



Erciyes University Journal of the Institute of Science and Technology

Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi

ISSN 1012-2354

Cilt (Volume): 27, Sayı (Issue): 3, Temmuz/July-2011

<http://fbe.erciyes.edu.tr/>



Bitkilerde krom toksisitesi ve hücresel cevaplar

Mustafa YILDIZ, Hakan TERZİ, Behiye URUŞAK

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Afyonkarahisar

Anahtar Kelimeler

Krom toksisitesi,
Büyüme,
Klorofil biyosentezi,
Reaktif oksijen türleri,
Lipit peroksidasyonu,
Detoksifikasyon
mekanizmaları

ÖZET

Birçok endüstri alanında çeşitli krom (Cr) bileşiklerinin aşırı kullanımı, çevrenin bu elementle kontaminasyonu konusunda endişenin artmasına neden olmaktadır. Kromun alınımı ve fitotoksik etkileri bu elementin oksidasyon durumuna bağlıdır. Kromun hem heksavalent [Cr(VI)] hem de trivalent [Cr(III)] formu fitotoksiktir; fakat Cr(III)'a göre Cr(VI) daha toksiktir. Bitkiler Cr için spesifik bir transport sisteminden yoksun olduğu için sülfat ve demir gibi iyonların taşıyıcıları tarafından alınmaktadır. Krom fitotoksisitesi tohum çimlenmesi ve fide büyümesini inhibe etmekte, besin ve su dengesini bozmakta, pigmentleri degrade etmekte, hem grubu enzimlerinin aktivitesini azaltmakta ve çeşitli metabolitlerin birikimini teşvik etmektedir. Krom; fotosentez ve solunum gibi fizyolojik işlevlerde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Krom oksidatif zarara neden olan reaktif oksijen türlerinin oluşumunu teşvik etmektedir. Reaktif oksijen türleri lipit peroksidasyonunu başlatma kapasitesine sahiptir. Organik asitler, antioksidant enzimler, prolin birikimi, metallotiyoneinler, alternatif oksidaz yolu ve stres proteinleri bitkilerde ağır metal toleransı mekanizmalarının bileşenleri olarak önemlidir ve toksik metallerin detoksifikasyonu ile ilişkilidir. Bu derlemede, bitkilerde Cr toksisitesinin etkileri ve muhtemel Cr detoksifikasyonu ve toleransı mekanizmaları tartışılmıştır.

Chromium toxicity and cellular responses in plants

ABSTRACT

The extensive use of various chromium (Cr) compounds in numerous industries has caused increasing concern about environmental contamination with this element. The uptake and phytotoxic effects of Cr depends on its oxidation state. Both hexavalent [Cr(VI)] and trivalent [Cr(III)] forms of Cr are phytotoxic, but Cr(VI) is more toxic than Cr(III). Since plants lack a specific transport system for Cr, it is taken up by carriers of essential ions such as sulfate or iron. Cr phytotoxicity inhibits seed germination and seedling growth, disrupts nutrient and water balance, degrades the pigments, reduces the activities of heme enzymes, and induces accumulation of various metabolites. Chromium causes deleterious effects on plant physiological processes such as photosynthesis and respiration. Chromium induces formation of reactive oxygen species, resulting in oxidative damage. The reactive oxygen species have the capacity to initiate lipid peroxidation. Organic acids, antioxidant enzymes, proline accumulation, metallothioneins, alternative oxidase pathway and stress proteins are important in plants as components of tolerance mechanisms and are also involved in detoxification of toxic metals. In this review, the effects of Cr toxicity and possible mechanisms of Cr detoxification and tolerance in plants are discussed.

Keywords

Chromium toxicity,
Growth,
Chlorophyll
biosynthesis,
Reactive oxygen species,
Lipid peroxidation,
Detoxification
mechanisms

1. Giriş

Madencilik, kentsel veya endüstriyel katı, gaz ve sıvı atıkları, pestisit ve yapay gübre kullanımı, boya sanayisi ve araba egzoz gazları doğaya aşırı miktarda ağır metallerin salınmasına neden olmaktadır. Çevresel kirleticilerin neden olduğu bu ağır metal stresi, bitkilerde büyümeyi sınırlamakta ve ürün verim ve kalitesini düşürmektedir [1]. Bakır (Cu), çinko (Zn), demir (Fe), mangan (Mn), molibden (Mo), nikel (Ni) ve kobalt (Co) gibi bazı ağır metaller bitki büyüme ve gelişimi için gerekli mikro besin elementleridir. Buna karşın, arsenik (As), civa (Hg), kadmiyum (Cd), kurşun (Pb) ve krom (Cr) gibi bazı ağır metaller ise bitki gelişimi için gerekli olmayan elementlerdir [2]. Mikro besin elementi olsun ya da olmasın ağır metallerin, atmosferde, suda ve topraktaki konsantrasyonunun belli bir seviyenin üzerine çıkması, tüm canlılar için ciddi problemlere neden olmaktadır [3].

Krom (Cr), dünyada en fazla bulunan yedinci elementtir [4]. Kromun trivalent [kromik formu; Cr(III) veya Cr⁺³] ve heksavalent [kromat formu; Cr(VI) veya Cr⁺⁶] olarak adlandırılan çeşitli fitotoksik formları bulunur. Cr(VI), en toksik form olup; kromat (CrO₄⁻²) veya dikromat (Cr₂O₇⁻²) oksianyonları şeklinde genellikle oksijen ile ilişkili olarak oluşmaktadır. Oldukça toksik olan Cr membran zararlarına, organellerde yapısal değişimlere, metabolik aktivitede bozulmalara ve büyümede inhibisyona neden olmaktadır [5]. Krom stresine maruz kalan bitkilerde oluşan tekli (single) oksijen, süperoksit anyonu, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri (ROT'lar) lipidler, proteinler ve DNA gibi biyomoleküllerde oksidatif zarara neden olabilmektedir [6]. Krom fitotoksitesisi tohum çimlenmesi ve fide gelişimini inhibe etmekte, besin ve su dengesini bozmakta, fotosentetik pigmentlerde bozulmalara ve antioksidant enzimlerin aktivitesinde değişimlere neden olmaktadır [7-9]. Bununla birlikte, Cr gibi ağır metaller ile kirlenmiş topraklarda büyüyen bitkilerde Cr alınımı, transportu, birikimi ve detoksifikasyonunu kapsayan temel mekanizmaların yanı sıra Cr'un fizyolojik etkilerinin moleküler ve genetik teknikler ile anlaşılmasının oldukça önemli olduğu vurgulanmıştır [10].

Bitkilerde ağır metallere tolerans, bir genotip ve çevresi arasındaki etkileşim ile belirlenen ağır metal alınımındaki azalma veya içsel alıkoyma ile ilişkilidir. Ağır metallerin detoksifikasyonunda potansiyel mekanizmalara sahip olan bazı bitkiler ağır metallere toleranslı olarak ifade edilmektedir [11]. Ağır metallere karşı bitkiler tarafından geliştirilen korunma mekanizmaları aile, cins, tür, alttür ve çeşit seviyesinde farklılıklar gösterebilmektedir [12, 13]. Ağır metal toksitesinden korunmak için bitkilerin geliştirdiği içsel savunma mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılacak kadar, bu mekanizmalar arasında vakuolar kompartımanlaşma, sıcaklık şoku proteinleri [11], enzimatik ve non-enzimatik antioksidant sistemleri [14-16], metallothioneinler gibi metal bağlayıcı ligandlar [17] gösterilmektedir. Bununla birlikte, ağır metallerle kirlenmiş alanların fitoremediasyonu için uygun tür veya çeşitlerin geliştirilmesinde metal toleransı ile ilgili moleküler mekanizmalar ve genetik temellerin aydınlatılmasının önemli olduğu vurgulanmıştır [18, 19].

Bu derlemede, bitkilerde Cr toksitesisinin bitki büyüme ve gelişimi, klorofil biyosentezi ve lipid peroksidasyonu üzerine

etkileri ve muhtemel metal detoksifikasyon mekanizmaları hakkında bilgi verilmiştir.

2. Krom Fitotoksitesisi

2.1 Çevresel Kirletici Olarak Krom

Dünyada krom (Cr) üretimi yılda yaklaşık 107 ton civarındadır [20]. Metal sanayi ve kimya endüstrisi gibi alanlarında yaygın kullanımından dolayı Cr'un farklı bileşikleri hızla çevreye yayılmaktadır. Krom bileşikleri deri işleme, paslanmaz çelik üretiminde, boya pigmenti ve kromik asit üretiminde büyük ölçüde kullanılmaktadır [1]. Krom, periyodik cetvelin VI B grubunda yer alan bir geçiş metalidir. Bitki metabolizmasında herhangi bir rol oynamayan Cr (7.2 g/cm³), bitkiler için toksik bir element [4, 21] olup; toprak, su ve havada bulunmaktadır. Doğal olarak oluşan topraklarda Cr konsantrasyonu ana kayaya bağlı olarak 10-50 mg kg⁻¹ aralığında değişmektedir [10].

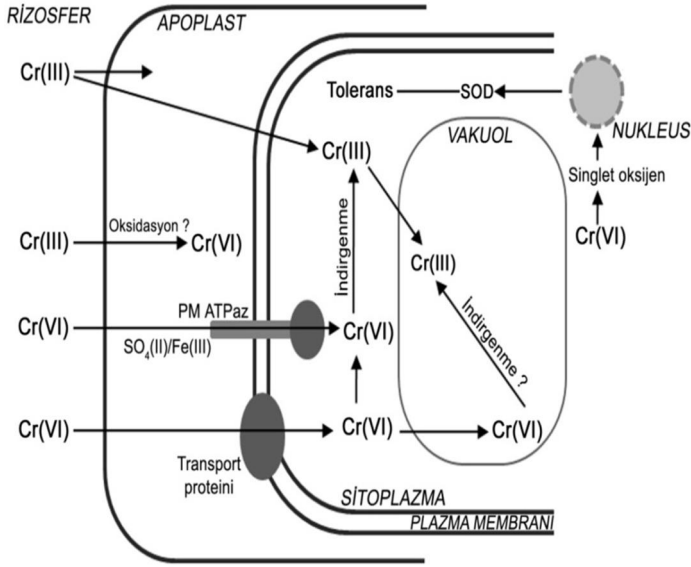
Farklı oksidasyon durumları gösteren Cr'un trivalent [Cr(III)] ve heksavalent [Cr(VI)] türleri tamamen farklı kimyasal özellik gösteren en kararlı formlarıdır [1]. Kromun hem trivalent hem de heksavalent formları fitotoksiktir [21]. Daha toksik form olarak düşünülen Cr(VI), kromat (CrO₄⁻²) ve dikromat (Cr₂O₇⁻²) şeklinde iki oksianyon formu halinde bulunmaktadır. Buna karşın daha az mobil ve toksik olan Cr(III); oksitler, hidroksitler ve sülfatlar şeklinde veya toprakta ve sucul çevrelerde organik bileşiklere bağlı halde bulunmaktadır [10]. Oksidasyon-redüksiyon (redoks) reaksiyonları hem toprak hem de sucul ortamlarda meydana gelmektedir. Redoks reaksiyonları mobilite ve fitotoksitesinin değiştirilmesinde önemlidir. Trivalent ve tetravalent durumdaki mangan Cr(III)'ü Cr(VI)'a okside ederken, topraktaki FeS ve organik maddeler Cr(VI)'ü daha kararlı ve daha az fitotoksik olan Cr(III)'a indirgeyebilmektedir [22].

2.2 Krom Alınımı, Taşınımı ve Birikimi

Metal alınımı ve taşınımı bitki türü ve metal çeşidine göre farklılıklar göstermektedir. Bitkiler havada gaz halinde bulunan ağır metalleri stomaları aracılığıyla [23, 24] ve kolloidlere tutunmuş, organik maddelere bağlı ve toprak çözeltisi içinde iyon halinde bulunan metalleri ise kökleri aracılığıyla almaktadır. Toprak sıcaklığı, organik madde miktarı ve diğer metallerin varlığı gibi toprak çözeltisindeki metal konsantrasyonunu değiştiren çevresel faktörler metal alınımını etkilemektedir [25].

