



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**Çavdar (*Secale cereale* L.) Bitkisinde Kurşun
(Pb) Elementinin Genotoksik ve Fizyolojik
Etkileri**

SEZEN İĞDELİOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

DANIŞMAN

Doç. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT

EŞ-DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. İlhan DOĞAN

İSTANBUL, 2014



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**Çavdar (*Secale cereale* L.) Bitkisinde Kurşun
(Pb) Elementinin Genotoksik ve Fizyolojik
Etkileri**

SEZEN İĞDELİOĞLU

Biyoloji Öğretmeni

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

DANIŞMAN

Doç. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT

EŞ-DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. İlhan DOĞAN

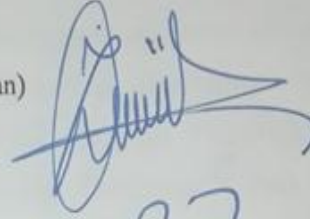
İSTANBUL, 2014

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

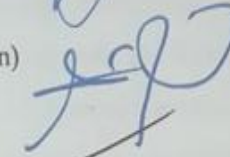
Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Sezen İĞDELIOĞLU'nun "Çavdar (*Secale cereale* L.) Bitkisinde Kurşun (Pb) Elementinin Genotoksik ve Fizyolojik Etkileri" başlıklı tez çalışması, 09 Mayıs 2014 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

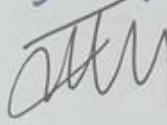
Doç. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT (Danışman)
Marmara Üniversitesi



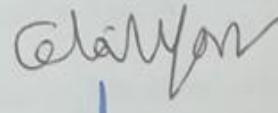
Yrd. Doç. Dr. İlhan DOĞAN (Eş Danışman)
İzmir Yüksek Teknoloji Üniversitesi



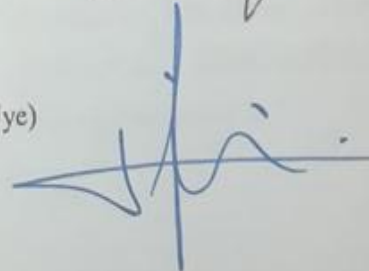
Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI (Üye)
İstanbul Üniversitesi



Prof. Dr. Celal YARCI (Üye)
Marmara Üniversitesi



Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul FİLİZ (Üye)
Düzce Üniversitesi



ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 09 / 11 / 2015 tarih ve 2015/15-02 sayılı kararı ile Sezen İğdelioğlu'nun Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr. Ugur YAHŞI



ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarım sırasında, bilgi ve deneyimleri ile bana yardımcı olan ve her türlü olanağı sağlayan danışmanlarım Sayın **Doç. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT** ve **Yrd. Doç. Dr. İlhan DOĞAN**'a içtenlikle teşekkür ederim.

Deney sonuçlarımın analizlerinde yardımcı olan **İbrahim Ertuğrul YALÇIN**'a, deneylerin yürütülmesi sırasında hep yanımda olan ve yardımlarını hiç esirgemeyen arkadaşlarım **Zeynep UZUNOVA**, **Sedat KARADENİZ**, **ONUR ZORLUER** ve **Zerrin DEĞERMENCİ**'ye, fizyolojik analizlerin gerçekleştirilmesi sırasında Marmara Üniversitesi Genel Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'nın olanaklarından yararlanmamı sağlayan ve tecrübelerinden faydalandığım **Doç. Dr. Filiz VARDAR**'a, moleküler analizlerin yapılmasında yardımcı olan ve Düzce Üniversitesi Genetik ve Fizyoloji Laboratuvarı'nı kullanmama imkân sağlayan **Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul FİLİZ** ve **Yrd. Doç. Dr. Şemsettin KULAÇ**'a, ağır metal ve mineral element analizlerin yapıldığı Bahçeşehir Üniversitesi laboratuvarlarındaki imkânlardan yararlanmamı sağlayan **Doç. Dr. Göksel DEMİR**'e,

Yüksek lisans süresince her zaman bana tüm desteği, ilgiyi ve yardımı gösteren müstakbel eşim **Aytekin YÜCEL**'e çok teşekkür ediyorum.

Son olarak da, tüm eğitim hayatım boyunca her türlü desteği gösteren annem **Hatice İĞDELİOĞLU**, ağabeylerim **Mehmetali İĞDELİOĞLU** ve **Nazım İĞDELİOĞLU**'na olan şükranlarımı ifade etmek isterim.

- Bu çalışma, kısmen Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAPKO) tarafından “Yulaf (*Avena sativa* L.) ve Çavdar (*Secale cereale* L.) Bitkilerinde Kurşun (Pb) Elementinin Genotoksik ve Fizyolojik Etkilerinin Değerlendirilmesi” isimli ve FEN-A-150513-0168 numaralı proje ile desteklenmiştir.
- S. İğdelioğlu, İ. Doğan, İ. İ. Özyiğit, E. Filiz, S. Karadeniz, Z. Uzunova, Ş. Kulaç, G. Demir, Evalution of Molecular, Physiological and Nutritional Alterations Caused by Lead in Rye (*Secale cereale* L.), 5th International Symposium on Sustainable Development, ISSD 2014, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina on May 15-18, 2014, Şeklinde uluslararası kongrede sözlü olarak sunulmuştur.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR	i
ABSTRACT	vii
SEMBOL LİSTESİ	viii
KISALTMALAR	i
ŞEKİL LİSTESİ	ii
TABLO LİSTESİ	iv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Secale cereale</i> L. Bitkisinin Taksonomisi	3
2.2. Ağır Metallerin Tanımı	4
2.3. Ağır Metallerle İlgili Genel Bilgiler	5
2.3.1. Bitkilerde Stres	6
2.3.2. Stres Faktörleri	6
2.3.3. Strese Karşı Bitkide Oluşan Fazlar.....	6
2.4. Kurşun ve Bitki	7
2.4.1. Kurşun	7
2.4.2. Bitkilerde Kurşun Elementi	9
2.5. Bitki Besin Elementleri ve Önemi	11
2.5.1. Bor	14
2.5.2. Kalsiyum.....	14
2.5.3. Bakır	15
2.5.4. Demir	15
2.5.5. Potasyum	16
2.5.6. Magnezyum	18
2.5.7. Mangan	18
2.5.8. Sodyum	19
2.5.9. Çinko	20
2.6. ICP (Inductively Coupled Plasma) tekniği	21
2.7. Genotoksosite	22
2.8. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)’a Dayalı DNA Belirteçleri	23

2.9. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – Rastgele Çoğaltılmış DNA Farklılığı) Tekniği	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
3.1. Bitki Materyali	26
3.2. Kimyasallar.....	26
3.2.1. Farklı Konsantrasyonlarda (100, 200 ve 400 µM) Pb(NO ₃) ₂ Solüsyonu Hazırlanması	27
3.3. Sterilizasyon Teknikleri	28
3.3.1. Besiyerinin sterilizasyonu	28
3.3.2. Çalışma ortamının ve kullanılan aletlerin sterilizasyonu	29
3.3.3. Tohumların yüzey sterilizasyonu	29
3.3.4. Sterilizasyonda kullanılan solüsyonların hazırlanışı	29
3.4. Besiyerinin Hazırlanması.....	29
3.5. Tohum Ekim İşlemleri	30
3.5.1. Tohumların Besiyerine Ekilmesi ve Bitkilere Ağır Metal Uygulanması.....	30
3.6. Fotosentetik Pigmentler	32
3.6.1. Klorofil a-b, a/b, toplam klorofil ve karotenoidlerin miktarlarının belirlenmesi	32
3.7. Total Protein Miktarının Belirlenmesi	33
3.8. Kurşun Akümüasyonu ve Mineral Besin Elementlerinin Tayini	34
3.8.1. Laboratuvar çalışmaları	34
3.8.2. İstatistiksel Analizler	36
3.9. Kurşun Stresinin Genotoksik Ölçümü	36
3.9.1. Laboratuvar çalışmaları	37
3.9.2. Genetik Verilerin Analizi.....	40
4. BULGULAR.....	41
4.1. Klorofil a-b, Klorofil a/b, Toplam Klorofil ve Karotenoidlerin Miktarları.....	41
4.2. Kurşun Stresi ve Mineral Beslenme Üzerine Etkileri.....	45
4.3. Total Protein Miktarları	55
4.4. Genotoksik Bulgular	56
4.4.1. Genomik DNA Kalıp Kararlılığı.....	56

4.4.2. RAPD Analiz Sonuçları	57
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	59
KAYNAKLAR	71
ÖZGEÇMİŞ	96



ÖZET

Çavdar (*Secale cereale* L.) Bitkisinde Kurşun (Pb) Elementinin Genotoksik ve Fizyolojik Etkileri

Bu araştırmada kurşun stresi altında yetiştirilen çavdarın (*S. cereale* L.) fizyolojik parametreleri ve genotoksisitesi yapılan deneylerle karakterize edilmiştir. Çavdar tohumları 15 gün süre ile MS (Murashige ve Skoog) besiyerinde çimlendirilmiş, daha sonra 0, 100, 200 ve 400 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ içeren MS besiyerlerinde 15 gün süre ile büyütülmüşlerdir. Deneysel periyottan sonra yetiştirilen fidanlar toplanmış ve çavdarın fotosentetik pigment (klorofil *a*, *b*, toplam klorofil, klorofil *a/b* ve karotenoidler) ve toplam protein içerikleri, bazı mineral besinlerin (B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na ve Zn) alımı ve akümüasyonu ve genetik materyali incelenmiştir. Fotosentetik pigment ve toplam protein içerikleri Arnon, 1949 and Bradford, 1976 ya göre bulundu. Mineral besinlerin ölçümü ICP-OES cihazı kullanılarak yapıldı. Kurşunun genotoksik etkileri RAPD-PCR tekniği kullanılarak değerlendirildi. Bizim sonuçlarımıza göre kurşun uygulamalarını takip eden süreçte RAPD-PCR profillerinde yeni bantların ve normal bantların ortaya çıkması ve kaybolmasını içeren değişiklikler kurşun uygulamasına maruz kalmamış filizlerle yapılan karşılaştırma ile ortaya çıkarılmış ve fotosentetik pigment (klorofil *a*, *b*, toplam klorofil, klorofil *a/b* ve karotenoidler) ve toplam protein içeriklerinde ve bitki büyüme parametrelerinde kurşun stresi altında kalan çavdarda değişiklikler bulunmuştur. Yüksek kurşun stresi (400 μM) uygulanmış bitkilerde klorofil *a*, klorofil *b*, total klorofil ve karotenoid değerlerinde (% türünden) 6.68, 6.07, 2.9, 8.57 oranında düşüş gözlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda kurşun stresi uygulanması ile yaprak ve köklerde Fe, Na, B miktarlarında düşüş, Mg, Ca, Cu, K, Zn ve Mn miktarlarında artış gözlenmiştir. Sonuçta yaptığımız bu çalışma RAPD tekniğinin diğer fizyolojik parametrelerden gelen verilerle birlikte kurşun kirliliğinin risk değerlendirmelerinde kullanılmasının yararlı olabileceğini göstermiştir.

Mayıs, 2014

Sezen İĞDELİOĞLU

ABSTRACT

Genetical and Physiological Effects of Lead (Pb) on the growth of Rye (*Secale cereal* L.)

In this investigation, the experiments were carried out to characterize some physiological parameters and genotoxicity of *Secale cereale* under Pb stress. Plants were germinated for 15 days in MS media and then they were grown in MS media containing 0, 100, 200 and 400 μM of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ for 15 days. After the end of the experimental period, plantlets were harvested and the effects of Pb exposures on photosynthetic pigment (chlorophyll *a* and *b*, total chlorophyll, chlorophyll *a/b* and carotenoids) and total protein contents, uptakes and accumulations of some mineral (B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Zn, Mn and Na) nutrients and genetic material of *S. cereale* were examined. Determination of the contents of photosynthetic pigments and total soluble protein were carried out according to Arnon (1949) and Bradford (1976), respectively. Measurements of mineral nutrients were done using Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy. For evaluation of genotoxic effect of Pb, RAPD-PCR technique was employed. According to our results, changes in RAPD-PCR profiles following Pb treatments included loss and appearance of new bands compared to unexposed plantlets and the contents of photosynthetic pigments (total chlorophyll, chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, chlorophyll *a/b* and carotenoids), total protein and growth parameters were altered in *S. cereale* grown under Pb stress. Chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, total chlorophyll and carotenoids were decreased by 6.68, 6.08, 2.89 and 8.57% under severe Pb stress (400 μM), respectively. While the concentrations of Na, Fe and B were reduced, the concentrations of Cu, Ca, K, Mg, Mn and Zn were increased in the leaves and roots of *S. cereal* with the application of different levels of Pb treatments. In our study, induced genomic alterations and changes in physiological features were detected in *S. cereale* grown with Pb. Overall, the present results suggest that RAPD technique along with the data from physiological parameters can be used for making risk assessments for Pb pollution.

May, 2014

Sezen IGDELIOGLU

SEMBOL LİSTESİ

%	:	Yüzde
μL	:	Mikrolitre
μM	:	Mikromolar
B	:	Bor
Ca	:	Kalsiyum
Cd	:	Kadmiyum
CO₂	:	Karbondioksit
Cu	:	Bakır
Fe	:	Demir
Gr	:	Gram
K	:	Kelvin
K	:	Potasyum
Kg	:	Kilogram
M	:	Molar
Mg	:	Magnezyum
mg	:	Miligram
Mhz	:	Megahertz
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
Mn	:	Mangan

Na	:	Sodyum
Ni	:	Nikel
nm	:	Nanometre
°C	:	Santigrad derece
Zn	:	Çinko
µg	:	Mikrogram
Pb	:	Kurşun
Mo	:	Molibden
Hg	:	Civa
Co	:	Kobalt

KISALTMALAR

bç	: Baz çifti (Base pair)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinukleotid trifosfat
ICP	: İndüktif eşleşmiş plasma
Kla	: Klorofil a
Klb	: Klorofil b
MS	: Murashige ve Skoog Besiyeri
PCR	: “Polymerase Chain Reaction” (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
ppm	: “Part per million” (Milyonda bir)
RAPD	: “Random Amplified Polymorphic DNA” (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA)
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
Taq DNA polimeraz	: DNA polimeraz enzimi (<i>Thermus aquaticus</i> ’tan elde edilen)
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3-1-1: Çalışmada Kullanılan <i>S. cereale</i> L. var. Aslım-95 tohumları	26
Şekil 4-1-1: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerde K _{la} Miktarları	41
Şekil 4-1-2: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerde K _{lb} Miktarları	42
Şekil 4-1-3: Farklı Konsantrasyonlarda Pb Uygulanan Bitkilerde K _{la/b} Miktarları	42
Şekil 4-1-4: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerde Total K _l Miktarları.....	43
Şekil 4-1-5: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerde Karotenoid Miktarları.....	44
Şekil 4-2-1: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Pb Mineralinin Miktarları.....	45
Şekil 4-2-2: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Fe Mineralinin Miktarları.....	45
Şekil 4-2-3: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Mg Mineralinin Miktarları.....	46
Şekil 4-2-4: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Ca Mineralinin Miktarları.....	46
Şekil 4-2-5: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Cu Mineralinin Miktarları.....	47
Şekil 4-2-6: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Na Mineralinin Miktarları.....	47
Şekil 4-2-7: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında K Mineralinin Miktarları.....	48
Şekil 4-2-8: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında B Mineralinin Miktarları.....	48
Şekil 4-2-9: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Zn Mineralinin Miktarları.....	49
Şekil 4-2-10: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Mn Mineralinin Miktarları	49
Şekil 4-2-11: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Pb Mineralinin Miktarları.....	50

Şekil 4-2-12:Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Fe Mineralinin Miktarları.....	50
Şekil 4-2-13:Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Mg Mineralinin Miktarları.....	51
Şekil 4-2-14:Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Ca Mineralinin Miktarları.....	51
Şekil 4-2-15:Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Cu Mineralinin Miktarları.....	52
Şekil 4-2-16:Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Na Mineralinin Miktarları.....	52
Şekil 4-2-17:Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Köklerinde K Mineralinin Miktarları.....	53
Şekil 4-2-18:Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Köklerinde B Mineralinin Miktarları.....	53
Şekil 4-2-19:Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Zn Mineralinin Miktarları.....	54
Şekil 4-2-20:Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Mn Mineralinin Miktarları.....	54
Şekil 4-3-1: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Total Protein Değerleri	55
Şekil 4-4-1: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Genomik DNA Kalıp Kararlılık Yüzdeleri.....	56
Şekil 4-5-1: Farklı konsantrasyonlarda Pb(NO ₃) ₂ (S1: kontrol, S2: 100 µM, S3: 200 µM, S4: 400 µM) uygulanan <i>S. cereale</i> bitki köklerinden izole edilen DNA'nın RAPD-PZR sonuçları.....	57

TABLO LİSTESİ

Tablo 2-1-1: Türkiye’de 2011 ve 2012 yılında üretilen tahıl miktarları (TUIK, 2012). ..	4
Tablo 2-2-1: Bazı ağır metallere ait toprak ve bitki içeriğinde bulunma miktarları (Adriano, 2001).	5
Tablo 2-5-1: Bitki besin elementleri (Epstein, 1999).	12
Tablo 3-2-1: MS Kültür ortamının kimyasal bileşenleri ve miktarları (Murashige ve Skoog, 1962)	27
Tablo 4-5-1: Farklı konsantrasyonlarda kurşun uygulanan <i>S. cereale</i> bitkilerinde RAPD yönteminin kullanılması ile elde edilen bant sayıları ve bantların moleküler büyüklükleri	58



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüz dünyasında toprak kökenli ağır metal kirliliği önemli çevresel sorunları da beraberinde getirmektedir (Carfagna ve ark., 2013). Endüstri devriminin başlangıcından bu yana biyosfere ağır metal salınımı önemli derecede artarak devam etmektedir. Kentsel atıklar, atık suların ve fosil yakıtların kullanımı, atık yakma ünitelerinin salınımları, metal madenleri ve eritme endüstrilerinin atıkları, endüstriyel atıkların uzaklaştırılması, pestisit, herbisit ve gübre gibi tarımsal kimyasalların kullanımı gibi antropojenik uygulamaların artması ile birlikte birlikte daha fazla ağır metal miktarı doğal çevreye girerek ekosisteme zarar vermektedir (Vamerali ve ark., 2010). Dünya çapındaki toprak kirliliğine, organik ve inorganik kirleticiler arasında en fazla (%37>) ağır metaller neden olmaktadır (Bhargava ve ark., 2012). Bu metallerin toprakta yüksek konsantrasyonda bulunması, toprak kalitesinin düşmesine yol açmakta (Long ve ark., 2002; Yang ve ark., 2005), ekosistemlerin sağlığı açısından önemli tehlikeler ortaya çıkarmaktadır. Ağır metallerin insan ve hayvan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri, bu metallerin çevrede uzun süre kalmaları sonucunda giderek artmaktadır (Gisbert ve ark., 2003; Wu ve ark., 2010).

Besin zinciri yoluyla bitki, hayvan ve insanın vücuduna girerek burada biriken toksik ağır metaller, mutajenik olmaları sebebi ile genetik materyel değişikliklerine ve bununla bağlantılı olarak karsinojenik sonuçların ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir (Yang ve ark., 2005).

Hava ve tarım topraklarındaki ağır metal kirliliği küresel ölçekteki ekolojik problemlerin en önemlisi olarak en başta gelmektedir (Kabata-Pendias ve Pendias, 1999). Toksik konsantrasyonlarda ağır metale maruz kalma, bitkilerde birçok değişikliğin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu değişikliklerin yol açtığı zararların bir kısmı gözle görülebilir ve ölçülebilir (morfolojik değişiklikler) düzeyde iken, birçoğunun anlaşılabilmesi için ileri düzeyde biyokimyasal analizlerin gerçekleştirilmesini gerektirmektedir. Ağır metal zararlarının ilk ve en belirgin etkisi bitkilerde köklerde görülür (Ouzounidou ve ark., 1995; Tester ve Leigh, 2001; Verma ve Dubey, 2003).

Doğal kirlenmenin yanı sıra, gelişmekte olan ülkelerde ileri teknolojilerin kullanılmaması ve kirliliği önleyici tedbirlerin yetersizliği endüstri kaynaklı çevre kirliliğini arttırmaktadır (Jabeen ve ark., 2009). Ağır metaller, çevreye bırakıldıklarında tüm canlılar için büyük tehdit oluşturmakta ve ağır metallerin besin zinciri yoluyla organizmalarda birikmesi bu organizmalarda ciddi hastalıkların ortaya çıkmasına hatta ölümlere neden olmaktadır (Manimaran ve Prabu, 2013). Bu nedenle, ağır metallerin canlılar üzerinde oluşturabileceği olumsuz etkilerin göz ardı edilmemesi gereken bir olgudur (Aissa ve Kéloufi, 2012).

Bu çalışmada çavdarın (*S. cereale*) farklı konsantrasyonlarda kurşun stresinden nasıl etkilendiği mineral besin elementlerinin alınımı ve akümüasyonu, fizyolojik parametreler (fotosentetik pigment (klorofil *a*, klorofil *b*, total klorofil ve karotenoidler) ve total protein içerikleri, kök ve yapraklardaki kurşun birikimi) ve genotoksisite (genetik materyeldeki değişimler) deney sonuçlarına bakılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla MS ortamında çimlendirilen tohumlar 0 (kontrol), 100, 200, 400 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ içeren MS besi ortamlarında çimlendirilmiş ve yukarıda bahsedilen deneyler bu deney gruplarının oluşturulması ve farklı konsantrasyonlarda kurşun stresinin uygulanması ile birlikte gerçekleştirilmiştir.

Stresin bitki üzerindeki etkilerinin incelenmesinde, farklı konsantrasyonlardaki kurşun stresi uygulamalarına maruz bırakılan bitkiler ile kurşun stresi uygulamasına maruz kalmayan kontrol grubu bitkilerin arasında karşılaştırmalı analize dayanan çıkarımlar elde edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Secale cereale* L. Bitkisinin Taksonomisi

Alem	:	Plantae
Bölüm	:	Magnoliophyta
Sınıf	:	Liliopsida
Alt sınıf	:	Commelinidae
Takım	:	Cyperales
Aile	:	Poaceae
Cins	:	<i>Secale</i> L.
Tür	:	<i>Secale cereale</i> L.

Kültür çavdarının (*S. cereale*) Suriye, Ermenistan, İran, Türkiye ve Kırgız bozkırlarında yabani bir tür olarak bulunan *Secale anatolicum* bitkisinden ya da Ağrı Dağı ve Van Gölü çevresinde bulunan buğday ve arpa tarlalarında yabani ot olarak bulunan *Secale montanum* türlerinin her ikisinden de kökenlendiği düşünülmektedir (Newell-McGloughlin ve Re, 2006). Doğu Anadolu bölgesi çok yıllık çavdarın (*S. montanum*) birincil gen merkezi içinde yer almaktadır. Bu bölgede bitki yabani olarak yetişmektedir (Oelke ve ark., 1990). Çavdar, Amerika'nın kuzeyinden İngiliz ve Hollandalılar tarafından Avrupa'ya getirilmiştir. Kuzey-Güney Dakota, Nebraska, Georgia ve Minnesota çavdar üretiminde yüksek oranlara sahip alanlardır (Sencer ve Hawkes, 1980; Baykal, 2006).

Boyu 1–1,5 m arasında, kümelenmiş olarak bulunan, virüs, bakteri ve mantar hastalıklarına, kuraklık, yüksek ve düşük pH'ya, tuza, fazla suya, soğuğa, böceklerle ve yabancı otlara dayanıklı tek yıllık bir bitkidir (Duke, 1978). Kök sisteminin, ekildiği yerin toprak ve iklim özelliklerine göre derinlere doğru veya yüzeysel gelişmesi, adaptasyon sahasının çok geniş olmasını sağlamaktadır (Önmez, 1994). Özellikle toprak kalınlığının az olduğu erozyona uğramış arazilerde çavdar, toprağı koruması ve

canlılığını artırma bakımından da önemli bir kültür bitkisidir (Baykal, 2006).

Çavdar tohum olarak, otlak, saman, yer örtücü, hayvan yemi, alkollü içecek üretimi için üretilir ve ihracı yapılan bir bitkidir. A.B.D'nin orta bölgesinde öncelikle hububat olarak, bazen de otlak ya da saman olarak da yetiştirilir. Ayrıca yeşil gübre ya da örtücü olarak da yetiştirilebilir (Oelke ve ark., 1990). Çavdar organik yapıya katkıda bulunur, toprak erozyonunu önler, su girişini ve tutulmasını artırır. Aynı zamanda allelopatik etki göstererek yabancı otlarla mücadelede kullanılabileceği yönünde kanıtlar bulunmaktadır(Oelke ve ark., 1990; Baykal, 2006).

TÜİK'in 2012 verilerine göre ülkemizde 370.000 ton çavdar üretilmiştir. Bu verilere göre çavdar, ülkemizde üretimi yapılan en önemli beşinci tahıl çeşididir (Tablo 2-1-1). Ayrıca ülkemiz, dünya da temel çavdar üreticisi olan ülkeler arasında yer almaktadır (TÜİK, 2011; 2012).

Tablo 2-1-1: Türkiye’de 2011 ve 2012 yılında üretilen tahıl miktarları (TÜİK, 2012).

Üretim	2011 (Ton)	Pay (%)	2012 (Ton)	Pay (%)
	35 202 073	57,04	33 377 430	56,77
Buğday	21 800 000	35,33	20 100 000	34,19
Mısır (dane)	4 200 000	6,81	4 600 000	7,82
Çeltik	900 000	1,46	880 000	1,50
Arpa	7 600 000	12,32	7 100 000	12,08
Çavdar	365 750	0,59	370 000	0,63
Yulaf	218 040	0,35	210 000	0,36
Kaplıca	7 018	0,01	6 565	0,01
Darı	6 253	0,01	4 759	0,01
Kuşyemi	30	0,00	2	0,00
Mahlut	1 005	0,00	990	0,00
Tritikale	103 797	0,17	105 000	0,18
Sorgum	180	0,00	114	0,00

2.2. Ağır Metallerin Tanımı

Ağır metaller, yoğunluğu 5 g/cm^3 ’ten daha yoğun ve atom numarası 40’dan büyük olan elementler olarak tanımlanmaktadırlar (Birch, 1961). Ağır metaller doğal ve antropojenik süreçler neticesinde çevreye yayılmaktadır. Dünyada doğal olarak bulunan 90 elementten 53 tanesi ağır metaldir (Weast, ve ark., 1984). En çok bilinen ağır metaller Cd, Cr, Hg, Fe, Ni, Pb, ve Zn’dir (Azevedo ve Lea, 2005; Pohl ve ark., 2011).

Cu, Fe, Mn, Mo, Zn ve Ni gibi bazı ağır metaller canlılar için belli miktarları gereklidir ve eser (iz) element olarak adlandırılmaktadırlar (Mercier ve Pinnavala, 1997, Kabata-Pendias, 2010). Pb, Cd ve Hg gibi bazı ağır metaller canlılar için mutlak gerekli olmayıp eser miktarları dahi toksik etki göstermektedir (Farooq ve ark., 2008; Lal, 2010).

2.3. Ağır Metallerle İlgili Genel Bilgiler

Düşük konsantrasyonları dahi toksik etki gösterebilen ağır metaller önemli inorganik çevresel kirleticilerdir. Ağır metallerin toprakta birikmesi toprak verimliliği, ekosistem fonksiyonları, besin zinciri yoluyla hayvan ve insan sağlığı üzerinde önemli etkileri vardır (Majer ve ark., 2002; Sayadi ve Sayyed, 2011).

Ağır metallerin aşırı miktarlarına maruz kalan bitkilerde hücresel seviyede görülen toksik semptomlar bulunmaktadır. Bu semptomların ortaya çıkışı doğrudan ya da dolaylı olabilir ve enzim aktivitesi, su dengesi, proteinlerin yapısı, fotosentez, solunum ve ATP içeriği, büyüme, reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile alakalı olup hücre metabolizmasında metallerin teşvik ettiği etkiler olarak ortaya çıkmaktadır (Hall, 2002). Ayrıca, kloroplast yapısı, klorofil ve karotenoid biyosentezleri, elektron akımının aksaması, Kalvin döngüsü enzimlerinin aktiviteleri, stoma sayısı ve işlevi ile ilgili değişikliklere bağlı CO₂ miktarı ile alakalı fotokimyasal aktivite üzerine negatif etkileri bulunmaktadır (Kastori ve ark., 1998, Macfarlane ve Burchett, 2001; Prasad ve ark., 2001; Siatka ve ark., 2012).

Tablo 2-2-1: Bazı ağır metallere ait toprak ve bitki içeriğinde bulunma miktarları (Adriano, 2001).

(mg/kg)	Toprak	Bitki
Pb	10-30	0,1-0,5
Hg	0,05-0,5	0,005-0,05
Co	1,0-10	0,02-0,5

Tablo 2-2-1' in Devamı		
Mn	300-1 000	20-400
Fe	10 000-50 000	50-200
Cd	0,05-1,0	0,05-0,5

2.3.1. Bitkilerde Stres

Bir ortamda devamlı olarak ya da aralıklarla meydana gelen çok sayıdaki olumsuz fakat hemen öldürücü olmayan koşullar “stres” olarak tabir edilir. Botanik biliminde, bitkide metabolizma, büyüme ve gelişmeyi etkileyen veya engelleyen, uygun olmayan herhangi bir koşul veya madde “stres” olarak kabul edilir.. Bitkide genellikle bir dış faktörün varlığında oluşan etki olarak da tanımlanabilen stres kavramı, bitki toleransı ile de yakından ilişkilidir. Başta geri dönüşümlü olan ve canlı organizmanın tüm fonksiyonel düzeylerinde meydana gelen değişiklikler ve tepkiler daha sonra kalıcı hale de gelebilirler. Stres olayı geçici olarak meydana gelse bile bitkinin canlılık fonksiyonları gerilemeye başlar. Bitki, strese sebep olan etmene karşı kapasitesinin sonuna ulaştığında ise o ana kadar belirti göstermeden kalan zarar, kronik hastalığa veya geri dönüşümsüz bir zarara dönüşebilir (Gürel ve Avcıoğlu, 2001).

