

Transgenik (p-cV-ChMTIIGFP) Tütün Bitkisinin Kurşun Fitoekstraksiyon Kapasitesinin belirlenmesi ve Kurşunun Besin Elementi Alımına EtkisiAbdullah EREN ^{1*}, Hatice DAĞHAN ²¹ Mardin Artuklu Üniversitesi, Kızıltepe Meslek Yüksekokulu, Organik Tarım Bölümü, Mardin² Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü, Eskişehir*Sorumlu yazar (Corresponding author): abdullaheren@artuklu.edu.tr**Geliş Tarihi (Received):** 27.05.2024**Kabul Tarihi (Accepted):** 30.06.2024**Özet**

Bu çalışmada, kurşun (Pb) ile kirlenmiş topraktan transgenik (p-cV-ChMTIIGFP) tütün bitkisinin Pb fitoekstraksiyon kapasitesi ve Pb'nin bitkilerdeki bazı makro ve mikro besin elementleri alımı üzerine etkisini transgenik olmayan SR-1 tütün bitkisiyle karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Artan dozlarda Pb(NO₃)₂ formunda Pb uygulanan toprakta bitkiler kontrollü koşullarda 6 hafta boyunca yetiştirilmiştir. Kurşun uygulamalarının her iki bitkinin Pb içeriğine etkisi istatistiksel olarak % 5 düzeyinde önemli bulunmuştur. En yüksek Pb içeriği (53.2 µg bitki⁻¹) transgenik bitkinin 400 mg kg⁻¹ uygulamasında belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre artan Pb dozlarının her iki bitkide de azot (N), fosfor (P) ve potasyum (K) konsantrasyonlarını kontrol bitkilerine kıyasla azaltıcı etki gösterdiği belirlenmiştir. Toprağa artan dozlarda Pb uygulaması, transgenik ve transgenik olmayan tütün bitkilerinin bakır (Cu) ve çinko (Zn) konsantrasyonlarında kontrol bitkilerine kıyasla artışa neden olmuş ve bulgular istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Kurşun uygulamalarının demir (Fe) ve mangan (Mn) konsantrasyonları üzerindeki etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Transgenik (p-cV-ChMTIIGFP) tütün bitkisinin Pb stresine rağmen toksik belirtiler göstermemesi ve besin elementleri alımında azaltıcı etkisinin ise gübreleme ile desteklenerek akümüülasyon kapasitesinin artırılma potansiyeli bulunduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ağır metal, fitoremediasyon, kurşun (Pb), toprak kirliliği, transgenik, tütün**Determination of Lead Phytoextraction Capacity of Transgenic (p-cV-ChMTIIGFP) Tobacco Plant and Effect of Lead on Nutrient Uptake****Abstract**

This study aimed to assess the lead phytoextraction capacity of transgenic (p-cV-ChMTIIGFP) tobacco plants grown in soil contaminated with lead (Pb), as well as to examine how Pb affects the uptake of macro- and micronutrients by these plants, in comparison with non-transgenic SR-1 tobacco plants. The soil was administered increasing doses of Pb in the form of Pb(NO₃)₂, and the plants were cultivated under controlled conditions for a period of six weeks. The impact of the lead treatments on the Pb content of the plants was found to be statistically significant at the 5% level. The highest Pb content (53.2 µg plant⁻¹) was observed in the 400 mg kg⁻¹ application of the transgenic plant. The results indicated that increasing doses of Pb led to reductions in the concentrations of N, P and K in both plant types in comparison with the control. The application of Pb at increasingly elevated doses to the soil led to a statistically significant elevation in the concentrations of both Cu and Zn in transgenic and non-transgenic tobacco plants, as compared to the concentrations in the control plants. The application of increasing doses of Pb to soil resulted in a statistically significant increase in the concentrations of Cu and Zn in transgenic and non-transgenic tobacco plants, when compared to the concentrations in the control plants. The effect of Pb applications on the concentrations of iron (Fe) and manganese (Mn) was found to be statistically insignificant. It was found that transgenic (p-cV-ChMTIIGFP) tobacco plants did not show toxic symptoms despite Pb stress and the reduction effect on nutrient uptake has the potential to increase the accumulation capacity by supporting fertilization.

Keywords: Heavy metal, phytoremediation, lead (Pb), soil pollution, transgenic, tobacco