Bitkiler için toksik bir element olması nedeniyle Cr alınımı için spesifik bir mekanizma bulunmamaktadır. Krom alınımı, bitki metabolizması için zorunlu diğer metallerin alınımında kullanılan taşıyıcılar ile gerçekleşmektedir. Kromun toksik etkisi, bu metalin alınımı, taşınımı ve birikimini belirleyen farklı iyonik formlarına bağlıdır (Şekil 1). Zayed ve ark. [26], kromat (CrO₄⁻²) şeklinde absorbe edilen Cr'un muhtemelen Fe(III) redüktaz enzimleri ile köklerde toksik olmayan Cr(III) formuna dönüştürüldüğünü ileri sürmüştür. Howe ve ark. [27], köklerde Cr(VI)'un Cr(III)'a tamamen dönüştürülemediğini ve Cr'un vasküler dokulara girebildiğini ve Cr(III) ve Cr(VI) olarak yapraklara kolayca taşındığını rapor etmiştir. Bununla birlikte, hem Cr(VI) hem

de Cr(III) simplast yol ile endodermisi geçmek zorunda olduğu için hücrelerdeki Cr(VI), düşük Cr(VI) konsantrasyonunda kök korteks hücrelerinde tutulan Cr(III)'a kolaylıkla indirgenebilmekte (Şekil 1) ve bu durum Cr(III)'un düşük toksisitesini kısmen açıklamaktadır. Vasküler bitkiler Cr(VI)-redükleyici enzimleri içermemesine rağmen, bu enzimler bakteri ve funguslarda çok yaygın olarak bulunmuştur [4].



Şekil 1. Bitkilerde krom (Cr) alınımı ve taşınımı ile ilgili ileri sürülen model (Shanker ve ark. [1]'den değiştirilerek)

Krom (VI) taşınımı, sülfat gibi esansiyel anyonların taşıyıcıları ile gerçekleşen aktif bir mekanizmadır [4]. Demir, kükürt, fosforun taşıyıcıya bağlanmada Cr ile rekabet ettiği bilinmektedir [28]. Cervantes ve ark. [4], Cr(VI) alınımının sülfat translokasyon taşıyıcılarıyla hızlı ve aktif bir taşınım, Cr(III) alınımının ise pasif taşınım olduğu bildirmiştir. Bununla birlikte, arpada metabolik inhibitörlerin Cr(VI) alınımını azaltırken, Cr(III) alınımını etkilemediği bildirilmiştir [29]. Bu sonuç, Cr(VI) alınımının metabolik enerjiye bağlı olduğunu göstermekle birlikte [29], arpada her iki Cr türünün aktif mekanizma ile alındığı bildirilmiştir [30].

Bazı bitki türlerinde, Cr(III)'a göre Cr(VI) uygulamalarının daha fazla Cr birikimine neden olduğu bildirilmiştir [26]. Bununla birlikte, farklı bitki dokularında Cr birikimi bakımından farklılıklar olduğu gösterilmiştir. *Datura innoxia* bitkisinin gövdesine göre kök dokusunda daha yüksek konsantrasyonlarda Cr(VI)'un biriktiği saptanmıştır [31]. Benzer olarak, Cr(III) yerine Cr(VI)'a maruz bırakılan *Brassica juncea* ve *Salsola kali* bitkilerinin gövdelerine göre köklerinde Cr birikiminin daha yüksek olduğu bildirilmiştir [26, 32]. Golovatyj ve ark. [33], toprağın özelliğine ve Cr konsantrasyonuna bağlı olmaksızın Cr'un kök dokusunda fazla, toprak üstü organlarda ise düşük seviyede biriktiğini ve bu nedenle de Cr dağılımının kararlı bir yapı gösterdiğini ifade etmiştir. Örneğin, fasulyede Cr birikiminin tohumlarda %0.1 ve kök dokusunda ise %98 olduğu bulunmuştur [34].

Kromun köklerden ksilem aracılığı ile yapraklara düşük oranda taşınımı, bu metalin hücre duvarındaki -COOH grupları ile kompleks oluşturması ve kök hücrelerinin

vakuollerinde biriktirilmesinden kaynaklanabilmektedir [35]. Cr(III) hücre membranlarında birikirken, Cr(VI) membranları geçebilmekte ve sitoplazmadaki hücre-içi materyallerle etkileşime girebilmektedir [36]. Ağır metaller enzimlerin sülfidril gruplarına bağlanma eğiliminde olduğundan, esansiyel biyolojik bileşiklerin fonksiyon görmesi baskılanmaktadır [37].

2.3 Bitki Büyümesi

Bitkilerde Cr toksisitesi Fe⁺², Mn⁺², Cu⁺², Zn⁺² gibi iyonların değişen translokasyonu veya metal değiş-tokuşunun sonucu olarak iyonik dengesizliğe neden olmaktadır [1, 38]. Krom büyüme ve gelişme, enzimler ve diğer bileşikler üzerinde etkili olarak fitotoksik etki göstermektedir [1, 6, 16, 31, 39, 40].

Toksik seviyelerde Cr'a maruz kalan bitkilerde, fotosentez ve solunum gibi önemli metabolik olayların etkilenmesinden dolayı bitki büyümesinde azalma görülmektedir [1]. Krom toksisitesi bitkilerde tohum çimlenmesi ve radikula büyümesini azaltmaktadır [41]. Cr toksisitesi α - ve β -amilaz aktivitesini azaltarak embriyo ekseninin gelişimi için gerekli şekerlerin taşınımını engellemekte ve tohum çimlenmesini inhibe etmektedir. Peralta ve ark. [42], tohum çimlenmesinin ilk fizyolojik basamak olması nedeniyle Cr içeren bir ortamda tohum çimlenme yeteneğinin Cr toleransının belirlenmesinde indikatör olabileceğini bildirmiştir.

Karuppanapandian ve Manoharan [43], Cr(VI)'un fitotoksik etkilerinin kökler kadar gövde dokusunda da oldukça belirgin olduğunu; oysa Cr(III)'un sadece kök dokusunda toksik olduğunu bildirmiştir. Shanker ve ark. [1], diğer ağır metallere göre Cr'un kök uzunluğunu daha fazla inhibe ettiğini bildirmiştir. Cr stresi, kök hücrelerinde plazmolize ve solmaya neden olarak bitki köklerini etkileyebilmektedir [44]. Yüksek Cr konsantrasyonlarında kök büyümesindeki inhibisyon, besin ortamında Cr'un varlığında kökler tarafından suyun yeteri kadar alınamamasından kaynaklanmaktadır [45]. Krom stresi altındaki pirinç fidelerinin kök uzunluğu kontrole göre 100 μ M Cr(VI) uygulamasında tüm sürelerde azalmıştır [13]. Pandey ve ark. [46], bezelye bitkilerinde yüksek Cr(VI) konsantrasyonunda (200 μ M) kök uzunluğundaki azalmayı %18 olarak belirlemiştir. Cr(VI) konsantrasyonundaki bir artış (0-500 μ M) ile *Brassica juncea* cv. Varuna'da bitki uzunluğunun 200 μ M'da yaklaşık %50 oranında azaldığı saptanmıştır [40]. Krom stresinin neden olduğu kök büyümesindeki inhibisyon kök hücrelerinin bölünmesi ve uzamasındaki inhibisyonun veya hücre döngüsünün uzamasından kaynaklanabilmektedir [1]. Bununla birlikte, kök hücrelerinin büyümesindeki inhibisyonun fotosentetik oran üzerine Cr'un primer etkisi olarak düşünülmektedir [7]. Kök büyümesindeki azalmanın kök yüzeyinin zarar görmesinden dolayı hücre içeriğinin dışarı sızmasından ve kök tüylerinin ve epidermal hücrelerin zarar görmesinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir [47]. Scoccianti ve ark. [39], Cr'un hücre çeperi ve plazma membranındaki bağlanma bölgelerinden Ca⁺² gibi katyonların yer değiştirmesine neden olarak hücre fonksiyonlarında bozulmalara yol açabileceğini belirtmiştir.

Yaprak büyümesi (yaprak yüzey alanı gelişimi ve toplam yaprak sayısı) bitki verimini belirlemektedir. Cr(VI)

uygulaması yaprak yüzey alanı genişlemesini negatif olarak etkilemekte ve daha küçük yaprak oluşumuna neden olmaktadır [21, 47]. Krom içeren deri sanayi atıklarının farklı konsantrasyonlarına (%25-100) maruz bırakılan *Gossypium hirsutum*, *Vigna mungo*, *Vigna unguiculata* ve *Lycopersicon esculentum* bitkilerinde yaprak yüzey alanının kontrole göre %25'lik konsantrasyonda artış gösterdiği, buna karşın %75 ve 100'lük konsantrasyonlarda ise bitkilerin öldüğü bildirilmiştir [49]. Buğdayda bitki başına yaprak sayısı, besin ortamına 0.5 mM Cr ilave edildiğinde %50 azalmıştır [50]. Ağır metal stresi altında, yaprak yüzey alanındaki azalmanın nedenini açıklamak için muhtemel mekanizmalardan biri su kullanımının kısıtlanmasıdır [51]. Tripathi ve ark. [52], yaprak büyüme özelliklerinin ağır metal kirliliğinin uygun bir biyoindikatörü olduğunu ve toleranslı türlerin seleksiyonunda kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

Bitkilerde yüksek verim kuru ağırlık bakımından biyokütle üretiminde bir artıştır. Bitkiler tarafından üretilen toplam kuru ağırlığın yaklaşık %80-90'ını karbon bileşikleri oluşturur [53]. Krom, kloroplast ve mitokondrinin yapı ve işlevlerinde oksidatif zarara yol açarak kuru ağırlık üretimi üzerinde dolaylı bir etkiye sahiptir [21, 54]. Kromun toksik konsantrasyonlarında (0.1, 0.15 ve 0.25 mM), ekmeçlik buğdayın farklı dokularında kuru ağırlıktaki azalmanın köke göre gövdede daha belirgin olduğu bildirilmiştir [54]. Cr(VI) konsantrasyonundaki bir artış (0-500 µM) ile *Brassica juncea* cv. Varuna'da taze ağırlık önemli düzeyde azalırken, kuru ağırlık kontrole göre 500 µM Cr uygulamasında yaklaşık %57 daha yüksek bulunmuştur [40]. *Vallisneria spiralis*'de Cr birikimi ve biyokütle üretimi ile ilişkili toksisite değerlendirilmesinde, 2.5 µg/mL'nin üzerindeki Cr(VI) konsantrasyonlarında kuru ağırlık üretiminin olumsuz etkilendiği belirtilmiştir [6]. Zurayk ve ark. [55], *Portulaca oleracea* bitkisinde tuzluluk ve Cr(VI) birikiminin kuru ağırlıkta azalmaya neden olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte, sucul makrofit *Salvinia* türlerinde Cr stresinin kuru ağırlıkta azalmaya neden olduğu bildirilmiştir [56-58].

2.4 Klorofil Biyosentezi

Krom toksisitesi elektron taşımını, fotofosforilasyon, CO₂ fiksasyonu ve karbon indirgenme döngüsündeki enzimlerin aktivitesindeki değişikliklere neden olarak fotosentezi olumsuz etkilemektedir [1, 38]. Krom Hill reaksiyonlarını inhibe ederek fotosentezin hem ışık hem de karbon indirgeme reaksiyonlarını etkilemektedir [59]. Yüksek Cr(VI) konsantrasyonlarında (1 mM) kloroplast membranındaki tam bir bozunma ile tilakoid düzenlenişindeki bozunmanın birlikte gözlenmesi, hegzavalent Cr'un şiddetli fitotoksik etkisini göstermektedir [60].

Hem Cr(III) hem de Cr(VI) klorofil içeriğini azaltmakta ve böylece büyümeyi inhibe etmektedir [61-63]. Toplam klorofil içeriğinin buğday [54, 61], mısır [64], ıspanak [65] ve *Vigna mungo* [66] gibi birçok bitki türünde Cr stresine bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Diğer taraftan, Cr stresinin fasulye ve *Brassica juncea* bitkilerinde toplam klorofil birikiminde önemli bir artışa neden olduğu bildirilmiştir [40, 59]. Bununla birlikte, Cr stresinin sucul makrofit *Salvinia minima* ve *S. natans* bitkilerinde toplam klorofil içeriğinde değişikliğe neden olmadığı bildirilmiştir

[57, 58]. Mung fasulyesinin Cr'a toleranslı çeşitlerinde (TARM-22 ve K-851) toplam klorofil içeriğinin kontrole göre Cr uygulamalarında arttığı, hassas çeşitlerde (PDM-54 ve Sujata) ise azaldığı belirlenmiştir [67]. Cr(VI) stresinin klorofil a ve b'de önemli azalmalara neden olduğu ve klorofil a'ya göre klorofil b'deki azalmanın daha fazla olduğu saptanmıştır [8, 54]. Krom stresi altındaki birçok bitkide klorofil biyosentez yolundaki enzimlerin inaktivasyonu klorofil içeriğindeki azalmaya neden olmaktadır [1]. Krom stresinde klorofil a/b oranındaki azalma, fotosentetik anten kompleksinin periferal kısmının boyutundaki azalmadan kaynaklanmaktadır [68]. Klorofil b içeriğindeki azalmanın periferal kısımdaki proteinlerin degradasyonundan kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Klorofil a/b oranındaki azalma, klorofil b'ye göre klorofil a'nın daha hızlı bozulması ve klorofil a'nın sentezinin azalmasının bir sonucu olabileceği vurgulanmıştır [69, 70].