2.3.2. Stres Faktörleri

Levitt'e (1980) göre stres faktörleri, biyotik ve abiyotik olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Lichtenthaler (1996) ise stres faktörlerini doğal ve insan kaynaklı olmak üzere sınıflandırmaktadır. Yüksek ısıma, yüksek ve düşük sıcaklıklar, ani donma, su kıtlığı ve mineral eksikliği doğal stres faktörlerini oluştururken; hava kirleticileri, aşırı azot çıkışı, foto-oksidantlar ve ağır metaller insan kaynaklı stres faktörlerini oluşturmaktadır (Ashraf ve Foolad, 2007).

2.3.3. Strese Karşı Bitkide Oluşan Fazlar

Tepki Fazı: Toplam katabolik metabolizmanın toplam anabolik metabolizmaya üstün olduğu bir stres reaksiyonu ile başlayan bu fazda normal yaşamsal etkinlikler için

gereksinim duyulan yapısal (protein, karbonhidrat ve lipid yapısında yada bunların bileşenleri veya DNA vs.) ve fonksiyonel (metabolik, fiziksel veya mekaniksel olaylar vs.) olaylarda sapmalar meydana gelir. Ayrıca bu fazda canlılık aktivitelerinde gerileme görülmektedir.

Onarım Fazı: Eğer mevcut stresin yoğunluğu değişmez ise organizma tarafından proteinlerin veya koruyucu maddelerin sentezlerini içeren onarım mekanizmaları devreye girerek tamir olaylarını gerçekleştirmektedir. Ayrıca bu fazda adaptasyon olayının gerçekleşmesinin ortaya çıkması ile devam eden stres koşulları altında direncin arttığı bir dayanıklılık fazına geçiş meydana gelmektedir.

Bitiş Fazı: Eğer stres dönemi fazla uzun süreleri kapsarsa veya stres faktörünün yoğunluğu artarsa, bitiş fazı ortaya çıkmaktadır. Tolerans limitlerinin aşıldığı faz kalıcı zararların ve hatta ölümün gerçekleştiği dönemdir.

Rejenerasyon Fazı: Organizmalarda senesens olaylarının dominant halde görülmelerinden önce ve zararlı etkilerin çok yüksek olmadığı dönemlerde stres yapıcı faktörlerin etkileri ortadan kalkarsa fizyolojik fonksiyonların kısmen veya tam rejenerasyonun organizmaların savunma mekanizmaları tarafından gerçekleştirilmesi ile organizmalarda hasarlar tamir edilebilmektedir (Edreva, 1998; Gürel ve Avcıoğlu, 2001).

2.4. Kurşun ve Bitki

2.4.1. Kurşun

Kurşun, yoğunluğu 11,34 g/cm³, atom numarası 82 ve atom ağırlığı 207,2 g/mol olan bir elementtir (Kitman, 2000). Kurşun “Pb” olarak sembolize edilir. Periyodik cetvelde 4A grubunda yer alır. Rengi mavimsi-beyaz ve parlaktır ancak atmosferde yüzeyi karbonatla kaplanarak kararır (Burtis ve Ashwood, 2002; Kabata-Pendias ve Mukherjee, 2007; Topçu ve ark., 2009).

En çok bilinen çevresel kirleticilerden biri olan kurşun ekosistem, insan ve hayvan sağlığı üzerinde kalıcı zararların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Doğada genellikle Pb²⁺ iyonu halinde ve suda çözünmez durumda bulunur. Kurşunun doğada bulunan en

önemli kaynağı PbS olan galen cevheridir. Diğer önemli kurşun kaynakları PbSO_4 , PbCO_3 , Pb_3O_4 , $\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$ ve $\text{Pb}_5(\text{AsO}_4)_3\text{Cl}$ 'dur (Kabata-Pendias, 2010).

Kurşun toprakta doğal olarak bulunan bileşenlerden biridir. Anakayalar topraktaki doğal kurşun kaynağıdır. Toprağın kurşun içeriği ortalama 25 mg/kg'dır (Nagajyoti ve ark., 2010; Kabata-Pendias, 2010; Rao ve ark., 2011). Toprak içinde kurşun mobilitesi genellikle yavaştır ancak asidite gibi faktörler çözünülebilirliğini artırır (Kabata-Pendias, 2010).

Metal kirliliği olan topraklarda genellikle kurşun, çinko ve kadmiyum ile birlikte bulunur (Hernández-Allica ark., 2007). Kurşun tüm tehlikeli ağır metaller içinde ikinci sırayı almaktadır. Çevreye yayılım yolları; madencilik, kömür, benzin üretimi, akü üretimi, enerji santralleri, gübreler, tarım ilaçları, kurşun içeren boyalar, patlayıcılar, arıtma çamurları ve kanalizasyonlar yoluyla (Sharma ve Dubey, 2005; Sengar ve ark., 2008).

Her çeşit doğal çevrede ve canlı organizmalarda iz halinde kurşuna rastlanır. Canlı organizmada bulunan kurşun varlığı fizyolojik yaşam için gerekliliğinden değil doğal çevrede, yiyecek ve içeceklerde bulunmasından dolayıdır (Kabata-Pendias ve Pendias, 1984; Kınalıoğlu ve ark., 2008; Cheng ve Hu, 2010). Kurşun maruz kalmış topraklardaki kurşun oranları 400-800 mg/kg arasında gözlemlenirken sanayi bölgelerinde bulunan topraklardaki kurşun oranları 1000 mg/kg seviyesine kadar ulaşabilmektedir (Kabata-Pendias, 2010). Tırağın yoğun olduğu bölgelerde anayola 100 metre uzaklıktaki bitkiler kurşun kirlenmesinden önemli derecede etkilenir. Bu etki bitki organlarının yüzey genişliğine, tırağın yoğunluğuna, etki süresine, ana yoldan uzaklığa, yöredeki rüzgarın şiddetine ve yönlerine göre değışir. Örneğın, ana yol kenarındaki bitkilerin Pb içerikleri 1500 ppm iken 150 metre uzaktaki bitkilerin Pb içerikleri 2-3 ppm olarak belirlenmiştir (Chen ve ark., 2010; Xia ve ark., 2010; Duong ve Lee, 2011).

Çevreyi kirleten en önemli kurşun kaynağı hava ile taşınan kurşundur. Kurşun kökenli endüstriyel faaliyetler (başta akü sanayii, porselen, seramik, renkli televizyon tüplerinin yapımı, kurşun içerikli duvar ve oto boyaları, muhtelif silah ve araç gereç imalatı için alaşım üretiminde olmak üzere birçok endüstri kolu) atmosferdeki kurşun kirlenmesinin

temel kaynaklarından (Yeşilyurt ve Akcan, 2000; Sawidis ve ark., 2011). Hava kaynaklı kurşunun büyük kısmı otomobil egzoz gazlarından ortaya çıkmaktadır (Sangani ve ark., 2010; Wiseman ve ark., 2013). Yapılan çalışmalarda çevre kirliliğine sebep olan kurşunun %98'inin egzoz gazlarından kaynaklandığı tespit edilmiştir (De Jonghe ve Adams, 1982; Servant, 1982).

Kurşun, doğada organik ve inorganik halde bulunabilir. İnorganik kurşun atmosferde partiküller halinde bulunurken, organik kurşun uçucu olup çoğunlukla gıda maddeleri ve içme suyuna karışmaktadır. Bu sebeple organik kurşun inorganik kurşuna göre canlı yaşamı üzerinde daha fazla etkiye sahiptir (De Jonghe ve Adams, 1982; Karademir ve Toker, 1995). Kurşunun toprağa ve atmosfere geçişi çeşitli yollarla olabilir. Bu yollar arasında, endüstri kuruluşlarının bacalarından ve taşıtların egzozlarından çıkan dumanlar, lehim, akü, boya, elektrik ve petrol sanayine ait atıklar ile pestisitler sayılabilir (Kalinowska, 1984; Aksoy, 1995; Saygıdeğer, 1995; Mark and Hendershot, 1997). Kirlilik sonucunda ortaya çıkan Pb, Cu, Zn vb. ağır metaller toprağa ve atmosfere geçerek ekosistemleri oluşturan organizmalar için tehlike oluşturmaktadırlar. Kurşun memeli dokularında birikimi gerçekleşen bir metaldir. Ortalama birikim değerleri <0,2-4,8 mg/kg arasındadır. En az kas hücrelerinde birikim görülürken karaciğer ve böbreklerde birikimi en yüksek düzeydedir (Jørgensen, 2000). İnsanlar kurşuna yiyecekler, su ve hava yolu ile maruz kalırlar. Çocuklar için toprak ve ev tozuna maruz kalım oranı vücutlarına aldıkları kurşun miktarı için önemli bir etkindir (Kabata-Pendias, 2010). Bazı çevresel etkenlerin dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğunun gelişiminde etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu çevresel etkenler arasında kurşun toksisitesi de bulunmaktadır. Kurşun zehirlenmesinde dikkat eksikliği, aşırı hareketlilik, huzursuzluk gibi belirtiler görülebilmektedir (Minder ve ark., 1994).

2.4.2. Bitkilerde Kurşun Elementi

Kurşun birkaç bin yıldan beri insanlar için önemli bir metaldir ancak çevreyi kirlüten ağır metallerin başında gelmektedir. Atmosferdeki toplam kurşun miktarının %80 kadarının petrol ve petrol ürünlerinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Rao ve ark., 2011; Pohl ve ark., 2011). Bitkilere kurşun alımı toprak ve hava yolu ile gerçekleşmektedir. Kurşun alımı çevresel faktörlere bağlıdır (Xiong, 1998). Kurşunun

kök tarafından emilimi pasif olduğu için topraktan alım oranı düşüktür. Bitkide taşınımı sınırlıdır ve bundan dolayı kökte birikim yapar (Sharma ve Dubey, 2005). Kurşunun topraktan emilimi ve aktivitesi toprak pH'ına, organik madde ve inorganik kolloidlere, demir oksit ve fosfor içeriğine bağlı olarak arttırılabilir. Kurşun topraktan ve kısmen havadan yapraklar yolu ile alındığından yaşlı bitki kısımlarında birikir. Bundan dolayı sürgün ve çiçeklerde kurşun oranı düşüktür (Blaylock, ve ark., 1997).

Kurşun atmosferde metal veya bileşik halinde bulunduğundan ve bu şekillerde yayıldığından ve her durumda toksik özellik gösterdiğinden çevresel kirlilik yaratan en önemli ağır metaldir (Saygıdeğer, 1995; Karademir ve Toker, 1995).

Kurşunun yüksek miktarlardaki uygulamalarında bitki kök ve yapraklarında kurşun birikiminden kaynaklanan DNA hasarlarının ortaya çıkışında artma tespit edilmiştir (Gichner ve ark., 2008). Kurşun hücre turgoru ve hücre duvarı stabilizasyonunu olumsuz etkilemesi ve stoma hareketlerini ve yaprak alanını azaltması nedeniyle bitki su rejimini etkilemektedir. Aynı zamanda bitkilerde kökler tarafından tutulması ve kök gelişimini negatif etkilemesi sebebi ile katyon ve anyon alımını azaltmakta ve dolayısıyla besin alımı etkilenmektedir (Sharma ve Dubey, 2005). Kurşun elementi bitki köklerinde sürgünlere göre daha fazla birikmektedir. 10 ve 20 günlük periyodlarla kum kültüründe çeltik bitkisi yetiştirilerek 500 ve 1000 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ uygulaması gerçekleştirilmiş ve deney sonuçlarına göre kök büyümesinin %22-42 ve sürgün büyümesinin %25 oranında azaldığı, kökler tarafından absorbe edilen Pb miktarının sürgünlerden 1,7 ile 3,3 kat arasında daha yüksek olduğu görülmüştür (Verma ve Dubey, 2003). Kurşun elementinin inorganik tuzları, kök uzaması ve büyümesinde, tohum çimlenmesinde, terleme, fotosentez ve mitoz bölünme hızı üzerinde olumsuz etkiler oluşturmuştur (Wierzbicka, 1998; Ekmekçi ve ark., 2009; Pourrut, 2011).

Kurşunun (Pb), bitki büyüme, element alınımı, klorofil ve su içeriğine etkisinin araştırılması amacıyla domateste (*Solanum lycopersicum* L.) yapılan çalışmada, 0, 75, 150 ve 300 mg/kg dozajlarındaki kurşun miktarlarına maruz bırakılmış ve uygulanan dozajlar arttıkça biriken kurşun miktarının da arttığı tespit edilmiştir. Özellikle 300 mg/kg doz uygulamasında, mineral element alımlarında ve doku ve su içeriklerinde, büyüme tolerans indeksinde, total klorofil içeriğinde kurşun konsantrasyonunun artışına

bağlı olarak büyük azalmaların görüldüğü de tespit edilmiştir (Akıncı ve ark., 2010).

2.5. Bitki Besin Elementleri ve Önemi

Bitkiler büyüme ve gelişimlerini tamamlayabilmek için bazı elementlere mutlak ihtiyaç duyarlar. Bu elementlere esansiyel elementler denir. Bu elementlerin eksikliği oluştuğunda bitkinin yaşam döngüsünde veya biyolojik sistemlerinde aksaklıklar meydana gelmektedir (Epstein, 1999; Kabata-Pendias ve Mukherjee, 2007). Bitkiler yaşamını devam ettirebilmesi ve büyüebilmesi için sentezlemesi gereken tüm maddeleri esansiyel mineraller varlığında yapabilir (Epstein, 1999). Tablo 2.5.1’de yüksek bitkilerin büyük çoğunluğu için gerekli olan mineral elementler verilmektedir.

İnorganik maddeler, fotosentez sırasında organik madde yapımında ve birçok metabolik olayda önemli görevler yapmaktadırlar. Bu yüzden bitki bünyesinde bulunan inorganik elementler besleyiciler veya besin elementleri olarak adlandırılmaktadırlar. Besin elementi içeriklerinin bitkilerde bilinmesi büyük önem taşımaktadır (Kacar ve Katkat, 2007). Bitkilerin kullandığı besin maddeleri kullanım miktarına göre makro veya mikro besin elementleri olarak gruplandırılır. Makro besin elementleri azot (N), fosfor (P), potasyum (K), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg) ve sülfür (S)’dür. Bitkiler bu besin elementlerini mikro besin elementlerine göre daha fazla miktarlarda kullanmaktadırlar. Mikro besin elementleri ise, demir (Fe), mangan (Mn), çinko (Zn), bakır (Cu), bor (B), molibden (Mo)’dir (Tucker, 1999; Hosier ve Bradley, 1999) Mokhele ve ark., 2012). Sodyum (Na) ve klor (Cl) elementlerinin ise bazı bitkiler için gerekli olduğu düşünülmektedir (Tucker, 1999). Tüm bu besin elementleri arasındaki ilişkiler bir elementin diğer bir elementin ya da elementlerin alımını artırması veya engellemesi açısından önemlidir. Bu elementlerin arasındaki dengenin bozulması bitkide kimyasal bir strese neden olabilir (Mokhele ve ark., 2012).

Tablo 2-5-1: Bitki besin elementleri (Epstein, 1999).

(Makro besin elementlerinin değerleri yüzde(%) ve mikro besin elementlerinin değerleri milyonda bir kısım (mg/kg) olarak verilmiştir).

Element	Kimyasal Sembolü	Kuru maddedeki konsantrasyonu (% veya mg/kg) ^a	Molibdene göre nisbi atom sayısı
Sudan veya Karbon dioksitten elde edilenler			
Hidrojen	H	6	60 000 000
Karbon	C	45	40 000 000
Oksijen	O	45	30 000 000
Topraktan elde edilenler			
<i>Makro besin maddeleri</i>			
Azot	N	1,5	1 000 000
Potasyum	K	1,0	250 000
Kalsiyum	Ca	0,5	125 000
Magnezyum	Mg	0,2	80 000
Fosfor	P	0,2	60 000
Sülfür	S	0,1	30 000

Tablo 2-5-1'in Devamı			
Silisyum	Si	0,1	30 000
<i>Mikro besin maddeleri</i>			
Klor	Cl	100	3 000
Demir	Fe	100	2 000
Bor	B	20	2 000
Mangan	Mn	50	1 000
Sodyum	Na	10	400
Çinko	Zn	20	300
Bakır	Cu	6	100
Nikel	Ni	0,1	2
Molibden	Mo	0,1	1

Çalışmamızda kurşunun mineral elementlerin alımları ve taşınmalarına etkilerinin araştırıldığı besin elementleri olan B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na ve Zn'nun bitkilerdeki görevleri, eksiklikleri durumda bitkilerde ortaya çıkan morfolojik ve fizyolojik değişiklikler alt başlıklarda belirtilmiştir.

2.5.1. Bor

Bor elementi, bitkiler tarafından pasif absorpsiyon yoluyla borik asit formunda alınmaktadır (Hu ve Brown, 1997). 1923 yılında bitki için gerekli olduğu keşfedilen borun bitki bünyesindeki fonksiyonları yapılan çalışmalarla anlaşılmaya çalışılmaktadır. Transpirasyona bağlı olarak bor ksilem iletim boruları içerisinde bitkide tepe noktalarına değin taşınır (Raven, 1980). Borun alınması ve iletim borularında taşınması bitkinin su alımı ile yakından ilgilidir (Marschner, 1976). Warington (1923). Borun bitkide hücre duvarı sentezinde, şekerlerin taşınmasında, membran permeabilitesinde, karbonhidrat ve protein metabolizmasında, solunumda, oksin ve fenol metabolizmasında olmak üzere birçok fonksiyonu vardır (Kacar ve Katkat, 1998). Borun hücre uzamasında, zar işlevlerinde, nükleik asit sentezinde ve hormon tepkilerinde rol oynadığı bilinmektedir (Shelp, 1993; Shams, 2012). Bor eksikliğinde bitki hücre duvarında şekil bozuklukları, kök uzamalarında gerileme ya da durma ve köklerin çalılışmış bir görünüm alma durumu, genç yaprak ve tepe tomurcuklarında siyah nekrotik lekeler görülmesi tespit edilmiştir (Kacar ve Katkat, 1998). Bitki gerek duyulan bor miktarından fazlasını aldığı bitkinin gelişmesi olumsuz etkilenmektedir (Harite, 2008) ve gelişme çoğu kez durmaktadır (Karaömerlioğlu, 2011).

2.5.2. Kalsiyum

Bitkiler kalsiyumu Ca^{2+} iyonu şeklinde alır. Suda çözünebilir durumdaki Ca^{2+} 'un büyük bölümü vakuol içinde bulunmaktadır (Kacar ve Katkat, 2010). Kalsiyum hücre duvarında değişebilir formlarda ve plazma membranının dış yüzeyinde bulunabilen, kolaylıkla apoplasta girebilen bir bitki besin maddesidir (Öktüren ve Sönmez, 2005). Kalsiyum hücre duvarı ve bitkinin yapısı için oldukça gerekli bir makro elementtir (White ve Broadley, 2003; Wang, 2013). Hücre duvarlarında kalsiyumun yaklaşık %90'ı bulunmaktadır. Bitki hücrelerini bir arada tutan kohezyon etmeni olarak görev yapmaktadır. Kalsiyum bitkilerde kalsiyum pektat şeklinde bulunarak çeperin önemli bir yapıtaşını oluşturmaktadır. Yeteri kadar kalsiyum bulunmazsa, hücre çeperinin orta lameli dolayısıyla çekirdek bölünmesi olsa dahi yeni hücre çeperi oluşmamaktadır (Demarty ve ark., 1984). Kalsiyum, köklerin ve sürgünlerin gelişimini, gövde uzamasını, damarların gelişimini (Matschi ve ark., 2013), yaprakların uzun süre dayanıklılığını ve

bu sayede fotosentezin devamlılığını sağlamakta, azot metabolizmasında ve karbonhidratların taşınmasında, bitkinin büyüme ve gelişme merkezi düzenleyicisi olarak fonksiyon göstermektedir (Hepler, 2005; Vanneste, 2013). Kalsiyum eksikliği genç yapraklarda kloroza sebep olmaktadır (Navarro ve ark., 2000). Kalsiyumun şiddetli eksikliğinde ise bitkilerde yapraklarda nekrozlar da görülmektedir (Aktaş, 2006). Kalsiyum dış stres etmenlerinin algılanmasında böylece bitki savunma mekanizmalarının aktif hale getirilmesinde önemli rol oynamaktadır (Bowler ve Fluhr, 2000) Örneğin; tuza toleransın artırılmasında kalsiyumun önemli bir rolünün olduğu pek çok çalışmada ortaya konmuştur (Cabañero, 2004; Lei, 2014).

2.5.3. Bakır

Bakır bitkiler tarafından temelde Cu^{2+} iyonu şeklinde alınır. Bitkiler doğal ve yapay organik bileşikler şeklindeki bakırı aldıkları gibi yaprakları aracılığıyla bakır tuzlarını ve komplekslerini de alırlar (Kacar ve Katkat, 2010). Bakır, bitki, hayvan ve insan dâhil olmak üzere bütün canlılar için mutlak gerekli bir elementtir (Güler ve Çobanoğlu, 2001). Bakır Cu^{+} 'dan Cu^{2+} 'ye oksitlenen redoks olaylarında görev alan enzimlerin bu fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için gereklidir. Fotosentez sırasında fonksiyonel olan plastosiyanin bu enzimlere bir örnektir (Haehnel, 1984; Solomon, 2004; Monari, 2012). Bitki tarafından kök dokularında daha fazla biriktirilme eğilimi bulunan bakırın, gövdeye iletimi sınırlı olarak ortaya çıkmaktadır ve bitkiler için bakır eser miktarda gerekmektedir (Kartal ve ark., 2004). Bakır eksikliğinde başlangıç belirtiler olarak nekrotik benekler önce genç yaprakların uçlarında belirmekte, ardından yaprak kenarları boyunca ilerleyip yaprağın tabanına ulaşmaktadır. Bakırın bitkide fazlalığında ise kloroz, nekroz, büyüme inhibisyonu gibi problemler ortaya çıkmakta, hücrelere toksik etki yapmaktadır (Marschner, 1995; Clemens, 2001; Larcher, 2003; Milner, 2014). Bakırın şiddetli eksikliğinde yapraklar olgunlaşmadan dökülmektedirler, ayrıca, toksik seviyelerde; kök kütikulasında kalınlaşmalar, kök gelişiminde inhibasyon, yan kök oluşumunda azalma ve koyu renkli benekler oluşmaktadır (Kartal ve ark., 2004).

2.5.4. Demir

Demir, dünya üzerinde oldukça bol bulunan bir elementtir ve çok kararlı bir yapıda olduğundan suda çözünmez (Ding ve ark., 2014). Bitkiler bu mineral elementi

bünyelerine alabilmek için çeşitli yollar geliştirmişlerdir (Walker ve Connolly, 2008; Palmer ve Guerinot, 2009; Hong, 2013). Demir bitkilerde önemli fizyolojik işlevleri olan ve pek çok biyokimyasal tepkimeleri katalize eden çeşitli enzimlerin yapısına girerek onların aktif hale geçmesini sağlarlar (Kacar ve Katkat, 1998; Curie ve Briat, 2003; Andersson, 2014). Ayrıca fotosentez, solunum, DNA sentezi gibi metabolik olaylarda görev almaktadır (Osma ve ark., 2012). Demir eksikliği dikotiledon bitkilerde birçok abnormal morfolojik ve fizyolojik olaylara sebep olmaktadır. Örneğin, biber ve bezelye gibi bitkiler demir eksikliğinde daha fazla etilen üretmektedirler. Bu da kök saçaklarının gelişimi ve köklerin diğer morfolojik özelliklerini değiştirmektedir (Schenkeveld ve ark., 2007; Panjtandoust, 2013). Demir bitkide mobil bir element olmadığından yaşlı yapraklardan genç yapraklara geçişi söz konusu değildir ve bu sebepten demir eksikliği belirtileri öncelikle genç yapraklarda ve özellikle de son çıkan yapraklarda gözlenmekte ve eksiklik uzun vadede ortaya çıkarsa yaşlı yapraklar da etkilenmektedir (Kacar ve Katkat, 2010). Protein sentezinin gerçekleştiği metabolik olaylarda demirin varlığı çok önemlidir. Yeterli miktarda demir içermeyen bitkilerde total protein miktarının azaldığı ve bununla birlikte çözünabilir organik azotlu bileşiklerin miktarlarının arttığı gözlenmiştir (Kacar ve Katkat, 2007).

Toprak sıcaklığının düşük ya da yüksek olması ve toprak neminin gereğinden fazla bulunması tarla koşullarında bitkilerin demir alımını olumsuz şekilde etkilemekte ve bitkilerde demir noksanlığı belirtileri görülebilmektedir (Römheld ve Marschner, 1986). Toprakta fazla miktarda ağır metal bulunması da bitkilerde demir eksikliğine yol açar. Örneğin, topraktaki yüksek miktarlardaki bakır, çinko ve mangan bitkilerde demir alımını negatif etkilediği bilinmektedir (Yılmaz, 2004).

2.5.5. Potasyum

Bitkiler geliştikleri ortamdan potasyumu K^+ iyonu şeklinde alır. Potasyum, bitkilerde fotosentezin metabolik reaksiyonlarında, osmotik potansiyelin ayarlanmasında, stomaların açılıp kapanma mekanizmasının düzenlenmesinde, bitki besin elementlerinin ve fotosentez ürünlerinin taşınmalarında, enzimlerin fonksiyonel halde bulunmalarında ve hücre bölünmesinde rol oynar (Kacar, 2006; Kacar ve Katkat, 2010). Potasyum, bitkilerde su dengesi üzerinde öneme sahiptir. Aktif absorpsiyon ile potasyum iyonunun

alınması ve birikmesi sonucu hücrede osmotik potansiyel artar ve buna bağlı olarak hücreye daha fazla su girişi olur. Bu nedenle potasyum hücrede ve dolayısıyla bitkide su dengesinin sağlanmasında büyük öneme sahiptir (Mengel ve Arneke, 1982). Potasyum iyonunun bitkiler tarafından alınmasıyla stomalar açılmakta, kaybı ile de bitkilerde stomalar kapanmaktadır (Humble ve Raschke, 1971; Penny ve Bowling, 1974). Bitkiler yeteri kadar potasyum alıyorsa suyu optimum kullanabilir (Fırat, 1998). Potasyum soğuğa, donlara ve kuraklığa karşı toleransı, azotun etkinliğini, hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılığı, meyvenin dayanma ömrünü ve meyvedeki yağ, şeker ve nişasta miktarlarını artırır (Tucker, 1999; Bozcuk, 2000). Gıda ve yem bitkilerinin protein değerlerini yükseltmek için potasyum uygulaması gerçekleştirilir (Kacar, 2006). Kıbağ ve Munzuroğlu (2003), baklagillerdeki potasyum içeriğinin diğer bitkilere oranla daha fazla bulunduğunu belirtmektedir.

Potasyum hücre membranlarından kolaylıkla geçebildiği yaşlı organlardan genç organlara taşınması mümkün olabilmektedir. Bitki potasyumu yeteri kadar bünyesine alamıyorsa kloroz görülmektedir (Kacar ve Katkat, 2010). Potasyumun bitkinin yaşlı kısımlarından genç ve yeni gelişmekte olan kısımlarına taşınmasından dolayı kloroz öncelikle yaşlı yapraklarda ortaya çıkmakla beraber eksikliğin uzun süreli devam etmesi halinde genç yapraklarda da görülmektedir (Cooper ve Donald, 1951). Potasyumun aşırı eksikliğinde yapraklar aşağı doğru kıvrılmakta, yaprak kenarları rulo şeklini almaktadır ve potasyum alımı gerçekleşmediği için yapraklar küçük kalmaktadır (Jones ve ark., 1949). Potasyum eksikliğinin mısır bitkisi köklerinin direncinin toprakta bulunan kökleri çürüterek zarar veren zararlılara karşı azaldığı ve gövdenin yere eğilmesine neden olduğu gösterilmiştir (Bozcuk, 2000). Potasyum eksikliği genç bitkilerde gövdenin zayıf kalmasına, köklerin hasarlı oluşmasına ve bundan dolayı bitkinin kolaylıkla yere devrilmesine neden olmaktadır (Aybak, 2005). Potasyum yetersizliğinde bitkilerde protein metabolizması ve buna bağlı olarak karbonhidrat metabolizması bozulmaktadır ve bu durumun sonuçlarından biri olarak bitkiler ihtiyacından daha fazla karbonhidrat depolar. Bunun sebebi proteinlerin yapısına girecek olan karbonun karbonhidrat olarak depo edilmesindendir (Bozcuk, 2000).

2.5.6. Magnezyum

Magnezyum toprakta iyonik (Mg^{2+}) halde bulunan mobil bir makro mineral element olup bitkiler için önemlidir (Kacar ve Katkat, 2010). Bitkilerde bulunan birçok enzimin yapısında magnezyum kofaktör olarak görev yapar. Magnezyumun DNA ve RNA sentezlerinde, fotosentezde klorofilin yapısında bulunmasından dolayı organik bileşiklerin sentezinde, bitki metabolizmasının enerji kaynağı olan solunumda ATP üretiminde, bitkilerin fosfor alımında fonksiyonları vardır (Müller ve Hansson, 2009; Elmlund ve ark., 2008; Kacar ve Katkat, 2010). K/Mg oranındaki magnezyumun azalması asmalarda stem dieback hastalığının ortaya çıkışını arttırmıştır (Uçgun ve Gezgin, 2008). Magnezyum eksikliği belirtileri bitkilerde öncelikle yaşlı yapraklarda gözlenmekte, bu yaprakların damarları arasında kloroz oluşmaktadır ve daha da ileri seviyede kök gelişimi olumsuz etkilenmektedir ve dolayısı ile özellikle tarım bitkilerinde verim ve kalite düşmektedir (Kacar ve Katkat, 2010). Magnezyum eksikliğinin en ayırt edici özelliği yaprak damarları arasında görülen sararmalardır. Şiddetli noksanlıkta yapraklar sarı veya beyaz olabilmekte, olgunlaşmamış yapraklar dökülmektedir ve ayrıca normal yapraklar ışığa karşı hassas yapıda olduklarından erken dökülürler (Marschner, 2008).