1. Giriş

Özellikle sanayi devrimiyle yoğunlaşan antropojenik faaliyetler (endüstri, trafik, maden faaliyetleri, vd) sonucunda topraklar ağır metallere kirlenmeye başlamıştır. Ağır metaller, toprakta bozulmadan kalabilen, yerkabuğunda doğal olarak bulunan, atom numarası 20'den büyük ve yoğunluğu $5,6 \text{ g cm}^{-3}$ 'den daha fazla olan kurşun (Pb), alüminyum (Al), kadmiyum (Cd), krom (Cr), bakır (Cu), civa (Hg), nikel (Ni), çinko (Zn), mangan (Mn) vb. elementlerdir (Dağhan, 2004; Masindi ve ark., 2021; Raychaudhuri ve ark., 2021). Toprakta meydana gelen ağır metal kirliliği sadece verim ve ürün kalitesi üzerinde değil, atmosferik ve sucul çevre kalitesini bozmakta, hatta besin zinciri yoluyla insan sağlığı üzerinde de olumsuz etkiler yaratmaktadır. Kalıcı yapıları nedeniyle ve biyolojik olarak tüketildiklerinde, ağır metaller canlı organizmalar tarafından alınabilmekte ve tekrarlanan tüketimlerle de vücutta biyoakümüle olabilmektedir. Dolayısıyla zamanla tüm besin ağını veya besin zincirini biyolojik olarak bozabilmektedirler. Bu da nihayetinde tüm sistemin kirlenmesine yol açmaktadır (Masindi ve ark., 2021). Amerika Zehirli Maddeler ve Hastalık Kayıt Ajansı (ATSDR)'nin 2 yılda bir yayınladığı insan sağlığına yönelik en önemli potansiyel tehdidi oluşturan Madde Öncelik Listesinde Pb, canlı organizmalar üzerindeki toksik etkileri nedeniyle Arsenik (As)'ten sonra en zehirli ikinci metal olarak yer almıştır (ATSDR, 2024).

Kurşun (Pb), topraklarda doğal olarak bulunan ve jeolojik süreçler sonunda toprağa karışan mavimsi gri renkli, yaygın ve oldukça zehirli bir kirleticidir ve ağırlıklı olarak sülfür (PbS , PbSO_4) veya oksijen (PbCO_3) gibi diğer elementlerle karışmış mineral formda bulunur (Meena ve ark., 2020; Rigoletto ve ark., 2020). Madencilik, tarımda kullanılan pestisit ve gübreler, kurşun bazlı boyalar, kurşunlu benzin kullanımını gibi antropojenik (insan faaliyetleri) kaynaklar sonucunda da tarım topraklarını kirletmektedir (Dotaniya ve

ark., 2020; Egendorf ve ark., 2020; Rahman ve ark., 2024). Kabata-Pendias ve Pendias (2001), toprak yüzeyinde Pb konsantrasyonunun 10 ile 67 mg kg^{-1} arasında değişmekte olduğunu, dünya genelinde ise bu miktarın ortalama 32 mg kg^{-1} olduğunu bildirmişlerdir (Meena ve ark., 2020).

Kirlenmiş toprakların rehabilite edilmesi, çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemlerle mümkündür (Tacıroglu ve ark., 2016; Eren ve Mert, 2017; Jagetiya ve Kumar, 2020). Kirlenmiş bölgenin büyüklüğü ya da maliyet ve güvenlik sorunları nedeniyle geleneksel iyileştirme yöntemlerinin uygulanmadığı koşullarda, fitoremediasyon yöntemlerinden biri olan fitoekstraksiyon yöntemi avantajlı olmaktadır (Jagetiya ve Kumar, 2020). Fitoekstraksiyon, yeşil bitkilerin kirlenmiş sahalarda nispeten düşük maliyet ile verimli bir şekilde dekontamine ettiği bir yöntemdir. Diğer yöntemlere kıyasla genellikle daha ekonomik ve çevre dostu olarak kabul edilir. Bu yöntem estetik açıdan hoş, daha güvenli ve yıkıcı olmayan, ticari kabul edilebilirliğe sahip sürdürülebilir bir teknolojidir (Dağhan, 2007; Jagetiya ve Kumar, 2020). Ancak, bitkilerin yavaş büyümesi, sadece belirli elementleri bitkinin absorbe edebilmesi ve yeşil aksam üretiminin az olması yöntemi kısıtlamaktadır. Gen mühendisliğindeki gelişmelerle bazı yabancı genler bitkilere entegre edilerek bitkinin genetik dönüşümünün sağlanmasıyla bu sınırlamaların bazıları aşılabilir. Bu modifikasyonlarla özellikle daha hızlı büyüeyebilen ve daha fazla yeşil aksam üretebilen bitkilere gen aktarımı sonucunda bitkilerin belirli ağır metal/leri daha etkili bir şekilde absorbe edebilmesi, biriktirdikleri ağır metalleri tolere edebilmeleri sağlanabilir (Dağhan, 2007).

Jagetiya ve Kumar, (2020) tarafından bildirildiğine göre Pb ile kirlenmiş toprakların fitoekstraksiyonunda kullanılan bazı potansiyel bitki türleri arasında Baker ve ark.1(991) tarafından belirlenenen; *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum murale*,

Arabidopsis thaliana, *Thlaspi caerulescens*, *Brassica oleracea* bitkilerinin yanısıra *Brassica juncea* (Kumar ve ark., 2002), *Populus nigra* (Ruttens ve ark., 2011) gibi bitkiler yer almaktadır. Ancak, *Nicotiana tabacum* bitkisi genetik çalışmalarda model bir bitki olarak tercih edilmektedir. Ayrıca, tütün bitkisinin bol yeşil aksamı, hızlı büyüyen, derin köklü bir bitki olması, toprak ve iklim seçiciliğinin olmaması nedeniyle fitoekstraksiyon yöntemi için ideal bitkiler arasında yer almaktadır (Dağhan, 2004).