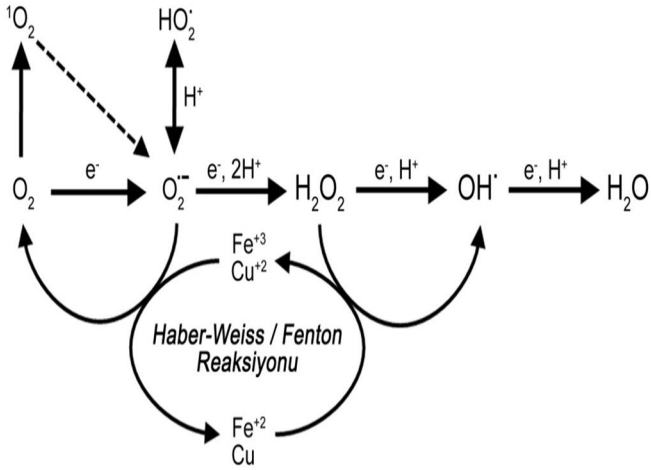
Krom stresinin *Spirodella polyrrhiza* ve *Vallisneria spiralis* gibi sucul bitki türlerinde ve *Brassica juncea*'da karotenoidlerin içeriğinde bir artışa neden olduğu bildirilmiştir [6, 40]. Karotenoidlerin içeriğinin düşük Cr konsantrasyonlarında arttığı, buna karşın yüksek Cr konsantrasyonlarında azaldığı belirtilmiştir [14, 59]. Bir antioksidant molekül olan karotenoidler reaktif oksijen türleri ile etkileşime girerek lipit peroksidasyonu gibi oksidatif stres zararlarının başlamasını engellemektedir [38].

Yüksek Cr konsantrasyonlarında klorofil içeriğindeki azalma, klorofil biyosentezi ve klorofilaz aktivitesi ile ilişkilidir [37]. Krom, klorofil biyosentezinde görev alan önemli bir enzim olan δ-aminolevülinik asit dehidratazi (ALAD) degrade edebilmekte ve böylelikle δ-aminolevülinik asit (ALA) kullanımını etkileyerek bitki dokularında ALA birikimine ve klorofil içeriğinde azalmaya neden olmaktadır [69]. Bu sonuçlar, ALA sentezinin Cr stresine hassas olmadığını, buna karşın porfobilinojen (PBG) oluşumunun Cr stresine oldukça hassas olduğunu göstermektedir. Kromun genellikle hegzavalent formu birçok enzimin aktif bölgesindeki Mg iyonları ile yer değiştirmekte ve klorofil içeriğini azaltmaktadır [69]. Bir metalloenzim olan ALAD'ın aktivitesi, Mg iyonlarının kullanılabilirliğine bağlıdır [71]. Ayrıca, Cr stresi bitkilerde demir eksikliğine neden olarak klorofil biyosentezinde bozulmalara neden olmaktadır [45]. Demir eksikliği olan bitkilerde düşük Cr konsantrasyonları klorozun azalmasına [26] ve yüksek Cr konsantrasyonları demir klorozuna neden olmaktadır [72]. Bununla birlikte, Fe eksikliği hem grubu enzimlerin aktivitesini azaltmaktadır [73]. Hegzavalent Cr'a maruz kalan bitkilerde demir kullanımının kısıtlanmasından dolayı klorofil içeriğindeki azalma, porfirinlerin öncüsü olan glisin ve süksinil Co-A'dan ALA'nın sentezi, koproporfirinojenin protoporfirin IX'a oksidasyonu veya Mg protoporfirinin protoklorofillite dönüştürülmemesinden kaynaklanmaktadır [24].

3. Krom Stresi ve Reaktif Oksijen Türleri

Ağır metaller, bitkilerde stres cevabı olarak reaktif oksijen türlerinin (ROT'lar) oluşumunu teşvik etmektedir [74]. ROT'lar, serbest radikallerin en yaygın formu olan "serbest oksijen radikalleri"dir. Moleküler oksijen, aşırı enerjiyle eşleşmemiş elektronlarından birinin ters dönmesiyle aktive olabilmekte ve tekli oksijen (¹O₂) oluşmaktadır (Şekil 2). Bununla birlikte, moleküler oksijene bir, iki veya üç elektronun transferi sonrasında sırasıyla süperoksit anyonu

(O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) veya hidroksil radikali (OH^\cdot) meydana gelmektedir. Son aşamada OH^\cdot radikaline bir elektronun transferiyle birlikte su (H_2O) oluşmaktadır. Hidroperoksil radikali (HO_2^\cdot), O_2^- 'nin konjuge asidi olarak reaksiyonda yerini almaktadır [75]. Bununla birlikte, hücrelerde yükseltgenmiş formda bulunan metal iyonları (Fe^{+3} , Cu^{+2}), O_2^- varlığında indirgenmekte ve böylece Fenton ya da Haber-Weiss reaksiyonları aracılığıyla H_2O_2 'in OH^\cdot radikaline dönüşümü katalizlenmektedir (Şekil 2) [75].

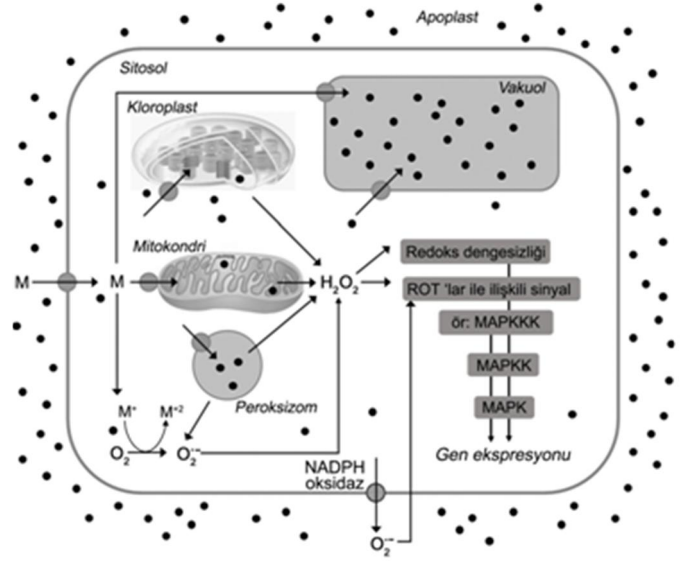


Şekil 2. Moleküler oksijenden (O_2) reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonu (Vranová ve ark. [75]'den değiştirilerek).

Hücredeki oksidatif stresin seviyesi reaktif oksijen türlerinin miktarı ile belirlenmektedir [76]. Abiyotik ve biyotik stresler tarafından oluşturulan metabolik dengesizliğe cevap olarak hücrel ROT üretimi artmakta ve sürdürülmektedir [77, 78]. Birçok abiyotik ve biyotik stresin ortak sonucu olan ROT'lar, Cr toksisitesinin sonucu olarak da oluşmaktadır [21, 60]. Cr(VI)'un toksik etkisi, hücre membranlarındaki sülfat kanallarından geçebilen negatif yüklü Cr(VI) iyon komplekslerinin etkisiyle oluşan ROT'lardan kaynaklanmaktadır [79]. Stres koşullarında ROT'ların artan üretimi hücreler için bir tehdit olabilmekte; fakat ROT'ların stres cevabı ve savunma yollarının aktivasyonunda bir sinyal molekülü olarak fonksiyon gördüğü düşünülmektedir [80]. Bu nedenle, ROT'ların hücrel stres indikatörleri ve stres-cevap sinyal iletim yollarında sekonder mesajcı olduğu belirtilmiştir [81].

Reaktif oksijen türleri kimyasal reaktivite, redoks potansiyeli, yarılanma ömrü ve hücrel kompartımanlar arasında hareketliliğe bağlı olarak hücre bileşenleri ile reaksiyona girmektedir [82]. Bitkilerde ROT'ların üretimi için kloroplast ve mitokondrilerin elektron transfer aktiviteleri ve peroksisomlardaki oksidatif metabolizma potansiyel kaynaklar olarak gösterilmektedir (Şekil 3). Diğer bir ifadeyle, ROT'ların üretimi fotosolunum, fotosentetik aparatlar ve mitokondriyal solunum gibi metabolik yollardan kaynaklanmaktadır [83, 84]. Ağır metaller taşıyıcılar tarafından hücre içine alınmakta ve ağır metal redoks aktivitesiyle veya subelüler bölgeye özgü şekilde metabolizmayı etkileyerek organellerde ROT'ların oluşumuna neden olmaktadır (Şekil 3). Plazma membranında lokalize olmuş NADPH oksidaz enziminin ağır metal bağımlı aktivasyonu da ROT'ların üretilmesine neden

olmaktadır. ROT'ların aşırı üretimi, bitki büyümesi inhibisyonuna ve hücre zararına neden olabilen redoks dengesizliklerine ve sinyal işlevlerinde (MAPK yolları gibi) bozukluklara neden olmaktadır (Şekil 3).



Şekil 3. Ağır metal bağımlı reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretim yolları. Siyah benekler, apoplastta ve hücre içinde ağır metal (M) dağılımını göstermektedir (Sharma ve Dietz [82]'den değiştirilerek).

Birçok ökaryotik organizmada olduğu gibi bitki hücrelerinin peroksisomları hücre-içi H_2O_2 üretiminin önemli merkezleridir. H_2O_2 okside edici ajan olarak fonksiyon görebilmekte ve Cr(III)'ü Cr(VI)'a okside edebilmektedir [85]. Diğer taraftan, L-sistein ve NADPH gibi biyolojik redüktanlar tarafından Cr(III) Cr(II)'a indirgenebilmektedir. Sonuçta, yeni oluşan Cr(II), köklerde doku zararına neden olan OH^\cdot radikali oluşturmak üzere H_2O_2 ile reaksiyona girmektedir [86]. Krom stresine maruz kalan darı ve bezelye bitkilerinin kök ve yapraklarında H_2O_2 seviyesinin arttığı bildirilmiştir [8, 46, 87]. Krom stresine maruz kalan birçok bitki türünde yüksek oranda H_2O_2 ve O_2^- radikallerinin oluştuğu ve bu metalin oksidatif stresin oluşumundan sorumlu olduğu bildirilmiştir [15, 21, 43, 60].

Mitokondriler tarafından metabolize edilen O_2 'in yaklaşık %1-5'i reaktif oksijen türlerine dönüştürülmektedir [78]. Bitkilerde toksik ve orta seviyedeki Cr'un mitokondrideki elektron transfer sistemine bağlandığı [38] ve eşleşmemiş elektron transfer zincirini inhiye ettiği [21] bildirilmiştir. Dixit ve ark. [21], Cr tarafından elektron transferindeki inhibisyonun, elektron taşıyıcılarındaki Cu ve Fe ile Cr'un etkileşime girmesinden kaynaklandığını belirtmiştir. Bu etkileşim elektron akışı sırasında redoks değişimlerine neden olmaktadır. Mitokondri sitokromları elektronları direkt olarak Cr'a transfer ederek Cr'u indirgemekte veya sitokromların indirgenmiş hem grupları Cr bağlanma bölgeleri olarak fonksiyon görmekte ve elektron transferini bloke edebilmektedir. Sitokrom oksidaz aktivitesinin aşırı inhibisyonu, kompleks IV'deki oksijen bölgesi olan sitokrom a_3 'e Cr'un bağlanmasından kaynaklanabilmektedir [21]. Diğer bir alternatif mekanizma mitokondrilerde süperoksit radikalinin üretimidir [75]. Farklı konsantrasyonlarda Cr uygulamalarına maruz kalan bezelye

bitkilerinde, kök mitokondrilerinin sitokrom b bölgesinde (kompleks III) süperoksit üretiminin arttığı belirtilmiştir [21].