2.5.7. Mangan

Toprakta oksitler ve hidroksitler şeklinde bulunan mangan bitkiler tarafından geliştikleri ortamdan kökleri aracılığıyla Mn^{2+} iyonu şeklinde veya doğal veya yapay kompleks ajanlara moleküler şekilde bağlanmış olarak alınır (Kacar ve Katkat, 2010). Manganın bitki tarafından alınabilmesi için organik asitler, amino asitler ve fenolikler gibi maddelerin oluşturduğu bazı kök salgılarına bağlıdır (Junior ve ark., 2010). Manganın kökler tarafından alınabilmesi için kök yüzeyindeki H^+ iyonları ile toprakta bulunan manganın yer değiştirmesi, kök salgılarıyla veya ölü hücre ve dokuların mikrobiyolojik ayrışmaları veya mangan oksitlerin indirgenme tepkimeleri olaylarından birinin gerçekleşmesi yolu ile ortaya çıkabilmektedir (Mou ve ark., 2011). Ayrıca bitkiler, püskürtme yönteminin kullanılması yoluyla mangani yaprakları aracılığıyla da bünyelerine alabilirler (Kacar ve Katkat, 2007). İki önemli enzim olan enzim-S ve süperoksit dismutazın (SOD) yapılarında Mn^{2+} yer almaktadır. Enzim-S fotosentezde

rol oynar ve manganın yeteri kadar alınamaması sonucu fotosentezde gerileme görülmektedir (Kacar, 1996). SOD enzimi, biyokimyasal tepkimeler sonucu oluşan hidrojen peroksidin parçalanmasında rol oynarak hücrelerin zarar görmesini engeller (Najafpour, 2009; Babbie ve ark., 2010). Çok kolay yükseltgenebilmesinden dolayı fotosentezde elektron taşınımı ve oksijen içermeyen radikallerin toksik etkilerinin ortadan kaldırılması gibi olaylarda önemli rol oynamaktadır (Kabata-Pendias ve Mukherjee, 2007). Mangan bitkilerin su içeriğini düzenler ve bu nedenle optimum düzeyde mangana sahip bitkiler daha az suya ihtiyaç duymaktadırlar (Anaç ve ark., 2013). Bitkilerin mangan içerikleri tür ve çeşidine bağlı olduğu gibi bitkilerin yetiştirme ortamlarına da bağlı olarakta değişiklikler göstermektedir (Kacar ve Katkat, 2007).

2.5.8. Sodyum

Sodyum bitkiler tarafından kökleri ile topraktan Na^+ iyonu şeklinde pasif olarak alınmakta ve ksilem ve floemde taşınmaktadır (Schubert ve Läuchli, 1990). Sodyum alımları yönünden bitki çeşitleri arasında önemli ayrımlılık bulunmaktadır (Mengel ve ark., 2001). Bitki genotipleri de sodyum alımları yönünden önemli farklılıklar göstermektedir (Karanlık ve ark., 1999). Sodyum potasyuma kimyasal olarak benzer (Kacar ve Katkat, 2007) ve genellikle sodyumun potasyumla olan rekabeti nedeniyle sodyum, potasyum noksanlığına neden olabilmektedir (Kaya ve ark., 2002). Bitkiler tarafından mineral elementlerin alımı sırasında özellikle sodyum ile potasyum ve kalsiyum gibi elementler rekabete girer ve bundan dolayı bitkilerde Na/K ve Na/Ca dengesi hızla bozulur (Marschner, 1995). Sodyum bu nedenden dolayı bu elementlerin topraktan alınımını ve bitkisel dokularda taşınımını azaltmaktadır (Tisdale ve ark., 1985). Bu durum bitkilerde potasyum eksikliğine sebep olmakta ve çeşitli enzimlerin aktivasyonu bu olay neticesinde engellemektedir (Tester ve Blatt, 1989). Bitkilerde stresten etkilenme derecesini düşürmek için bitkilere dışarıdan potasyum takviyesi yapılmaktadır (Cramer, 2002). Toprakta çok fazla miktarda sodyum bulunması bitkilerde sodyumun kök merkez silindiri ile gövde dokularında birikmesine neden olmaktadır ve bu durum da bitkinin su almasını ve suyu taşımasına ket vurmaktadır (Fırat, 1998).

Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) yüksek sodyum içeren veya tuzluluk problemi olan topraklarda yetiştirildiğinde büyümede durgunluk, yapraklarda yanıklık ve hassas çeşitlerde ölüm meydana gelebilmektedir. Bu etkiler özellikle çimlenme ve fide gelişimi sırasında ortaya çıkar. Sonuç olarak bitkilerde bu sebeplerden dolayı önemli ölçüde cılız gelişim görülebilmektedir (Jebara ve ark., 2005). Suyun önemi ve kullanımı toprakta birikmiş tuz varlığında daha da artmaktadır (Aybak, 2005). Kacar ve Katkat (2007), %0.15 oranında sodyum miktarının buğday ve yonca bitkilerinde, %0.40 oranında sodyum miktarının genç fasulye bitkisi yapraklarında ve %0.40 oranında sodyum miktarının arpa bitkisinde toksik etki gösterdiğini saptamışlardır.

2.5.9. Çinko

Bitkiler çinkoyu genelde iki değerlikli Zn^{2+} iyonu şeklinde alır (Kacar ve Katkat, 2010). Kimi bitkilerin kökünde Zn içeriği yüksektir. Gövdede çinko göreceli olarak boğumlarda toplanır (Obata ve Kitagishi, 1980). Bitki kökleri tarafından alınan çinko kısa süre içerisinde gövdeye taşınır (Robson ve Pitman, 1983). Çeşitli enzimlerin yapılarında yer alır ve çok sayıda enzimi aktive eder. Karbonhidrat, protein ve oksin metabolizmasında rol oynar (Kacar ve Katkat, 2010). Ayrıca nükleik asit ve diğer mineral element metabolizmalarında rol oynar (Osma ve ark., 2012). Çinko yetersizliğine her bitkinin duyarlılığı farklı olmakla birlikte meyve ağaçları içerisinde özellikle turuncgillerde çinko eksikliğine sıklıkla rastlanılmaktadır (Kacar ve Katkat, 2010). Mısır, soya, pamuk, fasulye, patates ve soğan gibi bitkiler çinko eksikliğine duyarlı, *Poaceae* familyasına mensup olan bitkiler, çinko eksikliğine toleranslı bitkiler olarak bilinirler (Çakmak ve ark., 1996). Toprakta çinko konsantrasyonu arttığında bitkilerde kök gelişimi ve fosfor ve demir alımları azalır (Boşgelmez ve ark., 2001).

Çinko noksanlığında bitkilerde protein miktarı azalmakta ancak amino asitlerin miktarı arttığı için protein kalitesi etkilenmemektedir (Çakmak ve ark., 1989). Ayrıca çinko, nişasta üretimi, oksitosin aktivitesi, çiçeklenme, tane oluşumu ve tohum olgunlaşması olayları içerisinde rol oynamaktadır (Boşgelmez ve ark., 2001; Kacar ve Katkat, 2010). Çinko eksikliğinin en açık belirtisi olan bodur büyüme ve küçük yaprak oluşumunun oksin metabolizmasındaki bozulmadan kaynaklandığı ve özellikle de indol asetik asit

(IAA) oluşumundaki azalmadan dolayı ortaya çıktığı düşünülmektedir (Kacar ve Katkat, 2010).

2.6. ICP (Inductively Coupled Plasma) tekniği

Spektroskopi, ışının madde ile etkileşimini inceler. Spektrometre ise özellikle elektromanyetik ışın şiddetinin çeşitli detektörlerle ölçülmesini ifade eder. Son yıllarda, örneklerin atomlarına ayrılması ve oluşan atomların uyarılması yoluyla analize imkan veren ve elektriksel boşalığa dayanan atomik emisyon spektroskopisi, yerini plazmalara bırakmıştır (Eroğlu ve Aksoy, 2003). ICP tekniğindeki plazma argon gazı ile oluşturulur. ICP torch'u üç kuartz tüpten oluşur. Çoğunlukla argon olan inert bir gaz tübe doğru akar. Bu akıcı gaz plazmayı destekleyen gazdır ve kuartz tüp için bir soğutucu görevi yapar. Plazma elektromanyetik olarak argon gazının indüksiyon sarımlarında bir radyo frekans jeneratörü ile etkileşmesi sonucu oluşur. Radyo indüksiyon jeneratörünün gücü 27 veya 41 Mhz de 0,5-2 kw'tır. Argon gazı akımında ilk elektronların oluşturulması bir elektron kaynağı ile sağlanır ve elektronların argon atomları ile çarpışması sonucu argon iyonları daha fazla sayıda elektronun oluşmasına sebep olur. Bu etkileşim sonucunda iyonlar ve elektronlar aynı yöne doğru akmaya başlar. Ortamın bu akmaya karşı gösterdiği direnç ile ortamın sıcaklığı 10000 K'e (+2730C) kadar yükselir. Plazmanın içine giren örnek çözeltisi, atomlarına ayrılır ve uyarılır. ICP yönteminin avantajları yüksek sıcaklıklara ulaşabilmesi, plazma sıcaklığının her bölgede aynı olması ve bu nedenle kendi absorpsiyon ve kendi dönüşüm etkileriyle karşılaşılması, örnek çözeltinin plazma içerisinde oldukça uzun tutulabilme süresine sahip olması ve atomlaştırma ayırma ve uyarma işlemlerinin inert kimyasal çevrede gerçekleştirilmesidir. Alevin kullanıldığı absorpsiyon ve emisyon spektroskopisi yöntemlerinde, oksijenin yüksek kısmi basıncı nedeniyle, toprak alkali elementleri, nadir toprak elementleri ve bor, silisyum gibi bozunmayan oksit ve hidroksit radikaller oluşturan elementlerin analizlerinde duyarlılık düşüktür. Fakat argon gazı ile oluşturulan plazmada böyle bir sorun yoktur. ICP yöntemi ile aynı anda analizi mümkün olan tüm elementlerin nitel ve nicel tayinleri yapılabilir (Yıldız, 1993).

Plazmada oluşan atom ve iyonların emisyonu değişik şekillerde ölçülebilir. ICP-OES (İndüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektroskopisi) sırası ile ölçüm yapanlar (İng.: sequential) ve aynı anda ölçüm yapanlar (İng.: simultaneous) olmak üzere iki

bölümde incelenebilir (Eroğlu ve Aksoy, 2003). Bizim çalışmamızda Perkin Elmer marka ICP-OES Optima 7000 DV kullanılmıştır (Şekil 3-8-1).

2.7. Genotoksisite

Genotoksisite, fiziksel ya da kimyasal ajanlarla genetik materyalde oluşan hasardır. Toksik maddelerin hücrede genom yapısında meydana getirdiği değişimler, mutasyon olarak da isimlendirilir (Kramer, 1998). Bitkilerin hareket kabiliyetleri kısıtlı olduğundan çevre kirliliğine ve mutajenik kimyasallara maruz kalma olasılıkları daha yüksektir. Bu maruziyet sonucunda bitkiler üzerinde genotoksik etkiler nedeni ile genomlarında mutasyon oluşumları ortaya çıkmaktadır (Cunningham ve Lee, 1995). Ağır metallerin artışına bağlı olarak hücre zarında, protein veya DNA gibi hücre bileşenlerinin yapısında hasarlar oluşabilmektedir (Prasad ve ark., 2001). Genotoksik hasarlara örnek olarak DNA tek zincir kırılmaları, DNA çift zincir kırılmaları, kromozomların ayrılamamaları, mikro çekirdek oluşumu (MN), nükleotid kayıpları veya eklenmeleri, gen duplikasyonları, çerçeve kayma mutasyonları, genom kararsızlığı verilebilir (Waisberg ve ark., 2003).

Turpta (*Brassica napus* L.) yapılan çalışmada turp fideleri 0.5–5 mM kurşun nitrata [$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$] maruz bırakılarak etkileri, amino-levulinik asit (ALA), amino-levulinik asit dehidrataz (ALAD), fotosentetik pigment içeriği (klorofil *a*, klorofil *b* ve karotenoidler) açısından ve RAPD profil analizleriyle karşılaştırmalı olarak strese maruz kalmış ve kalmamış fidanlar arasında değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Ağır metal tespitine yönelik analizler sonucunda, kontrol bitkilerine oranla strese maruz kalmış bitkilerin yapraklarında 410 kat fazla kurşun tespit edilmiş ve kökteki kurşun oranının yapraklara oranla 1,7 kat fazla olduğu anlaşılmıştır. ALA ve ALAD için yapılan analizler sonucunda bunların miktarlarının (5 mM Pb dozajı uygulaması hariç) arttığı ve ters bir etkinin 5 mM Pb dozajı uygulamasında ALAD miktarı için azalma şeklinde ortaya çıktığı görülmüştür. RAPD profil analizleri sonucunda, kullanılan 11 RAPD primerinden band büyüklükleri 189–2928 baz çifti arasında olan toplam 90 DNA bandı elde edilmiş ve kontrol ile strese maruz kalmış bireyler arasındaki karşılaştırma ile strese maruz kalan bireylerin profillerinde ekstra 35 DNA bandının oluştuğunu göstermiş ve yeni oluşan bantların %77'sinin 1 kb'den küçük olduğu tespit edilmiştir.

Fotosentetik pigment içeriği ölçümleri sonucunda, farklı konsantrasyonlarda uygulanan kurşun stresi ile klorofil *a* ve klorofil *b* içerikleri arasında zayıf bir ilişki olduğu fakat en yüksek dozaj olan 5 mM kurşun stresi uygulanması sonucunda klorofil *a* içeriğinde %57,4 ve klorofil *b* içeriğinde %68,5, karotenoidlerin içeriğinde %38,1 azalma tespit edilmiştir. Sonuç olarak RAPD profil analizlerinin ve fizyolojik parametrelere ait ölçümlerin birlikte kullanılmasının ağır metal kirliliğinin tespitinde ekotoksikolojik olarak güçlü bir enstrüman olduğunu göstermiştir (Cenkci ve ark., 2010).

Roka (*Eruca sativa*) ile yapılan diğer bir çalışmada, farklı dozlardaki çinko, kurşun ve kadmiyum ağır metal miktarlarının (50 mg/kg - 100 mg/kg - 150 mg/kg) koleoptil ve radikula uzunluklarına etkisi araştırılmış ve en fazla etkilenen yapının radikula olduğu gösterilmiştir. Kadmiyum ve kurşun 150 mg/kg'de genotoksik etki göstermiş, yüksek konsantrasyondaki kadmiyum miktarının çinko ve kurşuna oranla radikula ve koleoptil büyümesini daha fazla azalttığı görülmüştür. RAPD tekniği kullanılarak genotoksik etkiler incelenmiş ve 20 çeşit primer kullanılmasına rağmen bunlardan 4 tanesinden DNA band profilleri elde edilememiştir. 3 primerden tek band, 13 primerden 5'ten fazla band elde edilmiş ve primer başına ortalama band sayısının 4 olduğu görülmüştür. Yüksek doz kadmiyum uygulamalarında spesifik DNA bantları elde edilmesine rağmen yüksek dozdaki çinko uygulamalarından spesifik DNA bantları elde edilememiştir (Qurainy ve ark., 2010).

Kurşunun mutajenik etkisini araştırmak amacıyla bir tütün varyetesi (*Nicotiana tabacum* var. *xanthi*) ile çalışılmış ve Comet analizi ile DNA hasarları değerlendirilmiş ve yüksek miktardaki kurşun uygulamalarında DNA hasarlarında önemli derecede artış tespit edilmiştir. Aynı zamanda bitki yaprak-kök yapılarında ağır metal analizleri gerçekleştirilmiş ve yüksek miktardaki kurşun uygulamalarında kurşun birikiminde dikkat çekici seviyede artış gözlenmiştir (Gichner ve ark., 2008).

2.8. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)'a Dayalı DNA Belirteçleri

PZR belirli bir DNA bölgesinin *in vitro* şartlarda ileri (forward) ve geri (reverse) primerler kullanılarak enzimatik olarak çoğaltılması işlemidir. PZR, Kary Mullis tarafından geliştirilmiş olup, moleküler biyoloji alanının hızlı bir şekilde gelişmesinde katalizör rol oynamıştır (Mullis ve ark., 1987; Steffan ve Atlas, 1991). PZR tekniği,

genetik yapısı değiştirilen bitki veya mikroorganizmaların tespiti, moleküler klonlama, DNA baz dizilişlerinin belirlenmesi, genetik akrabalık ve adli tıp vakalarının tespitinde kullanılmaktadır.

PZR'nin çalışma prensibi üç basamaktan oluşan reaksiyon dizisinin ard arda tekrarlanmasına dayanır:

1. DNA'nın çift iplikçığının sıcaklıkla ayrılması
2. Oligonükleotid primerlerin oluşturulan tek zincirli DNA molekülünde hedef bölgelere bağlanması
3. dNTP'lerin varlığında DNA polimerazın primerleri kullanarak hedef DNA bölgesinin kopyalanması

PZR tekniğinin uygulanması PZR makinesi içinde *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmekte olup, gerekli reaksiyon karışımı kalıp DNA'yı, nükleotid karışımını (dNTPs), bir ya da bir çift oligonükleotid primeri, DNA polimeraz enzimini, tampon çözeltisini ve $MgCl_2$ 'ü içerir.

2.9. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA – Rastgele Çoğaltılmış DNA Farklılığı) Tekniği

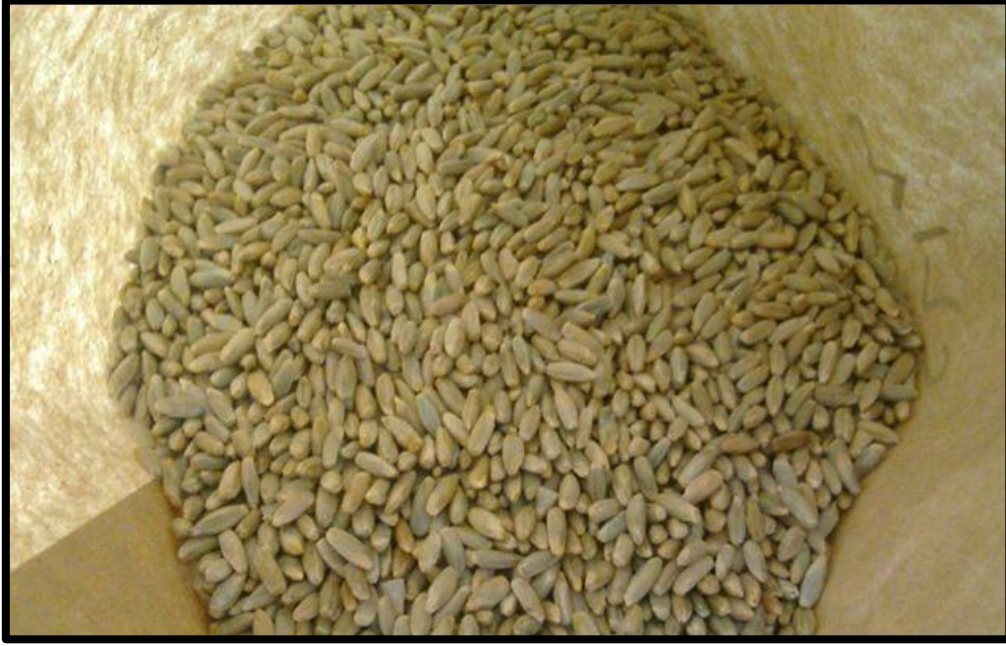
RAPD ilk defa 1990 yılında rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve PZR kullanımı temelli bir teknik olarak ortaya çıkmıştır (Williams ve ark., 1990; Welsh ve McClelland, 1990). RAPD yönteminde 9-10 baz çiftlik genel (universal) primerler kullanılmaktadır. İleri ve geri primerler kalıp DNA üzerinde komplementerleri olan, birbirine yakın iki bölgeye bağlanarak arada kalan DNA bölgesinin amplifikasyonunu sağlarlar. Bu şekilde çoğaltılan DNA bölgesine ait belli büyüklükteki DNA iplikçikleri agaroz jel üzerinde elektrik akımı uygulanarak belli bir voltaj altında yürütülür. Aynı türe ait farklı varyeteler yada farklı türler arasındaki akrabalık ilişkisi yada farklı koşullara maruz kalmış aynı türün bireyleri arasındaki genom düzeyindeki farklılıklar farklı sayıda primerler kullanılarak DNA'nın farklı bölgelerinin çoğaltılması sonucu DNA profil analizlerinin yapılması ile ortaya çıkarılabilir. RAPD profil analizleri polimorfizmin göstergesi olarak kullanılabilir (Welsh and McClelland, 1990). RAPD metodunun

güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini etkileyen pek çok farklı değişken vardır ve en önemlilerinden birisi hedef DNA'dır. MgCl₂ konsantrasyonu, Taq DNA polimeraz konsantrasyonu, primerlerin konsantrasyonları, dNTP'lerin konsantrasyonları ve primerlerin bağlanma seviyeleri RAPD tekniğini etkileyen diğer temel değişkenlerdir (Aydın, 2004). RAPD çalışmaları *in vivo* ve *in vitro* koşullarda meydana gelen DNA hasarlarının ve değişimlerinin tespitinde, karsinojenik instabilite analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Williams ve ark., 1993). Ayrıca, çok az miktarda DNA'ya ihtiyaç olması, evrensel primer seti kullanılması, hızlı sonuç alınması ve pahalı bir teknik olmaması RAPD tekniğinin genetik çalışmalarda sıklıkla kullanılması için avantaj oluşturmaktadır (Atienzar ve Jha, 2006). RAPD tekniğinin dezavantajı ise güvenilirliğinin sınırlı olmasıdır. Farklı laboratuvarlarda farklı sonuçlar hatta aynı çalışma içerisinde farklı sonuçlar ortaya çıkabilmektedir (Aksoy, 2009).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali

Çalışmada Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilen çavdar (*S. cereale* var. Aslım-95) tohumları kullanıldı.



Şekil 3-1-1: Çalışmada Kullanılan *S. cereale* L. var. Aslım-95 tohumları

3.2. Kimyasallar

Tohumların yüzey sterilizasyonu için %20'lik ticari çamaşır suyu (ACE® marka) kullanıldı. Kültür ortamlarının hazırlanmasında kullanılan kimyasallar; doku kültürü ile tohumdan bitki üretimleri sırasında Murashige ve Skoog (1962) tuzları (MS) [Sigma M5524], bitkilere kurşun ağır metali uygulamaları sırasında $Pb(NO_3)_2$ [Acros Organics 19811] bileşiği kullanıldı. MS besi ortamının içerdiği kimyasalların miktarları Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Çalışmada bitki besi ortamına jel yapıcı olarak agar [Sigma A7921] kullanıldı.

3.2.1. Farklı Konsantrasyonlarda (100, 200 ve 400 µM) Pb(NO₃)₂ Solüsyonu Hazırlanması

2 lt 400 µM'lık konsantrasyonda Pb(NO₃)₂ içeren solüsyon hazırlanmıştır. Bu solüsyondan 250 ml alınıp 1000 ml'ye kadar distile su ile tamamlanıp 100 µM konsantrasyonda solüsyon hazırlandı. 400 µM'lık solüsyondan 500 ml alınıp 1000 ml ye distile su ile tamamlanarak 200 µM'lık konsantrasyonda solüsyon hazırlanmıştır.

Tablo 3-2-1: MS Kültür ortamının kimyasal bileşenleri ve miktarları (Murashige ve Skoog, 1962)

Kullanılan Kimyasallar	Miktar (mg/l)
İNORGANİKLER	
Makro elementler	
NH ₄ NO ₃	1 650
KNO ₃	1 900
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Mikro elementler	
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37,3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3

Tablo 3-2-1'in Devamı	
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025
ORGANİKLER	
Glycine	2
Myo-inositol	100
Nicotonic acid	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
Thiamine HCl	0,1

3.3. Sterilizasyon Teknikleri

3.3.1. Besiyerinin sterilizasyonu

Hazırlanan besiyeri sterilizasyon için otoklavda 20 dakika boyunca 105 kPa basınçta 121°C'de tutuldu.

3.3.2. Çalışma ortamının ve kullanılan aletlerin sterilizasyonu

Steril çalışma alanında kullanılacak yüzeyler (steril kabin içi) kullanımdan 10–15 dakika önce %70’lik alkolle silinerek UV lambası açıldı. Kullanılan aletler (bisturi, pens vb.) kullanımdan önce etil alkol içine batırıldıktan sonra bek alevine tutularak alevle yüzey sterilizasyonuna tabi tutuldu. Tohumların çimlendirilecekleri 500 ml’lik cam magenta kapları 20 dakika boyunca 105 kPa basınçta 121°C’ de otoklavda bırakıldı.

3.3.3. Tohumların yüzey sterilizasyonu

Çavdar tohumları ilk olarak %70’lik etil alkolde 15 dakika bekletildikten sonra steril kabin içerisinde karıştırılarak 3 defa steril saf suyla yıkandı. Yıkanan tohumlar %20’lik çamaşır suyunda 10 dakika bekletildi. Daha sonra tohumlar steril distile su ile 3 defa yıkandı.

3.3.4. Sterilizasyonda kullanılan solüsyonların hazırlanışı

%70’lik alkolün hazırlanışı: %96’lık saf alkolden 730 ml alındı ve hacmi distile su ile 1000 ml’ye tamamlandı.

%20’lik çamaşır suyunun hazırlanışı: %5 oranında Sodyum Hipoklorit (NaClO) içeren çamaşır suyundan 20 ml alındı ve hacmi distile su ile 1000 ml’ye tamamlandı.

3.4. Besiyerinin Hazırlanması

Çimlendirme için besiyerinin hazırlanması;

1 litrelik borosilikat cam şişe içine 250 ml distile su konulmuştur. 4.43 gram tartılan MS tuzu borosilikat cam şişe içine ilave edilmiştir. Borosilikat cam şişe içine manyetik balık atılmış ve ısıtıcılı manyetik karıştırıcı ile MS tuzları eriyene kadar karıştırılması sağlanmıştır. MS tuzları eridiğinde 30.0 gram tartılan sukroz karışım içerisine ilave edilmiştir. Sukroz eridikten sonra 8.50 gram tartılan agar karışım içerisine eklenmiştir. Manyetik karıştırıcı da homojen hale getirilen besiyerinden manyetik balık çıkartılmış ve 1 litre çizgisine kadar distile su ile tamamlanmıştır. Son olarak besiyeri 0.5 N NaOH ve 0.5 N HCl solüsyonları kullanılarak pH=5.80’e ayarlanmıştır.

Ağır metal içerikli besiyerinin hazırlanması;

100, 200 ve 400 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ konsantrasyonlu solüsyonlar hazırlanmıştır. Daha sonra bu solüsyonlar içine agar, MS ve sukroz eklenerek her konsantrasyona ait besiyeri hazırlanmıştır. Son olarak besiyeri 0.5 N NaOH ve 0.5 N HCl solüsyonları kullanılarak $\text{pH}=5.8$ 'e ayarlanmıştır.

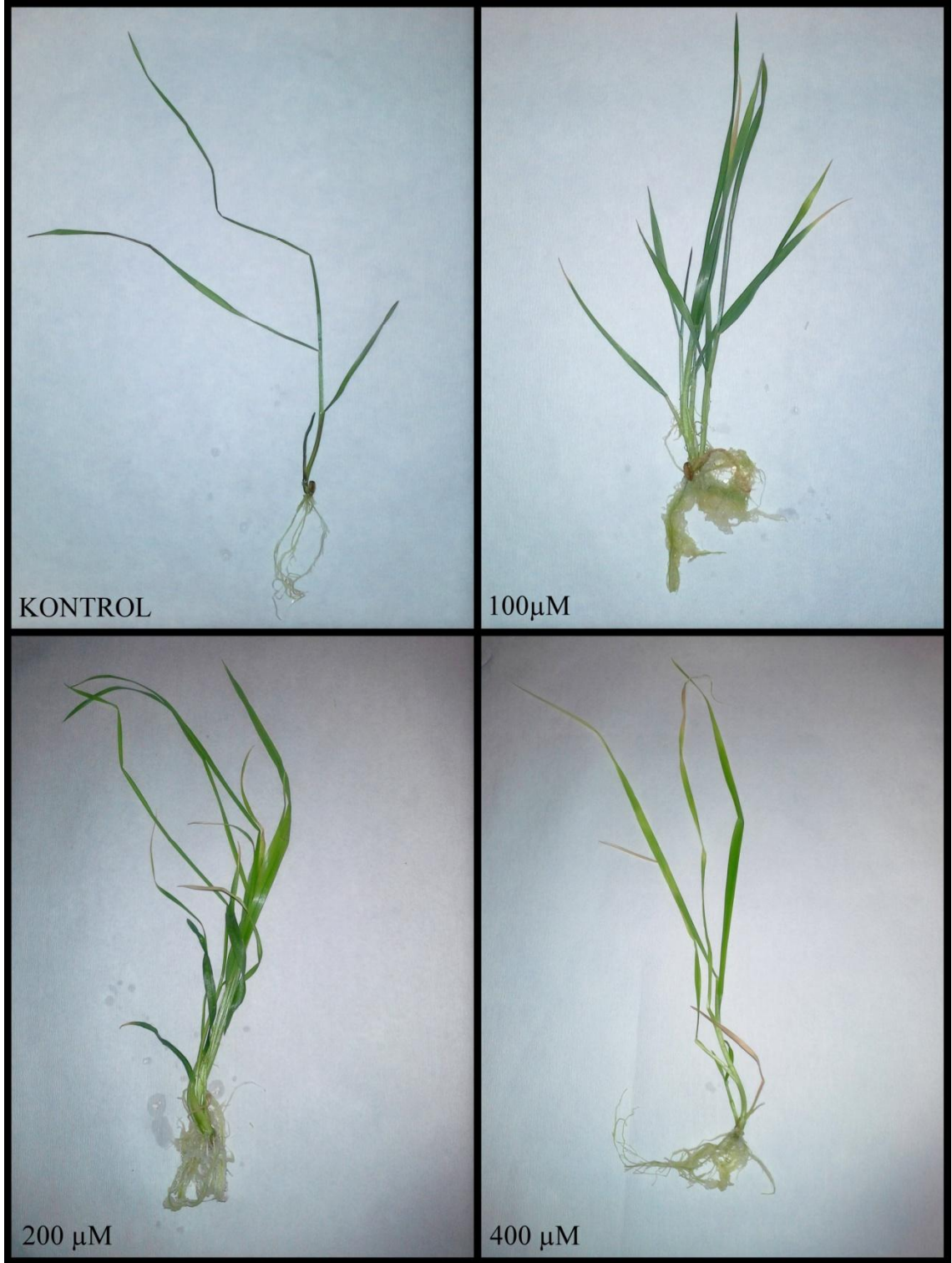
3.5. Tohum Ekim İşlemleri

3.5.1. Tohumların Besiyerine Ekilmesi ve Bitkilere Ağır Metal Uygulanması

Besiyerleri otoklavlama sonrasında steril kabin içinde önceden steril edilmiş cam magenta kaplarına 50'şer ml olacak şekilde dökülmüş ve donmaya bırakılmıştır. Katılaştıran besiyerlerine sterilizasyonu yapılan çavdar tohumları embriyo kısımları aşağı gelecek şekilde her magentaya 5'er adet olmak üzere ekilmişlerdir. 15 gün çimlendirilen tohumlar 100, 200 ve 400 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ içeren besiyerlerine aktarılmışlardır. 15 gün $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ içerikli besiyerlerinde büyümeye bırakılan çavdar bitkileri bu periyod sonunda hasat edilmiştir.