Topraktaki mevcut Pb bitki kökleri ile alınarak bitkinin diğer aksamına taşınır. Yüksek dozda Pb'ye maruz kalan bitkilerde çeşitli fizyolojik ve morfolojik değişimler gözlemlenebilir. Kurşunun toksik etkileri bitkilerin normal gelişimini ve fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyebilir. Kurşun toksisitesinin spesifik olmayan belirtileri arasında kök büyüme ve gelişmesinin kısıtlanması, bitkilerin cüceleşmesi ve kloroz (yapraklarda sararma) gibi belirtiler bulunur (Burton ve ark., 1984; Sharma ve Dubey, 2005; Doğan ve Çolak, 2009). Jones ve ark. (1973) Pb toksisitesine maruz kalan bitkilerin yapraklarının koyu yeşil, bodur büyüme, kloroz ve bitkinin böcek-zararlı istilasına uğramış gibi görünebildiğini belirtmişlerdir (Dotaniya ve ark., 2020).

Bitkilerin sağlıklı büyüme, gelişme ve sürdürülebilir ürün verimi için besin elementlerine ihtiyaçları vardır. Yüksek konsantrasyonlarda Pb'nin toprakta bulunması, bitkilerin mineral beslenmesinde dengesizliğe neden olabilir. Çeşitli araştırmalarda, Pb dolaylı olarak hücre içindeki mineral dengesizliğine sebep olduğu gözlemlenmiştir. Kurşun, bitkilerin köklerinden alınarak hücrelere taşınabilir ve hücre içindeki mineral alımı ve dengesini etkileyebilir. Bu durum, bitkilerin normal

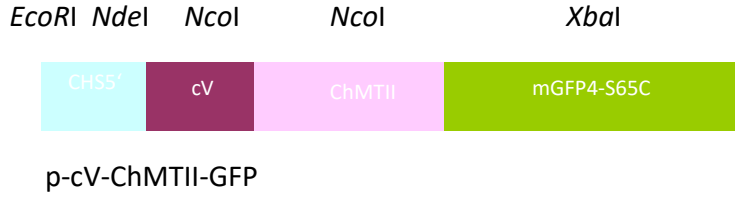
büyüme ve gelişimini olumsuz yönde etkileyebilir ve mineral beslenmesinde dengesizliklere yol açabilir (Sharma ve Dubey, 2005; Dalyan ve ark., 2020). Kurşun, topraktaki bazı elementlerin (K, Ca, Mg, Mn, Zn, Cu, Fe) bitki kök sistemine girişini sınırlayabilir veya engelleyebilir (Sharma ve Dubey, 2005). Bu durum, bitkilerin normal beslenme ve metabolizma süreçlerini etkileyerek büyümelerini ve gelişmelerini olumsuz yönde etkilemektedir.

Bu çalışmanın amacı, Çin hamsterinden izole edilen MT genini aktarılmış transgenik (p-cV-ChMTIIIGFP) tütün ve transgenik olmayan (SR-1) tütün bitkilerinin Pb fitoekstraksiyon kapasitelerini karşılaştırmalı olarak belirlemektir. Ayrıca Pb ile kirlenmiş bir toprağın fitoekstraksiyonu için test edilecek transgenik bitkinin Pb stresi koşullarında besin elementi alımı düzeylerindeki değişimler araştırılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1.Bitki materyali

Araştırmada bitki materyali olarak, transgenik olmayan SR-1 (*Nicotiana tabacum* var. Pelit Havana) ve SR-1 bitkisine gen aktararak elde edilen transgenik p-cV-ChMTIIIGFP tütün genotipleri kullanılmıştır. Her iki tütün genotipi RWTH-Aachen Üniversitesi, Moleküler Biyoloji Bölümü, Almanya'dan temin edilmiştir. Transgenik tütün bitkisi (p-cV-ChMTIIIGFP); Çin hamsterinden izole edilen metal bağlayan Metallothionein II (ChMTII) geni, vakuol hedef sinyal geni (cV) ve Yeşil Floresan Protein (mGFP4-S65C) genlerini içermektedir (Şekil 1). Transgenik bitkinin F3 generasyonundan elde edilen tohumlar denemede bitki materyali olarak kullanılmıştır (Dağhan, 2004; Eren, 2010).



Şekil 1. “Chinese hamster Metallotiyonin II geninin pTRA-kc bitki ekspresyon vektöründeki aktarılmış durumu. CHS 5: *chalcone synthase 5*’in translate edilmeyen bölge; cV: *C. roseus* strictosidine synthase’den izole edilen Vacuolar targeting signal; ChMTII: Chinese Hamster Metallotiyonin II; GFP: green florescent protein (mGFP4-S65C)” (Dağhan, 2004).

2.2. Toprak materyali

Amik Ovası Mahmutlu serisinden alınan deneme toprağı, killi-tın bünyeye (Bouyoucos, 1952), orta kireçli (Loeppert ve Suarez, 1996), hafif alkalın ve tuzsuz (Richards, 1954) özelliklere sahip bir topraktır (Eren, 2010). Toprağın EPA 3051 yöntemine (EPA, 1995) göre total Pb konsantrasyonu 3.92 mg kg^{-1} ve DTPA yöntemine (Lindsay ve Norvell, 1978) göre alınabilir Pb konsantrasyonu ise 0.29 mg kg^{-1} olarak belirlenmiştir.