Birçok hüresel işlev sırasında üretilebilen süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) bir dereceye kadar reaktif olup; biyolojik membranlardan geçememektedir [7]. Kloroplast ve mitokondrilere benzer olarak peroksizomlarda normal metabolizma sonucu $O_2^{\cdot-}$ radikallerini oluşturmaktadır. Diğer taraftan, ksantin oksidaz ve NADPH bağımlı oksidazın peroksizomal aktiviteleri $O_2^{\cdot-}$ 'i oluşturmakta ve glikolat oksidaz, flavin oksidaz ve β -oksidasyon ile katalaz tarafından metabolize edilen H_2O_2 üretilmektedir [88]. Ksantin oksidaz, ksantin ve hipoksantinün ürik aside oksidasyonunu katalizler ve iyi bilinen bir $O_2^{\cdot-}$ üreticisidir [86]. Krom stresi, bezelye köklerinde NADPH oksidaz aktivitesi ve NADPH bağımlı $O_2^{\cdot-}$ üretimini arttırmaktadır [46].

3.1 Lipit Peroksidasyonu

Bitkilerde Cr stresi, oksidatif strese ve lipit peroksidasyonuna neden olan reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olarak metabolik değişikliklere yol açmaktadır [1]. Hücre zarı lipitlerinin peroksidasyonu, membranların fonksiyonu ve bütünlüğünü olumsuz etkilemekte ve hücre fonksiyonunda geri dönüşümsüz zarara neden olabilmektedir [21].

Lipit peroksidasyonu hücre membranı ve yapısında bulunan doymamış yağ asitlerinin oksidasyonudur. Bu yağ asitlerinin peroksidasyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkan malondialdehit (MDA) gibi sitotoksik aldehitler DNA ve proteinler üzerinde önemli zararlara neden olmaktadır. MDA içeriği, lipit peroksidasyonunun bir indeksi olarak kabul edilmekte ve yüksek seviyede MDA birikimi aşırı lipit peroksidasyonunu göstermektedir [38]. Krom stresine maruz kalan pirinç, darı ve hardal bitkilerinin kök ve yaprak dokularında MDA içeriğinin arttığı ve bu artışın yüksek $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 içeriği ve oldukça toksik olan OH^{\cdot} radikali ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [7, 15, 47, 87].

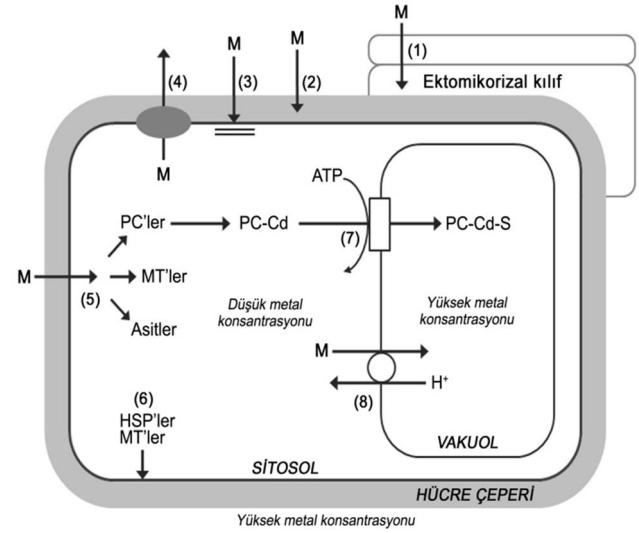
Krom stresine bağlı olarak lipit peroksidasyonunda bir artışın olduğu bildirilmiştir [15, 21, 47]. Panda ve ark. [61], buğdayda farklı Cr konsantrasyonlarının (1, 10 ve 100 mM) lipit peroksidasyonunu başlattığı ve malondialdehit miktarının konsantrasyon ve sürenin artmasına bağlı olarak arttığını bildirmiştir. Krom stresi uygulanmış bezelye köklerinde, membranların zarar görmesinin sonucu olarak elektrolit sızıntısının özellikle 200 μ M Cr(VI) uygulamasında lipit peroksidasyonuna bağlı olarak arttığı bildirilmiştir [46]. Farklı Cr(VI) konsantrasyonu ve uygulama sürelerine maruz bırakılan pirinç bitkilerinin köklerinde MDA içeriğinin zamanın bir fonksiyonu olarak arttığı bildirilmiştir [15].

Hekzavalent Cr'a maruz kalan *Amaranthus viridis* bitkisinde MDA içeriğinin Cr birikimindeki artışla paralellik gösterdiği bildirilmiştir [16]. Buğday bitkisinin yaprak dokusunda MDA içeriğinin Cr(VI) konsantrasyonları (0.10, 0.15 ve 0.25 mM) ve sürelerinin (8 ve 14 sa) artışına bağlı olarak arttığı rapor edilmiştir [54]. Farklı konsantrasyon (0-200 μ M) ve sürelerde (1-7 gün) Cr(VI) stresine maruz bırakılan hiperakümülatör *Brassica juncea*'nın *Vigna radiata*'ya göre daha fazla Cr biriktirdiği, buna karşın *Brassica juncea*

gövdesinde MDA içeriğinin daha düşük oranda (%) arttığı bildirilmiştir [90]. Alüminyuma toleranslı Gebenia ve hassas Shang 70-119 arpa çeşitlerinde 100 μ M Cr(VI) uygulamasının kök ve yaprak dokularında MDA içeriğini arttırdığı ve bu artışın hassas çeşitte nispeten daha fazla olduğu bildirilmiştir [9]. Diğer taraftan, Cr stresinin sucul makrofit *Salvinia natans* bitkisinin MDA içeriğinde değişikliğe neden olmadığı bildirilmiştir [57]. Krom stresine bağlı olarak lipit peroksidasyonundaki artışa reaktif oksijen türlerinin üretimindeki artış neden olmaktadır [15, 38].

4. Krom Detoksifikasyon Mekanizmaları

Bitkiler ağır metallerin detoksifikasyonu ve bu metallere karşı toleransı sağlayan birçok kompleks hüresel mekanizmaya sahiptir. Ağır metallerin köklerden salınan organik asitler tarafından tutulması, metal bağlayıcı ligandlar olarak adlandırılan metalloitiyoneinler (MT'ler) tarafından ağır metal iyonlarının şelatlanması ve alıkonulması, metal stresi ile ilişkili proteinler (Şekil 4), antioksidant enzimler, prolin birikimi ve alternatif oksidaz yolu bu mekanizmalar arasında gösterilmektedir [11, 17, 81].



Şekil 4. Bitki hücrelerinde ağır metal detoksifikasyonu ve toleransında potansiyel mekanizmalar. (1) Mikorizalar tarafından köklere metal hareketinin azaltılması. (2) Hücre çeperi ve kök salgılarına bağlanma. (3) Plazma membranı tarafından hücre içine ağır metal alımının azaltılması. (4) Apoplasta aktif olarak ağır metallerin atılması. (5) Çeşitli ligandlar ile ağır metallerin sitosolde şelatlanması. (6) Plazma membranının korunması ve onarımı. (7) Vakuollere PC-Cd komplekslerinin transportu. (8) Ağır metallerin vakuolde biriktirilmesi (Marschner [24]'den değiştirilerek).

4.1 Organik Asitler

Kökler, toprakta çözünmez formda bulunan metallere bağlanan organik asitler içermektedir. Sitrik asit ve malik asit gibi karboksilik asitler ve histidin gibi amino asitler metaller için potansiyel ligandlardır ve detoksifikasyon ve toleransta önemli rol oynayabilmektedir [91, 92]. Al^{+3} ve Ni^{+2} detoksifikasyonunun düzenlenmesinde sitrik asidin rolü açıkça belirlenmiştir [93]. Bununla birlikte, organik asitler

toprakta hareketsiz halde bulunan metallerin ekstraksiyonunun artırılmasında kullanılmaktadır [94]. Kök sızıntıları, eser metallerle kompleksler oluşturan ve bu metallere redoks davranışlarını etkileyen önemli ajanlardır [95, 96]. Kök sızıntıları Cr bileşikleriyle kompleksler oluşturarak bitki alınımı için kullanılabilir hale getiren organik asitler içermektedir [97].

Lycopersicon esculentum bitkilerinde karboksilik asit ve amino asitlerin varlığında Cr alınımının arttığı gösterilmiştir [98]. Bununla birlikte, amino asitlerin Cr transportunda daha az etkili olduğu bulunmuştur [98]. Sitrik asit, aspartik asit ve oksalik asit gibi organik asitler inorganik Cr'u bağlı Cr'a dönüştürerek daha uzun süre çözünebilir ve dolayısıyla bitki için kullanılabilir hale getirmektedir [97]. Krom stresine maruz kalan pirinç bitkilerinin kök dokularından salınan oksalik, malik ve sitrik asidin rizosfer pH'ını artırdığı ve bu durumun Cr birikimini artırdığı bildirilmiştir [99]. Bununla birlikte, *Albizia amara*, *Casuarina equisetifolia*, *Tectona grandis* ve *Leucaena leucocephala* gibi bazı ağaç türlerinde 20 mM sitrik asit uygulamasının kök dokusunda Cr(III) ve Cr(VI) birikimini artırdığı bildirilmiştir [1]. Benzer olarak, Cr stresine maruz kalan *Datura innoxia* bitkilerinde sitrik asidin Cr alınım ve birikimini arttıran bir şelatör olduğu bildirilmiştir [100].

4.2 Antioksidant Enzimler

Birçok aerobik organizmada, çevresel streslerin sonucu olarak oluşan toksik reaktif oksijen türlerinin (ROT'lar) etkin şekilde elimine edilmesi gerekmektedir. Hücreler fraksiyonlardaki ROT'ların seviyesi, çoklu ROT üreten metabolik yollar (solunum, fotosentez, NADPH oksidaz, amin oksidaz ve hücre çeperine bağlı peroksidad) ve temel ROT döngüsünü oluşturan temizleme mekanizmaları arasındaki etkileşim ile belirlenmektedir [81, 101].

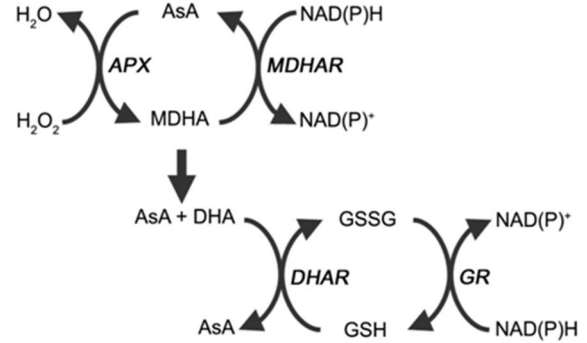
Reaktif oksijen türlerinin seviyesini kontrol etmek ve hücreleri oksidatif zarardan korumak için bitkiler tarafından geliştirilen karmaşık antioksidant savunma sistemi çeşitli enzimleri ve enzimatik olmayan molekülleri içermektedir [75]. Bitkilerdeki antioksidant enzimler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidad (APX), guaiakol peroksidad (POD), glutatyon redüktaz (GR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) gibi düşük molekül ağırlıklı enzimleri içermektedir [102]. Diğer taraftan, indirgenmiş glutatyon (GSH), askorbik asit (AsA), α -tokoferol, lipoik asit, antosiyanin ve karotenoidler gibi enzimatik olmayan antioksidantların oksidatif strese karşı koruma sağladığı bilinmektedir [103].

Süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzimlerinin teşviki ve aktivasyonu bitkilerdeki önemli metal detoksifikasyon mekanizmalarından biridir [1]. SOD ve CAT enzimlerinin kombine etkisi oksidatif stresin etkilerini hafifletmede önemlidir. Çünkü SOD enzimi $O_2^{\cdot-}$ 'in diğer bir reaktif aracı olan hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürülmesinde ve peroksisomlarda lokalize olan ve hem grubu içeren CAT enzimi ise H_2O_2 'in H_2O ve O_2 'e dönüştürülmesinde etkilidir [101, 104]. Düşük Cr(VI) konsantrasyonu (1 μ M) uygulamalarının kök ve yaprak dokusunda SOD aktivitesinde önemli artışa neden olması, bu enzimin savunma mekanizmasındaki rolünü göstermektedir. Katalaza benzer olarak peroksidazlar (APX ve POD),

H_2O_2 'in temizlenmesinde fonksiyon görmektedir; fakat bu temizlemeyi çeşitli organik ve inorganik indirgenmiş ko-substratların (askorbik asit, glutatyon) oksidasyonu ile gerçekleştirmektedir [81].

