain, D., Haydon, M.J., Wang, Y., Wong, E., Sherson, S.M., Young, J., Camakaris, J., Harper, J.F. ve Cobbett, C.S., 2004. P-type ATPase Heavy Metal Transporters with Roles in Essential Zinc Homeostasis in

- Arabidopsis*. Plant Cell, 16, 1327-1339.
- Iglesia-Turino, S., Febrero, A., Jauregui, O., Caldelas, C., Araus, J.L. ve Bort, J., 2006. Detection and Quantification of Unbound Phytochelatin 2 in Plant Extracts of *Brassica napus* Grown with Different Levels of Mercury. Plant Physiology, 142, 742-749.
- Ingle, R.A., Mugford, S.T., Rees, J.D., Campbell, M.M. ve Smith, J.A.C., 2005. Constitutively High Expression of the Histidine Biosynthetic Pathway Contributes to Nickel Tolerance in Hyperaccumulator Plants. The Plant Cell, 17, 2089-2106.
- Jabeen, R., Ahmad, A. ve Iqbal, M., 2009. Phytoremediation of Heavy Metals: Physiological and Molecular Mechanisms. Botanical Reviews, 75, 339-364.
- Jack, E., Hakvoort, H.W.J., Reumer, A., Verkleij, J.A.C., Schat, H. ve Ernst, W.H.O., 2007. Real-Time PCR Analysis of Metallothionein-2b Expression in Metallicolous and Non-Metallicolous Populations of *Silene vulgaris* (Moench) Garcke. Environmental and Experimental Botany, 59, 84-91.
- Karenlampi, S., Schat, H., Vangronsveld, J., Verkleij, J.A.C., van der Lelie, D., Mergeay, M. ve Tervahauta, A.I., 2000. Genetic Engineering in the Improvement of Plants for Phytoremediation of Metal Polluted Soils. Environmental Pollution, 107, 225-231.
- Kassis, E., Cathala, N., Rouached, H. ve Rouger, F., 2007. Characterization of a Selenate-Resistant *Arabidopsis* Mutant. Root Growth as a Potential Target for Selenate Toxicity. Plant Physiology, 143, 1231-1241.
- Kerkeb, L. ve Krämer, U., 2003. The Role of Free Histidine in Xylem Loading of Nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*. Plant Physiology, 131, 716-724.
- Kim, D.Y., Bovet, L., Kushnir, S., Noh, E.W., Martinoia, E. ve Lee, Y., 2006. AtATM3 Is Involved in Heavy Metal Resistance in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 140, 922-932.
- Klein, M.A., Sekimoto, H., Milner, M.J. ve Kochian, L.V., 2008. Investigation of Heavy Metal Hyperaccumulation at the Cellular Level: Development and Characterization of *Thlaspi caerulescens* Suspension Cell Lines. Plant Physiology, 147, 2006-2016.
- Kobae, Y., Uemura, T., Sato, M.H., Ohnishi, M., Mimura, T., Nakagawa, T. ve Maeshima, M., 2004. Zinc Transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is Localized to Vacuolar Membranes and Implicated in Zinc Homeostasis. Plant Cell Physiology, 45, 1749-1758.
- Korenkov, V., Park, S.H., Cheng, N.H., Sreevidya, C., Lachmansingh, J., Morris, J., Hirschi, K. ve Wagner G.J., 2007. Enhanced Cd²⁺ Selective Root-Tonoplast-Transport in Tobaccos Expressing *Arabidopsis* Cation Exchangers. Planta, 225, 403-411.
- Krämer, U., Talke, I. ve Hanikenne, M., 2007. Transition Metal Transport. FEBS Letters, 581, 2263-2272.
- Küpper, H. ve Kochian, L.V., 2010. Transcriptional Regulation of Metal Transport Genes and Mineral Nutrition During Acclimatization to Cadmium and Zinc in the Cd/Zn Hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens* (Ganges Population), New Phytologist, 185, 114-129.