2.3. Saksı denemesi

Araziden 0-30 cm derinlikten alınan toprak kurutulduktan sonra saksı denemesinde kullanılmak üzere 4 mm’lik elek ile elenmiştir. Her saksıya 2 kg toprak doldurularak temel gübreler (200 mg kg^{-1} N (NH_4SO_4 formundan), 100 mg kg^{-1} P ve 125 mg kg^{-1} K (KH_2PO_4 formundan) ve 2.5 mg kg^{-1} Fe (Fe-EDTA formundan)) çözelti şeklinde verilmiştir. Lindsay (1979) tarafından belirtilen ortalama ve üst sınırlar göz önünde bulundurularak artan dozlarda Pb (0-25-50-100-200-400 mg kg^{-1}) $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ formunda saksılara üç tekerrürlü olarak uygulanmış ve inkübasyona (3 hafta) bırakılmıştır. Deneme, faktöriyel deneme düzenine göre bütün genotipleri ana parsellere, ağır metal dozları ise alt parsellere yerleştirilmiştir. Kontrollü koşullarda ($25 \text{ }^\circ\text{C}$, 16 saat ışık ve 8 saat karanlık döngüsü) transgenik tütün tohumları antibiyotik içeren MS besi ortamında ve normal tütün bitkisi (SR-1) ise torf-perlit karışımı ortamında çimlendirilmiştir. Bitkiler 2-3 yapraklı ve hafifçe köklendiklerinde saksılara

aktarılmıştır (Dağhan, 2004). Altı hafta boyunca deiyonize su ile sulanan bitkiler bu süre sonunda toprak yüzeyinin yaklaşık 1 cm üzerinden kesilerek hasat edilmiştir. Hasat sonrası bitki yeşil aksamaları saf suyla yıkanıp, kurutma dolabında $65 \text{ }^\circ\text{C}$ de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmuştur. Kurutulan bitki örnekleri Agat taşlı bitki öğütme değirmeninde (Retsch RM200) öğütüldükten sonra nitrik asit (HNO_3) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ile yaş yakma yöntemine göre mikrodalga fırında (MarsXpress CEM) çözünürleştirilerek Pb, P, K, Fe, Cu, Zn ve Mn konsantrasyonları İndüktif Eşleşmiş Plazma-Atomik Emisyon Spektrometre (ICP-AES; Varian Series-II) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Azot (N) analizi, yaygın olarak kabul edilen Kjeldahl yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir, bu yöntem bitkilerin N içeriğini belirlemede güvenilir bir şekilde kullanılmaktadır (Kacar, 1994).

2.4. İstatistiksel analiz

Saksı denemesinden elde edilen veriler, SAS istatistiksel analiz programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Ortalama değerler arasındaki farklar belirlemek için LSD (Least Significant Difference: En Küçük Önemli Fark) testi uygulanmış ve gruplar oluşturulmuştur. Bu analiz yöntemi, elde edilen verilerin istatistiksel olarak anlamlı farklarını belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Kurşun uygulamalarının tütün bitkilerinde Pb içeriği üzerine etkisi

Transgenik (p-cV-ChMTIIGFP) ve transgenik olmayan (SR-1) tütün

bitkilerinin Pb uygulamalarının Pb içeriğine etkisi istatistiksel olarak $P < 0.05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Bu sonuç, Pb uygulamalarının bitkilerin Pb birikimine olan etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir. En yüksek doz Pb ($400 \text{ mg Pb kg}^{-1}$) uygulamasında transgenik p-cV-ChMTIIGFP ve transgenik olmayan SR-1 bitkilerinin Pb içerikleri arasındaki fark yaklaşık % 24.3 olarak belirlenmiştir. Transgenik tütün bitkisinin Pb içeriği, Pb dozlarındaki artışla birlikte transgenik

olmayan SR-1 bitkisine göre daha fazla artmıştır (Tablo 1). Bu sonuç, transgenik tütün bitkisinin topraktan daha fazla Pb biriktirebileceğini işaret etmektedir. Ayrıca, transgenik tütün (p-cV-ChMTIIGFP) bitkisinin, fitoekstraksiyon yöntemi için tasarlanan $400 \text{ mg Pb kg}^{-1}$ dozuna kadar herhangi bir nekroz ve kloroz belirtisi göstermemesi bu bitkinin yüksek Pb dozlarına karşı toleranslı olabileceğine işaret etmektedir.