Şekil 3-5-1: MS besi ortamına ekilmiş *S. cereale* L. var Aslım 95 tohumları



Şekil 3-5-2: 15 gün MS besi ortamında ve daha sonra da 15 gün 0, 100, 200 ve 400 µM Pb(NO₃)₂ içeren besi ortamlarında büyütülerek hasat edilen çavdar bitkileri

3.6. Fotosentetik Pigmentler

3.6.1. Klorofil a-b, a/b, toplam klorofil ve karotenoidlerin miktarlarının belirlenmesi

Toplam klorofil miktarının belirlenebilmesi için kontrol ve deney grubu bitkilerine ait yaprak örneklerinden 0.5 gr tartıldı. Daha sonra üzerlerine bir miktar kalsiyum karbonat (CaCO_3) ve 15 ml %80'lik (hacim/hacim) aseton ilave edildi ve buz üzerine yerleştirilmiş soğuk havan içerisinde örnekler parçalandı.



Şekil 3-6-1: %80'lik aseton ile parçalanmış yaprak örneği

Parçalanan dokuların (homojenat) santrifügasyonu 3000 g'de, +4°C'de yapıldı (10 dakika). Santrifüjden sonra elde edilen üst sıvının hacmi ölçüldü ve içerdiği toplam klorofil-karotenoid miktarlarının belirlenebilmesi için 645, 663 ve 470 nm dalga boylarına ayarlanmış spektrofotometrede absorbansları ölçüldü. Arnon (1949)'a göre örneklerin 1 litresindeki total klorofil miktarları mg cinsinden aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$C_a = [12.7 \times D_{663} - 2.69 \times D_{645}] \times \frac{\text{ml}}{1000}$$

$$C_b = [22.9 \times D_{645} - 4.68 \times D_{663}] \times \frac{\text{ml}}{1000}$$

$$\text{Total C} = [20.2 \times D_{645} + 8.02 \times D_{663}] \times \frac{\text{ml}}{1000}$$

$$C_{x+c} = \frac{1000 A_{470} - 1.90 C_a - 63.14 C_b}{214} \times \frac{\text{ml}}{1000}$$

3.7. Total Protein Miktarının Belirlenmesi

Reaktif hazırlanması: 50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 25 ml %95'lik etanolde çözüldü. Daha sonra üzerine 50 ml orto-fosforik asit eklendi. Çözelti saf suyla 500 ml'ye tamamlandı ve filtre kağıdından süzülerek kullanıma hazır hale getirildi.

Protein standardının hazırlanması: Çavdar köklerinin protein içeriği Bradford (1976)'a göre tayin edilmiştir. Buna göre stok çözelti Bovine Serum albumin (BSA)'dan hazırlanır. Bu amaçla %50 seyreltilmiş 2 mg/ml'lik stok ampul BSA'dan 0.01 mg/ml, 0.02 mg/ml, 0.04 mg/ml, 0.08 mg/ml ve 0.1 mg/ml alınarak deney tüplerine aktarıldı. Hacim 100 µl oluncaya kadar sodyum fosfat tamponu ilave edildi. Deney tüplerinin üzerine 5'er ml Bradford reaktifi eklendi. Karışım vortekslelendikten 5 dakika sonra spektrofotometrede 595 nm'de standarta karşı okundu. Okunan absorbans değerlerinden protein standart grafiği oluşturuldu.

Tüp	BSA	Tampon Çözelti	Reaktif
1	0.01 mg/ml	90 µL	5 ml
2	0.02 mg/ml	80 µL	5 ml

3	0.04 mg/ml	60 µL	5 ml
4	0.08 mg/ml	20 µL	5 ml
5	0.1 mg/ml	0 µL	5 ml

Özütün hazırlanması: Taze bitki materyali (1.0 gr) soğuk havan içerisinde 3 ml 0.1 M (pH 7.7) fosfat tamponu ile birlikte homojenize edildi. Bu işlemden sonra özüt +4°C’de 12.000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi. Üst sıvılar protein kaynağı olarak kullanıldı. 5 ml Bradford reaktifi içerisine 100 µl üst sıvı eklendi ve karanlıkta 5 dk kadar reaksiyonun gerçekleşmesi için beklendi. Ölçüm 595 nm’de yapıldı ve elde edilen sonuçlar standart grafiğinde yerine kondu. (Bradford 1976).

3.8. Kurşun Akümülayonu ve Mineral Besin Elementlerinin Tayini

Besi ortamında 15 gün boyunca kontrol ve dört farklı konsantrasyonda (100, 200 ve 400 µM) Pb(NO₃)₂’a maruz bırakılan *S. cereale* bitkilerinin kök ve yapraklarındaki kurşun akümülayonu ve buna bağlı olarak B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na ve Zn mineral elementlerinin bitkideki miktarları aşağıda temel özellikleri anlatılan ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometers) cihazının kullanıldığı teknik ile ölçüldü.

3.8.1. Laboratuvar çalışmaları

S. cereale bitkilerinin kontrol ve deney gruplarına ait kök ve yapraklarındaki kurşun akümülayonu ve buna bağlı olarak B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na ve Zn mineral elementlerin mikarlarının belirlenebilmesi için seçilen bitki kısımları çürüme ve kontaminasyonu önlemek için kurutma kâğıtlarından yapılmış zarflara konularak 80°C sıcaklıkta çalışan etüvde 48 saat bekletildi. Kurutma işleminden sonra örnekler kurşun ve diğer mineral besin elementlerinin dağılımını homojenize etmek için öğütücü ile öğütölüp, 1.5 mm’lik elekten geçirildi. Her işlem öncesi, öğütücü aparatları ve ince elek muhtemel bir kontaminasyonu engellemek için % 96’lık etil alkolle temizlendi ve daha

sonra distile sudan geçirilerek kurulandı. Öğütülen örnekler, etiketlenerek kilitli plastik poşetlere yerleştirildiler.

Ağır metal ve mineral besin elementlerinin tayini için ön çalışmalar, Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne ait Araştırma Laboratuvarları'nda yapılmıştır. Kök ve yaprak örnekleri hassas terazide tartılarak çözme sistemindeki teflon hücrelere konulmuştur. Çalışmamızda kapalı sistem mikrodalga çözme sistemi kullanılarak, hassas terazide tartılan kök ve yaprak örnekleri sıvılaştırılmıştır. Çözme işleminde yüksek sıcaklığa ve basınca dayanıklı teflon kaplar kullanılmıştır.

Bitki örneklerinden 0.2 gr tartılarak teflon hücrelere konuldu. Daha sonra üzerlerine 8 ml HNO₃ ilave edilip, Berghof-MWS2 marka model mikrodalga fırında kademeli olarak önce 145 derece 5 dakika, sonra 165 derece 5 dakika ve en son olarakta 175 derece 20 dakika ile çözme işlemi yapıldı. Hücreler mikrodalga uygulamasından sonra oda sıcaklığında su banyosunda 20 dakika soğumaya bırakıldı. İşlemden sonra numuneler 1-2 µm ortalama çaplı filtre kağıdı ile süzülerek steril 50 ml'lik falcon tüplerine ultra saf su ile aktarıldı. Merck marka 1000 ppm'lik multi element kullanılarak hazırlanan standart çözeltiler hazırlandı ve Bahçeşehir Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü Laboratuvarı'nda bulunan Perkin Elmer marka ICP-OES Optima 7000 DV (Şekil 3-7-1) kullanılarak element tayin işlemleri gerçekleştirildi.

Çalışmamızda kurşuna ilaveten B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na ve Zn mineral elementlerinin tayini yapılmıştır.



Şekil 3-8-1: ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer – Perkin Elmer Optima 7000 DV

3.8.2. İstatistiksel Analizler

Çalışmamızda elde edilen veriler SPSS 18.00 İstatistik Paket Programı yardımıyla analiz edildi ve analiz sonuçları değerlendirildi. Özellikle klorofil, karotenoid ve toplam protein miktarları her bir gruba ait bireyler için ayrı ayrı değerlendirilmiş olup deney gruplarından elde edilen veriler kontrol gruplarından elde edilen veriler ile karşılaştırıldı. Her bir tür kendi içinde değerlendirmeye tabi tutuldu. Sonuçlar ortalamanın standart hatası alınarak ve varyans analizi yapılarak istatistik analize tabi tutuldu. Varyans analizi karşılaştırılan gruplar arasında istatistik olarak fark bulunmuş ise farklı olan grupların belirlenmesinde çoklu karşılaştırma yöntemlerinden Tukey Testi $p < 0.05$ ve $p < 0.01$ önem seviyelerinde yapıldı.

3.9. Kurşun Stresinin Genotoksik Ölçümü

Çalışmamızda, kontrol grubuna ait ve dört farklı konsantrasyonda (100, 200 ve 400 μM) $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ile muamele edilen *S. cereale* L. bitkilerinin kurşun stresinin genotoksik olarak belirlenmesi RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) tekniği kullanılarak gerçekleştirildi.

3.9.1. Laboratuvar çalışmaları

DNA izolasyonu Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit kullanılarak yapıldı.

DNA izolasyonu için;

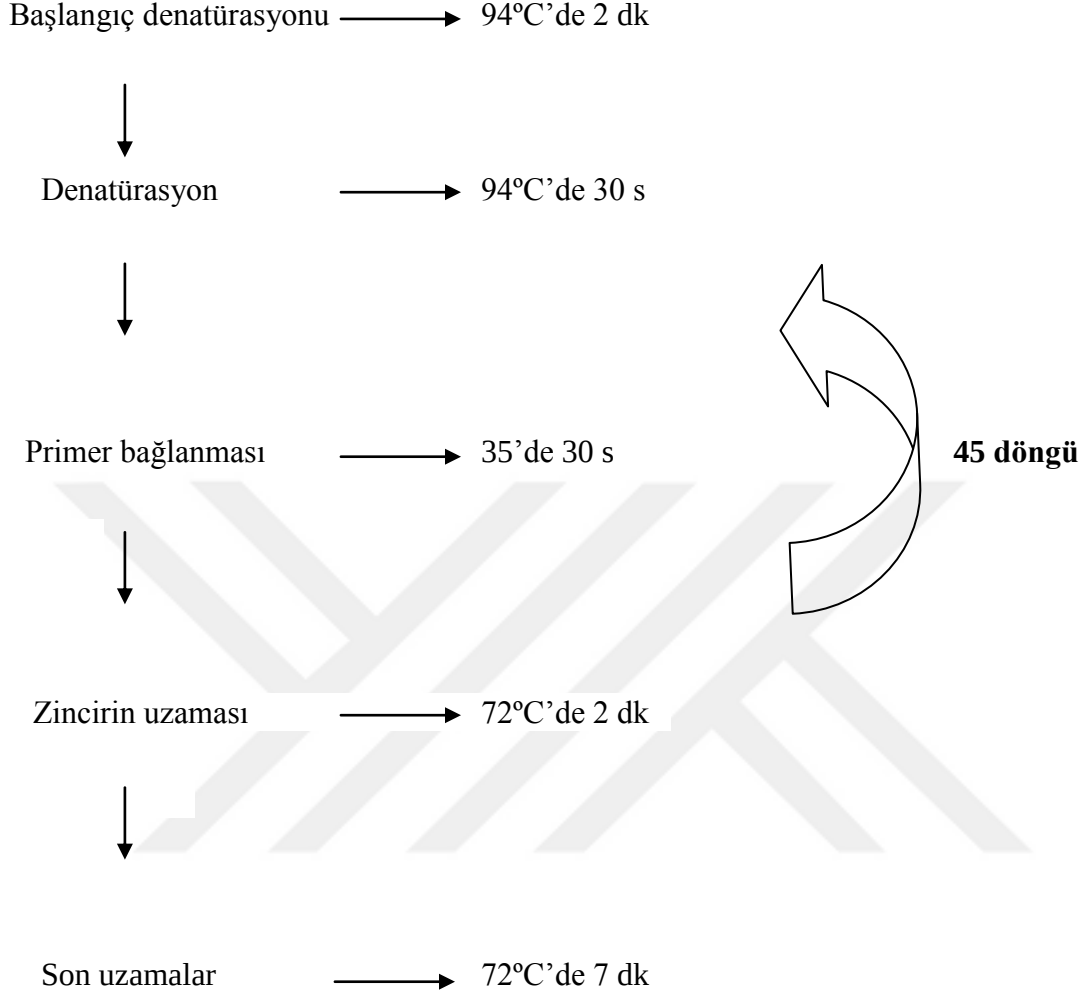
- Bitki tohumlarının çimlendirilmesinden elde edilen ve ağır metale maruz bırakılarak büyütülen bitkilerin kök uçlarından örnekler alınarak -800C'de 1 saat bekletildi ve daha sonra 0.04 gr alınan bitki materyali tissue lyser yardımıyla ezildi.
- Ezilen örnekler tüplere aktarıldı ve üzerine 600 µl Nuclei Lysis Solution eklenerek 3 sn vortexlenip 650C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyondan sonra her tüpe 3 µl RNase Solution eklendi ve 370C'de 15 dakika inkübe edildi. Mevcut olan RNA'ların parçalanması sağlandı.
- Örnekler üzerine 200 µl Protein Precipitation Solution eklendi ve 20 sn vortexlendi. Çözeltide mevcut olan proteinler çöktürüldü.
- Tüpler 14 000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve tüplerin diplerinde pellet oluşumu görüldü.
- Dikkatli bir şekilde tüplerin üzerindeki süpernatant pellete dokunulmadan alınarak temiz 1,5 ml'lik tüplere aktarıldı ve üzerine 600 µl oda sıcaklığında bulunan isopropanolden eklendi.
- Tüpler 14 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant boşaltıldı. Tüpler üzerine 600 µl oda sıcaklığındaki %70 'lik ethanolden eklendi ve 14 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant tekrar dikkatlice boşaltılarak tüplerde sadece çökeltiler bırakıldı.
- Tüp içindeki alkolün tamamen alınması için steril filtre kağıtları ile tüp içindeki alkol emdirildi.
- En son aşamada tüpler üzerine 100 µl DNA Rehydration Solution eklenip 650C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- DNA izolasyonu tamamlandı ve DNA örnekleri +40C'de saklandı.

Elde edilen DNA'ların konsantrasyonları BioSpec-nano Micro-volume UV-Vis Spektrofotometre ile ölçülmüştür.

PCR uygulamasında kullanılacak bileşenler ve miktarları şöyledir:

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
DNA	50–100 ng
Tampon çözelti (10X)	2,5 µl
MgCl ₂ (2,5 mM)	3,5 µl
dNTP karışımı (2,5 mM)	1 µl
Taq DNA polimeraz (5U)	0,5 µl
Primer (10 mM)	3 µl
Distile su	12 µl
Toplam hacim:	25 µl

RAPD PZR protokolü



Elde edilen PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde, 1xTBE tamponuyla, 90–100 Voltta yaklaşık 75 dakika yürütüldü. Ayrıca jellerde 2 kuyucuğa (ilk ve son kuyucuk), elde edilen bantların büyüklüklerini belirlemek amacıyla DNA standardı (GeneRuler™ 100bp DNA, Fermentas) konulmuştur. Daha sonra Etidyum bromür (EtBr) ile boyanan jeller UV görüntüleme sistemi vasıtasıyla görüntülenerek dijital fotoğraf olarak kayıt edilmiş ve bilgisayara aktarılmıştır.

3.9.2. Genetik Verilerin Analizi

Farklı kurşun konsantrasyonlarındaki polimorfizm oranları ayrı ayrı tespit edilmiş ve genomik kalıp stabilitesi (ing. Genomic Template Stability=GTS) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$GTS=[1- (a/n)] \times 100$$

a: her örnekteki toplam polimorfik bant sayısı
n: kontrol bitkilerindeki toplam bant sayısı

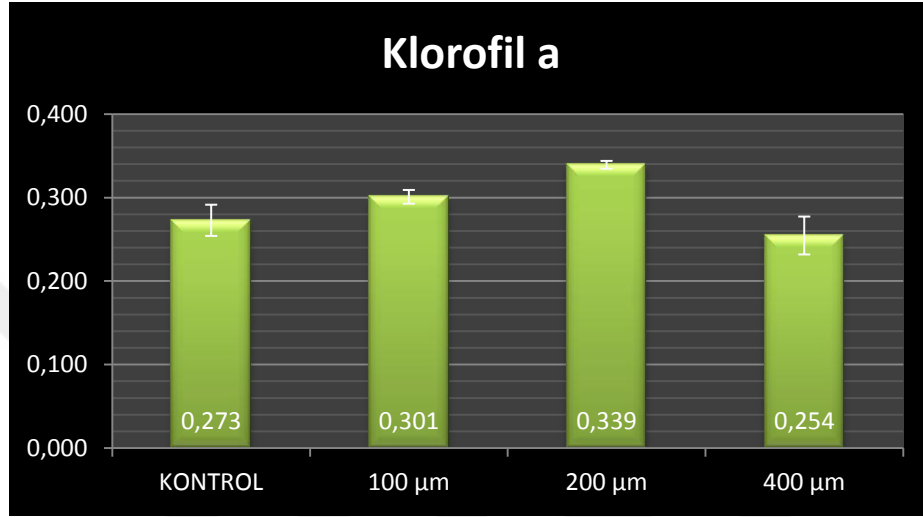
Ayrıca bantların moleküler büyüklükleri Gel Analyzer 2010 programı ile belirlenmiştir.



4. BULGULAR

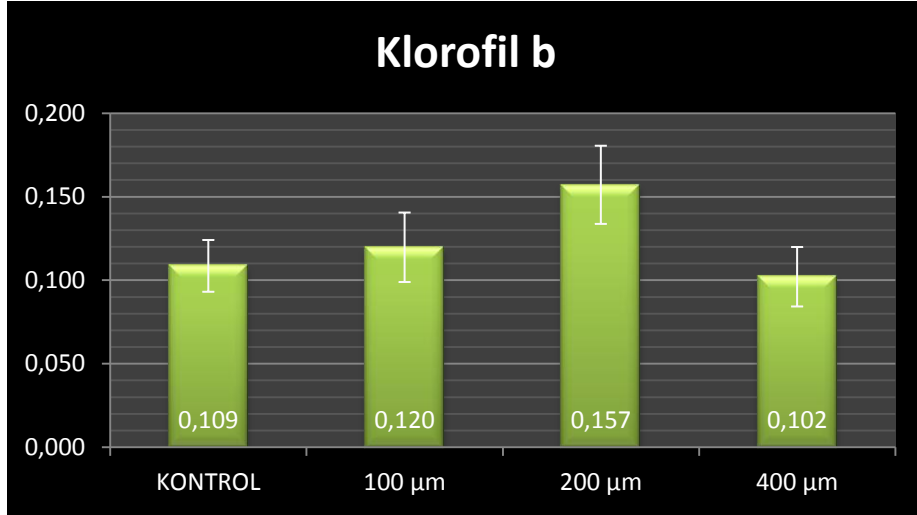
4.1. Klorofil *a-b*, Klorofil *a/b*, Toplam Klorofil ve Karotenoidlerin Miktarları

Yaptığımız çalışmalarda her deney grubuna ait yaprak özütlerinde klorofil *a-b*, klorofil *a/b*, toplam klorofil ve karotenoidlerin miktarları tespit edilmiştir.



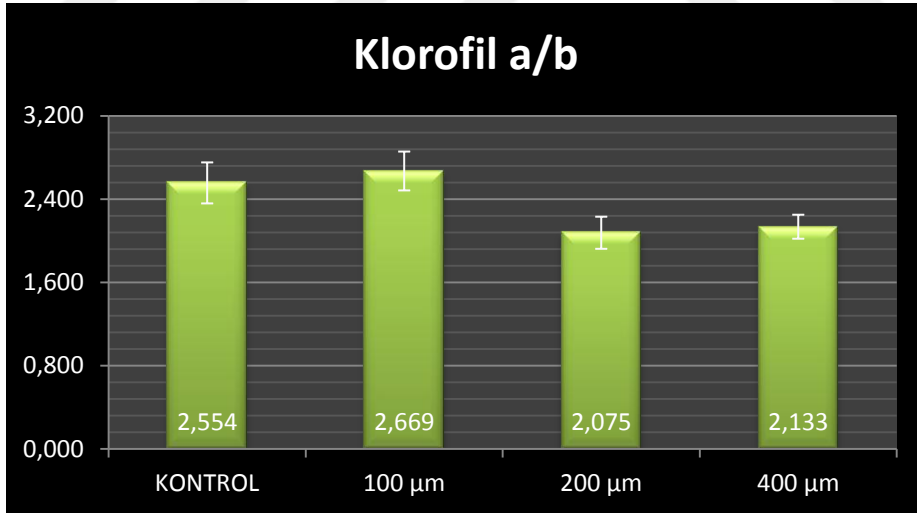
Şekil 4-1-1: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerde K_a Miktarları

0 (kontrol), 100, 200 ve 400 µM konsantrasyonlarında kurşun uygulanan bitkilerin homojenatlarında spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. Ölçümler sonucunda homojenatlardaki klorofil *a* değerleri göreceli olarak sırasıyla 0,273-0,301-0,339-0,254 olarak bulunmuştur.



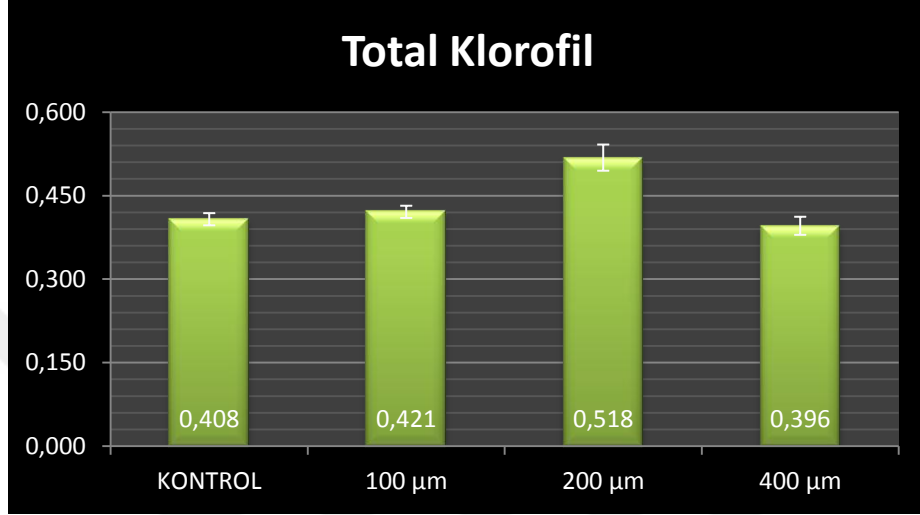
Şekil 4-1-2: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerde Klb Miktarları

0 (kontrol), 100, 200 ve 400 µM konsantrasyonlarında kurşun uygulanan bitkilerin homojenatlarında spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. Ölçümler sonucunda homojenatlardaki klorofil *b* değerleri göreceli olarak sırasıyla 0,109-0,120-0,157-0,102 olarak bulunmuştur.



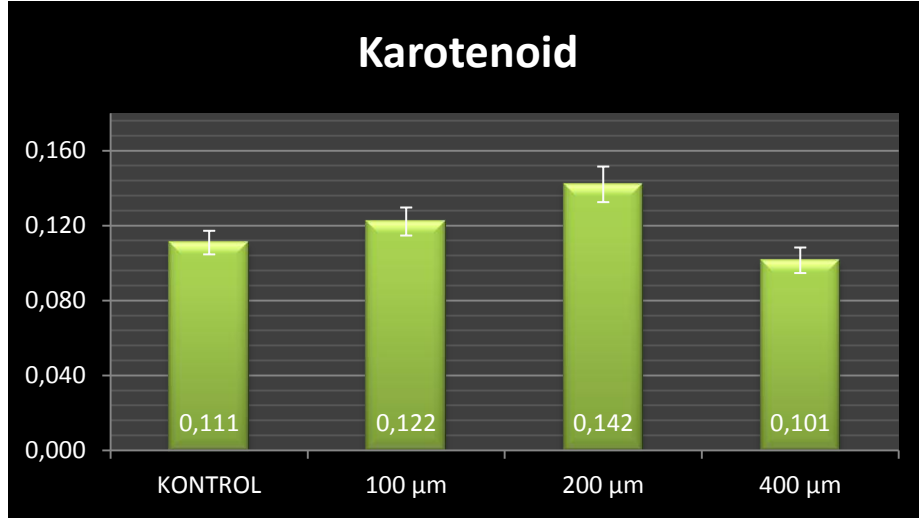
Şekil 4-1-3: Farklı Konsantrasyonlarda Pb Uygulanan Bitkilerde Kla/b Miktarları

0 (kontrol), 100, 200 ve 400 μM konsantrasyonlarında kurşun uygulanan bitkilerin homojenatlarında spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. Ölçümler sonucunda homojenatlardaki klorofil *a/b* oranları göreceli olarak sırasıyla 2,554-2,669-2,075-2,133 olarak bulunmuştur.



Şekil 4-1-4: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerde Total Kl Miktarları

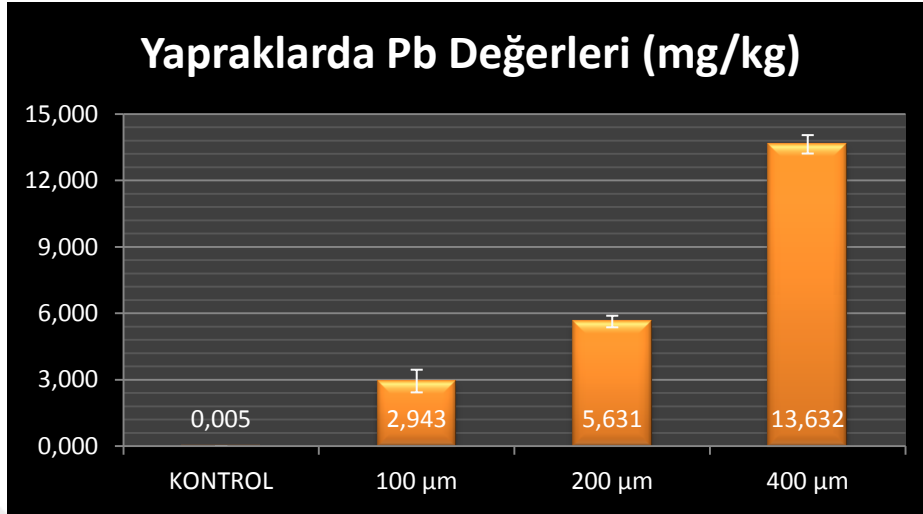
0 (kontrol), 100, 200 ve 400 μM konsantrasyonlarında kurşun uygulanan bitkilerin homojenatlarında spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. Ölçümler sonucunda homojenatlardaki toplam klorofil değerleri göreceli olarak sırasıyla 0,408-0,421-0,518-0,396 olarak bulunmuştur.



Şekil 4-1-5: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerde Karotenoid Miktarları

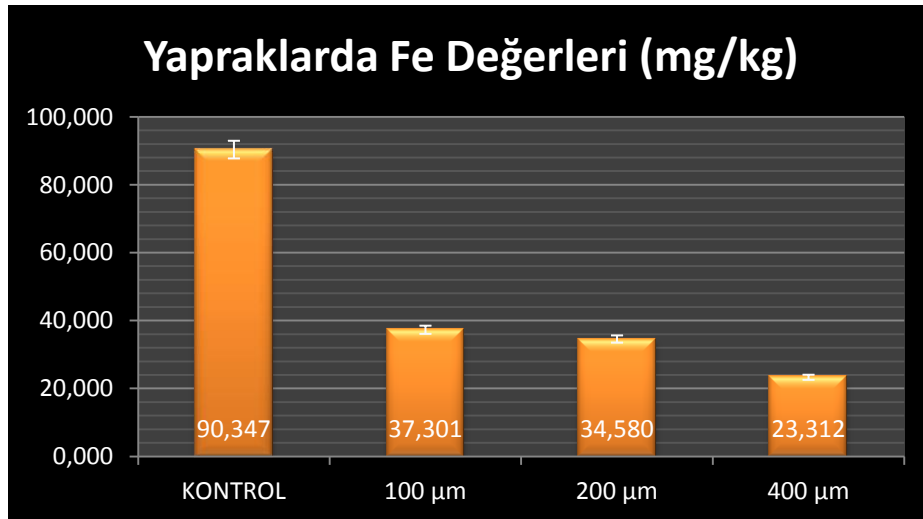
0 (kontrol), 100, 200 ve 400 µM konsantrasyonlarında kurşun uygulanan bitkilerin homojenatlarında spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. Ölçümler sonucunda homojenatlardaki karotenoidlerin değerleri göreceli olarak sırasıyla 0,111-0,122-0,142-0,101 olarak bulunmuştur.