- Lahner, B., Gong, J., Mahmoudian, M., Smith, E.L., Abid, K.B., Rogers, E.E., Guerinot, M.L., Harper, J.F., Ward, J.M., McIntyre, L., Schroeder, J.I. ve Salt, D.E., 2003. Genomic Scale Profiling of Nutrient and Trace Elements in *Arabidopsis thaliana*. Nature Biotechnology, 21, 1215-1221.
- Lanquar, V., Lelievre, F., Barbier-Brygoo, H. ve Thomine, S., 2004. Regulation and Function of AtNRAMP4 Metal Transporter Protein. Soil Science and Plant Nutrition, 50, 1141-1150.
- Lebaudy, A., Vavasseur, A., Hosy, E. ve Hecker, K., 2008. Plant Adaptation to Fluctuating Environment and Biomass Production are Strongly Dependent on Guard Cell Potassium Channels. PNAS, 105, 5271-5276.
- LeDuc, D.L., AbdelSamie, M., Montes-Bayon, M. ve Wenton, L.M., 2006. Overexpressing both ATP Sulfurylase and Selenocysteine Methyltransferase Enhances Selenium Phytoremediation Traits in Indian Mustard. Environmental Pollution, 144, 70-76.
- Lee, S., Moon, J.S., Ko, T.S., Petros, D., Goldsbrough, P.B. ve Korban, S.S., 2003. Overexpression of *Arabidopsis* Phytochelatin Synthase Paradoxically Leads to Hypersensitivity to Cadmium Stress. Plant Physiology, 131, 656-663.
- Lee, J., Shim, D., Song, W.Y., Hwang, I. ve Lee, Y., 2004. *Arabidopsis* Metallothioneins 2a and 3 Enhance Resistance to Cadmium When Expressed in *Vicia faba* Guard Cells. Plant Molecular Biology, 54, 805-815.
- Lee, M. ve Yang, M., 2010. Rhizofiltration Using Sunflower (*Helianthus annuus* L.) and Bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. vulgaris) to Remediate Uranium Contaminated Groundwater, Journal of Hazardous Materials, 173, 589-596.
- Li, T.Q., Yang, X.E. ve Long, X.X., 2004. Potential of Using *Sedum alfredii* Hance for Phytoremediating Multi-Metal Contaminated Soils. Journal of Soil and Water Conservation, 18, 79-83.

- Li, J., Guo, J., Xu, W. ve Ma, M., 2006. Enhanced Cadmium Accumulation in Transgenic Tobacco Expressing the Phytochelatin Synthase Gene of *Cynodon dactylon* L. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48, 928-937.
- Lindblom, S.D., Abdel-Ghany, S., Hanson, B.R. ve Wenter, M.K., 2006. Constitutive Expression of a High-Affinity Sulfate Transporter in Indian Mustard Affects Metal Tolerance and Accumulation. *Journal of Environmental Quality*, 35, 726-733.
- Liu, G.S., Sanchez-Fernandez, R., Li, Z.S. ve Rea, P.A., 2001. Enhanced Multispecificity of *Arabidopsis* Vacuolar Multidrug Resistance-Associated Protein-Type ATP-Binding Cassette Transporter, AtMRP2. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 8648-8656.
- Long, X.X., Yang, X.E. ve Ni, W.Z., 2002. Current Status and Perspective on Phytoremediation of Heavy Metal Polluted Soils. *Journal of Applied Ecology*, 13, 757-762.
- Lotte, V.N., Jan, M., Koen, O. ve Kris, V., 2007. Phytoextraction of Metals From Soils: How Far from Practice? *Environmental Pollution*, 150, 34-40.
- Lovely, D.R., 1993. Dissimilatory Metal Reduction. *Annual Reviews of Microbiology*, 47, 263-290.
- Lu, Y.P., Li, R.S. ve Rea, P.A., 1997. AtMRP1 Gene of *Arabidopsis* Encodes a Glutathione S-Conjugate Pump: Isolation and Functional Definition of a Plant ATP Binding Cassette Transporter Gene. *Proceedings of The National Academy of Science USA*, 94, 8243-8248.