Tablo 1. Farklı Pb dozlarının transgenik ve transgenik olmayan tütün bitkilerinin Pb içeriğine etkisi

Doz	Pb ($\mu\text{g bitki}^{-1}$)	
	p-cV-ChMTIIGFP	SR-1
0	2.49	2.66
25	5.86	4.78
50	14.5	7.49
100	37.5	26.0
200	35.0	38.4
400	53.2	42.8
LSD ($p < 0.05$)	24.8 ^a	20.4 ^b

Song ve ark. (2003), YCF1 geninin *Arobidopsis thaliana* bitkisine aktarılması ile elde edilen transgenik bitkilerin, yüksek miktarda Zn ve Pb'ye toleranslı olduğunu bildirmiştir. Bu durum, bitkilerin fitoremediasyon yönteminde kullanılabilme potansiyelini ortaya koymaktadır. Özellikle genetik olarak değiştirilmiş tütün bitkisinin yüksek Pb biriktirme kapasitesi, geniş bir coğrafi dağılıma sahip olması ve hızlı büyümesi, fitoremediasyon için uygun bir aday olduğunu göstermektedir. Ayrıca, yapılan diğer araştırmalar da tütün bitkilerinin Pb konsantrasyonlarında artış olduğunu doğrulamıştır. Bu bulgular, bitki bazlı fitoremediasyonun çevresel kirleticilerle mücadelede önemli bir strateji olabileceğini göstermektedir (Gisbert ve ark., 2003; Kınay ve Erdem, 2019).

3.2. Kurşun uygulamalarının besin elementi alımına etkisi

Bitki besin elementleri, bitki büyüme ve gelişmesi için ihtiyaç duyduğu elementlerdir. Bitki tarafından topraktan alınan besin elementleri bitkilerin fizyolojik ve moleküler mekanizmalarını geliştirerek farklı çevresel streslerin olumsuz etkilerini

de hafifletebilir. Bu temel besin maddelerinden her biri bitki içinde yer alan metabolik süreçlerde görev alırlar Örneğin; azot (N), fosfor (P), potasyum (K), kalsiyum (Ca) ve magnezyum (Mg) doğrudan veya dolaylı olarak hücre bölünmesi, hücre genişlemesi ve farklılaşması için çok önemlidir (Dalyan ve ark., 2020). Bu elementler bitki tarafından yeterince alınamamaları durumunda bitki normal büyüme ve gelişmesini tamamlayamaz. Dotaniya ve ark. (2020), topraktaki yüksek Pb seviyesinin bitkilerin büyüme ve gelişimini olumsuz etkilemesinin yanı sıra bitkinin ihtiyaç duyduğu besin elementlerinin alımını da etkileyerek bitkinin abiyotik strese maruz kalmasına da neden olabileceğini ifade etmişlerdir.

Artan dozlarda Pb uygulamasının bitkilerin bazı makrobesin elementleri alımına etkisi Tablo 2'de verilmiştir. Kurşun uygulamalarının p-cV-ChMTIIGFP ve SR-1 tütün bitkilerinin N konsantrasyonuna etkisi istatistiksel olarak önemsizken, P ve K konsantrasyonları üzerinde ise $P < 0.05$ düzeyinde önemli bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Tablo 2. Farklı Pb dozlarının tütün bitkilerinde N, P ve K konsantrasyonlarına etkisi (%)

Doz	N		P		K	
	p-cV-ChMTIIGFP	SR-1	p-cV-ChMTIIGFP	SR-1	p-cV-ChMTIIGFP	SR-1
0	1.95	1.94	0.35	0.36	7.39	6.41
25	1.63	1.64	0.32	0.33	7.10	6.61
50	1.44	1.39	0.32	0.32	6.83	6.17
100	1.40	1.45	0.30	0.29	6.62	6.55
200	1.62	1.55	0.32	0.27	6.27	6.23
400	1.76	1.48	0.30	0.24	6.54	6.19
LSD ($p<0.05$)	Ö.D.		0.005		0.13	

Kurşun uygulamalarının, tütün bitkilerinde artan Pb dozlarına karşı kontrol grubuna göre, N ve P konsantrasyonları ile K (SR-1 25 ve 100 mg Pb kg⁻¹ uygulamaları hariç) konsantrasyonunda azalmalara neden olmuştur (Tablo 2.). Diğer yandan Jones ve ark. (1991)'nin tütün bitkisinin çiçeklenme döneminde genç yapraklarda tespit ettikleri besin elementleri sınır değerlerine göre deneme bitkilerinin N konsantrasyonları düşük (<% 3.5 noksan), P konsantrasyonları yeterli (% 0.27-0.50) ve K konsantrasyonları (>% 3.20) fazla olarak belirlenmiştir. Ancak, bitkilerde bu elementlerin herhangi bir noksanlık ya da toksisite belirtisi gözlenmemiştir. Başlangıçta temel gübre uygulamasına karşın bitkilerin artan dozlarda Pb uygulaması ile kontrole kıyasla N, P ve K

alımında azalma görülmüştür. Kurşun uygulamaları bitki içinde besin elementi dengesinin olumsuz etkilenmesine neden olduğu görülmüştür. Nitekim Yılmaz ve ark. (2009) artan dozlarda (75, 150 ve 300 mg L⁻¹) Pb uygulamalarının, *Solarium melongena* bitki yapraklarında P konsantrasyon düzeylerinde azalmalara neden olduğunu bildirmişlerdir.

Kurşun uygulamalarının bitkilerin bazı mikro besin elementleri alımına etkisi Tablo 3.'de verilmiştir. Farklı dozlarda Pb uygulamalarının transgenik (p-cV-ChMTIIGFP) ve SR-1 tütün bitkilerinin Fe ve Mn konsantrasyonuna etkisi istatistiksel olarak önemsizken, Cu ve Zn konsantrasyonlarına etkisi ise istatistiksel olarak P<0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur (Tablo 3.).