Kloroplastlar ve diğer hücreler bileşenlerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunan askorbik asit (AsA) ve glutatyon (GSH) gibi antioksidantlar bitkilerin oksidatif strese karşı olan savunma sisteminde oldukça önemlidir [102]. Bitkilerde yüksek seviyede indirgenmiş/yükseltgenmiş AsA ve GSH oranlarının sürdürülmesi hücrelerde etkin şekilde ROT'ların temizlenmesi için zorunludur. Bu oran indirgeyici güç olarak NADPH kullanan glutatyon redüktaz (GR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) enzimleri tarafından sağlanmaktadır (Şekil 5) [81, 102]. Bitkilerde GSH, H_2O_2 seviyesinin kontrol edilmesinde fonksiyon görmektedir [103].

Artan stres koşullarında zamana bağlı olarak gözlenen daha yüksek GR aktivitesine karşın indirgenmiş glutatyon (GSH) ve toplam glutatyonun tüketimi artmaktadır. Aynı zamanda, askorbik asidi oluşturan DHAR ile GSH'un okside glutatyona (GSSG) dönüşümünün artmasıyla antioksidant savunma mekanizması gerçekleşmektedir. DHAR ile üretilen askorbik aside ilave olarak MDHA'nın orantısız, enzimatik olmayan dönüşümü ile oluşturulan askorbik asit, APX tarafından H_2O_2 'in direkt olarak detoksifikasyonunda kullanılabilir (Şekil 5) [81]. Ağır metal stresinde, APX ekspresyonunun artışında GSH bir sinyal aracı olarak fonksiyon görmektedir [105].



Şekil 5. Bitkilerde ROT uzaklaştıran askorbat-glutasyon döngüsü (Mittler [81]'den modifiye edilerek alınmıştır).

Bazı antioksidant enzimlerin (SOD, CAT, APX, GPX ve GR) aktivitesi üzerine Cr stresinin etkisi bazı bitki türlerinde değerlendirilmiştir [15, 54, 61, 67]. Pirinç bitkisinde 50-100 μ M Cr(VI) uygulamalarının kök dokusunda SOD aktivitesini artırdığı, buna karşın GPX ve GR aktivitesinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir [15]. Bununla birlikte, 14 gün süreyle 0.10, 0.15 ve 0.25 mM Cr(VI) stresine maruz kalan buğday fidelerinin gövde dokusunda SOD aktivitesinin arttığı; ancak CAT, APX ve GR aktivitesinin azaldığı saptanmıştır [54]. Buğdayın kök ve gövde dokusunda SOD ve CAT aktivitesinin azaldığı ve POD aktivitesinin kök dokusunda azaldığı, ancak gövde dokusunda arttığı bildirilmiştir [106]. Panda ve ark. [61], buğday fidelerinin yaprak dokusunda SOD aktivitesinin düşük konsantrasyonlardaki (0.1 ve 1 mM) Cr uygulamalarında artarken yüksek konsantrasyonlarda (10 ve 100 mM) azaldığını; fakat CAT aktivitesinin tüm Cr uygulamalarında

azaldığını belirtmiştir. Ganesh ve ark. [107], sucul *Pistia stratiotes* bitkilerinin kök ve yaprak dokularındaki peroksidaz aktivitesinin Cr(VI) konsantrasyonundaki (5-200 ppm) artışla önemli düzeyde arttığını, buna karşın CAT aktivitesinin azaldığını rapor etmiştir. Sucul *Salvinia natans* bitkilerinin yaprak dokusunda APX, POD, GR, MDHAR ve DHAR aktivitesinin Cr stresine bağlı olarak arttığı, CAT aktivitesinin ise değişmediği bildirilmiştir [57]. Dixit ve ark. [21], bezelye köklerinde 20 µM Cr(VI) uygulamasının SOD aktivitesini arttırdığı, 200 µM Cr(VI) uygulamasının ise SOD aktivitesinde önemli bir inhibisyona neden olduğunu bildirmiştir. Krom stresine karşı hassas mung fasulyesi çeşitlerinde (PDM-54 ve Sujata) SOD, CAT ve APX aktivitesinin belirgin bir şekilde arttığı, buna karşın toleranslı çeşitlerde (TARM-22 ve K-851) ise enzim aktivitelerinin azaldığı rapor edilmiştir [67]. Diğer taraftan, 1.5 ppm Cr stresine maruz kalan *Echinochloa colona* bitkilerinde CAT ve APX aktivitesinin hassaslara göre toleranslı kalluslarda daha yüksek olduğu bildirilmiştir [108]. Alüminyuma toleranslı Gebenia ve hassas Shang 70-119 arpa çeşitlerinde 100 µM Cr(VI) uygulamasının kök ve yaprak dokularında SOD, APX, POD, CAT ve GR aktivitelerinde önemli artışa neden olduğu bildirilmiştir [9]. Diwan ve ark. [90], farklı konsantrasyon (0-200 µM) ve sürelerde (1-7 gün) Cr(VI) stresine maruz bırakılan ve fazla Cr biriktiren *Brassica juncea* ve daha az Cr biriktiren *Vigna radiata* bitkilerinde SOD ve CAT aktivitesinin arttığını bildirmiştir. Bununla birlikte, APX ve GR aktivitesinin *B. juncea* bitkisinde tüm Cr(VI) uygulamalarında arttığı, buna karşın *V. radiata* bitkisinde sadece bir günlük uygulama süresinin sonunda arttığı belirlenmiştir. Cr(III) ve Cr(VI) stresine maruz kalan *Vigna mungo* L. Hepper cv. Co4 köklerinde CAT enziminin H₂O₂ indirgenmesine katılmadığı, buna karşın SOD enziminin O₂⁻'in temizlenmesinde aktif olarak fonksiyon gösterdiği bildirilmiştir [43]. Aynı araştırmacılar, Cr(III) ve Cr(VI) stresine maruz kalan bitkilerde oluşan H₂O₂'in parçalanmasında APX aktivitesinin CAT enzimine göre daha etkin olduğunu belirtmişlerdir. Bu durum, Willekens ve ark. [109] tarafından APX'in bir hücreyi baştanbaşa geçebilmesi ve bir indirgeyici olan askorbik asit varlığında yüksek substrat afinitesine sahip olmasına karşın, CAT'ın peroksizomlarda lokalize olması ve düşük substrat afinitesine sahip olması ile açıklanmıştır. *Vigna mungo* köklerinde 100 µM Cr(VI) uygulamasının zamana bağlı olarak DHAR, MDHAR ve GR aktivitelerinde önemli artışa neden olduğu rapor edilmiştir [43]. Bu araştırma sonuçlarına göre Cr(III) veya Cr(VI) uygulanmış *Vigna mungo* köklerinde MDHAR aktivitesinde bir artış olmamasına karşın, DHA içeriğinde önemli bir artış olmasının nedeni Noctor ve Foyer [102] tarafından bildirildiği gibi bu metabolitin enzimatik olmayan yolla oluşmasıdır. Bu durum monodihidroaskorbatın (MDHA) kısa ömürlü olmasından veya Cr tarafından MDHAR enziminin inhibisyonundan kaynaklanabilmektedir [43]. Cr(VI) stresi altında DHAR aktivitesindeki artış, bu enzimin ve dolayısıyla AsA konsantrasyonunda artışla sonuçlanan aşırı ROT üretimi ile ilişkili olabilmektedir. Cr(VI) uygulamalarında artmış AsA içeriği DHAR enziminin döngüsel fonksiyonu ile açıklanabilmektedir [43].

Reaktif oksijen türlerinin (serbest radikal) oluşumu ve savunma mekanizmaları arasındaki denge, bitkilerin yaşam döngülerini sürdürebilmeleri için oldukça önemlidir. Antioksidant enzimlerin aktivitesindeki artış, elektron taşıma zincirinin Cr-teşvikli inhibisyonu ile oluşan serbest

radikallere direkt bir cevap olabilmektedir. Bununla birlikte, Cr konsantrasyonunun artışına bağlı olarak antioksidant enzimlerin aktivitesindeki azalma enzim sistemleri üzerine Cr iyonlarının inhibe edici etkisinden kaynaklanabilmektedir [1].

4.3 Prolin Birikimi

Bitkilerde prolin birikiminin tuzluluk, kuraklık, yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık, ağır metal, patojen enfeksiyonu, besin kıtlığı, atmosferik kirlenme ve UV ışımaya gibi stres durumlarında genellikle arttığı bildirilmiştir [31, 110, 111]. Prolinin ağır metal stresi sonucu oluşan reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunda fonksiyon göreyerek stresi azalttığı vurgulanmıştır [112].

Bitkilerde yaygın olarak bulunan ve diğer amino asitlere oranla daha fazla miktarda biriken prolin, kullanılabilir azot birikimini düzenlemektedir [113]. Bitki dokularında prolin birikimi, (1) prolin degradasyonundaki azalma, (2) prolin biyosentezindeki artma, (3) protein sentezindeki veya prolin kullanımındaki azalma, (4) proteinlerin hidrolizinden kaynaklanabilmektedir [114].

Lipit peroksidasyonunun neden olduğu hücre zararı, membran geçirgenliğini değiştirerek su stresine benzer koşullar oluşturmada ve bu durum prolin sentezini teşvik etmektedir [115]. Şelatlama özelliği ile prolinin metal iyonlarını bağlayabilmesi, bitkilerin ağır metal stresi altında hayat döngülerini tamamlayabilmesine katkıda bulunmaktadır [116]. Prolinin, proteinlerin yapısını stabilize eden moleküler şaperonlar olarak fonksiyon gördüğü ve prolin birikiminin sitosolik pH'ı ve hücrenin redoks durumunu dengede tutabildiği düşünülmektedir. Prolin birikimi stres cevabını etkileyen stres sinyalinin bir parçası olabilmektedir [117, 118].

Prolin Cr gibi birçok ağır metal stresine cevap olarak yüksek miktarlarda bitki dokularında birikmektedir [31, 119]. Krom stresine maruz kalan *Datura innoxia*'nın kök ve yaprak dokusunda prolin birikiminin Cr konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı ve bu artışın Cr(III)'a göre Cr(VI) uygulamasında daha fazla olduğu bildirilmiştir [31]. Aynı araştırmacılar, prolin birikiminin Cr toleransının bir göstergesi olmadığı, aksine Cr toksisitesinin bir semptomu olduğunu ileri sürmüştür. Diğer taraftan, Cr'a toleranslı soya fasulyesi (*Glycine max* L. Merr.) genotiplerinde prolin içeriğinin yüksek olduğu ve Cr konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak prolin içeriğinin kademeli olarak arttığı belirtilmiştir [119]. Ozmotik düzenleme, sitoplazmik enzimlerin korunması, stres sonrası büyüme için karbon ve azot kaynağı olması, membranların daha kararlı hale getirilmesi, protein sentezinde görev alması ve redoks potansiyeli düzenlenmesi gibi birçok fonksiyona sahip olmasından dolayı prolin birikimi Cr toksisitesinin üstesinden gelebilmek için bitkiler tarafından geliştirilmiş bir adaptasyon stratejisi olarak düşünülmektedir [59, 119].