- Luo, C.L., Shen, Z.G. ve Li, X.D., 2008. Plant Uptake and Leaching of Metals During the Hot EDDS-Enhanced Phytoextraction Process. *International Journal of Phytoremediation*, 9, 181-196.
- Lyyra, S., Meagher, R.B., Kim, T., Heaton, A., Montello, P. ve Balish, R.S., 2007. Coupling Two Mercury Resistance Genes in Eastern Cottonwood Enhances the Processing of Organomercury. *Plant Biotechnology Journal*, 5, 254-262.
- Macek, T., Macková, M., Pavlíková, D., Száková, J., Truksa, M. ve Cundy, A., 2002. Accumulation of Cadmium by Transgenic Tobacco. *Acta Biotechnology*, 22, 101-106.
- Martínez, M., Bernal, P., Almela, C., Vélez, D., García-Agustín, P. ve Serrano, R., 2006. An Engineered Plant That Accumulates Higher Levels of Heavy Metals than *Thlaspi caerulescens*, with Yields of 100 Times more Biomass in Mine Soils. *Chemosphere*, 64, 478-485.
- Meagher, R.B., Rugh, C.L., Kandasamy, M.K., Gragson, G. ve Wang, G., 2000. Engineered Phytoremediation of Mercury Pollution in Soil and Water Using Bacterial Genes. In: Terry, N. ve Banuelos, G. (eds.). *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Lewis, Boca Raton, pp. 201-219.
- Meers, E., Ruttens, A., Hopgood, M.J., Samson, D. ve Tack, F.M., 2005. Comparison of EDTA and EDDS as Potential Soil Amendments for Enhanced Phytoextraction of Heavy Metals. *Chemosphere*, 58, 1011-1022.
- Meers, E., Tack, F.M. ve Verloo, M.G., 2008. Degradability of Ethylenediaminedisuccinic Acid (EDDS) in Metal Contaminated Soils: Implications for Its Use Soil Remediation. *Chemosphere*, 70, 358-363.
- Mejare, M. ve Bulow, L., 2001. Metal-Binding Proteins and Peptides in Bioremediation and Phytoremediation of Heavy Metals. *Trends in Biotechnology*, 19, 67-73.
- Mendoza-Cózatl, D.G., Butko, E., Springer, F. ve Harper, L., 2008. Identification of High Levels of Phytochelatins, Glutathione and Cadmium in the Phloem Sap of *Brassica napus*. A Role for Thiol-Peptides in the Long-Distance Transport of Cadmium and the Effect of Cadmium on Iron Translocation. *Plant Journal*, 54, 249-259.
- Mengoni, A., Gonnelli, C., Hakvoort, H.W.J., Galardi, F., Bazzicalupo, M., Gabbriellini, R. ve Schat, H., 2003. Evolution of Copper-Tolerance and Increased Expression of a 2b-Type Metallothionein Gene in *Silene paradoxa* L. Populations. *Plant and Soil*, 257, 451-457.
- Merrifield, M.E., Ngu, T. ve Stillman, M.J., 2004. Arsenic Binding to *Fucus vesiculosus* Metallothionein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324, 127-132.
- Meyers, B., Zaitsman, A., Lacroix, B., Kozlovsky, S.V. ve Krichevsky, A., 2010. Nuclear and Plastid Genetic Engineering of Plants: Comparison of Opportunities and Challenges. *Biotechnology Advances*, 6, 747-756.
- Mills, R.F., Francini, A., da Rocha, P.S.C.F., Baccarini, P.J., Aylett, M., Krijger, G.C. ve Williams, L.E., 2005. The Plant P-1B-Type ATPase AtHMA4 Transports Zn and Cd and Plays a Role in Detoxification of Transition Metals Supplied at Elevated Levels. *FEBS Letters*, 579, 783-791.