Tablo 3. Farklı Pb dozlarının tütün bitkilerinde Cu, Fe, Zn ve Mn konsantrasyonlarına etkisi (mg kg⁻¹)

Doz	Cu		Fe		Mn		Zn	
	p-cV-ChMTIIGFP	SR-1	p-cV-ChMTIIGFP	SR-1	p-cV-ChMTIIGFP	SR-1	p-cV-ChMTIIGFP	SR-1
	P		P		P		P	
0	2.88	2.69	151	176	70.1	65.9	5.60	6.47
25	3.37	3.93	142	159	66.5	59.6	6.77	5.03
50	2.97	1.43	160	148	64.5	61.8	7.30	6.67
100	3.69	2.65	145	161	66.1	65.2	7.00	9.07
200	4.86	3.25	186	163	73.8	67.3	5.43	6.43
400	4.27	4.15	176	148	78.6	72.2	7.70	6.90
LSD ($p<0.05$)	0.22		Ö.D.		Ö.D.		3.26	

Kurşun uygulamaları ile en yüksek Cu (4.86 mg kg⁻¹) ve Fe (186 mg kg⁻¹) konsantrasyonu transgenik (p-cV-ChMTIIGFP) tütün bitkilerinin 200 mg Pb kg⁻¹ uygulama dozunda belirlenmiştir. Her iki bitki çeşidinde Mn konsantrasyonu doz artışlarıyla azalmıştır, ancak 100 mg Pb kg⁻¹

¹ dozundan sonra tekrar artmıştır. En yüksek Pb uygulama (400 mg kg⁻¹) dozunda transgenik (p-cV-ChMTIIGFP) bitkileri Mn konsantrasyonu 78.6 mg kg⁻¹, SR-1 bitkilerinde ise 72.2 mg kg⁻¹ olarak belirlenmiştir. Kurşun uygulamaları sonucu, Zn konsantrasyonlarında kontrol

grubuna göre, transgenik (200 mg Pb kg⁻¹ dozu hariç) ve SR-1 (25 ve 200 mg Pb kg⁻¹ dozları hariç) tütün bitkilerinde genel olarak artış olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.). Bu veriler ışığında, transgenik bitkilerinin (p-cV-ChMTIIGFP) genel olarak SR-1 tütün bitkilerine kıyasla daha yüksek Cu, Fe ve Mn konsantrasyonlarına sahip olduğu belirlenmiştir.

Jones ve ark. (1991)'nın tütün bitkisinin çiçeklenme döneminde genç yapraklarda tespit ettikleri besin elementleri sınır değerlerine göre deneme bitkilerinin Cu ve Zn konsantrasyonları düşük (Cu:<15 mg kg⁻¹ ve Zn:<20 mg kg⁻¹) düzeyde iken Fe ve Mn konsantrasyonlarının yeterli (Fe:50-200 mg kg⁻¹ ve Mn:30-250 mg kg⁻¹) düzeylerde olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla her iki bitkide Pb uygulamaları ile mikro besin elementlerinin alımında artış olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak Pb uygulamaları ile kontrole kıyasla her iki bitkide de N, Cu ve Zn noksanlık düzeyinde bulunurken, P, Fe ve Mn konsantrasyonları yeterli ve K konsantrasyonları ise yüksek düzeyde oldukları görülmüştür. Bu da Pb uygulamaları ile bitkilerin besin elementi alımı etkilenerek dokularda besin elementi dengesizliğine neden olduğunu göstermektedir. Besin elementi alım farklılığı bitki türüne, toprak koşullarına (pH, Tuz, kireç, organik madde ve topraktaki besin elementi içeriklerine) bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Bu nedenle elde edilen araştırma sonuçları da farklı olabilmektedir. Araştırmacılar, Pb'nin çoğu durumda katyonların (K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺, Cu⁺⁺, Fe⁺⁺) ve anyonların (NO₃⁻) bitki kök sistemine girişini engellediğini bildirmişlerdir (Kabata-Pendias, 1992; Sharma ve Dubey, 2005). Sürgün ve yapraklardaki Fe seviyesinin artan Pb uygulamaları ile düşüşler gösterebildiği de rapor edilmiştir (Wallace ve ark., 1992). Bu durum, Pb stresine maruz kalan bitkilerin iyon alımında meydana gelen azalmaların temel nedeninin, bitki köklerinin Pb toksisitesinden etkilenmesi ve kök büyüme

ile gelişmesinin engellenmesi olduğunu göstermektedir (Kınay ve Erdem, 2019). Kurşun uygulamasının *Oryza sativa* (Chatterjee ve ark., 2004), *Medicago sativa* (Lopez ve ark. 2007) ve *Raphanus sativus* (Gopal ve Rizvi, 2008) bitkilerinde Zn, Fe, Mn, Cu, Ca, P ve Mg konsantrasyonlarında azalmaya yol açtığı rapor edilmiştir (Dalyan ve ark., 2020).