4.2. Kurşun Stresi ve Mineral Beslenme Üzerine Etkileri



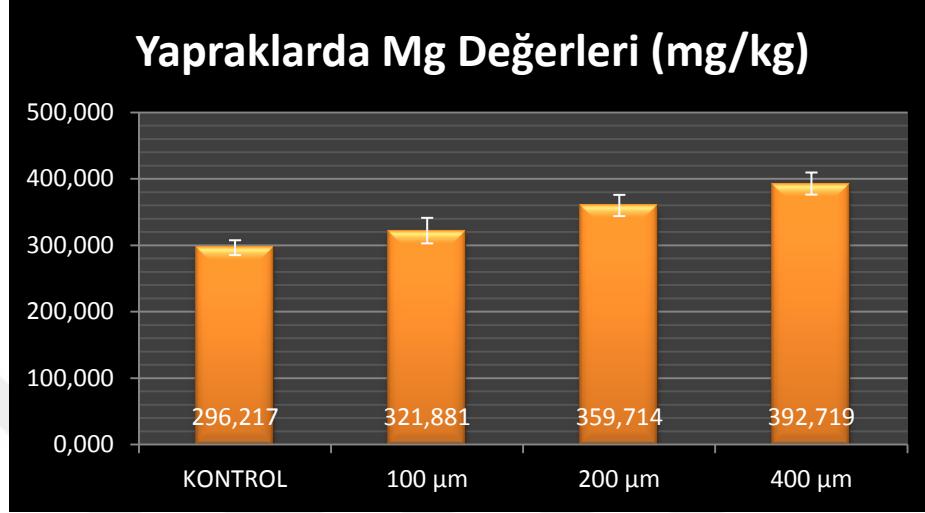
Şekil 4-2-1: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Pb Mineralinin Miktarları

0 (kontrol), 100, 200 ve 400 μM kurşun uygulanan bitkilerin yapraklarından elde edilen kurşun değerleri göreceli olarak sırasıyla; 0,005-2,943- 5,631-13,632 mg/kg olarak bulunmuştur.



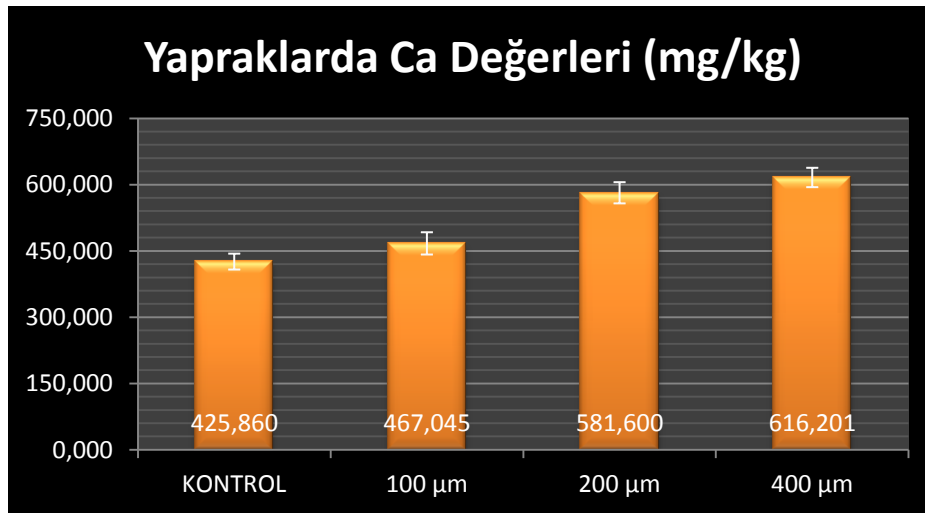
Şekil 4-2-2: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Fe Mineralinin Miktarları

0 (kontrol), 100, 200 ve 400 μM kurşun uygulanan bitkilerin yapraklarından elde edilen demir değerleri göreceli olarak sırasıyla; 90,347-37,301-34,580-23,312 mg/kg olarak bulunmuştur.



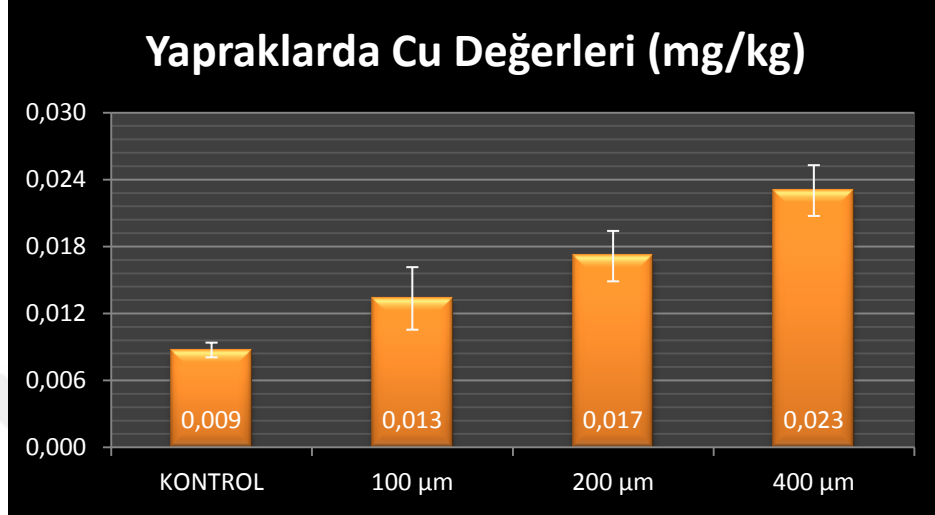
Şekil 4-2-3: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Mg Mineralinin Miktarları

0(kontrol), 100, 200 ve 400 μM kurşun uygulanan bitkilerin yapraklarından elde edilen magnezyum değerleri göreceli olarak sırasıyla; 296,217-321,881-359,714-392,719 mg/kg olarak bulunmuştur.



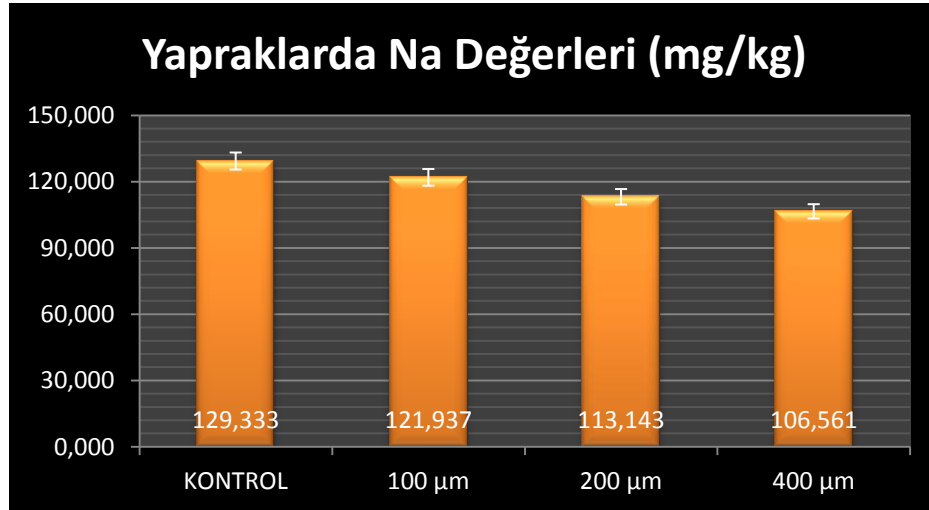
Şekil 4-2-4: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Ca Mineralinin Miktarları

0 (kontrol), 100, 200 ve 400 μM kurşun uygulanan bitkilerin yapraklarından elde edilen kalsiyum değerleri göreceli olarak sırasıyla; 425,860-467,045-581,600-616,201 mg/kg olarak bulunmuştur.



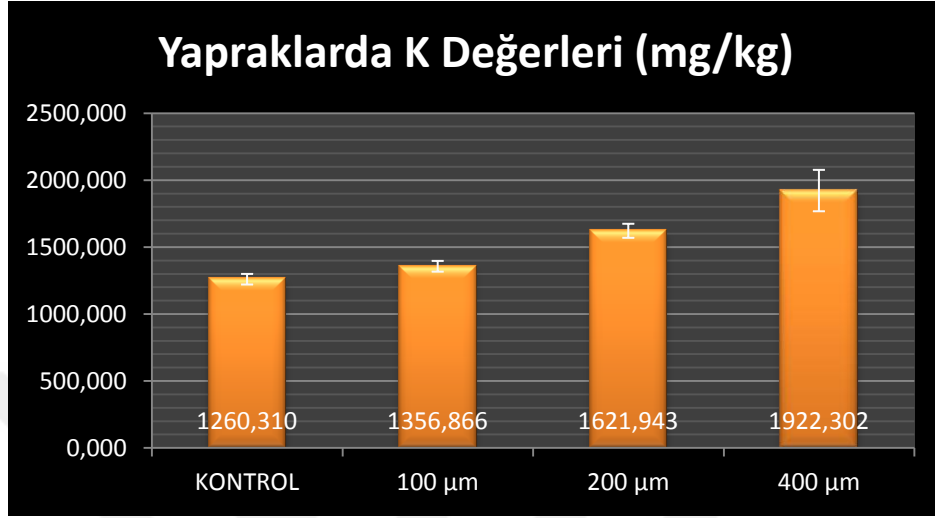
Şekil 4-2-5: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Cu Mineralinin Miktarları

0 (kontrol), 100, 200 ve 400 μM kurşun uygulanan bitkilerin yapraklarından elde edilen bakır değerleri göreceli olarak sırasıyla; 0,009-0,013- 0,017-0,023 mg/kg olarak bulunmuştur.



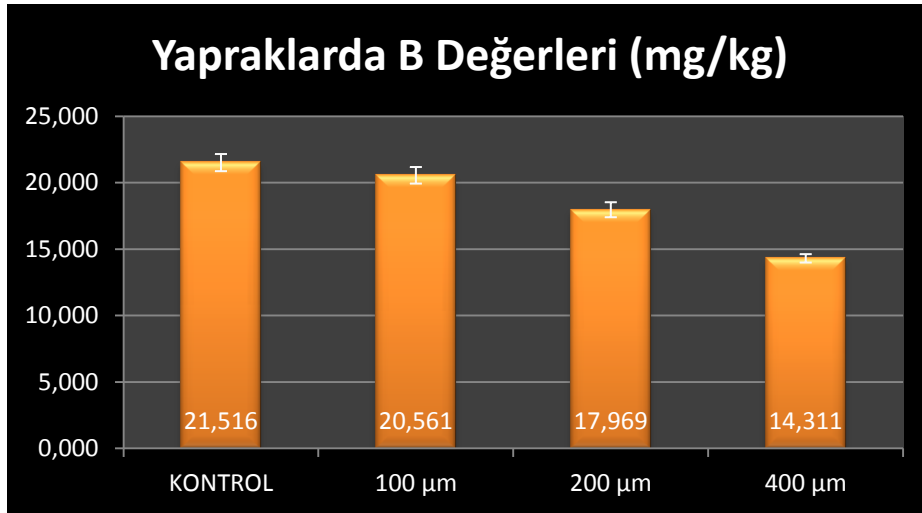
Şekil 4-2-6: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Na Mineralinin Miktarları

0 (kontrol), 100, 200 ve 400 μM kurşun uygulanan bitkilerin yapraklarından elde edilen sodyum değerleri göreceli olarak sırasıyla; 129,333-121,937-113,143-106,561 mg/kg olarak bulunmuştur.



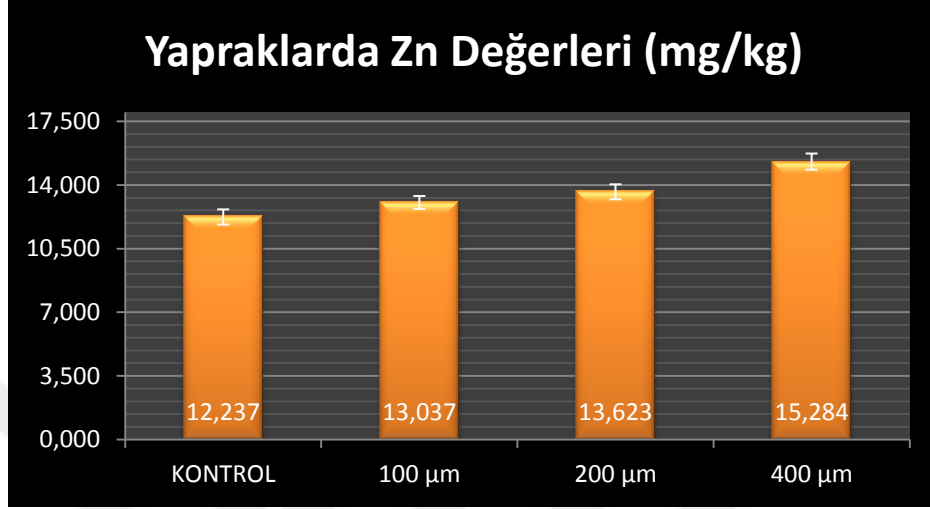
Şekil 4-2-7: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında K Mineralinin Miktarları

0 (kontrol), 100, 200 ve 400 μM kurşun uygulanan bitkilerin yapraklarından elde edilen potasyum değerleri göreceli olarak sırasıyla; 1260,310-1356,866-1621,943-1922,302 mg/kg olarak bulunmuştur.



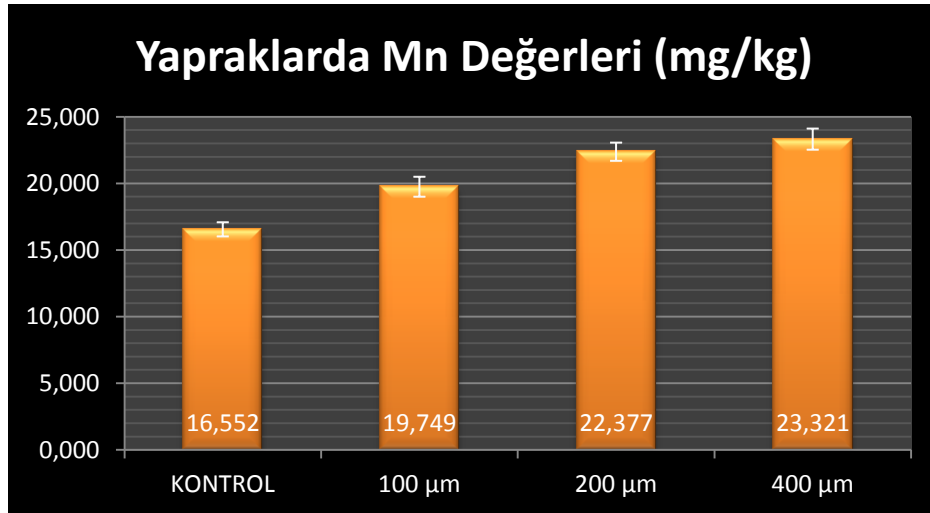
Şekil 4-2-8: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında B Mineralinin Miktarları

0 (kontrol), 100, 200 ve 400 μM kurşun uygulanan bitkilerin yapraklarından elde edilen B değerleri göreceli olarak sırasıyla; 21,516-20,561-17,969-14,311 mg/kg olarak bulunmuştur.



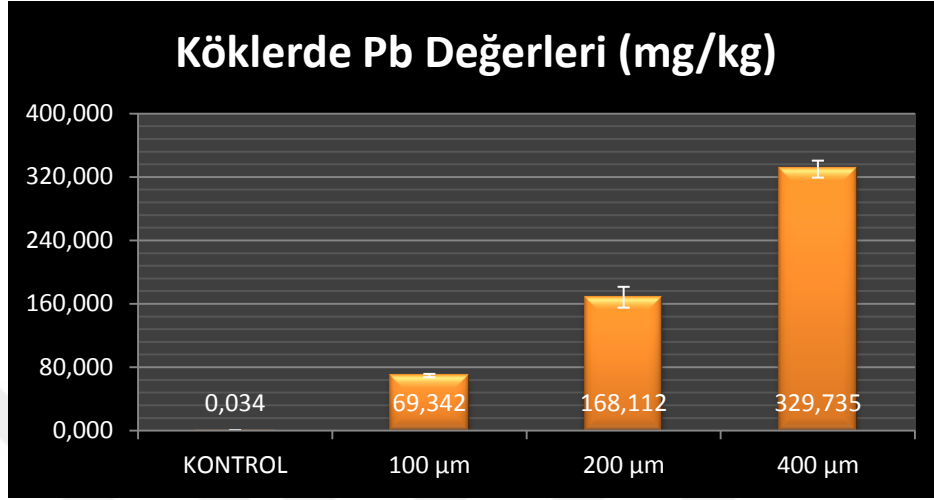
Şekil 4-2-9: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Zn Mineralinin Miktarları

0 (kontrol), 100, 200 ve 400 μM kurşun uygulanan bitkilerin yapraklarından elde edilen çinko değerleri göreceli olarak sırasıyla; 12,237-13,037-13,623-15,284 mg/kg olarak bulunmuştur.



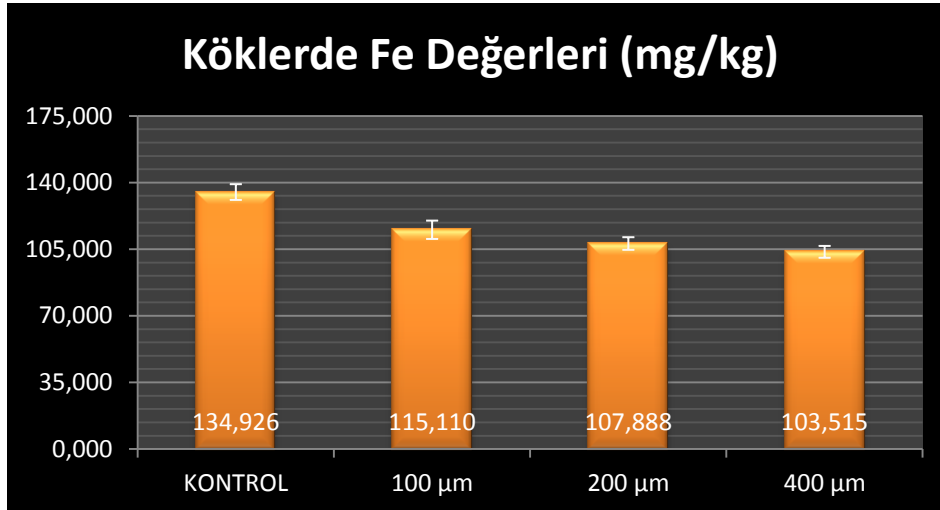
Şekil 4-2-10: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Yapraklarında Mn Mineralinin Miktarları

0 (kontrol), 100, 200 ve 400 μM kurşun uygulanan bitkilerin yapraklarından elde edilen mangan değerleri göreceli olarak sırasıyla; 16,552-19,749-22,377-23,321 mg/kg olarak bulunmuştur.



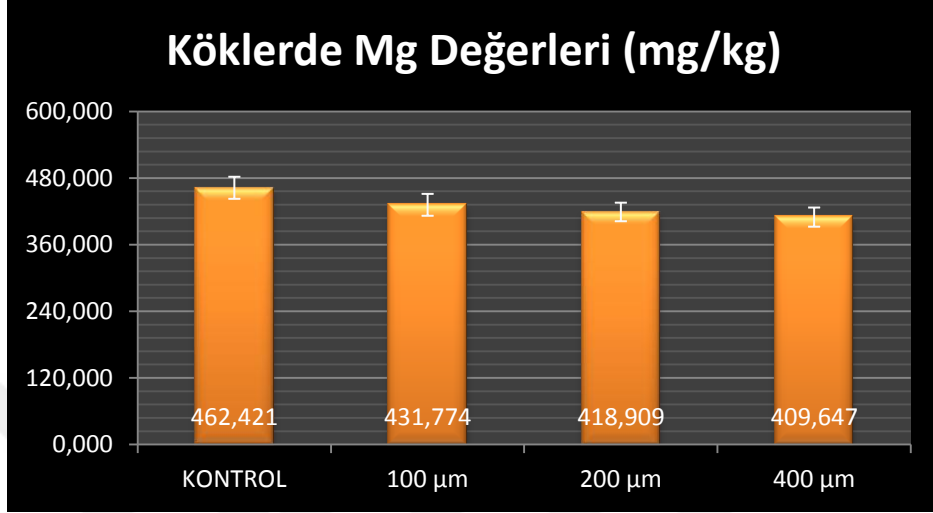
Şekil 4-2-11: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Pb Mineralinin Miktarları

0 (kontrol), 100, 200 ve 400 μM kurşun uygulanan bitkilerin köklerinden elde edilen kurşun değerleri göreceli olarak sırasıyla; 0,034-69,342-168,112-329,735 mg/kg olarak bulunmuştur.



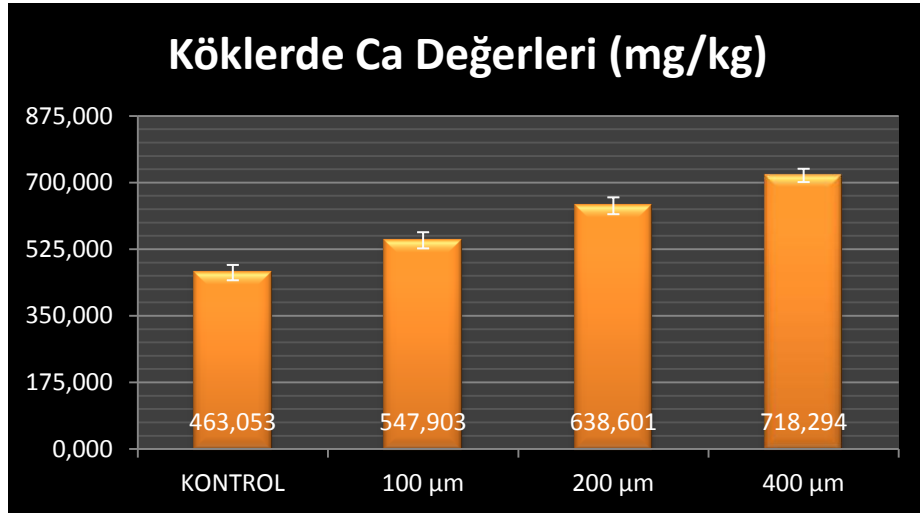
Şekil 4-2-12: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Fe Mineralinin Miktarları

0 (kontrol), 100, 200 ve 400 μM kurşun uygulanan bitkilerin köklerinden elde edilen demir değerleri göreceli olarak sırasıyla; 134,926-115,110-107,888-103,515 mg/kg olarak bulunmuştur.



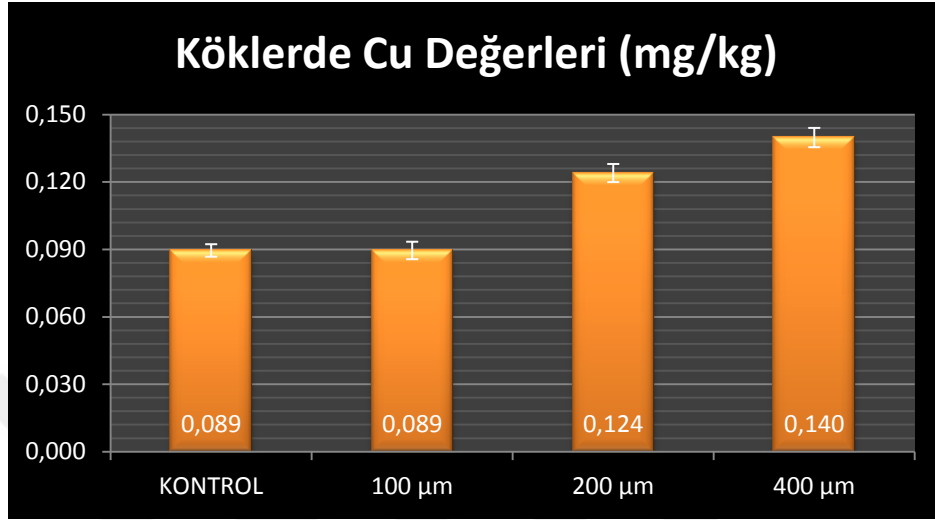
Şekil 4-2-13: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Mg Mineralinin Miktarları

0 (kontrol), 100, 200 ve 400 μM kurşun uygulanan bitkilerin köklerinden elde edilen magnezyum değerleri göreceli olarak sırasıyla; 462,421-431,774-418,909-409,64 mg/kg olarak bulunmuştur.



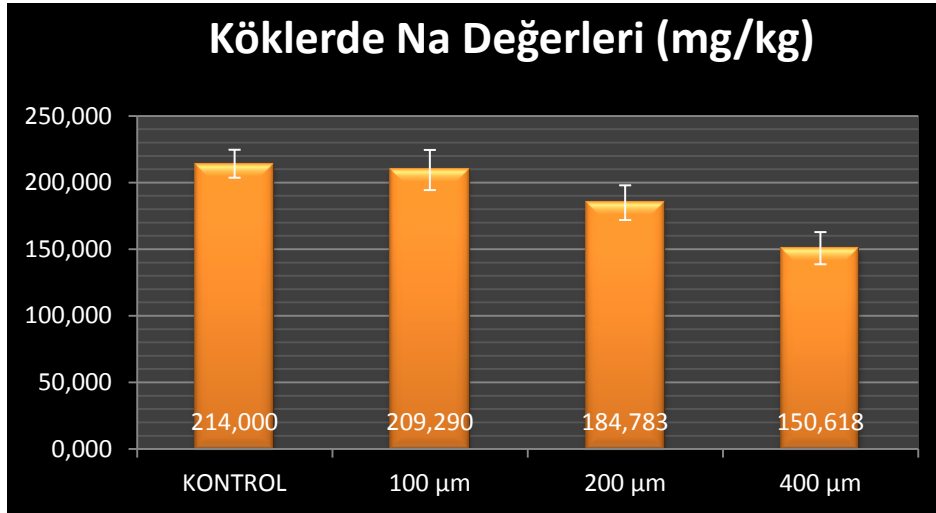
Şekil 4-2-14: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Ca Mineralinin Miktarları

0 (kontrol), 100, 200 ve 400 μM kurşun uygulanan bitkilerin köklerinden elde edilen kalsiyum değerleri göreceli olarak sırasıyla; 463,053-547,903-638,601-718,294 mg/kg olarak bulunmuştur.



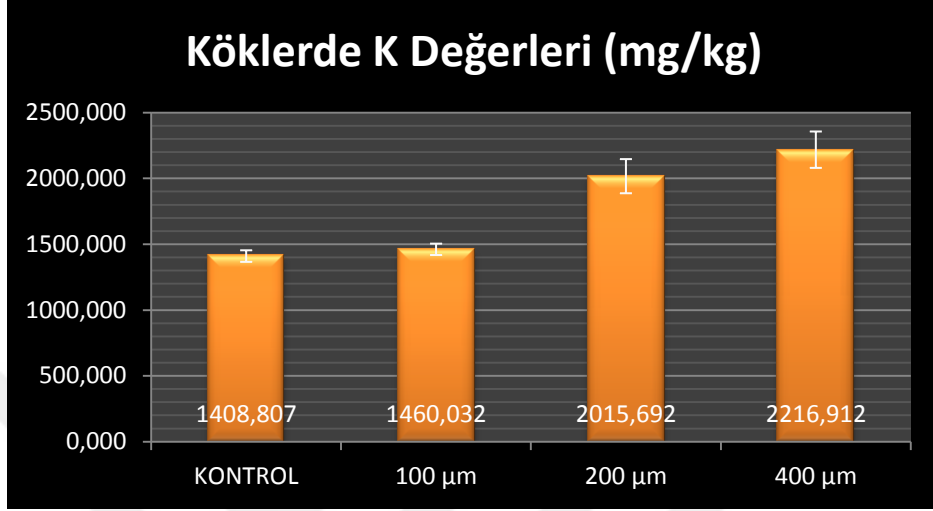
Şekil 4-2-15: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Cu Mineralinin Miktarları

0 (kontrol), 100, 200 ve 400 μM kurşun uygulanan bitkilerin köklerinden elde edilen bakır değerleri göreceli olarak sırasıyla; 0,089-0,089-0,124-0,140 mg/kg olarak bulunmuştur.



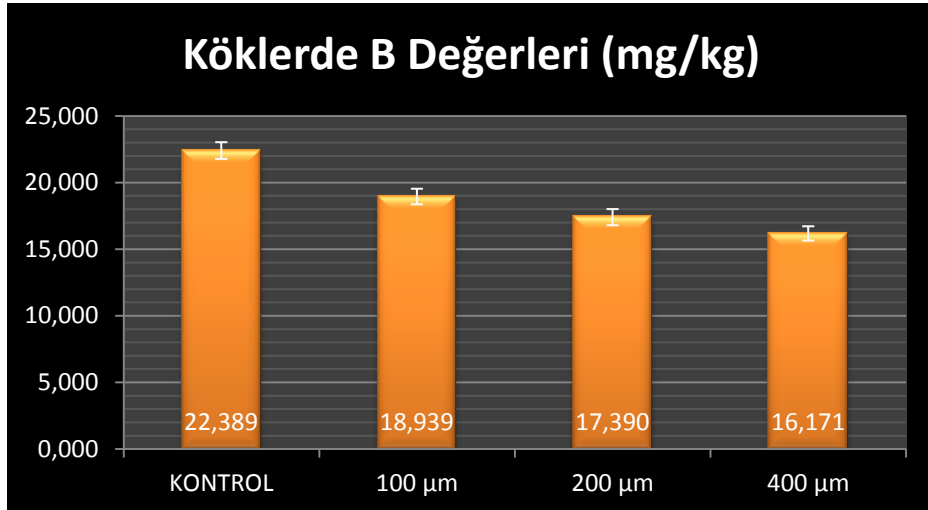
Şekil 4-2-16: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Na Mineralinin Miktarları

0 (kontrol), 100, 200 ve 400 μM kurşun uygulanan bitkilerin köklerinden elde edilen sodyum değerleri göreceli olarak sırasıyla; 214,000-209,290-184,783-150,618 mg/kg olarak bulunmuştur.