- Milner, M.J. ve Kochian, L.V., 2008. Investigating Heavy-Metal Hyperaccumulation Using *Thlaspi caerulescens* as a Model System. *Annals of Botany*, 102, 3-13.
- Montanini, B., Blaudez, D., Jeandroz, S., Sanders, D. ve Chalot, M., 2007. Phylogenetic and Functional Analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) Family: Improved Signature and Prediction of

- Substrate Specificity. *BMC Genomics*, 8, 107-123.
- Navari-Izzo, F. ve Quartacci, M.F., 2001. Phytoremediation of Metals. Tolerance Mechanism Against Oxidative Stress. *Mineral Biotechnology*, 13, 73-83.
- Newman, L.A. ve Reynolds, C.M., 2004. Phytodegradation of Organic Compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 225-230.
- Noctor, G., Gomez, L., Vanacker, H. ve Foyer, C.H., 2002. Interactions between Biosynthesis, Compartmentation and Transport in the Control of Glutathione Homeostasis and Signalling. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1283-1304.
- Oomen, R.J.F.J., Wu, J., Lelièvre, F., Blanchet, S., Richaud, P., Barbier-Brygoo, H., Aarts, M.G.M. ve Thomine, S., 2008. Functional Characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the Metal Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, 181, 637-650.
- Ortiz, D.F., Kreppel, L., Speiser, D.M., Scheel, G., McDonald, G. ve Ow, D.W., 1992. Heavy Metal Tolerance in the Fission Yeast Requires an ATP Binding Cassette-Type Vacuolar Membrane Transporter. *EMBO Journal*, 11, 3491-3499.
- Ortiz, D.F., Kreppel, L. ve Spaser, D.M., 1995. Transport of Metal Binding Peptides by HMT1, a Fission yeast ABC-Type Vacuolar Membrane Protein. *Journal Biological Chemical*, 270, 4721-4727.
- Padmavathamma, P. K. ve Loretta, Y.L., 2007. Phytoremediation Technology: Hyper-accumulation Metals in Plants. *Water Air Soil Pollution*, 184, 105-126.
- Papoyan, A. ve Kochian, L.V., 2004. Identification of *Thlaspi caerulescens* Genes that May be Involved in Heavy Metal Hyperaccumulation and Tolerance. Characterization of a Novel Heavy Metal Transporting ATPase. *Plant Physiology*, 136, 3814-3823.
- Pal, R. ve Rai, J.P.N., 2010. Phytochelatin: Peptides Involved in Heavy Metal Detoxification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160, 945-963.
- Pan, A., Yang, M., Tie, F., Li, L., Chen, Z. ve Ru, B., 1994. Expression of Mouse Metallothionein-I-Gene Confers Cadmium Resistance in Transgenic Tobacco Plants. *Plant Molecular Biology*, 24, 341-351.
- Pavlíková, D., Macek, T., MacKová, M., Száková, J., Balík, J., 2004. Cadmium Tolerance and Accumulation in Transgenic Tobacco Plants with a Yeast Metallothionein Combined with a Polyhistidine Tail. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 54, 233-237.
- Pence, N.S., Larsen, P.B., Ebbs, S.D., Letham, D.B.L., Lasat, M.M., Garvin, D.F., Eide, D. ve Kochian, L.V., 2000. The Molecular Physiology of Heavy Metal Transport in the Zn/Cd Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97, 4956-4960.
- Persans, M.W., Nieman, K. ve Salt, D.E., 2001. Functional Activity and Role of Cation-Efflux Family Members in Ni Hyperaccumulation in *Thlaspi goesingense*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98, 9995-10000.
- Peterson, A.G. ve Oliver, D.J., 2006. Leaf-Targeted Phytochelatin Synthase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, 885-892.
- Petra, K., Juan, B., Pilar Bernal, M., Flavia, N., Charlotte, P., Stefan, S., Rafael, C. ve Carmela, M., 2009. Trace Element Behaviour at the Root-Soil Interface. Implications in Phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany*, 67, 243-259.