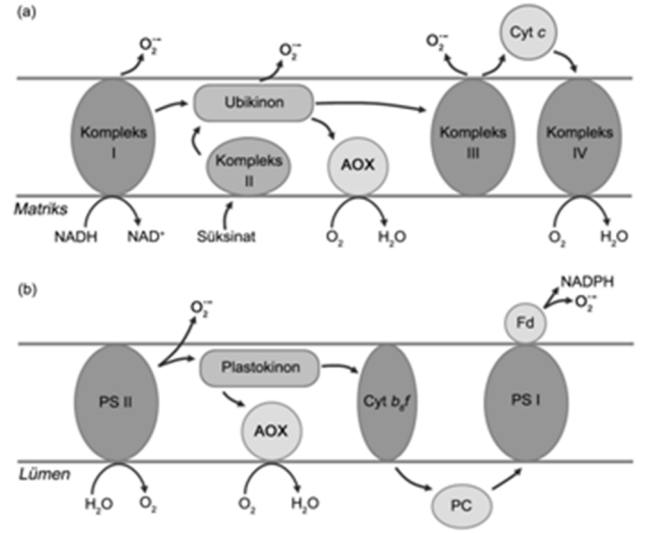
4.4 Metallotiyoneinler: Metal Bağlayıcı Ligandlar

Metallotiyoneinler (MT'ler) mRNA translasyon ürünleri olup; sisteyince zengin düşük moleküler ağırlıklı metal bağlayıcı proteinlerdir [120]. Metallotiyoneinlerin bir sınıfı olan fitoşelatinler (PC'ler) ise gen ürünü olmayıp, yüksek oranda metal derişimlerine maruz kalan bitkilerde fitoşelatin

sentetaz enzimi ile glutatyondan sentezlenen polipeptidlerdir [18]. MT'lerin antioksidantlar gibi fonksiyon yaparak metal metabolizmasında veya plazma membranlarının onarım mekanizmalarında rol oynadıkları düşünülmektedir [121]. Krom stresi sonucu oluşan reaktif oksijen türleri, MT'lerin sentezini teşvik eden sinyal molekülleri olarak rol oynayabilmektedir. MT'ler bitkilerde Cr detoksifikasyonunda muhtemel bir role sahiptir ve Cr stresine maruz kalan *Sorghum* çeşitlerinde (duyarlı K 10 ve tolerant CO 27) MT benzeri proteinlerin eksprese edildiği rapor edilmiştir [35]. Aynı araştırmacılar, Cr'a toleranslı ve hassas *Sorghum* çeşitlerinde MT3 geninin ekspresyonu üzerine Cr(VI) etkisini değerlendirdiğinde, hassas çeşide göre toleranslı çeşitte ilgili gene ait bant yoğunluğunun daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Bu durum, Cr stresine karşı toleranslı çeşitte MT geninin yüksek transkripsiyon oranına sahip olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Cr uygulaması sonucu oluşan reaktif oksijen türlerinin, MT mRNA transkripsiyonunu teşvik eden tetikleyici bir sinyal olabileceği ileri sürülmüştür [35]. Hezavalent Cr'a maruz bırakılan *Brassica juncea* ve *Vigna radiata* bitkilerinin kök ve gövde dokularında PC içeriğinin arttığı ve PC'lerin, sentezlenen antioksidant enzimlerle birlikte Cr toleransına katkıda bulunabileceği bildirilmiştir [90]. Benzer olarak, mısır bitkilerinde Cr konsantrasyonunun artışına bağlı olarak MT'lerin seviyesindeki artışın Cr stresine karşı tolerans sağladığı bildirilmiştir [121]. MT'ler Cr iyonlarına bağlanıp, onları non-toksik hale getirerek bitkilerdeki Cr detoksifikasyonunda önemli bir rol oynamaktadır [38]. Cd, Hg ve Cu gibi ağır metaller ile mukayese edildiğinde bitkilerde Cr detoksifikasyonunda MT'lerin rolü ile ilgili olarak ilave çalışmalara gereksinim vardır.

4.5 Alternatif Oksidaz Yolu

Bitkilerde mitokondriyal solunum, sitokrom yolu ve alternatif oksidaz (AOX) olarak adlandırılan alternatif bir yoldan oluşmaktadır [122]. Reaktif oksijen türlerinin üretimi, alternatif oksidaz (AOX) tarafından kloroplast ve mitokondriyal elektron transport zincirindeki elektronların alternatif bir yola sokulmasıyla azaltılabilmektedir. AOX, elektron transport zinciri boyunca hareket eden elektronları saptırmakta ve bu elektronları, oksijenin suya indirgenmesinde kullanmaktadır (Şekil 6). Böylelikle, O_2 'nin $O_2^{\cdot-}$ 'e indirgenmesi için gerekli elektronların önlenmesi ve ROT'ların oluşumu için substrat olan O_2 'nin seviyesinin azaltılması ile ROT üretimi azalmaktadır. Mitokondriyal AOX miktarındaki azalma bitkilerin oksidatif strese hassasiyetini arttırmaktadır [123]. AOX, sitosolik enerji yükünün yüksek olduğu durumlarda Krebs döngüsünün sürdürülmesi veya oksidatif strese karşı hücrelerin korunmasında muhtemel bir role sahiptir [124]. APX ve/veya CAT enzimlerinden yoksun transjenik bitkilerde ve aşırı ışığa maruz kalan normal bitkilerde kloroplastik AOX'un teşvik edildiği belirtilmiştir [125]. Hezavalent Cr'un farklı konsantrasyonlarına (0–10 mg L⁻¹) maruz kalan *Salvinia minima* bitkilerinin yapraklarında AOX kapasitesinin arttığı bildirilmiştir [58]. Ağır metal stresi, alternatif solunum yolunun çalışma kapasitesini artırmasına karşın [58, 126], AOX ile ağır metal stresi arasındaki ilişki hakkında çok az bilgi mevcuttur [127].



Şekil 6. Reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunun önlenmesinde alternatif oksidazın (AOX) fonksiyonu. (a) Mitokondri ve (b) kloroplasttaki elektron transfer zincirinde, O_2 'nin $O_2^{\cdot-}$ 'e indirgenmesinde kullanılan elektronlar AOX tarafından alınmakta ve bu elektronlar O_2 'nin H_2O 'ya indirgenmesinde kullanılmaktadır (Mittler [81]'den değiştirilerek).

4.6 Ağır Metallerle İlişkili Stres Proteinleri

Ağır metal stresine karşı hücrel cevaplarla ilişkili olarak metalloproteinler [128], tiyoredoksinler [129], glutatyon metabolizmasının proteinleri [130], antioksidant enzimler [131] ve sıcaklık şoku proteinleri [132] gibi ağır metal teşvikli genlerin teşhisi, ağır metal detoksifikasyonu ve toleransı bakımından önemli katkılar sağlamıştır.

Ağır metallerle maruz kalan bitkilerde sıcaklık şoku proteinlerinin (Heat Shock Proteins, HSP'ler) artan üretiminin bir ağır metal cevabı olduğu bildirilmiştir [11]. Moleküler ağırlıkları 10 ila 70 kDa arasında değişen birçok stres proteininin ağır metallerce teşvik edildiği belirtilmiştir [133]. Sıcaklık şoku proteinleri, birçok abiyotik stres sırasında zarar gören proteinlerin korunması, onarımı ve/veya degradasyonunda fonksiyon gören genel stres proteinleridir [134-136].

Ağır metallerle cevap olarak HSP70 ve küçük HSP'lerin biriktiği ve bu proteinlerin hücre membranlarının korunmasında fonksiyon gördüğü belirtilmiştir [11]. İlginç olarak, ağır metal stresinden önce kısa süreli yüksek sıcaklık uygulamasının membran zararını engelleyerek ağır metal toleransını teşvik ettiği rapor edilmiştir [137]. Pirinç bitkilerinde düşük moleküler ağırlıklı HSP (16-20 kDa) mRNA seviyelerinin yüksek sıcaklık ve ağır metal stresinde arttığı bildirilmiştir [138]. Bununla birlikte, *Armeria maritima*, *Silene vulgaris* ve *Lycopersicon peruvianum* bitkilerinde HSP17'nin ağır metal stresine cevap olarak biriktiği bildirilmiştir [137-139]. Krom stresine maruz kalan domates fidelerinde sıcaklık şoku proteini HSP90-1'e ait genin ekspresyon seviyesinin arttığı ve HSP90-1 proteini hasarının iyileştirilmesi ve hücrel dengenin korunmasında rol oynadığı belirtilmiştir [140]. Sıcaklık şoku proteinleri (HSP), hücrel fonksiyonların yerine getirilmesinde görev yapan normal proteinlerin katlanmasında moleküler

şaperonlar olarak fonksiyon görmekte ve supramoleküler yapıların oluşturulmasında veya polipeptitlerin çökmesinin engellenmesinde önemli fizyolojik rol oynayabilmektedir [141].

Abiyotik ve biyotik streslere cevap olarak ifade edilen gen veya proteinlerin teşhisi stres toleransı ile ilişkili moleküler mekanizmaların anlaşılması için temel basamağı oluşturmaktadır. Ağır metallerle maruz kalan bitkilerde proteomik çalışmalara az rastlanmaktadır [121, 142]. Bu çalışmalarda, bitkilerin metal toleransında GSH-bağımlı yol ile ilişkili proteinler, antioksidant proteinler ve HSP'lerin önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Labra ve ark. [121], 300 ppm $K_2Cr_2O_7$ uygulamasına maruz kalan mısır fidelerinde antioksidant, detoksifikasyon ve glikolitik yol ile ilişkili proteinlerin seviyesinde artış olduğu saptanmıştır. Ayrıca, mısır fidelerinde Cr stresinin bir sonucu olarak seviyelerinde artış belirlenen glioksalaz I enziminin ve metallothioneinlerin Cr'un detoksifiye edilmesinde rol oynadığı bildirilmiştir [121].

5. Sonuç

Bitkiler, hücresel seviyede ağır metallerin detoksifikasyonu ve toleransını kapsayan bir dizi potansiyel mekanizmaya sahiptir [143]. Bitkilerin ağır metallerle cevabı ile ilişkili bazı genlerin teşhisi moleküler yaklaşımlar ile ortaya konmuştur. Kromun fizyolojik etkileri ile birlikte Cr alınımı, taşınımı, birikimi, detoksifikasyonu ve toleransını içeren temel mekanizmaların anlaşılması, Cr ile kirlenmiş alanların fitoremediasyonu için oldukça önemlidir. Bununla birlikte, Cr ile kirlenmiş alanların etkin şekilde fitoremediasyonu için kullanılacak hiperakümülatör türlerin belirlenmesi, bu bitkilerin Cr stresine karşı gösterdikleri biyokimyasal ve moleküler cevapların hücresel düzeyde araştırılarak ağır metal detoksifikasyonu ve toleransında fonksiyon gören metallothioneinler ve diğer stres proteinlerini ifade eden genlerin teşhisi önemli olacaktır. Gelecek araştırmalarda, ağır metal detoksifikasyonu ve toleransı mekanizmalarının aydınlatılmasında ağır metal, hiperakümülatör bitki ve fitoremediasyon kapsamında proteomik ve genomik çalışmaların yapılması önemli veriler sağlayacaktır.

Kaynaklar

- Shanker, A.K., et al., Chromium Toxicity in Plants, Environ. Int., 31, 739-753, 2005.
- Niess, D.H., Microbial Heavy-Metal Resistance, App. Microbiol. Biotechnol., 51, 730-750, 1999.
- Benavides, M.P., et al., Cadmium Toxicity in Plants, Braz. J. Plant Physiol., 17, 21-34, 2005.
- Cervantes, C., et al., Interactions of Chromium with Micro-Organisms and Plants, FEMS Microbiol. Rev., 25, 335-347, 2001.
- Kimbrough, D.E., et al., A Critical Assessment of Chromium in the Environment. Crit. Rev. Env. Sci. Technol., 29, 1-46, 1999.
- Vajpayee, P., et al., Chromium Induced Physiological Changes in *Vallisneria spiralis* L. and Its Role in Phytoremediation of Tannery Effluent, B. Environ. Contam. Tox., 67, 246-256, 2001.
- Choudhury, S., Panda, S.K., Toxic Effect, Oxidative Stress and Ultrastructural Changes in Moss *Taxitheelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under Lead

- and Chromium Toxicity. Water Air Soil Poll., 167, 73-90, 2005.
- Pandey, V., et al., Chromium Effect on ROS Generation and Detoxification in Pea (*Pisum sativum*) Leaf Chloroplasts, Protoplasma, 236, 85-95, 2009b.
- Ali, S., et al., The Ecotoxicological and Interactive Effects of Chromium and Aluminum on Growth, Oxidative Damage and Antioxidant Enzymes on Two Barley Genotypes Differing in Al Tolerance, Environ. Exp. Bot., 70, 185-191, 2011.
- Zayed, A.M., Terry, N., Chromium in the Environment: Factors Affecting Biological Remediation, Plant Soil, 249, 139-156, 2003.
- Hall, J.L., Cellular Mechanisms for Heavy Metal Detoxification and Tolerance, J. Exp. Bot., 53, 1-11, 2002.
- Ekmekçi, Y., et al., Effects of Cadmium on Antioxidant Enzyme and Photosynthetic Activities in Leaves of Two Maize Cultivars, J. Plant Physiol., 165, 600-611, 2008.
- Rout, G.R., et al., Differential Chromium Tolerance Among Eight Mung Bean Cultivars Grown in Nutrient Culture, J. Plant Nutr., 20, 341-347, 1997.
- Sinha, S., et al., Chromium Induced Lipid Peroxidation in The Plants of *Pistia Stratiotes* L., Role of Antioxidants and Antioxidant Enzymes, Chemosphere, 58, 595-604, 2005.
- Panda, S.K., Chromium-Mediated Oxidative Stress and Ultrastructural Changes in Root Cells of Developing Rice Seedlings, J. Plant Physiol., 164, 1419-1428, 2007.
- Liu, D.H., et al., Hexavalent Chromium Uptake and Its Effects on Mineral Uptake, Antioxidant Defence System and Photosynthesis in *Amaranthus viridis* L., Bioresource Technol., 99, 2628-2636, 2008.
- Cobbett, C., Goldsbrough, P.B., Phytochelatin and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis, Annu. Rev. Plant Biol., 53, 159-182, 2002.
- Cobbett, C.S., Phytochelatin Biosynthesis and Function in Heavy-Metal Detoxification, Curr. Opin. Plant Biol., 3, 211-216, 2000.
- Rascio, N., Navari-Izzo, F., Heavy Metal Hyperaccumulating Plants: How and Why Do They Do It? And What Makes Them So Interesting? Plant Sci., 180, 169-181, 2011.
- Han, F.X., et al., Phytoavailability and Toxicity of Trivalent and Hexavalent Chromium to *Brassica juncea*, New Phytol., 162, 489-499, 2004.
- Dixit, V., et al., Chromium Ions Inactivate Electron Transport and Enhance Superoxide Generation *in vivo* in Pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) Root Mitochondria, Plant Cell Environ., 25, 687-690, 2002.
- Strlic, M., et al., A Comparative Study of Several Transition Metals in Fenton Like Reaction System at Circum-Neutral pH. Acta Chim. Slov., 50, 619-632, 2003.
- Lindberg, S., et al., Atmosphere-Surface Exchange of Mercury in A Forest: Results of Modeling and Gradient Approaches, J. Geophys. Res., 97: 2519-2528. 1992
- Marschner, H., Mineral Nutrition of Higher Plants, London, Academic Press, 2002.
- Greger, M., Metal Availability and Bioconcentration in Plants, pp.1-27, In: Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J.,