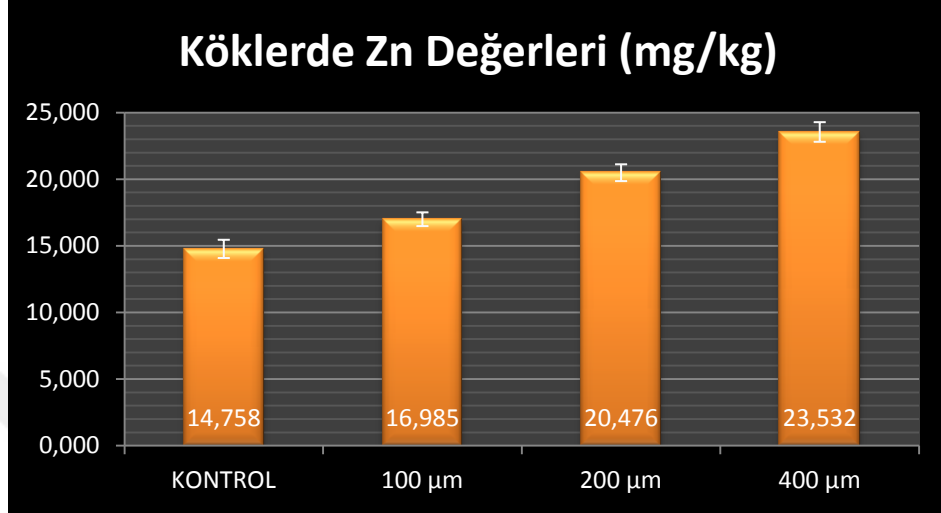
Şekil 4-2-17: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Köklerinde K Mineralinin Miktarları

0 (kontrol), 100, 200 ve 400 μM kurşun uygulanan bitkilerin köklerinden elde edilen potasyum değerleri göreceli olarak sırasıyla; 1408,807-1460,032-2015,692-2216,912 mg/kg olarak bulunmuştur.



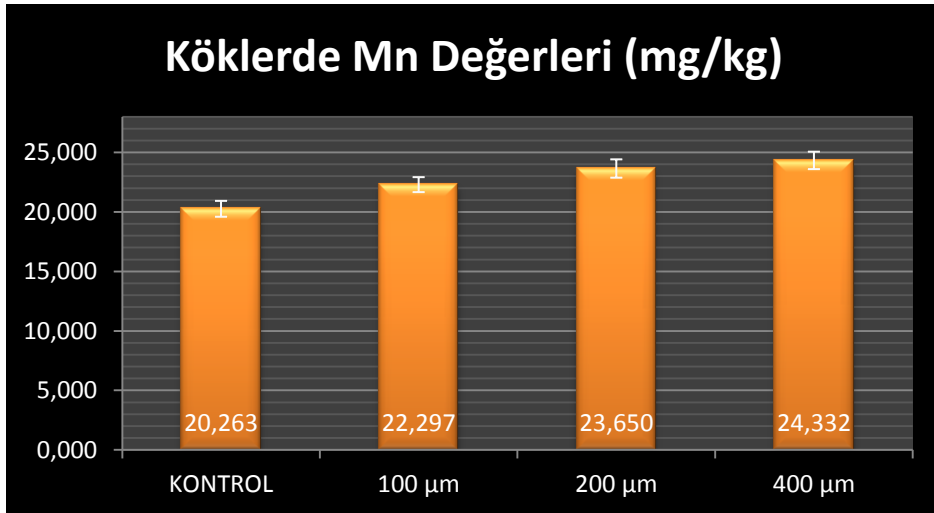
Şekil 4-2-18: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Köklerinde B Mineralinin Miktarları

0 (kontrol), 100, 200 ve 400 μM kurşun uygulanan bitkilerin köklerinden elde edilen bor değerleri göreceli olarak sırasıyla; 22,389-18,938-17,390-16,171 mg/kg olarak bulunmuştur.



Şekil 4-2-19: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Zn Mineralinin Miktarları

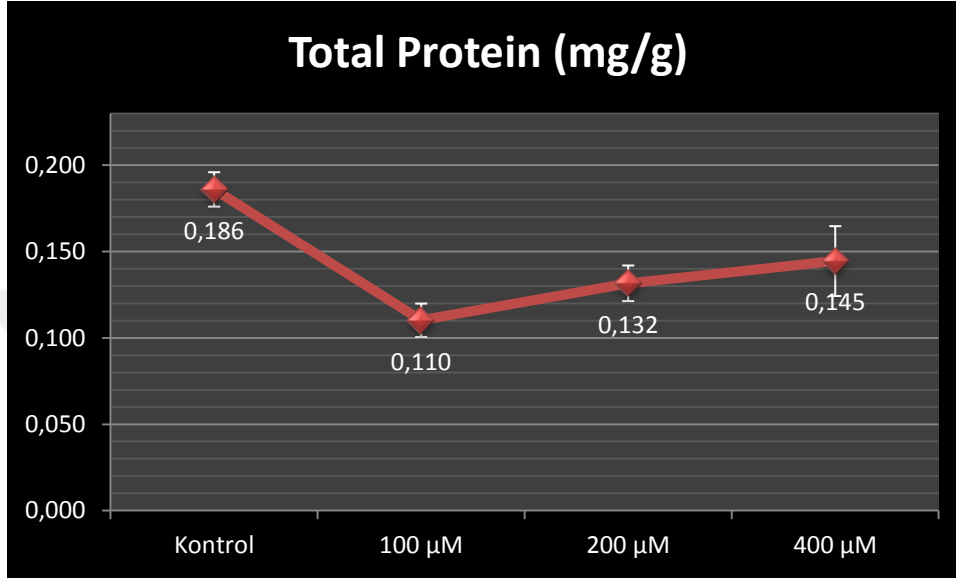
0 (kontrol), 100, 200 ve 400 μM kurşun uygulanan bitkilerin köklerinden elde edilen Zn değerleri göreceli olarak sırasıyla; 14,758-16,985-20,47-23,532 mg/kg olarak bulunmuştur.



Şekil 4-2-20: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Mn Mineralinin Miktarları

0 (kontrol), 100, 200 ve 400 μM kurşun uygulanan bitkilerin köklerinden elde edilen Mn değerleri göreceli olarak sırasıyla; 20,263-22,297-23,650-24,332 mg/kg olarak bulunmuştur.

4.3. Total Protein Miktarları

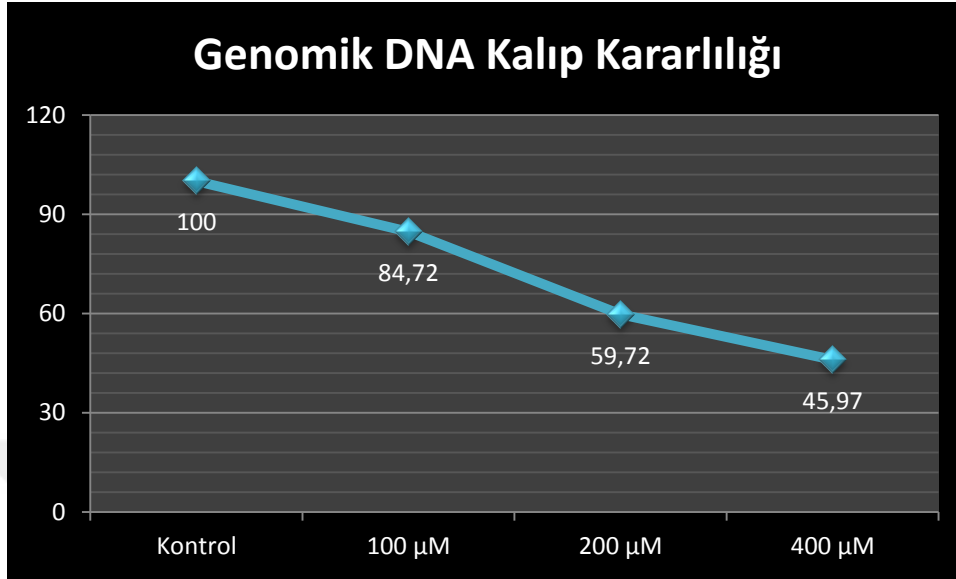


Şekil 4-3-1: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Köklerinde Total Protein Değerleri

0 (kontrol), 100, 200 ve 400 μM kurşun uygulanan bitkilerin köklerinden ölçülen total protein değerleri göreceli olarak sırasıyla; 0,186-0,110-0,132-0,145 mg/g olarak bulunmuştur.

4.4. Genotoksik Bulgular

4.4.1. Genomik DNA Kalıp Kararlılığı

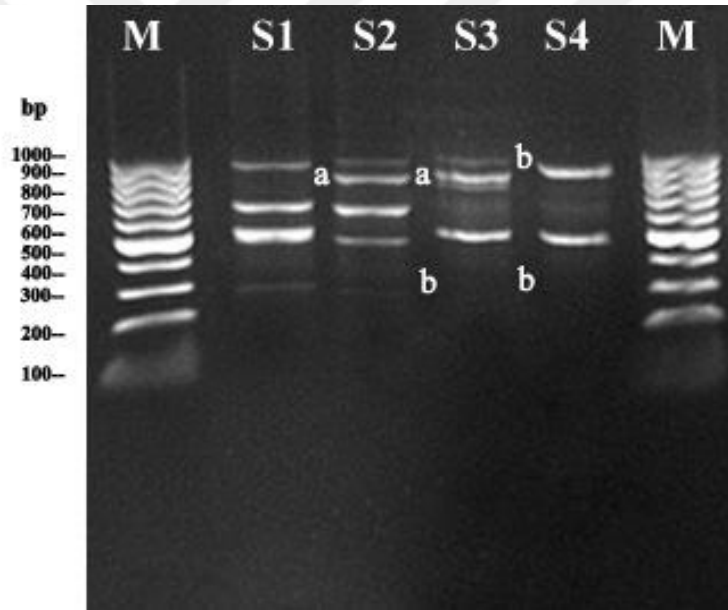


Şekil 4-4-1: Farklı Konsantrasyonlarda Kurşun Uygulanan Bitkilerin Genomik DNA Kalıp Kararlılık Yüzdeleri

0 (kontrol), 100, 200 ve 400 µM kurşun uygulanan bitkilerin genomik DNA kalıp kararlılık yüzdeleri göreceli olarak sırasıyla; 100,0-84,72-59,72-45,97 olarak hesaplanmıştır.

4.4.2. RAPD Analiz Sonuçları

Farklı kurşun konsantrasyonları uygulanan bitkilerin kök hücrelerinden DNA izole edildi ve RAPD-PZR moleküler markör tekniği kullanılarak RAPD profilleri oluşturuldu ve RAPD profilleri kullanılarak kontrol ile farklı konsantrasyonlarda strese maruz kalan bireyler arasında karşılaştırmalı analizler yapıldı. Ağır metal içermeyen besi yerine ekilen tohumlar 15 gün süreyle çimlendirildi. Çimlendirilen tohumlar 100, 200 ve 400 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ içeren besiyerlerine aktarıldı. 15 gün $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ içerikli besiyerlerinde büyümeye bırakılan çavdar bitkileri uygulama periyodu sonunda hasat edildi. RAPD analizlerinde DNA çoğaltımı için 7 farklı primer (RAPD İontek®) kullanılmıştır. Primerler aracılığı ile çoğaltılan DNA bölgeleri Thermo Scientific 0WL EASYCAST B2 cihazı kullanılarak işaretleyici GeneRuler 100 bp DNA bantları (Thermo Scientific) referans alınarak boyutları tespit edildi.



Şekil 4-5-1: Farklı konsantrasyonlarda $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (S1: kontrol, S2: 100 μM , S3: 200 μM , S4: 400 μM) uygulanan *S. cereale* bitki köklerinden izole edilen DNA'nın RAPD-PZR sonuçları

Çalışma sonucunda RAPD profil analizlerine göre yeni bantların ortaya çıktığı (100 μM ve 200 μM uygulamalarda) ve varolan bantların kaybolduğu (200 μM ve 400 μM uygulamalarda) belirlenmiştir. Oluşan ve kaybolan bantlar ile uygulanan $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ konsantrasyon oranları arasında yüksek bir korelasyon olduğu gözlenmiştir. **a:** yeni bant oluşumları, **b:** kaybolan bantlar

Tablo 4-5-1: Farklı konsantrasyonlarda kurşun uygulanan *S. cereale* bitkilerinde RAPD yönteminin kullanılması ile elde edilen bant sayıları ve bantların moleküler büyüklükleri

Primer: 4 (CTGAGGTCTC)					
	Toplam bant sayısı	a	b	A	B
Kontrol	4	-	-	-	-
100 µM Pb uygulaması	5	1	-	949 bç	
200 µM Pb uygulaması	5	2	1	965 bç, 761 bç	311bç
400 µM Pb uygulaması	3	-	2	-	1073 bç, 311 bç
a: yeni oluşan bantlar, b: kaybolan bantlar. A: yeni bantların molekül büyüklükleri, B: kaybolan bantların molekül büyüklükleri.					

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada *S. cereale* bitkisinin farklı derecelerdeki kurşun stresinden nasıl etkilendiği ve bu stresin bitkide meydana getirdiği fizyolojik ve genotoksik sonuçlar araştırılmıştır. Günümüzde çevre kirliliği, zararları hergün daha çok artan ve insanlığın karşılaştığı en ciddi sorunlardan biridir. Özellikle toprak ve havada oluşan ağır metal kirliliği canlıları tehdit etmektedir (Çağlarırnak ve Hepçimen, 2010; Ölgün ve Gür, 2012; Saint-Laurent ve ark., 2013). Çevre kirliliğinin oluşma sebeplerinin çoğunluğu insan kaynaklıdır. Her yıl milyonlarca toksik kirletici madde çevreye bırakılmaktadır ve bunun sonucu olarak bu toksik kirleticiler ekosistemdeki organizmalara zarar vermektedir (Beckett ve ark., 1998; Akın ve Akın, 2007; Sujetoviene ve Sliumpaite, 2013).

Kurşunun toksik etkisi konsantrasyonuna, tuz oluşturma şekline, toprak özelliğine ve bitki türüne ve çeşidine bağlı olarak değişim göstermektedir (Salt, 1995). Kurşunun bitkiler için toksik olan seviyeleri bitkilerdeki makromoleküllerin yapısında yer alan fonksiyonel gruplarda bulunan metal iyonlarını, fotosentezi, mineral element metabolizmasını ve bitki su kapasitesini düzenleyen çeşitli enzim aktivitelerini değiştirmek yoluyla bitkide çimlenme, sürgün gelişimi, tolerans indeksi gibi olayları etkilemektedir (Lamhamdi ve ark., 2011). Bu etkileri azaltmak için bitkiler farklı tolerans yöntemleri geliştirmişlerdir. Bitkiler topraktan kökleri ile aldıkları kurşunu çözünmemiş formda köklerde ya da taşınan kurşunu hücrelerin içerisinde vakuollerde depo ederler. (Munzuroğlu ve Geckil, 2002; Tiwari, 2013).

Triticum aestivum ile yapılan bir çalışmada bitkilere 0, 10, 30 ve 60 mM konsantrasyonlarda kurşun nitrat uygulaması yapılmış ve kontrolle strese maruz kalan bireyler karşılaştırıldığında strese maruz kalan bireylerin total klorofil, klorofil *a-b*, ve karotenoidlerinin değerlerinde düşüşler gözlenmiştir (Tiwari, 2013). Diğer bir çalışmada ise *Brassica rapa* L. bitkisine 0, 0,5, 1, 3, 5 mM konsantrasyonlarında 6 gün süreyle kurşun nitrat uygulaması yapılmış ve K_{1a}, K_{1b} ve karotenoidlerin miktarları ile kurşun konsantrasyonu arasında negatif bir korelasyon gözlenmiştir. Kontrol bitkilerine göre 5 mM Pb(NO₃)₂ uygulanmış bitkilerde K_{1a} değerleri %57.4, K_{1b} değerleri %68.5 ve karotenoidlerin değerlerinde %38.1 oranında düşüşler saptanmıştır (Cenkci, 2010).

Cyperus difformis L., *Chenopodium ambrosioides* L., *Digitaria sanguinalis* L. bitkilerine 5, 10, 20 mg/kg kadmiyum klorür, 50, 100, 200 mg/kg nikel sülfat ve 50, 100, 200 mg/kg kurşun asetat bileşikleri verilmiş ve deney sonuçlarında kurşunlu bileşik verilen bitkilerin K_{la} ve K_{lb} ölçüm değerleri kadmiyum ve nikel içeren bileşiklerin uygulandığı bitkilerin ölçüm değerlerinden daha yüksek çıkmıştır (Ewais, 1997). Kurşunun *Spartiana alterniflora* ve *Pinus halipensis* bitkilerinin çimlenmelerine ket vurduğu gösterilmiştir. Bu durum kurşunun enzimlere bağlanarak onların inaktivasyonuna sebep olması olarak açıklanabilir. Murherji ve Maitra (1976) 60 µM kurşun asetat uygulaması yapılarak strese maruz bırakılan pirinç endodermisinde proteaz ve amilazın %50 oranında inaktive edildiği göstermiştir (Murherji ve Maitra, 1976). Kurşun hücresel düzeyde sülfür grupları ile reaksiyona girerek enzim aktivitesini engellemektedir. Yüksek kurşun konsantrasyonu oksidatif stresi tetikleyerek reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi arttırmaktadır (Reddy, 2005).

Talinum triangulare bitkisine 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 ve 1.25 mM konsantrasyonlarında Pb(NO₃)₂ strese maruz bırakılmış ve bu bitkinin toksisite ve tolerans sistemleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda 0.25 ve 0.5 mM konsantrasyon uygulamalarına maruz kalan gruplarda kontrol bitkilerine göre K_{la}, K_{lb}, total klorofil ve karotenoidlerin ölçüm değerlerinde yükselmeler gözlemlenmiştir. Konsantrasyonların kurşun içerikleri arttıkça pigment ölçüm değerlerinde düşüşler gerçekleşmiştir (Kumar, 2012).

Bizim çalışmamızda da *Talinum triangulare* ile yapılan çalışmada olduğu gibi 100 ve 200 µM Pb(NO₃)₂ içeren MS ortamında yetişen çavdar bitkilerinin K_{la}, K_{lb}, total klorofil ve karotenoidlerin ölçüm değerlerinde yükselmeler gözlenmiştir. Kurşun bitki büyümesine ve fotosentetik pigment üretim mekanizmalarına negatif etkileri bulunmaktadır (Sharma and Dubey, 2005; Sengar al., 2008; Cenkci ve ark., 2010; Pourraut ve ark., 2011). Yaptığımız çalışmanın sonuçlarına göre düşük kurşun konsantrasyonları (100 ve 200 µM) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu seviyede strese maruz kalmış bireylerde klorofil üretiminin artmasına sebep olmuştur. Düşük konsantrasyonlu kurşun alınımlı strese tepki olarak bitkide metabolik olayların artmasını sağlamıştır. Uzun süreli kurşun stresi uygulanması yaprak büyümesinde gerilemeye ve fotosentetik üretiminde düşüşlere neden olmaktadır (Parys ve ark., 1998). Fotosentetik pigment üretimi ağır metal stresine maruz kalan çoğu bitkide birincil meydana gelen

olaylardan biridir (Shakya ve ark., 2008; Cenkci ve ark., 2010; Kumar, 2012). Ağır metaller fotosentetik pigment biyosentezindeki enzimatik basamaklara ya da Mg iyonu yerine klorofil yapısına girerek bu metabolik olaylara dahil olmaktadır (Sengar ve ark., 2008; Cenkci ve ark., 2010; Pourraut ve ark., 2011). Yaptığımız çalışmada verilerimize baktığımızda kurşun stresi uygulanan çavdar bitkisinde fizyolojik karakterlerin kurşun stresini tolare edecek şekilde değişikliğe uğraması yolu ile direncin ortaya çıktığı ve bu direnç mekanizmalarının fotosentetik pigment içeriğinin 100 ve 200 μM kurşun stresi altında artmasına sebep olduğu görülmektedir. Çavdar tarafından 100 ve 200 μM stres seviyelerinde kendini koruma adına gerekli yanıtlar oluşturulabilmiştir. Verilere baktığımızda klorofil *a*, klorofil *b*, klorofil *a/b*, total klorofil ve karotenoidlerin içeriklerinde kontrol ile karşılaştırıldığında 100 μM stres seviyesinde göreceli olarak %10.34, 10.22, 4.48, 3.24 ve 10.10 ve 200 μM stres seviyesinde kontrol ile karşılaştırıldığında göreceli olarak klorofil *a*, klorofil *b*, total klorofil ve karotenoid içeriklerinde %24.39, 44.66, 27.12 ve 28.04 oranında artış fakat klorofil *a/b* içeriğinde %18.75 oranında azalma olduğu görülmüştür. Total protein miktarlarına baktığımızda 100 ve 200 μM stres seviyelerinde göreceli olarak kontrol ile karşılaştırıldığında %40.86 ve 29.03 oranında düşüş olduğu gözlenmiştir. Burada dikkati çeken nokta artan stres seviyesine karşın total proteindeki düşüşün kontrolle karşılaştırıldığında azalmasıdır. Bu bize bitkide SOS savunma sisteminin aktif hale geldiğini düşündürmektedir. Bu olay çeşitli genlerin ekspresyonunun durdurulması ve SOS genlerinin aktif hale gelmesi sonucu çeşitli proteinlerin ki bunlar arasında en önemlileri enzimlerin ortaya çıkışı ile başarılabilmektedir (Qureshi ve ark., 2007). Daha sonrada değineceğimiz üzere kalsiyum gibi çeşitli elementlerin bu mekanizmaların doğru çalışmasında kritik önemi bulunmaktadır. Bitki için kurşun stresi altında hayatta kalma ve gelişim sadece iyon dengesi ve bunun gibi olayların iyi düzenlenmesi ile değil aynı zamanda yeterli fotosentetik biyokütlenin ve enerji ihtiyacının oluşturulabilmeside önemlidir. Bu açıdan bakıldığında fotosentetik pigment içeriği çavdar bitkisinde kurşun stresi uygulanarak incelenmiş ve artan kurşun stresi konsantrasyonlarında klorofil *a*, klorofil *b*, klorofil *a/b* ve karotenoidlerin değerlerinin aynı modeli oluşturduğu bulunmuştur. 400 μM stres altında çavdar bitkisinde klorofil *a*, klorofil *b*, klorofil *a/b* ve karotenoid içeriklerinde göreceli olarak kontrol ile karşılaştırıldığında yaklaşık %6.68, 6.07, 16.47, 2.9 ve 8.57 oranında düşüşlerin olduğu gözlenmiştir. 400 μM stres altında

total protein miktarına baktığımız zaman kontrolle karşılaştırıldığında total protein miktarında %22.04 oranında düşüş olduğu gözlenmesine rağmen bu düşüşün 100 ve 200 μ M stresler altındaki düşüşlere nazaran daha az olduğu tespit edilmiştir. Buda bize belli bir noktadan sonra bitkinin hayatta kalmak için kurşun stresini baskıyacak gerekli ayarlamaları yapamadığı ve dolayısı ile strese karşı cevap oluşturamadığı ve bu yüzden fotosentetik biyokütlede ve total protein seviyelerinde düşüşlerin görüldüğü fikrine götürmektedir. Bu durum kurşunun proteaz, amilaz gibi enzimlere bağlanarak ya da hücresel düzeyde sülfür grupları ile reaksiyona girerek onları engellemesi olarak açıklanabilir. Yüksek kurşun konsantrasyonu oksidatif stresin ortaya çıkmasına sebep olur. Aynı zamanda kurşun klorofillerin biyosentezi ile alakalı enzimatik basamaklara katılabilmektedir (Sharma ve Dubey, 2005). Yüksek kurşun konsantrasyonlarının bitkilerin su oranlarını, su stoklarını ve klorofil oranlarını düşürdüğü bilinmektedir (Ewais, 1997).

Kurşun elementi bitkiler için mutlak gerekli olmayıp, toprakta 15-40 ppm dozunda bulunur, topraktaki kurşun konsantrasyonu 150 ppm'i aşmadığı sürece insan ve bitki sağlığı açısından tehlike oluşturmaz. Ancak 300 ppm'i aştığında potansiyel olarak insan sağlığı açısından tehlikelidir (Adiloğlu, 2013). Kurşun bitki büyümenin baskılanması ve besin elementlerinin bitkiye alımının engellenmesi yoluyla bitki içerisindeki besin elementi gereksiniminin karşılanamamasına sebep olur ki buda bitki içindeki iyon dağılımını etkiler (Wozny ve Jerezynska, 1991; Malkowski ve ark., 2002). Kurşun başlıca bitkinin kök sistemi ile absorbe edilir ve küçük miktarlarda yapraklar yoluyla bitkiye alınmaktadır. Bitkiye alınan kurşun başlıca bitki kökünde birikir fakat sonradan bir kısmı bitkinin toprak üstü organlarına geçer (Rao ve ark., 2011). Bitkiler tarafından kurşunun alımını ve bitkilerde kullanılabilirliğini toprak pH'sı, toprak partiküllerinin büyüklükleri, iyon değişim kapasitesi, kök yüzey alanı, kökten madde salınımı ve mikorizal terleme oranı etkilemektedir (Sharma ve Dubey, 2005). Bu etkileri azaltmak için bitkiler farklı tolerans yöntemleri geliştirmişlerdir (Wang, 2003). Topraktan bitki kökleri ile alınan kurşun çözünmemiş formda köklerde tutulur. Sınırlı miktarda kurşun kökten diğer organlara taşınır. Çünkü kök epidermisi kurşun taşınımına karşı doğal bariyer oluşturmaktadır. Öldürücü dozlara maruz kalındığında bariyer etkisiz duruma gelir ve vasküler sisteme kurşun geçişi gerçekleşir (Gichner ve ark., 2008). Kurşunun

bitki içerisinde birikimi çeşitli büyüklüklerde olabilir ve başlıca bu birikimler hücreler arası boşluklar, hücre duvarı ve vakuollerde bulunmaktadır. Az miktarda kurşun birikimi endoplazmik retikulum, diktiyozom ve diktiyozom türevi kesecikler içinde de gerçekleşebilmektedir (Kabata-Pendias ve Pendias, 1984). Kurşun hücreye girdikten sonra birçok enzim aktivitesine ket vurur, hormonal sistemi, mineral beslenme ve su dengesini ve membran yapısı ve geçirgenliğini bozar. Kurşun ağır metalinin enzimlerin -SH grupları ile olan etkileşimlerinden dolayı enzim aktivitesini engeller. Metalloenzimlerin yapısında bulunan kofaktörlerin ana elemanları olan metallerle kurşun yer değiştirerek bu enzimlerin inaktive olmasına sebep olmaktadır (Sharma ve Dubey, 2005). Kurşun elementi, hücre turgoru ve hücre duvarı stabilitesini olumsuz etkilemesi, stoma hareketlerini ve yaprak alanını azaltması nedeniyle bitki su rejimini etkilemektedir. Aynı zamanda kökler tarafından tutulması ve kök gelişimini azaltması nedeniyle bitkilerin katyon ve anyon alımını azaltmakta dolayısıyla besin alımını etkilemektedir (Sharma ve Dubey, 2005).

Toprak çözeltisi içindeki kurşun kökler tarafından absorbe olur ve daha sonradan absorbe olan kurşun musilaj üronik asidin karboksil gruplarına ya da direkt rhizoderm hücre yüzeyinde bulunan polisakkaritlere bağlanır (Seregin ve Ivanov, 2001). Kök epidermis yüzeyi ile emilen kurşun pasif taşıma ile kök içine girer ve su taşınımını takip ederek farklı bölgelere hareket eder (Tung ve Temple, 1996). Ancak tüm kök boyunca kurşun absorbe edilme miktarı aynı değildir. Genç kök hücrelerinin ve ince hücre duvarına sahip hücrelerin bulunduğu bölgelerde kurşun alımı kolaylaşır (Seregin ve ark., 2004). Kök apikal kısmı pH'nın en düşük olduğu kısımdır ve düşük pH kurşun çözünürlüğünü arttırmaktadır. Henüz kurşunun köklere giriş mekanizması moleküler düzeyde bilinmemektedir. Kurşun kök sistemine birçok yolla girebilir ancak en çok kullanılan yol iyon kanalları ile olandır. Kurşun alımı seçici olmayan bir olgudur ve kök hücrelerinde alımı hücre zarının negatif potansiyelini koruyan H⁺/ATPase pompasına bağlıdır (Hirsch ve ark., 1998). Kalsiyumun kurşun alımını engellediği bilinmektedir (Garland ve Wilkins, 1981; Pourrut ve ark., 2011). Kalsiyum kanallarından geçiş için bu iki katyon arasında rekabet vardır (Huang ve Cunnigam, 1996). Bazı bilimadamları kalsiyum iyon kanallarının kurşunun köke girmek için kullandığı ana yol olduğunu göstermiştir (Wang ark., 2007; Pourrut ve ark., 2008). Transgenik bitkilerin kullanımı

ile kurşunun halkasal nükleotid kapılı iyon kanalları gibi seçici olmayan kanalları kullanabileceği (Arazi ark., 1999; Kohler ark., 1999) ya da düşük affiniteli katyon taşıyıcıları ile taşınabileceğini gösterilmiştir (Wojas ark., 2007).