- Picault, N., Cazale, A.C., Beyly, A., Cuine, S., Carrier, P., Luu, D.T., Forestier, C. ve Peltier, G., 2006. Chloroplast Targeting of Phytochelatin Synthase in *Arabidopsis*: Effects on Heavy Metal Tolerance and Accumulation. *Biochimie*, 88, 1743-1750.
- Pilon-Smits, E. ve Pilon, M., 2002. Phytoremediation of Metals Using Transgenic Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21, 439-456.
- Pilon-Smits, E., 2005. Phytoremediation. *Annual Reviews of Plant Biology*, 56, 15-39.
- Pomponi, M., Censi, V., Di Girolamo, V., De Paolis, A., di Toppi, L.S. ve Aromolo, R., 2006. Overexpression of *Arabidopsis* Phytochelatin Synthase in Tobacco Plants Enhances Cd²⁺ Tolerance and Accumulation but not Translocation to the Shoot. *Planta*, 223, 180-190.
- Prasad, M.N.V., 2003. Metal Hyperaccumulators in Plants-Biodiversity Prospecting for Phytoremediation Technology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6, 276-312.
- Pulford, I.D. ve Watson, C., 2003. Phytoremediation of Heavy Metal-Contaminated Land by Trees: A Review. *Environment International*, 29, 529-540.
- Ramos, J., Clemente, M.R., Naya, L. ve Commer, P., 2007. Phytochelatin Synthases of the Model Legume *Lotus japonicus*. A Small Multigene Family With Different Responses to Cadmium and Alternatively Spiced Variants. *Plant Physiology*, 143, 1110-1118.
- Rascio, N. ve Navari-Izzo, F., 2011. Heavy Metal Hyperaccumulating Plants: How and Why do They do it? And What Makes them so Interesting? *Plant Science*, 180, 169-181.

- Raskin, I., Smith, R.D. ve Salt, D.E., 1997. Phytoremediation of Metals: Using Plants to Remove Pollutants From the Environment. *Current Opinion in Biotechnology*, 8, 221-226.
- Raskin, I. ve Ensley, D.E., 2000. Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment. Wiley, New York, pp. 352.
- Rauser, W.E., 1995. Phytochelatins and Related Peptides. Structure, Biosynthesis and Function. *Plant Physiology*, 109, 1141-1149.
- Rea, P.A., Li, Y.-P., Drozdowicz, Y.M. ve Martinoia, E., 1998. From Vacuolar GS-X Pumps to Multispecific ABC Transporters. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 727-760
- Rea, P.A., 2007. Plant ATP-Binding Cassette Transporters. *Annual Reviews of Plant Biology*, 58, 347-375.
- Reeves, R.D., 2006. Hyperaccumulation of Trace Elements by Plants. In: Morel, J.L., Echevarria, G. ve Goncharova, N. (Eds.). *Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils*, NATO Science Series: IV: Earth and Environmental Sciences, Springer, NY, pp. 1-25.
- Reisinger, S., Schiavon, M., Terry, N. ve Pilon-Smits, E.A.H., 2008. Heavy Metal Tolerance and Accumulation in Indian Mustard (*Brassica juncea* L.) Expressing Bacterial γ -Glutamylcysteine Synthetase or Glutathione Synthetase. *International Journal of Phytoremediation*, 10, 440-454.
- Rizzi, L., Petruzzelli, G., Poggio, G. ve Vigna Guidi, G., 2004. Soil Physical Changes and Plant Availability of Zn and Pb in a Treatability Test of Phytostabilization. *Chemosphere*, 57, 1039-1046.
- Rugh, C.L., Wilde, H.D., Stacks, N.M., Thompson, D.M., Summers, A.O. ve Meagher, R.B., 1996. Mercuric Ion Reduction and Resistance in Transgenic *Arabidopsis thaliana* Plants Expressing a Modified Bacterial *merA* Gene. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA*, 93, 3182-3187.