4. Sonuç ve Öneriler

Araştırmada, transgenik p-cV-ChMTIIGFP tütün bitkisinin, transgenik olmayan SR-1 bitkilerine göre daha fazla Pb aldığı belirlenmiştir. Ayrıca, 400 mg Pb kg⁻¹ dozunda bitkilerin toksisite belirtileri göstermemesi, özellikle transgenik tütün bitkisinin daha yüksek dozda Pb uygulamalarıyla daha fazla Pb akümüle edebilme ve tolere etme kapasitesine sahip olabileceğini göstermektedir. Kurşun ile kirlenmiş toprakların fitoekstraksiyon yöntemi ile temizlenmesi çalışmalarında bitkilerde Pb toksisitesi nedeniyle oluşabilecek besin elementi dengesizliklerinin toprak analizlerine dayalı gübreleme ile kısmen önlenebileceği sonucuna varılmıştır.

Transgenik tütün bitkisinin yüksek miktarda Pb'yi akümüle etmesi ve hızlı büyüme özellikleri göstermesi bu bitkinin fitoremediasyon için ideal bir bitki olabileceği ve daha yüksek Pb doz uygulamalarında bitkinin test edilmesi gerekmektedir. Fitoemediasyon yaklaşımlarında kirlenmiş toprakları büyük ölçeklerde dekontamine etmek için daha geniş araştırmaların yapılması gerektiği düşünülmektedir. Bitki genetiği alanındaki araştırmalar, çevresel kirliliğin azaltılması için yenilikçi çözümler sunabilir.

Yazarların Katkı Beyanı

Yazarlar makaleye eşit katkıda bulduklarını, makalenin yayına hazır son halini gördüklerini/okuduklarını ve onayladıklarını beyan ederler.

Çıkar Çatışması Beyanı

Tüm yazarlar, bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

Finansman

Bu çalışma, Mustafa Kemal Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırmalar Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından "08M1103" nolu proje ile desteklenmiştir.

Açıklama

Tütün tohumlarını sağladığı için Prof. Dr. Rainer Fisher'a teşekkür ederiz. Bu, çalışma ilk yazarın yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

Kaynaklar

- ATSDR, 2024. The ATSDR 2022 Substance Priority List. (<https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html#2022spl>), Erişim: 07.03.2024.
- Baker, A.J.M., Reeves, R.D., McGrath, S.P., 1991. In situ decontamination of heavy metal polluted soils using crops of metal-accumulating plants - A feasibility study. In: Hinchee, R.E., Olfenbuttel, R.F. (Eds.), *In situ bioreclamation: applications and investigations for hydrocarbon and contaminated sites remediation*. Butterworth-Heinemann, London, pp. 600-605.
- Bouyoucos, G.J., 1951. A recalibration of hydrometer for making mechanical analysis of soils. *Agronomy Journal*, 43: 434-438.
- Burton, G.W., Ingold, K.U., 1984. Carotene: An unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224: 569-573.
- Chatterjee, C., Dube, B.K., Sinha, P., Srivastava, P., 2004. Detrimental effects of lead phytotoxicity on growth, yield, and metabolism of rice. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 35(1-2): 255-265.
- Dağhan, H., 2004. Phytoextraction of heavy metal from contaminated soils using genetically modified plants. PhD thesis, RWTH-Aachen University, Germany.
- Dağhan, H., 2007. Fitoremediasyon: Bitki kullanılarak kirlenmiş toprakların temizlenmesi. *GAP Tarım Kongresi-V, Kongre Bildiri Kitabı*, 17-19 Ekim 2007), Şanlıurfa, s. 362-367.
- Dalyan, E., Yüzbaşıoğlu, E., Akpınar, I., 2020. Physiological and biochemical changes in plant growth and different plant enzymes in response to lead stress. In: B. Fagan, ed. *Lead in Plants and the Environment*. London.
- Doğan, M., Colak, U., 2009. Effect of lead applied to *Triticum aestivum* L. cv. Tosunbey on some physiological characteristics. *Ekoloji*, 19(73): 98-104.
- Dotaniya, M.L., Dotaniya, C.K., Solanki, P., Meena, V.D., Dutaniya, R.K., 2020. Lead contamination and its dynamics in soil-plant system. In: B. Fagan, ed. *Lead in Plants and the Environment*. London, pp. 83-98.
- Egendorf, S.P., Groffman, P., Moore, G., Cheng, Z., 2020. The limits of lead (Pb) phytoextraction and possibilities of phytostabilization in contaminated soil: a critical review. *International Journal of Phytoremediation*, 22(9): 916-930.
- EPA, 1995. Contaminants and remedial options at select metals-Contaminated Sites, EPA/540/R-95/512.6.
- Eren, A., 2010. Kurşun metali ile kirlenmiş toprakların transgenik bitki kullanılarak temizlenme olanaklarının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Hatay.
- Eren, A., Mert, M., 2017. Ağır metal (Ni, Cd ve Cu) uygulamalarının Andız Otu, Fener Otu ve Sığırkuyruğu bitkilerinin büyüme ve gelişmesi üzerine etkisi. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 4(1): 50-58.
- Gisbert, C., Ros, R., De Haro, A., Walker, D.J., Bernal, M.P., Serrano, R., Navarro-Aviñó, J., 2003. A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 303(2): 440-445.
- Gopal, R., Rizvi, A.H., 2008. Excess lead alters growth, metabolism and translocation of certain nutrients in radish. *Chemosphere*, 70(9): 1539-1544.