Bu çalışmada kurşun elementinin bitkideki diğer mineral besin elementlerinin alımını nasıl etkilediği de araştırılmıştır. Sonuçlar bize açık bir şekilde göstermiştir ki bitkide kökte ve topraküstü yapılarda besin kompozisyonu kurşuna maruz bırakılma neticesinde değişmiştir. Kurşun stresi altında çavdar kök ve yapraklarındaki besinlerin akümülyasyonunda farklılıklar ortaya çıkmıştır (Şekil 4.2.1-4.2.20). Çavdar bitkisinin kök ve yapraklarında Zn, Mn, Ca, Cu ve K konsantrasyonları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artan kurşun konsantrasyonları ile doğru orantılı olarak artmıştır ve en çok artış en yüksek seviyedeki kurşuna maruz bırakılan gruplarda görülmüştür. Kökte ve yaprakta Fe, B ve Na içeriği artan kurşun konsantrasyonlarına maruz kalma neticesinde doğru orantılı olarak düşmüştür. Kontrol ile yapılan karşılaştırmalarda ise Mg içeriğinin yaprakta artarken kökte düştüğü ve artan kurşun konsantrasyonları ile artışın ya da düşüşün arttığı gözlenmiştir. Ca stres koşullarına karşı yanıt oluşturmada hücrede hayati fonksiyonların ortaya çıkmasında oldukça önemlidir. Bu çalışmada Ca seviyesinin artan kurşun stresine maruz kalması ile doğru orantılı olarak arttığı gözlenmiştir. Bu da bize bitkinin gerekli yanıtı oluşturabilmek için Ca alımını arttırdığı fikrine götürmektedir. Mg ve Fe fotosentetik aktivitenin yerine getirilebilmesi için gerekli olan iki kritik elementtir. Kurşunun kloroplastın yapısını bozarak fotosentez oranını düşürdüğü, klorofil sentezinin azalmasına sebep olduğu, elektron taşıma sistemini ve Calvin Döngüsü'nde görevli enzimleri engellediği daha önceki yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Ewais, 1997). Mg'un kökteki alımının düşüşünün sebebi kurşunun selektif olmayan kanalları bloke etmesi sonucu ortaya çıkması mümkün görülmektedir. Bitki stres karşısında hayatta kalmayı sağlayabilmek için fotosentez artışını belli bir noktaya kadar gerçekleştirmiştir ama yüksek kurşun stres uygulamalarında kökten toprak üstü kısımlara kurşun geçişindeki artıştan dolayı fotosentez inhibasyonu gerçekleşmiştir. Kökteki Mg, Fe, B ve Na alımının artan kurşun stresine maruz kalma neticesinde artan oranlarda düşüşler kurşun ile bu elementler arasındaki antagonistic ilişkilerden kaynaklandığı ya da bu elementlerin alımında fonksiyonel olan kanalların kurşun tarafından bloke edilmesi ile açıklanabilir. Mesela

kurşun stresine maruz kalma sonucu artan Zn ve Mn alımının bitki dokularında Fe konsantrasyonunu düşürmektedir. Bu durumun özellikle fotosentezi engelleyen bir etkisi olacaktır. Çünkü Fe fotosentezde görev yapan birçok enzimin yapısında bulunmaktadır. Bitkide yüksek Zn konsantrasyonu Fe eksikliğini tetikleyecektir. K elementi hücrede iyonik gücün dengede tutulmasında kritik öneme sahiptir (Kacar ve Katkat, 2010). Kurşunun iyon dengesini bozduğunu gösteren birçok çalışma yapılmıştır. İyonik dengenin kurulması adına K alımı strese bir cevap olarak bitki tarafından oluşturulmuş olabilir. Kurşun belli oranlara kadar kökte tutulmuştur ve bitkinin kurşuna yoğun bir şekilde maruz kaldığı yer köktür. Kurşunun kök hücrelerine geçişi belli bir noktaya kadar engellenebilmiş olsa da yüksek oranlarda kurşuna maruz kalan köklerde belli bir noktadan sonra kurşunun hücrelere geçişi söz konusu olmuştur.

Bu çalışmada çavdar bitkisinin farklı seviyelerdeki kurşun stresinden nasıl etkilendiği genotoksik alanda yapılan çalışma sonuçlarına bakılarak değerlendirilmiştir. DNA'daki değişimler tespit edilirken RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) tekniği kullanılmıştır. RAPD ilk defa 1990 yılında rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nu (Polymerase Chain Reaction) temel alan bir teknik olarak ortaya çıkmıştır (Williams ve ark., 1990; Welsh ve McClelland, 1990).

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisi çimlenme aşamasındayken Hg, B, Cr ve Zn toksik elementlerine 150 ve 350 ppm dozajlarında maruz bırakılmış ve RAPD tekniği kullanılarak fasulye kök ve yapraklarında DNA olası hasarları tespit edilmiştir. RAPD analizlerinde guanin-sitozin (GC) oranı %60–70 olan 12 primer kullanılmış ve DNA profilleri elde edilmiştir. Toplam bant sayısı 120 bulunmuş ve DNA bantlarının büyüklüğünün 263–3125 bp arasında değiştiği ve Hg, B, Cr ve Zn uygulamaları sonucunda elde edilen polimorfizm oranları sırasıyla %26.7, 45.8, 30.0 ve 25.3 olduğu tespit edilmiştir (Cenkci ve ark., 2009). Benzer bir çalışmada, yaygın çevresel kirleticilerden olan paranitrofenolün (PNP) farklı orandaki konsantrasyonları (4, 18, 36, 72, 144, 288, 360, 720 nM) uygulanarak fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkisinde DNA üzerindeki olası hasarlar araştırılmıştır. Yapılan çalışmada toplam 46 RAPD primerinden 8 tanesinden polimorfik DNA bantları elde edilmiştir. Düşük konsantrasyonda PNP uygulamalarında 5 yeni bant (%9.0) ortaya çıkarken, yüksek konsantrasyonda PNP uygulamalarında 11 yeni bant (%22.9) ortaya çıkmıştır. Benzer

bir şekilde düşük konsantrasyonda PNP uygulamalarında 11 bant kaybı (%20.0), yüksek konsantrasyonda PNP uygulamalarında ise 22 bant kaybı (%45.8) gözlenmiştir (Enan, 2007). Bir başka çalışmada fasulye bitkisinde bor elementinin genotoksik etkisi RAPD tekniği uygulanarak kontrol edilmiştir. Çalışmada 5 (%19.0) ve 10 ppm (%13.0) bor stresi uygulamaları gerçekleştirilmiştir. OPA-08 primerinin kullanıldığı RAPD analizlerinde, fasulye bitkisindeki bütün dozlardaki boron stresi uygulamalarında toplam 14 yeni bandın ve toplam 7 DNA bandının da kaybolduğu tespit edilmiştir (Kekec ve ark., 2010).

Yapılan bir çalışmada, baklada kadmiyum genotoksisitesine karşı selenyumun etkisi araştırılmış ve DNA hasarlarının tespitinde RAPD tekniği kullanılmıştır. Bitkilere kadmiyum ($CdCl_2$) stresi 183.316, 18.3316, 1.83316 ppm, selenyum (Se^{4+}) stresi ise 0.08, 8.0, 800.0 ppm düzeylerinde uygulanmıştır. Yapılan DNA analizleri sonucunda 8 RAPD primerinden toplam 100 DNA bandı elde edilmiş ve bant büyüklüklerinin 300–400 bp arasında değiştiği bulunmuştur. Çalışma sonucunda kadmiyumun bütün uygulama dozları genetik polimorfizme neden olmuştur ve genomik kararsızlığı artırmıştır. Ayrıca, kadmiyum stresine karşı belli düzeylerde selenyum kullanıldığında kadmiyumun neden olduğu polimorfizmin azaldığı ve genomik kararlılığın arttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak selenyum ile kadmiyumun birbirine karşı antagonistik etki gösterdiği bulunmuştur (Taspınar ve ark., 2009).

Turp bitkisinde (*Brassica napus* L.) yapılan çalışmada turp tohumları 0.5–5.0 mM kurşun nitrat ($Pb(NO_3)_2$) stresine maruz bırakılarak etkileri RAPD analizi ile değerlendirilmiştir. RAPD analizleri sonucunda, 11 RAPD primerinden toplam 90 DNA bandı elde edilmiş, band büyüklüklerinin 189–2928 bp arasında değiştiği, deneme bitkilerinde ekstra 35 DNA bandının oluştuğu ve yeni oluşan bantların %77'sinin 1 kb'den küçük olduğu tespit edilmiştir (Cenkci ve ark., 2010). Roka (*Eruca sativa*) bitkisiyle yapılan diğer bir çalışmada, kadmiyum ve kurşunun 150 mg/l seviyesinde stres uygulamalarında genotoksik etki gösterdiği RAPD tekniği kullanılarak gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan 20 farklı primerden 4 tanesinden DNA bandı elde edilememiş, 3 primerinden tek bant, 13 primerden 5'ten fazla DNA bandı elde edilmiş ve primer başına ortalama bant sayısının 4 olduğu ortaya çıkmıştır. Yüksek dozda kadmiyum uygulamalarında spesifik DNA bantları elde edilmiş fakat yüksek dozdaki

Çinko uygulamalarından spesifik DNA bantları elde edilememiştir (Qurainy ve ark., 2010).

Bor bakımından zengin olan topraklarda yetişen buğday (*Triticum aestivum*) bitkisinde, bor elementinin genotoksik etkisinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışmada, bor elementinin (H₃BO₃) genotoksik etkisi RAPD tekniği ile kontrol edilmiştir. Buğday bitkisi için 100 ppm seviyesindeki uygulamasında önemli DNA değişimleri tespit edilmiştir (Kekec ve ark., 2010). Buğdaygillerin önemli türlerinden biri olan arpa (*Hordeum vulgare*) bitkisinde yapılan çalışmada, RAPD tekniği kullanılarak kadmiyumun genotoksik etkisi incelenmiştir. RAPD analizleri sonucunda test edilen 17 primerden 9 primerin spesifik sonuçlar verdiği görülmüş ve büyüklükleri 144–2639 b arasında değişen toplam 129 DNA bandı elde edilmiştir. 10, 20 ve 40 mg L⁻¹ Cd uygulaması sonucunda polimorfizm oranları (P) sırasıyla %37.9, 52.7 ve 53.4 olarak saptanmıştır. Elde edilen DNA bantlarına bakıldığı zaman, bütün dozlardaki ağır metal uygulamaları sonucunda 4 yeni bandın oluştuğu ve 16 bandın da kaybolduğu görülmüştür (Liu ve ark., 2009). Arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkisinde kadmiyum kirliliğinin DNA zerindeki genotoksik etkilerini göstermek için yapılan diğer bir çalışmada yine RAPD tekniği kullanılarak 0, 30, 60, 120 mg/L konsantrasyonlarında kadmiyum stresine maruz bırakılan arpa fidelerinde DNA analizleri gerçekleştirilmiştir. RAPD analizlerinde kullanılan 12 farklı primer uzunlukları 180 ile 2344 b arasında değişen toplamda 110 DNA bandı üretmiştir. 30, 60 ve 120 mg/L stres uygulamalarında polimorfizm oranları sırasıyla P (%) = %34.5, 40.9 ve 44.5 olarak bulunmuştur (Liu ve ark., 2005).

Atık su kirliliğinin genotoksik etkisinin incelenmesi amacıyla yulafla (*Avena sativa*) yapılan çalışmada, arıtılmış ve ham atık suların genotoksik etkisi RAPD tekniği kullanılarak incelenmiş ve RAPD analizleri sonucunda arıtılmış ve ham atık suların her ikisinin de genotoksik etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Yapılan analizlerde 15 farklı primer 186 DNA bandı üretmiş ve primer başına düşen bant sayısı 12.4 bulunmuştur. Ham atık sularla sulanan bitkilerin RAPD analizleri kontrol grubu analizleri ile karşılaştırıldığında ortaya çıkan 51 yeni DNA bandı ve varolan DNA bantlarından 19 tanesinin kaybolduğu tespit edilmiştir. Keza benzer şekilde arıtılmış atık sularla sulanan bitkilerin RAPD analizlerinin kontrol grubu RAPD analizleri ile karşılaştırıldığında ise

16 tane yeni DNA bandının ortaya çıktığı ve 17 tane varolan DNA bandının bulunduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak arıtılmış atık suyun ham atık suya oranla genotoksik etkisinin daha az olduğu bulunmuştur (Swaileh ve ark., 2008).

Pirinç (*Oryza sativa* L.) bitkisiyle yapılan çalışmada, RAPD analizleri için 12 farklı primer kullanılmış ve kontrol bireylerinde baz çifti sayısı 179–3056 arasında değişen 180 DNA bandı elde edilmesine rağmen kadmiyumun 15, 30 ve 60 mg/kg stres uygulamalarında polimorfizm değeri (P) sırasıyla %32.8, 44.4 ve 66.7 olarak bulunmuş ve kontrol grubu bireyleri ile karşılaştırma yapıldığında toplam 108 yeni DNA bandının oluşumu ve 164 varolan DNA bandının kaybolduğu tespit edilmiştir. Genomik kalıp stabilite değerlerine (GTS) bakıldığında genomik kalıp kararlılığının 15 mg stres uygulamasında %67.1, 30 mg stres uygulamasında %52.7, 60 mg stres uygulamasında %32.3 olduğu saptanmıştır (Liu ve ark., 2007).

Türkiye-Karabük bölgesinde demir-çelik fabrikalarının atıklarına maruz kalan liken türünde (*Evernia prunastri* L.) hava kirliliğinin genotoksik etkisi RAPD tekniği kullanılarak araştırılmış ve 10 kirli ve 1 temiz bölgeden (kontrol) olmak üzere toplam 11 bölgeden toplanan örneklerin ağır metal DNA analizlerinde 21 primer kullanılarak elde edilen sonuçlarda 13 primerin normal DNA bantları ve 104 tanede yeni DNA bandı ürettiği tespit edilmiştir. Genomik kalıp stabilitesi (GTS) değerlerine bakıldığında ise, demir-çelik fabrikasına yakın bölgelerde GTS değerlerinin yüksek olduğu bulunmuştur (Cansaran-Duman ve ark., 2011).

RAPD analizi için 7 farklı primer kullanılarak kurşun stresine maruz bırakılmış ve bırakılmamış (kontrol) çavdar kök hücrelerinden ekstraksiyonu yapılan genomik DNA'ların amplifikasyonları gerçekleştirilmiştir. 7 primerden 4'ü (~%57) güçlü bant motifi ortaya çıkarmasına rağmen 3 primer genomik DNA'nın amplifikasyonunda fonksiyonel olamamıştır. CTG AGG TCTC (RAPD İontek®) dizisine sahip primer kurşuna maruz kalmış ve kalmamış örnekler arasında birbirlerinden ayrılabilen band profillerinin içinde 15 tane tekrar oluşturulabilen güçlü bantların ortaya çıkışını sağlamıştır. Temsili RAPD profilleri Şekil 4.4.1'de gösterilmektedir. Kurşuna maruz kalmış ve kalmamış bitkilerden elde edilen DNA parmakizleri karşılaştırıldığında birbirlerinden farklı olduğu açık bir şekilde görülmektedir. Kurşuna maruz kalan DNA

parmakizi profilleri ile kontrol (kurşuna maruz kalmamış) DNA parmakizleri arasındaki temel farklılığa sebep olan olaylar bazı varolan bantların kaybolması ve bazı yeni bantların oluşmasıdır. Kurşuna maruz kalmış ve maruz kalmamış çavdar bitkileri Tablo 4-5-1 'de ve Şekil 4.4.1'de karşılaştırılmıştır. 100 ve 200 μM 'lik kurşun stresi uygulamalarda yeni ortaya çıkan bantın moleküler büyüklüğü yaklaşık olarak 949, 965 ve 761 bç'dir (Tablo 4-5-1). 200 ve 400 μM 'lık kurşun stresi uygulamalarında kaybolan bantların moleküler büyüklükleri yaklaşık olarak 311 ve 1073 bç' dir (Tablo 4-5-1).

Genomik DNA istikrarı (RAPD modellerindeki değişikliklerle alakalı yapılan nitel bir ölçüm) ve total protein ve fotosentetik pigment içerikleri ile alakalı veriler arasında çavdar bitkisinde karşılaştırmalı analizler yapılmıştır. Kurşun konsantrasyonundaki artış ile birlikte çavdar bitkisinde total protein ve fotosentetik pigment içeriklerinde ve genomik DNA istikrarında düşüşler görülmüştür ve aralarında bir korelasyon vardır (Şekil 4-1-1, 4-1-2, 4-3-1, 4-3-2). RAPD profil sonuçlarımıza göre yeni bantların ortaya çıkışı ve kayboluşu 100, 200 ve 400 μM kurşun stresine maruz bırakma uygulamalarında ortaya çıkmıştır. Yeni bantların ortaya çıkışı ve kayboluşu belki DNA da oluşan hasarın seviyesi ile alakalı olarak genomik kalıbın dengesizliğinden dolayı meydana gelmiştir. Bu çalışma ile birlikte çevresel faktörlerin organizmaların karakterlerini etkilediği gösterilmiştir. Kurşun tek ve çift iplikçikteki kırılmalar, modifiye edilmiş bazlar, nukleotidlerin kaybolduğu bölgeler, DNA-protein çapraz bağları, okside olmuş bazlar gibi durumların oluşmasını başlatabilir (Bisova ve ark., 2003; Hsiao and Stapleton, 2004). Bu tür farklı DNA lezyonları ve mutasyonlarının varlığından dolayı önemli yapısal değişikliklerin indüksiyonu PZR olaylarının kinetiğini büyük oranlarda etkileyebilir (Bowditch ve ark., 1993; Pan ve Yu, 2011). Yeni PZR ürünlerinin ortaya çıkışı yapısal bir değişiklikten yada ortaya çıkan büyük nukleotid eksilmelerinden veya homolog rekombinasyon gibi mutasyonların sonucu olarak oligonukleotid işleme noktalarında meydana gelir (Atienzar ve ark., 1999). En son yapılan çalışmalar göstermiştir ki DNA parmakizi toksik maddelerin etkilerinin tespiti için biyoindikatörlerden biridir (Atienzar ve ark., 2000). Kirletici toksik kimyasallar ile oluşturulan RAPD profil değişiklikleri genomik DNA kalıp istikrarı ve diğer parametrelerle birlikte genotoksik etki değişikliklerinin karşılaştırmalı olarak ortaya konmasında kullanılmıştır (Liu ve ark., 2005).

Veriler göstermiştir ki kurşun bitkinin bütün bölümlerinde akümüle olmuştur ve akümüstasyon dışarıdan verilen kurşun artışına paralel olarak artmıştır. Çavdar fidanlarından alınan yapraklardaki fotosentetik pigment içeriğindeki değişiklikler uygulanan kurşun konsantrasyonu ile ters bir ilişki sergilemiştir. Çavdar fidanlarındaki fotosentetik pigment seviyelerindeki düşüş RAPD profillerinde değişiklikler ile bir korelasyon göstermiştir (Şekil 4-1-1, 4-1-2, 4-1-5 ve 4-5-1). Bu bulgular göstermektedir ki DNA da ortaya çıkan hasar uzantılarının çavdar fidanlarının yaprak hücrelerine zarar verdiği öngörülmüştür. Keza yine birkaç makro ve mikro besinin alımının, taşımının ve kullanımının kurşun tarafından değişikliğe uğratıldığı gözlenmiştir. Kurşunun fazlalılığı belli elementlerin alımını düşürmüş ve bazılarını arttırmıştır. Bu artış ve düşüşler bitkinin hangi kısmının olaya dahil olması ile de alakalıdır.

Sonuçta, RAPD-PZR metodu kurşun tarafından oluşturulan genomik düzeydeki değişikliklerin tespitinde bir araştırma aracı olarak kullanılabilir. Daha da ilerisi için RAPD-PZR parmakizi diğer fizyolojik parametrelerle birlikte düşünüldüğünde kurşun toksisitesinin tayininde güçlü bir strateji olarak kullanımını destekler sonuçları ortaya çıkarmıştır. Deneyde kullandığımız primer kurşunun sebep olduğu DNA düzeyindeki değişikliklerinin tespitinde bize bilgi sağlama yönünden oldukça kullanışlı olmuştur fakat spesifik olarak DNA düzeyindeki modifikasyonların gösterilebilmesi için dizi analizi ya da daha detaylı moleküler deneylerin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Acar, O. ve Baykal, F. (2008) Tuz Stresinin Triticale ve Bazı Secale Taksonlarında Total Süperoksit Dismütaz (SOD; E.C. 1.15.1.1) ve Total Peroksidaz (POD; EC 1.11.1.7) Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması. 19. Ulusal Biyoloji Kongresi. 23-27 Haziran, Trabzon, Türkiye, Bildiri özetleri kitabı, s. 408.
2. Adiloğlu, A. (2013) Karamenderes Havzası Topraklarında Bazı Ağır Metallerin (Cr, Ni, Pb) Kirliliğinin Araştırılması. JOTAF/Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, 10 (1).
3. Adriano, D. C. (2001) Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals. Springer.
4. Aissa, L. ve Keloufi, B. (2012) Determining the Heavy Metal Pollution in Mascara (Algeria) by Using *Casuarina equisetifolia*. Ecologia Balkanica, 4 (1); 1-7.
5. Akan, J. C., Abdulrahman, F. I., Sodipo, O. A. ve Chiroma, Y. A. (2010) Distribution of Heavy Metals in the Liver, Kidney and Meat of Beef, Mutton, Caprine and Chicken from Kasuwan Shanu Market in Maiduguri Metropolis, Borno State, Nigeria. Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology, 2(8); 743-748.
6. Akgüç, N., Özyiğit, İ. İ. ve Yarcı, C. (2008) *Pyracantha coccinea* Roem. (Rosaceae) as a Biomonitor for Cd, Pb and Zn in Muğla Province (Turkey). Pakistan Journal of Botany, 40 (4); 1767-1776.
7. Akın, M. ve Akın, G. (2007) Suyun önemi, Türkiye’de su potansiyeli, su havzaları ve su kirliliği. Ankara Üniversitesi Dil ve Tarih-Coğrafya Fakültesi Dergisi, 47 (2); 105-118.
8. Akıncı E. A., Akıncı S. ve Yılmaz K. (2010) Response of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to lead toxicity: Growth, element uptake, chlorophyll and

- water content. African Journal of Agricultural Research, 5 (6); 416-423.
9. Aksoy, A. (1995) Kayseri-Kırşehir Karayolu Kenarında Yetişen Bitkilerde Ağır Metal Kirlenmesi. II. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi Programı, Kayseri.
 10. Aksoy, D. (2009) Patlıcan (*Solanum melongena*) Tohumlarında Bakır (Cu) Stresi ile Oluşan DNA Değişikliklerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
 11. Aktas, H., Abak, K., ve Cakmak, I. (2006). Genotypic variation in the response of pepper to salinity. Scientia horticulturae, 110(3), 260-266.
 12. Anaç , D., Kılıç, C. C. ve Esetlili, B. Ç. (2013) Toprak Bilgisi ve Bitki Besleme, Anadolu Üniversitesi.
 13. Andersson, M. S., Pfeiffer, W. H. ve Tohme, J. (2014) Enhancing Nutritional Quality in Crops Via Genomics Approaches. In: Genomics of Plant Genetic Resources (pp. 417-429), Springer Netherlands.
 14. Arazı, T., Sunkar, R., Kaplan, B. ve Fromm, H. (1999) A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants. The Plant Journal, 20(2); 171-182.
 15. Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant physiology, 24(1);1-15.
 16. Ashraf M. ve Foolad M. R. (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stres resistance. Environmental and Experimental Botany, 59 (2); 206-216.
 17. Atienzar, F. A. ve Jha, A. N. (2006) The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 613 (2); 76-102.

18. Atienzar, F. A., Billingham, Z. ve Depledge, M. H. (2002) 4-*n*-Nonylphenol and 17- β estradiol may induce common DNA effects in developing barnacle larvae. *Environmental Pollution*, 120(3); 735-738.
19. Aybak, H. Ç. (2005) Bitkisel Üretim. Hasat Yayınevi, İstanbul, 52- 57.
20. Aydın, S. Ö. (2004) RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) belirleyicileri ve bitki sistematiği. *Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6;113-129.
21. Azevedo, R. A. ve Lea, P. J. (2005) Toxic metals in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, Volume 17, No.1.
22. Babior, B. M. (1997) Superoxide: a two-edged sword. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30(2); 141-145.
23. Babbie, A., Tokuriki, N. ve Hollfelder, F. (2010) What makes an enzyme promiscuous?. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14 (2); 200–207.
24. Badora, A. (2002) Bioaccumulation of Al, Mn, Zn and Cd in pea plants (*Pisum sativum* L.) against a background of unconventional binding agents. *Polish J. Environ. Stud.*, 11(2);109-116.
25. Baker, A. J. ve Walker, P. L. (1990) Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants (Vol. 155). CRC Press, Boca Raton, FL.
26. Başar, H. ve Özgümüş, A. (1999) Değişik demirli gübre ve dozlarının şeftali ağaçlarının bazı mikro besin elementi içerikleri üzerine etkisi. *Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi*, 23; 273-281.
27. Beckett, K. P., Freer-Smith, P. H. ve Taylor, G. (1998) Urban woodlands: Their role in reducing the effects of particulate pollution. *Environmental Pollution*, 99; 347-360.
28. Bhargava, A., Carmona, F. F., Bhargava, M. ve Srivastava, S. (2012)

- Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. Journal of environmental management, 105; 103-120.
29. Birch, F. (1961) Composition of the earth's mantle. Geophysical Journal International, 4 (Supplement 1), 295-311.
30. Bisova K., Hendrychova J., Cepak V. ve Zachleder V. (2003) Cell growth and division processes are differentially sensitive to cadmium in *Scenedesmus quadricauda*. Folia Microbiologica, 48; 805-816.
31. Blaylock, M. J., Salt, D. E., Dushenkov, S., Zakharova, O., Gussman, C., Kapulnik, Y. ve Raskin, I. (1997). Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. Environmental Science and Technology, 31(3), 860-865.
32. Boşgelmez, A., Boşgelmez, İ. İ., Paslı, N., Savaşçı, S. ve Kaynaş, S. (2001) *Ekoloji-II Toprak*. ISVAK yayınları No: 6; 460-707.
33. Bowditch, B. M., Albright, D. G., Williams, J. G. ve Braun, M. J. (1993) The use of Randomly Amplified Polymorphic DNA Markers in Comparative Genome Studies. Methods in Enzymology, 224; 294-309.
34. Bowler, C., ve Fluhr, R. (2000). The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. Trends in plant science, 5(6), 241-246.
35. Bozcuk, S. (2000) Bitki Fizyolojisi. Hacettepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Ankara, Türkiye, 67; 80-85, 105-111.
36. Bradford, M. (1976) A Rapid ve Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal. Biochem., 72; 248-254.
37. Burtis, C. A. ve Ashwood, R. E. (2002) Fundamentals Of Clinical Chemistry. EPHC (Environment Protection and Heritage Council), 5th Ed., 652-659.

38. Cabanero, F. J., Martínez, V. ve Carvajal, M. (2004) Does calcium determine water uptake under saline conditions in pepper plants, or is it water flux which determines calcium uptake?. *Plant Science*, 166(2); 443-450.
39. Cakmak, I., Sari, N., Marschner, H., Ekiz, H., Kalayci, M., Yilmaz, A. ve Braun, H.J. (1996) Phytosiderophore release in bread and durum wheat genotypes differing in zinc efficiency. *Plant Soil* 180: 183-189.
40. Cansaran-Duman, D., Atakol, O. ve Aras, S. (2011) Assessment of air pollution genotoxicity by RAPD in *Evernia prunastri* L. Ach. from around iron-steel factory in Karabük, Turkey. *Journal of Environmental Sciences*, 23(7); 1171-1178.
41. Carfagna, S., Lanza, N., Salbitani, G., Basile, A., Sorbo, S. ve Vona, V. (2013) Physiological and morphological responses of Lead or Cadmium exposed *Chlorella sorokiniana* 211-8K (Chlorophyceae). *Springer Plus*, 2: 147 (7 pages).
42. Cenkci, S., Cigerci, I. H., Yildiz, M., Ozay, C., Bozdog, A. ve Terzi, H. (2010) Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genome template stability in *Brassica rapa* L. *Environ. Exp. Bot.* 67; 467–473.
43. Chen, X. Y., Daniell, T. J., Neilson, R., O’Flaherty, V. ve Griffiths, B. S. (2010) A comparison of molecular methods for monitoring soil nematodes and their use as biological indicators. *European Journal of Soil Biology*, 46 (5); 319–324.
44. Cheng, H. ve Hu, Y. (2010) Lead (Pb) isotopic fingerprinting and its applications in lead pollution studies in China: a review. *Environmental Pollution*, 158(5); 1134-1146.
45. Clemens, S. (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212; 475–486.
46. Cooper, H. P., ve Donald, L. (1951). Plant-nutrient deficiency symptoms in

- cotton. Hunger Signs in Crops. Washington., Amer. Soc. Agr. and Nat'l Fert. Assoc, 135-170.
47. Cramer, G. R. (2002) Calcium-sodium interactions under salinity stress. In: Salinity. Environment-Plants-Molecules. Eds. A. Lauchli and U. Lüttge. Kluwer Academic Publishers, Invited Review, 205-227.
 48. Cunningham, S. D., ve Lee, C. R. (1995). Phytoremediation: plant-based remediation of contaminated soils and sediments. Bioremediation: Science and applications, (bioremediation), 145-156.
 49. Curie, C. ve Briat, J. F. (2003) Iron transport and signaling in plants. Annual Review of Plant Biology, 54; 183–206.
 50. Çağlarırnak, N. ve Hepçimen, A. Z. (2010) Ağır metal toprak kirliliğinin gıda zinciri ve insan sağlığına etkisi. Akademik Gıda, 8 (2); 31-35.
 51. Çakmak, İ., Marschner, H., Bangerth, F.(1989). Effects of zinc nutritional status on growth, protein metabolism and levels of indole-3-acetic acid and other phytohormones in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Exper. Bot. 40:405-412.
 52. De Jonghe, W. R. A. ve Adams F. C. (1982) *Biochemical cycling of organic lead compounds*. In: Toxic metals in the atmosphere, pages 561-593.
 53. Demarty, M., Morvan, C., ve Thellier, M. (1984). Calcium and the cell wall. Plant, Cell and Environment, 7(6), 441-448.
 54. Ding, J., Wu, J. H., Liu, J. F., Yuan, B. F., ve Feng, Y. Q. (2014). Improved methodology for assaying brassinosteroids in plant tissues using magnetic hydrophilic material for both extraction and derivatization. Plant Methods, 10(1), 39.
 55. Duke, J. A. (1978). The quest for tolerant germplasm. Crop tolerance to suboptimal land conditions, (croptoleranceto), 1-61.