- Ruiz, O.N., Hussein, H.S., Terry, N. ve Daniell, H., 2003. Phytoremediation of Organomercurials via the Chloroplast Genetic Engineering. *Plant Physiology*, 132, 1344-1352.
- Ruiz, O.N., Alvarez, D., Torres, C., Roman, L. ve Daniell, H. 2011. Metallothionein Expression in Chloroplasts Enhances Mercury Accumulation and Phytoremediation Capability. *Plant Biotechnology Journal*, 9, 609-617.
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar Nanda, P.B.A., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I. ve Raskin, I., 1995. Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals From the Environment Using Plants. *Bio/Technology*, 13, 468-474.
- Salt, D.E. ve Rauser, W.E., 1995. MgATP-Dependent Transport of Phytochelatins Across the Tonoplast of Oat Roots. *Plant Physiology*, 107, 1293-1301.
- Salt, D.E. ve Krämer, U., 2000. Mechanisms of Metal Hyperaccumulation in Plants. In: Raskin, I. ve Ensley, B.D. (eds.). *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean-up the Environment*. Wiley, New York, pp. 231-246.
- Salt, D.E., 2004. Update on Plant Ionomics. *Plant Physiology*, 136, 2451-2456.
- Samarghandi, M.R., Nouri, J., Mesdaghinia, A.R., Mahvi, A.H., Nasser, S. ve Vaezi, F., 2007. Efficiency Removal of Phenol, Lead and Cadmium by Means of UV/TiO₂/H₂O₂ Processes. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 4, 19-25.
- Schor-Fumbarov, T., Goldsbrough, P.B., Adam, Z. ve Tel-Or, E., 2005. Characterization and Expression of a Metallothionein Gene in the Aquatic Fern *Azolla filiculoides* under Heavy Metal Stress. *Planta*, 223, 69-76.
- Schützendübel, A. ve Polle, A., 2002. Plant Responses to Abiotic Stresses: Heavy Metal-Induced Oxidative Stress and Protection by Mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1351-1365.
- Shi, W.-Y., Shao, H.B., Li, H., Shao, M.A. ve Du, S., 2009. Co-Remediation of the Lead Polluted Garden Soil by Exogenous Natural Zeolite and Humic Acids. *Journal of Hazardous Materials*, 167, 136-140.
- Silver, S. ve Phung, L., 2005. A Bacterial View of the Periodic Table: Genes and Proteins for Toxic Inorganic Ions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32, 587-605.
- Singh, O.V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R. ve Jain, R.K., 2003. Phytoremediation: An Overview of Metallic Ion Decontamination from Soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 405-412.
- Song, W.-Y., Martinoia, E., Lee, J., Kim, D., Kim, D.-Y., Vogt, E., Shim, D., Choi, K.S., Hwang, I. ve Lee, Y., 2004. A Novel Family of Cys-Rich Membrane Proteins Mediates Cadmium Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 135, 1027-1039.
- Song, W.-Y., Park, J., Mendoza-Cozatl, D.G., Suter-Grotemeyer, M., Shim, D., Hortensteiner, S., Geisler, M., Weder, B., Rea, P.A. ve Rentsch, D., 2010. Arsenic Tolerance in *Arabidopsis* is Mediated by two ABCC-Type Phytochelatin Transporters. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA*, 107, 21187-21192.
- Sun, R.L. ve Zhou, Q.X., 2005. Heavy Metal Tolerance and Hyperaccumulation of Higher Plants and Their

- Molecular Mechanisms. *Acta Phytoecologica Sinica*, 19, 321-332.
- Sun, Q., Ye, Z.H., Wang, X.R. ve Wong, M.H., 2007. Cadmium Hyperaccumulation Leads to an Increase of Glutathione Rather than Phytochelatins in the Cadmium Hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Journal of Plant Physiology*, 164, 1489-1498.