- (Eds), Heavy Metal Stress in Plants-From Molecules to Ecosystems. Springer, Berlin, 1999.
26. Zayed, A.M., et al., Chromium Accumulation, Translocation and Chemical Speciation in Vegetable Crops, *Planta*, 206, 293-299, 1998.
 27. Howe, J.A., et al., Localization and Speciation of Chromium in Subterranean Clover Using XRF, XANES, and EPR Spectroscopy, *Environ. Sci. Technol.*, 37, 4091-4097, 2003.
 28. Wallace, A., et al., Some Effects of Chromium Toxicity on Bush Bean Plants Grown in Soil, *Plant Soil*, 44, 471-473, 1976.
 29. Skeffington, R.A., et al., Chromium Uptake and Transport in Barley Seedlings *Hordeum vulgare*, *Planta*, 132, 209-214, 1976.
 30. Ramachandran, V., et al., Uptake and Transport of Chromium in Plants, *J. Nucl. Agric. Biol.*, 9, 126-129, 1980.
 31. Vernay, P., et al., Effect of Chromium Species on Phytochemical and Physiological Parameters in *Datura innoxia*, *Chemosphere*, 72, 763-771, 2008.
 32. Gardea-Torresdey, J.L. et al., Bioaccumulation of Cadmium, Chromium and Copper by *Convolvulus arvensis* L., Impact on Plant Growth and Uptake of Nutritional Elements, *Bioresource Technol.*, 92, 229-235, 2004.
 33. Golovatyj, S.E., et al., Effect of Levels of Chromium Content in a Soil on Its Distribution in Organs of Corn Plants, *Soil Res. Fertil.*, 99, 197-204, 1999.
 34. Huffman, E.W.D., Allaway, H.W., Chromium in Plants: Distribution in Tissues, Organelles, and Extracts and Availability of Bean Leaf Cr to Animals, *J. Agric. Food Chem.*, 21, 982-986, 1973.
 35. Shanker, A.K., et al., Differential Antioxidative Response of Ascorbate Glutathione Pathway Enzymes and Metabolites to Chromium Speciation Stress in Green Gram (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek. cv. CO4) Roots, *Plant Sci.*, 166, 1035-1043, 2004.
 36. Gikas, P., Romanos, P., Effects of Trivalent (Cr(III)) and Hexavalent (Cr(VI)) Chromium on the Growth of Activated Sludge, *J. Hazard. Mater.*, 133, 212-217, 2006.
 37. Van Assche, F., Clijsters, H., Effects of Metals on Enzyme Activity in Plants, *Plant Cell Environ.*, 13, 195-206, 1990.
 38. Panda, S.K., Choudhury, S., Chromium Stress in Plants, *Braz. J. Plant Physiol.*, 17, 95-102, 2005.
 39. Scoccianti, V., et al., Uptake and Toxicity of Cr(III) in Celery Seedlings, *Chemosphere*, 64, 1695-1703, 2006.
 40. Gupta, S., et al., Chromium Increases Photosystem 2 Activity in *Brassica juncea*, *Biol. Plant.*, 53, 100-104, 2009.
 41. Panda, S.K., Mahapatra, S., Patra, I.I.K., Chromium Toxicity and Water Stress Simulation Effects in Intact Senescing Leaves of Green Gram (*Vigna radiata* L. Var Wilczek K₈₅₁), pp.129-136, In: Panda, S.K., (Ed), *Advances in Stress Physiology of Plants*, Scientific Publishers, India, 2002.
 42. Peralta, J.R., et al., Uptake and Effects of Five Heavy Metals on Seed Germination and Plant Growth in Alfalfa (*Medicago sativa* L.), *B. Environ. Contam. Tox.*, 66, 727-734, 2001.
 43. Karuppanapandian, T., Manoharan, K., Uptake and Translocation of Tri- and Hexa-Valent Chromium and Their Effects on Black Gram (*Vigna mungo* L. Hepper cv. Co4) Roots, *J. Plant Biol.*, 51, 192-201, 2008.
 44. Mcgrath, S.P., Chromium and Nickel, pp.152-178, In: Alloway, B.J., (Ed) *Heavy Metal In Soils*, Second Ed. Chapman and Hall, Great Britain, 1995.
 45. Barcelo, J., et al., Water Relations of Chromium VI Treated Bush Bean Plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender) Under Both Normal and Water Stress Conditions, *J. Exp. Bot.*, 37, 178-187, 1986.
 46. Pandey, V., et al., Chromium (VI) Induced Changes in Growth and Root Plasma Membrane Redox Activities in Pea Plants, *Protoplasma*, 235, 49-55, 2009a.
 47. Castro, R.O., et al., Effects of Dichromate on Growth and Root System Architecture of *Arabidopsis thaliana* Seedlings, *Plant Sci.*, 172, 684-691, 2007.
 48. Pandey, V., et al., Antioxidative Responses in Relation to Growth of Mustard (*Brassica juncea* cv. Pusa Jaikisan) Plants Exposed to Hexavalent Chromium, *Chemosphere*, 61, 40-47, 2005.
 49. Karunyal, S., et al., Effects of Tannery Effluent on Seed Germination, Leaf Area, Biomass and Mineral Content of Some Plants, *Bioresource Technol.*, 47, 215-218, 1994.
 50. Sharma, D.C., Sharma, C.P., Chromium Uptake and Its Effects on Growth and Biological Yield of Wheat, *Cereal Res. Commun.*, 21, 317-321, 1993.
 51. Radin, J.W., Boyer, J.S. Control of Leaf Expansion by Nitrogen Nutrition in Sunflower Plants: Role of Hydraulic Conductivity and Turgor, *Plant Physiol.*, 69, 771-775, 1982.
 52. Tripathi, A.K., et al., Changes in Some Physiological and Biochemical Characters in *Albizia lebbek* as Bio-Indicators of Heavy Metal Toxicity, *J. Environ. Biol.*, 20, 93-98, 1999.
 53. Bishnoi, N.R., et al., Effect of Chromium on Photosynthesis, Respiration and Nitrogen Fixation in Pea (*Pisum sativum* L.) Seedlings, *J. Plant Physiol.*, 142, 25-30, 1993.
 54. Subrahmanyam, D., Effects of Chromium Toxicity on Leaf Photosynthetic Characteristics and Oxidative Changes in Wheat (*Triticum aestivum* L.), *Photosynthetica*, 46, 339-345, 2008.
 55. Zurayk, R., et al., Common Hydrophytes as Bioindicators of Nickel, Chromium and Cadmium Pollution, *Water Air Soil Poll.*, 127, 373-388, 2001.
 56. Olguín, E.J., et al., The Effect of Both Different Light Conditions and The pH Value on The Capacity of *Salvinia minima* BAKER for Removing Cadmium, Lead and Chromium, *Acta Biotechnol.*, 22, 121-131, 2002.
 57. Dhir, B., et al., Physiological and Antioxidant Responses of *Salvinia natans* Exposed to Chromium-Rich Wastewater, *Ecotox. Environ. Safe.*, 72, 1790-1797, 2009.
 58. Prado, C., et al., Uptake of Chromium by *Salvinia minima*: Effect on Plant Growth, Leaf Respiration and Carbohydrate Metabolism, *J. Hazard. Mater.*, 177, 546-553, 2010.
 59. Zeid, I.M., Responses of *Phaseolus vulgaris* to Chromium and Cobalt Treatments, *Biol. Plant.*, 44, 111-115, 2001.
 60. Choudhury, S., Panda, S.K., Role of Salicylic Acid in Regulating Cadmium Induced Oxidative Stress in *Oryza sativa* L. Roots, *Bulg. J. Plant Physiol.*, 30, 95-110, 2004.

61. Panda, S.K., et al., Heavy Metals Induce Lipid Peroxidation and Affect Antioxidants in Wheat Leaves, *Biol. Plant.*, 46, 289-294, 2003.
62. Rai, V., et al., Effect of Chromium Accumulation on Photosynthetic Pigments Oxidative Stress Defense System, Nitrate Reduction, Proline Level and Eugenol Content of *Ocimum tenuiflorum* L., *Plant Sci.*, 167, 1159-1169, 2004.
63. Sinha, S., et al., Multivariate Modeling of Chromium-Induced Oxidative Stress and Biochemical Changes in Plants of *Pistia stratiotes* L., *Ecotoxicology*, 18, 555-566, 2009.
64. Sharma, D.C., et al., Phototoxic Lesions of Chromium in Maize, *Chemosphere*, 51, 63-68, 2003.
65. Gopal, R., et al., Chromium Alters Iron Nutrition and Water Relations of Spinach, *J. Plant Nutr.* 32, 1551-1559, 2009.
66. Hussain, M., et al., Effect of Lead and Chromium on Growth, Photosynthetic Pigments and Yield Components in Mash Bean [*Vigna mungo* (L.) Hepper], *Pak. J. Bot.*, 38, 1389-1396, 2006.
67. Samantaray, S., Biochemical Responses of Cr-Tolerant and Cr-Sensitive Mung Bean Cultivars Grown on Varying Levels of Chromium, *Chemosphere*, 47, 1065-1072, 2002.
68. Shanker, A.K., Physiological, Biochemical and Molecular Aspects of Chromium Toxicity and Tolerance in Selected Crops and Tree Species, PhD Thesis, Coimbatore: Tamil Nadu Agricultural University, India, 2003.
69. Vajpayee, P., et al., Chromium (VI) Accumulation Reduces Chlorophyll Biosynthesis, Nitrate Reductase Activity and Protein Content in *Nymphaea alba* L., *Chemosphere*, 41, 1075-1082, 2000
70. Vernay, P., et al., Interaction of Bioaccumulation of Heavy Metal Chromium With Water Relation, Mineral Nutrition and Photosynthesis in Developed Leaves of *Lolium perenne* L., *Chemosphere*, 68, 1563-1575, 2007.
71. Ilag, L.L., et al., Light Regulation of Chlorophyll Biosynthesis at the Level of 5-Aminolevulinate Formation in Arabidopsis, *Plant Cell*, 6, 265-275, 1994.
72. Schmidt, W., Influence of Chromium (III) on Root associated Fe (III) Reductase in *Plantago lanceolata* L., *J. Exp. Bot.*, 47, 805-810, 1996.
73. Chatterjee, J., Chatterjee, C., Phytotoxicity of Cobalt, Chromium and Copper in Cauliflower, *Environ. Pollut.*, 109, 69-74, 2000.
74. Dietz, K.-J., et al., Free Radicals and Reactive Oxygen Species as Mediator of Heavy Metal Toxicity in Plants, pp.73-79, In: Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J., (Eds), *Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystem*, Berlin, Springer, 1999.
75. Vranova, E., Signal Transduction During Oxidative Stress, *J. Exp. Bot.*, 53, 1227-1236, 2002.
76. Foyer, C.H., Noctor, G., Redox Sensing and Signaling Associated with Reactive Oxygen in Chloroplasts, Peroxisomes and Mitochondria, *Physiol. Plant.*, 119, 355-364, 2003.
77. Mithofer, A., et al., Biotic and Heavy Metal Stress Response in Plants: Evidence for Common Signals, *FEBS Lett.*, 566, 1-5, 2004.
78. Moller, I.M., et al., Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants, *Ann. Rev. Plant Biol.*, 58, 459-481, 2007.
79. Kaszycki, P., et al., Exogenously Applied Sulphate as a Tool to Investigate Transport and Reduction of Chromate in the Duckweed *Spirodela polyrhiza*, *Plant Cell Environ.*, 28, 260-268, 2005.
80. Knight, H., Knight, M.R., Abiotic Stress Signaling Pathways: Specificity and Cross-Talk, *Trends Plant Sci.*, 6, 262-267, 2001.
81. Mittler, R., Oxidative Stress, *Trends Plant Sci.*, 7, 405-410, 2002.
82. Sharma, S.S., Dietz, K.J., The Relationship Between Metal Toxicity and Cellular Redox Imbalance, *Trends Plant Sci.*, 14, 43-50, 2008.
83. Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G., Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses, *Plant Cell*, 8, 1773-1791, 1996.
84. Pei, Z.M., et al., Calcium Channels Activated by Hydrogen Peroxide Mediate Abscisic Acid Signaling in Guard Cells, *Nature*, 406, 731-734, 2000.
85. Rock, M.L., et al., Hydrogen Peroxide Effects on Cr Oxidation State and Solubility in Four Diverse, Cr-Enriched Soils, *Environ. Sci. Technol.*, 35, 4054-4059, 2001.
86. Vazquez, M.I.D., et al., Chromium VI Induced Structural Changes in Bush Bean Plants (*Phaseolus vulgaris* L.), *Ann. Bot.*, 59, 427-438, 1987.
87. Shanker, A.K., Pathmanabhan, G., Speciation Dependent Antioxidative Response in Roots and Leaves of Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench cv. CO27) Under Cr(III) and Cr(VI) Stress, *Plant Soil*, 265, 141-151, 2004.
88. Del Rio, L.A., et al., Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in Peroxisomes. Production, Scavenging, and Role in Cell Signaling, *Plant Physiol.*, 141, 330-335, 2006.
89. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford, 2004.
90. Diwan, H., et al., Induction of Phytochelatin and Antioxidant Defence System in *Brassica juncea* and *Vigna radiata* in Response to Chromium Treatments, *Plant Growth Regul.*, 61, 97-107, 2010.
91. Rausser, W.E., The Structure and Function of Metal Chelators Produced by Plants, *Cell Biol. Biophys.*, 31, 19-48, 1999.
92. Clemens, S., Molecular Mechanisms of Plant Metal Tolerance and Homeostasis, *Planta*, 212, 475-486, 2001.
93. Yang, M.N., et al., Salicylic Acid Induce Aluminum Tolerance by Modulation of Citrate Efflux From Roots of *Cassia tora* L., *Planta*, 217, 168-174, 2003.
94. Wu, L.H., et al., Effects of EDTA and Low Molecular Weight Organic Acids on Soil Solution Properties of a Heavy Metal Polluted Soil, *Chemosphere*, 50, 819-822, 2003.
95. Hale, M.G., Griffin, G.J., Effect of Injury on Exudation from Immature and Mature Plant Fruits, *Plant Physiol.*, Abstracts.13. 1974.
96. Caltado, D.A., et al., Organic Constituent and Complexation of Nickel (II), Cadmium (II) and Plutonium (VI) in Soybean Xylem Exudates, *Plant Physiol.*, 86, 734-739, 1988.
97. Barlett, J.R., James, B.R., Mobility and Bioavailability of Chromium in Soils, pp.267-304, In: Nriagu, J.O., Nieboer, E., (Eds), *Chromium in Natural and Human Environment*, John Wiley And Sons Inc., New York, 1988.