- Jagetiya, B., Kumar, S., 2020. Phytoremediation of lead: a review. In: B. Fagan, ed. *Lead in Plants and the Environment*. London.
- Jones, J.B. Jr., Wolf, B., Mills, H.A., 1991. *Plant Analysis Handbook: A Practical Sampling, Preparation, Analysis and Interpretation Guide*. Athens, GA: Micro - Macro Publishing.
- Jones, L.H.P., Clement, C.R., Hopper, M.J., 1973. Lead uptake from solution by perennial ryegrass and its transport from roots to shoots. *Plant Soil*, 38: 403-414.
- Kabata-Pendias, A., 1992. Trace metals in soils in Poland—occurrence and behaviour. *Soil Science Journal*, 140: 53-70.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 2001. *Trace elements in Soils and Plants*. 3rd Edn. Boca Raton: CRC Press. London.
- Kacar, B., 1994. *Bitki ve Toprağın Kimyasal Analizleri*. Ankara: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Eğitim, Araştırma ve Geliştirme Vakfı. No: 3, Ankara, s,705.
- Kınay, A., Erdem, H., 2019. The Effects of Increasing Doses of Lead Applications on Growth, Pb And Microelement Concentrations of Tobacco Varieties. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 7(12): 2083-2088.
- Lindsay, W.L., 1979. *Chemical Equilibria in Soils*. N.Y.: Wiley and Sons. p, 449.
- Lindsay, W.L., Norvell, W.A., 1978. Development of a DTPA test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Science Society of America Journal*, 42: 421-428.
- Loeppert, R.H., Suarez, D.L., 1996. Carbonate and gypsum. In: D.L. Sparks (Ed.), *Methods of soil analysis*. Part 3. Chemical Methods. 5: 437-474.
- Masindi, V., Mkhonza, P., Tekere, M., 2021. Sources of heavy metals pollution. In: B. Fagan, ed. *Remediation of Heavy Metals*. London.
- Meena, V., Dotaniya, M.L., Saha, J.K., Das, H., Patra, A.K., 2020. Impact of lead contamination on agroecosystem and human health. In: B. Fagan, ed. *Lead in Plants and the Environment*, 67-82.
- Rahman, S.U., Qin, A., Zain, M., Mushtaq, Z., Mehmood, F., Riaz, L., Naveed, S., Ansari, M.J., Saeed, M., Ahmad, I., Shehzad, M., 2024. Lead uptake, accumulation, and translocation in plants: Plant physiological, biochemical, and molecular response: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 241: 110849.
- Raychaudhuri, S.S., Pramanick, P., Talukder, P., Basak, A., 2021. Polyamines, metallothioneins, and phytochelatins—Natural defense of plants to mitigate heavy metals. *Studies in Natural Products Chemistry*, 69: 227-261.
- Richards, L.A., 1954. *Diagnosis and Improvement of Saline and Alkali Soils*. United States Department of Agriculture Handbook 60: 94.
- Rigoletto, M., Calza, P., Gaggero, E., Malandrino, M., Fabbri, D., 2020. Bioremediation methods for the recovery of lead-contaminated soils: A review. *Applied Sciences*, 10(10): 3528.
- Ruttens, A., Boulet, J., Weyens, N., Smeets, K., Adriaensen, K., Meers, E., Vangronsveld, J., 2011. Short rotation coppice culture of willows and poplars as energy crops on metal contaminated agricultural soils. *International Journal of Phytoremediation*, 13(1): 194-207.
- Sharma, P., Dubey, R. S., 2005. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1): 35-52.
- Song, W.Y., Sohn, E.J., Martinoia, E., Lee, Y.J., Yang, Y.Y., Jasinski, M., Forestier, C., Hwang, I., Lee, Y., 2003. Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants. *Nature Biotechnology*, 21(8): 914-919.

Taciroglu, B., Kara, E., Sak, T., 2016. Toprakta Ağır Metal Gideriminde Solucanların Kullanımı. *Kahramanmaraş Sütcü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi*, 19(2): 201-207.

Wallace, A., Wallace, G.A., Cha, J.W., 1992. Some modifications in trace metal toxicities and deficiencies in plants resulting from interactions with other

elements and chelating agents--the special case of iron. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10): 1589-1598.

Yilmaz, K., Akinci, İ. E., Akinci, S., 2009. Effect of lead accumulation on growth and mineral composition of eggplant seedlings (*Solanum melongena*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 37(3): 189-199.

Atıf Şekli: Eren, A., Dağhan, H., 2024. Transgenik (p-cV-ChMTIIGFP) Tütün Bitkisinin Kurşun Fitoekstraksiyon Kapasitesinin belirlenmesi ve Kurşunun Besin Elementi Alımına Etkisi. *MAS Uygulamalı Bilimler Dergisi*, 9(3): 690–699.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.13329516>.

To Cite: Eren, A., Dağhan, H., 2024. Determination of Lead Phytoextraction Capacity of Transgenic (p-cV-ChMTIIGFP) Tobacco Plant and Effect of Lead on Nutrient Uptake. *MAS Journal of Applied Sciences*, 9(3): 690–699.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.13329516>.