- Talke, I., Hanikenne, M. ve Krämer, U., 2006. Zinc Dependent Global Transcriptional Control, Transcriptional De-regulation and Higher Gene Copy Number for Genes in Metal Homeostasis of the Hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology*, 142, 148-167.
- Tandy, S., Schulin, R. ve Nowack, B., 2006. The Influence of EDDS on the Uptake of Heavy Metals in Hydroponically Grown Sunflowers. *Chemosphere*, 62, 1454-1463.
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M. ve Schroeder, J.I., 2000. Cadmium and Iron Transport by Members of a Plant Metal Transporter Family in *Arabidopsis* with Homology to *Nramp* Genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97, 4991-4996.
- Tong, Y.P., Kneer, R. ve Zhu, Y.G., 2004. Vacuolar Compartmentalization: A Second-Generation Approach to Engineering Plants for Phytoremediation. *Trends in Plant Science*, 9, 7-9.
- van de Mortel, J.E., Villanueva, L.A., Schat, H., Kwekkeboom, J., Coughlan, S., Moerland, P.D., Ver Loren van Themaat, E., Koornneef, M. ve Aarts, M.G.M., 2006. Large Expression Differences in Genes for Iron and Zinc Homeostasis, Stress Response, and Lignin Biosynthesis Distinguish Roots of *Arabidopsis thaliana* and the Related Metal Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology*, 142, 1127-1147.
- Van der Zaal, B.J., Neuteboom, L.W., Pinas, J.E., Chardonnens, A.N., Schat, H., Verkleij, J.A.C. ve Hooykaas, P.J.J., 1999. Overexpression of a Novel *Arabidopsis* Gene Related to Putative Zinc-Transporter Genes from Animals can Lead to Enhanced Zinc Resistance and Accumulation. *Plant Physiology*, 119, 1047-1055.
- Verret, G.A., Briat, J.F. ve Curie, C., 2003. Dual Regulation of the *Arabidopsis* High-Affinity Root Iron Uptake System by Long-Distance Signals. *Plant Physiology*, 132, 796-804.
- Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Leohardt, N., David, P., Nussaume, L., Vavasseur, A. ve Richaud, P., 2004. Overexpression of AtHMA4 Enhances Root-to-Shoot Translocation of Zinc and Cadmium and Plant Metal Tolerance. *FEBS Letters*, 576, 306-312.
- Verret, F., Gravot, A., Auroy, P., Preveral, S., Forestier, C., Vavasseur, A. ve Richaud, P., 2005. Heavy Metal Transport by AtHMA4 Involves the N-Terminal Degenerated Metal Binding Domain and the C-Terminal His(11) Stretch. *FEBS Letters*, 579, 1515-1522.
- Vert, G.A., Grotz, N., Dedaldechamp, F., Guerinot, M.L., Briat, J.F. ve Curie, C., 2002. IRT1, an *Arabidopsis* Transporter Essential for Iron Uptake from the Soil and or Plant Growth. *Plant Cell*, 14, 1223-1233.
- Vestergaard, M., Matsumoto, S., Nishikori, S., Shiraki, K. ve Hirata, K., 2008. Chelation of Cadmium Ions by Phytochelatin Synthase: Role of the Cysteine-Rich C-Terminal. *Anal. Sci.*, 24, 277-281.
- Wang, X., Song, Y., Ma, Y., Zhuo, R. ve Jin, L., 2011. Screening of Cd Tolerant Genotypes and Isolation of Metallothionein Genes in Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environmental Pollution*, 159, 3627-3633.
- Wei, W., Chai, T., Zhang, Y., Han, L., Xu, J. ve Guan, Z., 2009. The *Thlaspi caerulescens* NRAMP Homologue TcNRAMP3 is Capable of Divalent Cation Transport. *Molecular Biotechnology*, 41, 15-21.
- Wenger, K., Gupta, S.K., Furrer, G. ve Schulin, R., 2003. The Role of Nitritotriacetate in Copper Uptake by Tobacco. *Journal of Environmental Quality*, 32, 1669-1676.