98. Srivastava, S., et al., Fate of Trivalent Chromium in Presence of Organic Acids, Chem. Spec. Bioavailab., 10, 147-150, 1999.
99. Zeng, F.R., et al., Genotypic and Environmental Variation in Chromium, Cadmium and Lead Concentrations in Rice, Environ. Pollut., 153, 309-314, 2008.
100. Jean, L., et al., Effect of Citric Acid and EDTA on Chromium and Nickel Uptake and Translocation by *Datura innoxia*, Environ. Pollut., 153, 555-563, 2008.
101. Liszskay, A., et al., Production of Reactive Oxygen Intermediates (O_2^- , H_2O_2 , and OH) by Maize Roots and Their Role in Wall Loosening and Elongation Growth, Plant Physiol., 136, 3114-3123, 2004.
102. Noctor, G., Foyer, C.H., Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 49, 249-279, 1998.
103. Gupta, K.J., et al., In Higher Plants, Only Root Mitochondria, But Not Leaf Mitochondria Reduce Nitrite to NO, *In Vitro* and *In Situ*, J. Exp. Bot., 56, 2601-2609, 2005.
104. Kono, Y., Fridovich, I., Functional Significance of Manganese Catalase in *Lactobacillus plantarum*, J. Bacteriol., 155, 742-746, 1983.
105. Pekker, I., et al., Reactive Oxygen Intermediates and Glutathione Regulate The Expression of Cytosolic Ascorbate Peroxidase During Iron-Mediated Oxidative Stress in Bean, Plant Mol. Biol., 49, 429-438, 2002.
106. Dey, S.K., et al., Antioxidative Efficiency of *Triticum aestivum* L. Exposed to Chromium Stress, J. Environ. Biol., 30, 539-544, 2009.
107. Ganesh, K.S., Chromium Stress Induced Alterations in Biochemical and Enzyme Metabolism In Aquatic and Terrestrial Plants, Colloid. Surface. B., 63, 159-163, 2008.
108. Samantaray, S., et al., Induction, Selection and Characterization of Cr and Ni-Tolerant Cell Lines of *Echinochloa colona* (L.) *In Vitro*, J. Plant Physiol., 158, 1281-1290, 2001.
109. Willekens, H., et al., Catalase Is A Sink for H_2O_2 and Is Indispensable for Stress Defense in C-3 Plants, EMBOJ, 16, 4806-4816, 1997.
110. Verbruggen, N., Hermans, C., Proline Accumulation in Plants: A Review, Amino Acids, 35, 753-759, 2008.
111. Demirevska, K., et al., Response of Oryzacystatin I Transformed Tobacco Plants to Drought, Heat and Light Stress, J. Agron. Crop Sci., 196, 90-99, 2010.
112. Siripornadulsil, S., et al., Molecular Mechanisms of Proline-Mediated Tolerance to Toxic Heavy Metals in Transgenic Microalgae, Plant Cell, 14, 2837-2847, 2002.
113. Abraham, E., et al., Light-Dependent Induction of Proline Biosynthesis by Abscisic Acid and Salt Stress is Inhibited by Brassinosteroid in Arabidopsis, Plant Mol. Biol., 51, 363-372, 2003.
114. Yoshiba, Y., et al., Regulation of Levels of Proline as an Osmolyte in Plants Under Water Stress, Plant Cell Physiol., 38, 1095-1102, 1997.
115. Sinha, S., Gupta, A.K., Translocation of Metals From Fly Ash Amended Soil in The Plant of *Sesbania cannabina* L. Ritz: Effect on Antioxidants, Chemosphere, 61, 1204-1214, 2005.
116. Sinha, S., Saxena, R., Effect of Iron on Lipid Peroxidation, and Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidants and Bacoside, A Content in Medicinal Plant *Bacopa monnieri* L., Chemosphere, 62, 1340-1350, 2006.
117. Ashraf, M., Foolad, M.R., Roles of Glycine Betaine and Proline in Improving Plant Abiotic Stress Resistance, Environ. Exp. Bot., 59, 206-216, 2007.
118. Molinari, H.B.C., et al., Evaluation of The Stress-Inducible Production of Proline in Transgenic Sugarcane (*Saccharum* Spp.): Osmotic Adjustment, Chlorophyll Fluorescence and Oxidative Stress, Physiol. Plant., 130, 218-229, 2007.
119. Ganesh, K.S., et al., Influence of Chromium Stress on Proline Accumulation in Soybean (*Glycine max* L. Merr.) Genotypes, Global J. Environ. Res., 3, 106-108, 2009.
120. Kagi, J.H.R., Overview of Metallothioneins, Method. Enzymol., 205, 613-626, 1991.
121. Labra, M., et al., *Zea Mays* L. Protein Changes in Response to Potassium Dichromate Treatments, Chemosphere, 62, 1234-1244, 2006.
122. Juszczuk, I.M., Rychter, A.M., Alternative Oxidase in Higher Plants. Acta Biochim. Pol., 50, 1257-1271, 2003.
123. Maxwell, D.P., et al., The Alternative Oxidase Lowers Mitochondrial Reactive Oxygen Production in Plant Cells, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 96, 8271-8276, 1999.
124. Vanlerberghe, G.C., McIntosh, L., Alternative Oxidase: From Gene to Function, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48, 703-734, 1997.
125. Rizhsky, L., et al., The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco, Plant Physiol., 130, 1143-1151, 2002.
126. Castro-Guerrero, N.A., Enhanced Alternative Oxidase and Antioxidant Enzymes Under Cd^{2+} Stress in *Euglena*, J. Bioenerg. Biomembr., 40, 227-235, 2008.
127. Garmash, E.V., Golovko, T.K., Effect of Cadmium on Growth and Respiration of Barley Plants Grown Under Two Temperature Regimes, Russ. J. Plant Physiol., 56, 343-347, 2009.
128. Garcia-Hernandez, M., et al., Metallothioneins 1 and 2 Have Distinct But Overlapping Expression Patterns in Arabidopsis, Plant Physiol., 118, 387-397, 1998.
129. Lemaire, S., et al., Heavy-Metal Regulation of Thioredoxin Gene Expression in *Chlamydomonas reinhardtii*, Plant Physiol., 120, 773-778, 1999.
130. Xiang, C., Oliver, D.J., Glutathione Metabolic Genes Coordinately Respond to Heavy Metals and Jasmonic Acid in Arabidopsis, Plant Cell, 10, 1539-1550, 1998.
131. Cho, U.H., Park, J.O., Mercury-Induced Oxidative Stress in Tomato Seedlings, Plant Sci., 156, 1-6, 2000.
132. Didierjean, L., et al., Heavy Metal-Responsive Genes in Maize: Identification and Comparison of Their Expression upon Various Forms of Abiotic Stress, Planta, 199, 1-8, 1996.
133. Delhaize, E., et al., Effects of Cadmium on Gene Expression in Cadmium-Tolerant and Cadmium-Sensitive *Datura innoxia* Cells, Plant Mol. Biol., 12, 487-497, 1989.
134. Parsell, D.A., Lindquist, S., Heat Shock Proteins and Stress Tolerance, pp.457-494, In: Morimoto, R., Tissieres, A., Georgopoulos, C., (Eds), The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1994.
135. Downs, C.A., et al., The Chloroplast Small Heat-Shock Protein: Evidence For A General Role in Protecting

- Photosystem II Against Oxidative Stress and Photoinhibition, J. Plant Physiol., 155, 488-496, 1999.
136. Hamilton, E.W., Heckathorn, A., Mitochondrial Adaptations to NaCl Stress: Complex I is Protected by Anti-Oxidants and Small Heat Shock Proteins, Whereas Complex II is Protected by Proline and Betaine, Plant Physiol., 126, 1266-1274, 2001.
137. Neumann, D., How Does *Armeria maritime* Tolerate High Heavy Metal Concentrations, J. Plant Physiol., 146, 704-717, 1995.
138. Tseng, T.S., et al., The Heat-Shock Response in Rice Seedlings-Isolation, and Expression of cDNAs That Encode Class-I Low-Molecular-Weight Heat-Shock Proteins, Plant Cell Physiol., 34, 165-168, 1993.
139. Wollgiehn, R., Neumann, D., Metal Stress Response and Tolerance of Cultured Cells From *Silene vulgaris* and *Lycopersicon peruvianum*: Role of Heat Stress Proteins, J. Plant Physiol., 154, 547-553, 1999.
140. Goupil, P., et al., Expression of Stress-Related Genes in Tomato Plants Exposed to Arsenic and Chromium in Nutrient Solution, J. Plant Physiol., 166, 1446-1452, 2009.
141. Del Razo, L.M., et al., Stress Proteins Induced by Arsenic, Toxicol. App. Pharm., 177, 132-148, 2001.
142. Fagioni, M., et al., Proteomic Analysis of Multiprotein Complexes in the Thylakoid Membrane upon Cadmium Treatment, J. Proteome Res., 8, 310-326, 2009.
143. Baker, A.J.M., Brooks, R.R., Terrestrial Higher Plants Which Hyperaccumulate Metallic Elements: A Review of Their Distribution, Ecology and Phytochemistry, Biorecovery, 1, 81-126, 1989.