- Wenzel, W.W., Unterbrunner, R., Sommer, P. ve Pasqualina, S., 2003. Chelate-Assisted Phytoextraction Using Canola (*Brassica napus* L.) in Outdoors Pot and Lysimeter Experiments. *Plant and Soil*, 249, 83-96.
- Williams, L.E., Pittman, J.K. ve Hall, J.L., 2000. Emerging Mechanisms for Heavy Metal Transport in Plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465, 104-126.
- Wojas, S., Clemens, S., Hennig, J., Skodowska, A., Kopera, E., Schat, H., Bal, W. ve Antosiewicz, D.M., 2008. Overexpression of Phytochelatin Synthase in Tobacco: Distinctive Effects of AtPCS1 and CePCS Genes on Plant Response to Cadmium. *Journal of Experimental Botany*, 59, 2205-2219.
- Wong, H.L., Sakamoto, T., Kawasaki, T., Umemura, K. ve Shimamoto, K., 2004. Down-Regulation of Metallothionein, a Reactive Oxygen Scavenger, by the Small GTPase OsRac1 in Rice. *Plant Physiology*, 135, 1447-1456.
- Wu, L.H., Luo, Y.M., Xing, X.R. ve Christie, P., 2004. EDTA-Enhanced Phytoremediation of Heavy Metal Contaminated Soil with Indian Mustard and Associated Potential Leaching Risk. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 102, 307-318.

- Xue, T., Li, X., Zhu, W., Wu, C., Yang, G. ve Zheng, C., 2009. Cotton Metallothionein GhMT3a, a Reactive Oxygen Species Scavenger, Increased Tolerance against Abiotic Stress in Transgenic Tobacco and Teast. *Journal of Experimental Botany*, 60, 339-349.
- Yang, H., Nairn, J. ve Ozias-Akins, P., 2003. Transformation of Peanut Using a Modified Bacterial Mercuric Ion Reductase Gene Driven by an Actin Promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, 160, 945-952.
- Yang, X., Jin, X., Feng, Y. ve Islam, E., 2005. Molecular Mechanisms and Genetic Basis of Heavy Metal Tolerance in Plants. *Journal of Integrative Biology*, 47, 1025-1035.
- Yang, Z., Wu, Y., Li, Y., Ling, H.-Q. ve Chu, C., 2009. OsMT1a, a Type 1 Metallothionein, Plays the Pivotal Role in Zinc Homeostasis and Drought Tolerance in Rice. *Plant Molecular Biology*, 70, 219-229.
- Zaier, H., Ghnaya, T., Rejeb, K.B., Lakhdar, A., Rejeb, S. ve Jemal, F., 2010. Effects of EDTA on Phytoextraction of Heavy Metals (Zn, Mn and Pb) from Sludge-Amended Soil with *Brassica napus*. *Bioresource Technology*, 101, 3978-3983.
- Zhang, Z., Gao, X. ve Qiu, B., 2008. Detection of Phytochelatins in the Hyperaccumulator *Sedum alfredii* Exposed to Cadmium and Lead. *Phytochemistry*, 69, 911-918.
- Zhou, J. M. ve Goldsbrough, P.B., 1995. Structure, Organization and Expression of the Metallothionein Gene Family in *Arabidopsis*. *Molecular and General Genetics*, 248, 318-328.
- Zhu, Y.L., Pilon-Smits, E.A.H., Tarun, A.S., Weber, S.U., Jouanin, L. ve Terry, T., 1999. Cadmium Tolerance and Accumulation in Indian Mustard is Enhanced by Overexpressing γ -Glutamylcysteine Synthetase. *Plant Physiology*, 121, 1169-1177.
- Zimeri, A.M., Dhankher, O.P., McCaig, B. ve Meagher, R.B., 2005. The Plant MT1 Metallothioneins are Stabilized by Binding Cadmiums and are Required for Cadmium Tolerance and Accumulation. *Plant Molecular Biology*, 58, 839-855.