56. Duong, T. T. T. ve Lee, B. K. (2011) Determining contamination level of heavy metals in road dust from busy traffic areas with different characteristics. *Journal of Environmental Management*, 92 (3); 554–562.
57. Edreva, A. (1998) Molecular Bases of Stress in Plants. *Bitkilerde Stres Fizyolojisinin Moleküler Temelleri*. 22-26 Haziran, Bornova, İzmir, E. Ü. Bilim-Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, 1-33.
58. Ekmekçi, Y., Tanyolac, D. ve Ayhan, B. (2009) A crop tolerating oxidative stress induced by excess lead: maize. *Acta Physiol. Plant.* 31; 319–330.
59. El-Kholi, A. F. ve Hamdy, A. A. (1977) Boron potassium interrelationship in alfalfa plants [Egypt]. *Egyptian Journal of Soil Science (Egypt)*.
60. Elmlund, H., Lundqvist, J., Al-Karadaghi, S., Hansson, M., Hebert, H. ve Lindahl, M. (2008) A new cryo-EM single-particle ab initio reconstruction method visualizes secondary elements in an ATP-fueled AAA+ motor. *Journal of Molecular Biology*, 375; 934–947.
61. Epstein, E. (1999) Silicon. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50; 641-664.
62. Eroğlu, A. ve Aksoy, N. (2003) Jeotermal Suların Kimyasal Analizi. In: Toksoy, M. (ed.), *Jeotermal Enerji Doğrudan Isıtma Sistemleri Temelleri ve Tasarımı*, MMO Yay., İzmir, 149-183.
63. Ewais, E. A. (1997) Effects of cadmium, nickel and lead on growth, chlorophyll content and proteins of weeds. *Biologia Plantarum*, 39(3); 403-410.
64. Farooq, M., Anwar, F. ve Rashid, U. (2008) Appraisal of Heavy Metal Contents in Different Vegetables Grown in the Vicinity of an Industrial Area. *Pakistan Journal Botany*, 40 (5); 2099-2106.
65. Fırat, B. (1998) *Bitki Nasıl Beslenir*, Atlas Kitabevi, Konya.

66. Garland, C. J. ve Wilkins, D. A. (1981) Effect of calcium on the uptake and toxicity of lead in *Hordeum vulgare* L. and *Festuca ovina* L. New Phytologist, 87 (3); 581-593.
67. Gichner, T., Znidar, I. ve Szakova, J. (2008) Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 652 (2); 186–190.
68. Gisbert, C., Ros, R., De Haro, A., Walker, D. J., Pilar Bernal, M., Serrano, R. ve Navarro-Avino, J. (2003). A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. Biochemical and biophysical research communications, 303(2); 440-445.
69. Güler, Ç. ve Çobanoğlu, Z. (2001) *Gürültü*. Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi, 19.
70. Gürel, A., ve Avcıoğlu, R. (2001). Bitkilerde strese dayanıklılık fizyolojisi. Editörler: Özcan S., Gürel, E., Babaoğlu, M. Bitki Biyoteknolojisi, Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. SÜ Vakfı Yayınları, 288-326.
71. Haehnel, W. (1984) Photosynthetic electron transport in higher plants. Annual Review of Plant Biology, 35; 659-693.
72. Hall, J. L. (2002) Cellular Mechanisms for Heavy Metal Detoxification and Tolerance. Journal of Experimental Botany, 53 (366); 1-11.
73. Harite, Ü. (2008) *Pamukta Bor Toksisitesine Dayanıklılık*. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye, 68.
74. Hepler, P. K. (2005) Calcium: A central regulator of plant growth and development. American Society of Plant Biologists The Plant Cell, 17 (8); 2142-2155.
75. Hernandez-Allica, J., Garbisu, C., Barrutia, O. ve Becerril, J. M. (2007) EDTA-induced heavy metal accumulation and phytotoxicity in cardoon plants.

Environmental and Experimental Botany, 60 (1); 26-32.

76. Hirsch, R. E., Lewis, B. D., Spalding, E. P. ve Sussman, M. R. (1998) A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science*, 280 (5365); 918-921.
77. Hong, S., Kim, S. A., Guerinot, M. L. ve McClung, C. R. (2013) Reciprocal interaction of the circadian clock with the iron homeostasis network in *Arabidopsis sp.* *Plant physiology*, 161(2); 893-903.
78. Hosier, S. ve Bradley, L. (1999) *Guide to symptoms of plant nutrient deficiencies*. The University of Arizona Cooperative Extension, 5.
79. Hsiao C. J. ve Stapleton S. R. (2004) Characterization of Cd-induced molecular events prior to cellular damage in primary rat hepatocytes in culture: activation of the stress activated signal protein JNK and transcription factor AP-1. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 18; 133-142.
80. Hu, H., ve Brown, P. H. (1997). Absorption of boron by plant roots. *Plant and Soil*, 193(1-2), 49-58.
81. Huang, J. W. ve Cunningham, S. D. (1996) Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologist*, 134 (1); 75-84.
82. Humble, G. D., ve Raschke, K. (1971). Stomatal opening quantitatively related to potassium transport evidence from electron probe analysis. *Plant Physiology*, 48(4), 447-453.
83. Jabeen, R., Ahmad, A. ve Iqbal, M. (2009) Phytoremediation of heavy metals: physiological and molecular mechanisms. *The Botanical Review*, 75 (4); 339-364.
84. Jebara, S., Jebara, M., Limam, F., ve Aouani, M. E. (2005). Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt

stress. Journal of plant physiology, 162(8), 929-936.

85. Jones, H. A., Brown, B. E., ve Honghland, G. (1949). Plant-nutrient deficiency symptoms in the potato. Hunger sings in crops. Washington, Amer. Soc. Agronomy, 118-120.
86. Jorgensen, S. (2000). Principles of pollution abatement. Elsevier.
87. Junior, J. L., Reis, A. R., Rossi, M. L., Cabral, C. P., Nogueira, N. D. L. ve Malavolta, E. (2010) Changes In The Ultrastructure Of Soybean Cultivars In Response To Manganese Supply In Solution Culture. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.), 67 (3); 287-294.
88. Kabata-Pendias, A. (2010). Trace elements in soils and plants. CRC press.
89. Kabata-Pendias, A. ve Mukherjee, A.B. (2007) Trace Elements from Soil to Human. Springer Berlin Heidelberg, New York, 1-519.
90. Kabata-Pendias, A. ve Pendias, H. (1984) Trace elements in soils and plants. CRC Press, Florida.
91. Kabata-Pendias, A. ve Pendias, H. (1999) *Biogeochemistry of trace elements*. PWN, Warszawa, 344-355.
92. Kacar, B. (1996). Bitki Fizyolojisi. 4. Baskı. S.1-424. A.Ü. Ziraat Fakültesi Yayın No: 1447. A.ü. Ziraat Fak. Yayın Ünitesi, Ankara.
93. Kacar, B. (2006) Potasyumun bitkilerde işlevleri ve kalite üzerine etkileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü, 20- 29.
94. Kacar, B. ve Katkat, A.V. (1998) Bitki Besleme. Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Yayın No: 127. Vipış Yayınları, 3, Bursa.
95. Kacar, B. ve Katkat, V. (2007) Bitki Besleme, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 10-24.

96. Kacar, B. ve Katkat, V. (2010) Bitki Besleme (*Plant Nutrition*), 5. Baskı. Nobel Yayın Dağıtım, Yayın No: 849.
97. Kahvecioğlu, Ö., Kartal G., Güven A. ve Timur S. (2009) Metallerin Çevresel Etkileri-I, Metalurji, 136. sayı.
98. Kalinowska, A. (1984) Lead Concentration in the slug *Arion rufus* from sites at the different distances from a tourist road. *Ecological Bulletins*, 36: 46-49.
99. Karademir, M. ve Toker M. C. (1995) Ankara'nın bazı kavşaklarında yetişen çim ve bitkilerde egzoz gazlarından gelen kurşun birikimi. II.Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi., Ankara, 699-711.
100. Karanlık, S., Özkutlu, F., Öztürk, L., Bozbay, G., Özus, I., Çakmak, I., ve Ekiz, H. (2000). Investigation of the response of different bread and durum wheat cultivars to NaCl salt. In Orta Anadolu'da Hububat Tarımının Sorunları Ve Çözüm Yolları Sempozyumu, Konya, Turkey, 8-11 Haziran 1999. (pp. 365-374). Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Bahri Dağdaş International Winter Cereals Research Center.
101. Karaömerlioğlu, B. (2011) *Medicago sativa* L. and *Vicia sativa* L. Bitkileri Kullanılarak Toprakta Bor Gideriminin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye.
102. Kartal, G., Güven, A., Kahvecioğlu, Ö., Timur, S. (2004) Metallerin Çevresel Etkileri-II, İTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü Ders Notu, 137, İstanbul.
103. Kastori, R., Plesnicar, M., Sakac, Z., Pankovic, D. ve Arsenijevic-Maksimovic, I. (1998) Effect of excess lead on sunflower growth and photosynthesis. *Journal of Plant Nutrition*, 21 (1); 75-85.
104. Kaya, C., Higgs, D., İkinci, A. (2002) An experiment to investigate ameliorative effects of potassium sulphate on salt and alkalinity stressed

vegetable crops. Journal of Plant Nutrition, 25 (11); 2545-2558.

105. Kıbağ, F. ve Munzuroğlu, Ö. (2003) Fasulye Fidelerinin (*Phaseolus vulgaris* L.) Kök, Gövde ve Yaprak Büyümesi Üzerinde Kadmiyum (Cd ++) ve Civanın (Hg++) Etkileri. C. Ü. Fen Edebiyat Fakültesi, Fen Bilimleri Dergisi, 24; 64,75.
106. Kınalıoğlu, K., Çavuşoğlu, K., Yapar, K., Yalçın, E., Türkmen, Z. ve Duyar, Ö. (2008) The Investigation of Lead (Pb) Pollution in *Usnea longissima* Ach. Blacksea International Environmental Symposium, 194, Giresun–Turkey.
107. Kitman, J. L. (2000) *The secret history of lead*. The Nation-New York, 270 (11); 11-11.
108. Köhler, C., Gahm, A., Noma, T., Nakazawa, A., Orrenius, S. ve Zhivotovsky, B. (1999) Release of adenylate kinase 2 from the mitochondrial intermembrane space during apoptosis. FEBS letters, 447 (1); 10-12.
109. Kramer, P. J. (1998). Genetic Toxicology. Journal of pharmacy and pharmacology, 50(4), 395-405.
110. Kumar, A., Prasad, M. N. V. ve Sytar, O. (2012) Lead toxicity, defense strategies and associated indicative biomarkers in *Talinum triangulare* grown hydroponically. Chemosphere, 89 (9); 1056-1065.
111. Küçükyumuk, Z. (2011) Farklı çinko uygulamalarının değişik anaçlara aşılı elma çeşitlerinde çinko ve diğer besin elementi içerikleri ile verim üzerine etkileri. (Doctoral dissertation, SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü).
112. Lal, N. (2010) Molecular mechanisms and genetic basis of heavy metal toxicity and tolerance in plants. In: Plant Adaptation and Phytoremediation, Springer Netherlands, (pp. 35-58).
113. Lamhamdi, M., Bakrim, A., Aarab, A., Lafont, R., Sayah, F. (2011) Lead phytotoxicity on wheat (*Triticum aestivum* L.) seed germination and seedlings

- growth. *Comptes Rendus Biologies*. 334; 118–126.
114. Larcher, W. (2003) *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer.
 115. Lei, B., Huang, Y., Xie, J. J., Liu, Z. X., Zhen, A., Fan, M. L. ve Bie, Z. L. (2014) Increased cucumber salt tolerance by grafting on pumpkin rootstock and after application of calcium. *Biologia Plantarum*, 58 (1); 179-184.
 116. Levitt, J. (1980) *Responses of plants to Environmental Stresses. Water, Radiation, Salt and Other Stresses. Vol. II 2nd Ed.*, 607 pp. Academic Pres, Inc.
 117. Lichtenthaler, H. K. (1996) Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *Journal of plant physiology*, 148 (1); 4-14.
 118. Lichtenthaler, H. K. (1998). *The stress concept in plants: an introduction*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851(1); 187-198.
 119. Liu, W., Li, P. J., Qi, X. M., Zhou, Q. X., Zheng, L., Sun, T. H. ve Yang, Y. S. (2005) DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. *Chemosphere*, 61 (2); 158-167.
 120. Liu, W., Yang, Y. S., Li, P. J., Zhou, Q. X., Xie, L. A. ve Han, Y. P. (2009) Risk assessment of cadmium-contaminated soil on plant DNA damage using RAPD and physiological indices. *Journal of hazardous materials*, 161 (2); 878-883.
 121. Liu, W., Yang, Y. S., Zhou, Q., Xie, L., Li, P. A. ve Sun, T. (2007) Impact assessment of cadmium contamination on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings at molecular and population levels using multiple biomarkers. *Chemosphere*, 67 (6); 1155-1163.
 122. Long, X. X., Yang, X. E. ve Ni, W. Z. (2002) Current status and perspective on phytoremediation of heavy metal polluted soils. *J Appl Ecol.*, 13; 757-62.

123. Macfarlane, G. R. ve Burchett, M. D. (2001) Photosynthetic Pigments and Peroxidase Activity as Indicators of Heavy Metal Stress in the Grey Mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. Marine Pollution Bulletin, 42; 233-240.
124. Majer, J. B. J., Tscherko, D. ve Paschke, A. (2002) Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and microbial enzyme activities: a comparative investigation. Mutation Research, 515; 111-124.
125. Malkowski, E., Kita, A., Galas, W., Karcz, W. ve Kuperberg, J. M. (2002) Lead distribution in corn seedlings (*Zea mays* L.) and its effect on growth and the concentrations of potassium and calcium. Plant Growth Regulation, 37 (1); 69-76.
126. Manimaran, K. ve Prabu, V. A. (2013) Effect Of Cadmium On Growth, Chlorophyll *a* and Biomass Production of *Tetraselmis* sp. International Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 2 (4); 26-30.
127. Mark, K. F. ve Hendershot H. (1997) Trace Metals in Montreal Urban Soils and the Leaves of *Taraxacum officinale*. Can. J. Soil. Sci., 79; 385-387.
128. Marschner, H. (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, London.
129. Marschner, H. (2008) *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Digital Print. Academic Press, 889.
130. Matschi, S., Werner, S., Schulze, W. X., Legen, J., Hilger, H. H. ve Romeis, T. (2013) Function of calcium-dependent protein kinase CPK28 of *Arabidopsis thaliana* in plant stem elongation and vascular development. The Plant Journal 73 (6); 883–896.
131. Mengel, K., Kosegarten, H., Kirkby, E. A., ve Appel, T. (Eds.). (2001). Principles of plant nutrition. Springer Science and Business Media.

132. Mengel, K., ve Arneke, W. W. (1982). Effect of potassium on the water potential, the pressure potential, the osmotic potential and cell elongation in leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia plantarum*, 54(4), 402-408.
133. Mercier, L. ve PinnaVala, T. J. (1997) Access in Mesoporous Materials: Advantages of a Uniform Pore Structure in the Design of a Heavy Metal Ion Adsorbent for Environmental Remediation. *Advanced Materials*, 9 (6); 500-503.
134. Milner, M. J., Pineros, M. ve Kochian, L. V. (2014) *Molecular and physiological mechanisms of plant tolerance to toxic metals*. In: *Plant Abiotic Stress*, 2nd Ed., 179-201.
135. Minder, B., Das-Smaal, E. A., Brand, E. F. ve Orlebeke, J. F. (1994) Exposure to lead and specific attentional problems in schoolchildren. *Journal of Learning Disabilities*, 27 (6); 393-399.
136. Mokhele, B., Zhan, X., Yang, G. ve Zhang, X. (2012) Review: Nitrogen assimilation in crop plants and its affecting factors. *Canadian Journal of Plant Science*, 92 (3); 399-405.
137. Monari, A., Very, T., Rivail, J. L. ve Assfeld, X. (2012) A QM/MM study on the spinach plastocyanin: redox properties and absorption spectra. *Computational and Theoretical Chemistry*, 990; 119-125.
138. Mou, D., Yao, Y., Yang, Y., Zhang, Y., Tian, C. ve Achal, V. (2011) Plant high tolerance to excess manganese related with root growth, manganese distribution and antioxidative enzyme activity in three grape cultivars. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74 (4); 776–786.
139. Mukherji, S. ve Maitra, P. (1976) Toxic effects of lead on growth and metabolism of germinating rice (*Oryza sativa* L.) seeds and on mitosis of onion (*Allium cepa*) root tip cells. *Indian Journal of Experimental Biology*, 14; 519–521.

140. Mullis, K. B. (1987) PCR. U.S. patent 4 683 195, July.
141. Mullis, K. B., Erlich, H. A., Arnheim, N., Horn, G. T., Saiki, R. K. ve Scharf, S. J. (1987) *U.S. Patent No. 4,683,195*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
142. Munzuroglu, O. ve Geckil, H. (2002) Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 43 (2); 203-213.
143. Murashige, T. ve Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15 (3); 473-497.
144. Müller, H. A., Hansson, M. (2009) The barley magnesium chelatase 150-kD subunit is not an abscisic acid receptor1[OA]. *Plant Physiology*, 150; 157–166.
145. Nagajyoti, P. C., Lee, K. D. and Sreekanth, T. V. M. (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8 (3); 199-216.
146. Najafpour, M. M. (2009) A Possible Evolutionary Origin for the Mn₄ Cluster in Photosystem II: From Manganese Superoxide Dismutase to Oxygen Evolving Complex. *Origins of Life and Evolution of Biospheres*, 39 (2);151-163.
147. Navarro, M. J., Martinez, V. ve Carvajal, M. (2000) Amonium, bicarbonate and calcium effects on tomato plants grown under saline conditions. *Plant Science*, 157; 89-96.
148. Newell-McGloughlin, M., ve Re, E. (2006). Early History: Cultivation and Civilization. In *The Evolution of Biotechnology* (pp. 1-20). Springer Netherlands.
149. Oelke, E. A., Oplinger, E. S., Bahri, H., Durgan, B. R., Putnam, D. H., Doll, J.

- D. ve Kelling, K. A. (1990) *Rye*. In: Alternative field crops manual [Online]. www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/ (verified May 2012). Univ. of Wisconsin-Extension and Univ. of Minnesota.
150. Osma, E., Ozyigit, I. I., Leblebici, Z., Demir, G. ve Serin, M. (2012) Determination of heavy metal concentrations in tomato (*Lycopersicon esculentum* Miller) grown in different station types. Romanian Biotechnological Letters, 17 (1); 6962-6974.
151. Ouzounidou, G., Ciamporova, M., Moustakas, M. ve Karataglis, S. (1995) Responses of maize (*Zea mays* L.) plants to copper stress—I. Growth, mineral content and ultrastructure of roots. Environmental and Experimental Botany, 35 (2); 167-176.
152. Öktüren, F. ve Sönmez, S. (2005) Bitki besin maddeleri ile bazı büyüme düzenleyicileri (hormonları) arasındaki ilişkiler. Derim, 22 (2); 20-32.
153. Ölgen, M. K. ve Gür, F. (2012) Yatağan termik santrali çevresinden toplanan likenlerde (*Xanthoria parietina*) saptanan ağır metal kirliliğinin coğrafi dağılışı. Türk Coğrafya Dergisi, 57; 43-54.
154. Önmez, O. ve Açın, A. (1994) Konya–Karapınar Kırak Şartlarında FarklıSıra Aralıkları ile Azot ve Fosfor Dozlarının İki Çavdar Çeşidinin (*Secale cereale* L.) Dane Verimi, Kalite Özellikleri, Hasat İndeksi, Verim Unsurları ve Bazı Morfolojik Özellikleri Üzerine Etkileri Konusunda Bir Araştırma. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
155. Palmer, C. M. ve Gueriot, M. L. (2009) Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. Nature Chemical Biology, 5; 333–340.
156. Pan, J. ve Yu, L. (2011) Effects of Cd or/and Pb on soil enzyme activities and microbial community structure. Ecological Engineering, 37 (11); 1889-1894.
157. Panjtandoust, M., Sorooshzadeh, A. ve Ghanati, F. (2013) Influence of Iron

Application Methods on Seasonal Variations in Antioxidant Activity of Peanut. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 44 (14); 2118-2126.

158. Parys, E., Romanowska, E., Siedlecka, M., Poskuta, J. W. (1998) The effect of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and in mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*. Acta Physiol. Plant. 20; 313–322.
159. Penny, M. G., ve Bowling, D. J. F. (1974). A study of potassium gradients in the epidermis of intact leaves of *Commelina communis* L. in relation to stomatal opening. Planta, 119(1), 17-25.
160. Pohl, C., Croot, P. L., Hennings, U., Daberkow, T., Budeus, G., Loeff, M. R. (2011) Synoptic transects on the distribution of trace elements (Hg, Pb, Cd, Cu, Ni, Zn, Co, Mn, Fe, and Al) in surface waters of the Northern and Southern East Atlantic. Journal of Marine Systems, 84; 28-41.
161. Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P. ve Pinelli, E. (2011) *Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants*. In: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 213; 113-136. Springer, New York.
162. Prasad, M. N. V., Malec, P., Waloszek, A., Bojko, M. ve Strzalka, K. (2001) Physiological Responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to Cadmium and Copper Bioaccumulation. Plant Science, 161; 881–889.
163. Qurainy, F., Alameri A. A. ve Khan S. (2010) RAPD profile for the assessment of genotoxicity on a medicinal plant; *Eruca sativa*, Journal of Medicinal Plants Research, 47; 579–586.
164. Qureshi, M. I., Qadir, S., ve Zolla, L. (2007). Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. Journal of plant physiology, 164(10), 1239-1260.
165. Rao, M. M., Kumar M. ve Galib, A. (2011) Detection of toxic heavy metals and pesticide residue in herbal plants which are commonly used in the herbal formulations. Environ. Monit. Assess., 181; 267–271. DOI 10.1007/s10661-

010-1828-2.

166. Raven, J. A. (1980). Short-and long-distance transport of boric acid in plants. *New phytologist*, 84(2), 231-249.
167. Reddy, A. M., Kumar, S. G., Jyothsnakumari, G., Thimmanaik, S., Sudhakar, C. (2005) Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and bengal gram (*Cicer arietinum* L.). *Chemosphere*, 60; 97–104.
168. Römheld, V. ve Marschner, H. (1986). Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. *Advances in plant Nutrition*, 2:155-153.
169. Saint-Laurent, D., Gervais-Beaulac, V., Baril, F., Matteau, C. ve Berthelot, J.-S. (2013) Spatial variability of heavy metal contamination in alluvial soils in relation to flood risk zones in outhern Quebec, Canada. *Air, Soil and Water Research*, 6; 1-13.
170. Salt, D. E., Blaylock, M., Kumar, N. P., Dushenkov, V., Ensley, B. D., Chet, I., ve Raskin, I. (1995). Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Bio/Technolgy*, (13), 468-74.
171. Sangani, R. G., Soukup, J. M., Ghio, A. J. (2010) Metals in air pollution particles decrease whole-blood coagulation time. *Inhal. Toxicol.*, 22 (8); 621-626.
172. Sawidis, T. , Metentzoglou, E. , Mitrakas, M. ve Vasara, E. (2011) A Study of Chromium, Cooper, and Lead Distribution from Lignite Fuels Using Cultivated and Non-cultivated Plants as Biological Monitors. *Water, Air and Soil Pollution*, 220 (1-4); 339-352.
173. Sayadi, M. H. ve Sayyed, M. R. G. (2011) Variations in the heavy metal accumulations within the surface soils from the Chitgar industrial area of Tehran. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 1 (1); 36-46.

174. Saygıdeğer, S. (1995) *Lycopersicum esculentum* L. Bitkisinin çimlenmesi ve gelişimi üzerine kurşunun etkileri. 2. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi. Ankara. 588-597.
175. Schenkeveld, W. D. C., Dijcker, R., Reichwein, A. M., Temminghoff, E. J. M. ve Riemsdijk, W. H. (2007) The effectiveness of soil-applied FeEDDHA treatments in preventing iron chlorosis in soybean as a function of the o,o - FeEDDHA content. Plant Soil, 303; 161-176.
176. Schubert, S., ve Läuchli, A. (1990). Sodium exclusion mechanisms at the root surface of two maize cultivars. In Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition(pp. 183-187). Springer Netherlands.
177. Sencer, H. A. ve Hawkes, J. G. (1980) On the origin of cultivated rye. Biological Journal of the Linnean Society, 13(4); 299-313.
178. Sengar, R. K., Gautam, M., Sengar, R. K., Grag, S. K., Sengar, K. ve Chaudhary, R. (2008) Lead stress effects on physiobiochemical activities of higher plants. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 196; 73-93.
179. Seregin, I. V. ve Ivanov, V. B. (2001) Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. Russian Journal of Plant Physiology, 48 (4); 523-544.
180. Seregin, I. V., Shpigun, L. K. ve Ivanov, V. B. (2004) Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize roots. Russian Journal of Plant Physiology, 51 (4); 525-533.
181. Servant, J. (1982) Airbone lead in the enviromental in France. 595-619.
182. Shakya, K., Chettri, M. K., Sawidis, T. (2008) Impact of heavy metals (copper, zinc and lead) on the chlorophyll content of some mosses. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 54; 412-421
183. Shams, M., Etemadi, N., Baninasab, B., Ramin, A. A. ve Khoshgoftarmanesh,

- A. H. (2012) Effect of Boron ve Calcium on Growth and Quality of 'Easy Lover'cut Rose. *Journal of Plant Nutrition*, 35 (9); 1303-1313.
184. Sharma, P. ve Dubey, R. S. (2005) Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17 (1); 35-52.
 185. Shelp, B. J. (1993) *Physiology and biochemistry of boron in plants. Boron and Its Role in Production*. Gupta U. C. (ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida. pp, 53-58.
 186. Siatka,T., Kasparova, M. ve Spilkova, J. (2012) Effects of zinc and cadmium ions on cell growth and production of coumarins in cell suspension cultures of *Angelica archangelica* L. *Ces. slov. Farm.* 61; 261-266.
 187. Solomon, E. I., Szilagyi, R. K., DeBeer George, S. ve Basumallick, L. (2004) Electronic structures of metal sites in proteins and models: contributions to function in blue copper proteins. *Chemical reviews*, 104(2); 419-458.
 188. Steffan, R. J. ve Atlas, R. M. (1991) Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. *Annual Reviews in Microbiology*, 45(1); 137-161.
 189. Sujetoviene, G. ve Sliumpaite, I. (2013) Response of *Evernia prunastri* transplanted to an urban area in central Lithuania. *Atmospheric Pollution Research* 4; 222–228.
 190. Swaileh, K. M., Barakat, S. O. ve Hussein, R. M. (2013) RAPD Assessment of In Vivo Induced Genotoxicity of Raw and Treated Wastewater to Albino Rat. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 90(5); 621-625.
 191. Tester, M. ve Leğgh, R. A. (2001) Partitioning of Nutrient Transport Processes in Roots. *Journal Experimment of Botanical*, 52; 445-457.
 192. Tisdale, S. L., Nelson, W. L., ve Beaton, J. D. (1985). *Soil fertility and fertilizers*. Collier Macmillan Publishers.

193. Tiwari, U., Agnihotri, R. K., Shrotriya, S. ve Sharma, R. (2013) Effect of Lead Nitrate Induced Heavy Metal Toxicity on Some Biochemical Constituents of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Research Journal of Agricultural Sciences 4(2); 283-285.
194. Topçu, İ. B. ve Bilir, T. (2009) Experimental investigation of some fresh and hardened properties of rubberized self-compacting concrete. Materials and Design, 30(8); 3056-3065.
195. Toth, T., Andreji, J., Toth, J., Slavik, M., Arvay, J. ve Stanovic, R. (2012) Cadmium, lead and mercury contents in fishes – case study, Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences, 1 (February Special issue) 837-847.
196. Tucker, M. R. (1999) Essential plant nutrients: Their presence in North Carolina soils and role in plant nutrition. North Carolina Department of Agriculture and Consumer Services, Miscellaneous Publication, 2- 9.
197. Tung, G. ve Temple, P. J. (1996) Uptake and localization of lead in corn (*Zea mays* L.) seedlings, a study by histochemical and electron microscopy. Science of the total environment, 188(2); 71-85.
198. Türkiye İstatistik Kurumu (2011) Tahıllar ve diğer bitkisel ürünlerin üretim miktarları raporu.
199. Türkiye İstatistik Kurumu (2012) Tahıllar ve diğer bitkisel ürünlerin üretim miktarları raporu.
200. Uçgun, K. ve Gezgin, S. (2008) Makro Bitki Besin Elementlerinin Hastalıklarla ilişkisi. 4. Ulusal Bitki Besleme ve Gübreleme Kongresi Bildiriler Kitabı, Konya, 696-705.
201. Vamerali, T., Bandiera, M. ve Mosca, G. (2010) Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. Environmental Chemistry Letters, 8(1), 1-17.

202. Vanneste, S. ve Friml, J. (2013) Calcium: The Missing Link in Auxin Action. *Plants*, 2(4); 650-675.
203. Verma, S. ve Dubey, R. S. (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci.* 164; 645-655.
204. Von Marschner, H. ve Richter, C. (1974) Calcium-transport in Wurzeln von Mais-und Bohnenkeimpflanzen. *Plant and soil*, 40(1); 193-210.
205. Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B. ve Beyersmann, D. (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 192(2); 95-117.
206. Walker, E. L. ve Connolly, E. L. (2008) Time to pump iron: Iron deficiency signaling mechanisms of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 11; 530–535.
207. Wang, K. ve Li, J. F. (2007) Analysis of crystallographic evolution in (Na, K) NbO₃-based lead-free piezoceramics by X-ray diffraction. *Applied Physics Letters*, 91(26); 262902 (3 pages).
208. Wang, W., Vinocur, B., ve Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), 1-14.
209. Wang, Y. ve Wu, W. H. (2013) Potassium transport and signaling in higher plants. *Annual review of plant biology*, 64; 451-476.
210. Warington, K. (1923) The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants. *Ann. Bot.* 37(1); 629-672.
211. Weast, R. C., Astle, M. J. ve Beyer, W. H. (1984) CRC handbook of chemistry and physics.
212. Welsh, J. ve McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18; 7213–7218.

213. White, P. J. ve Broadley, M. R. (2003) Calcium in plants. *Annals of Botany*, 92 (4); 487-511.
214. Wierzbicka, M. (1998) Lead in the apoplast of *Allium cepa* L. Root tips: ultrastructural studies. *Plant Sci.*, (133); 105–119.
215. Williams, J. G., Hanafey, M. K., Rafalski, J. A., ve Tingey, S. V. (1993). [51] Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in enzymology*, 218, 704-740.
216. Williams, J., Kubelik, A. R. ve Livak, K. J. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18; 6531–6535.
217. Wiseman, C. L. S., Zereini, F. ve Püttmann, W. (2013) Traffic-related trace element fate and uptake by plants cultivated in roadside soils in Toronto, Canada, *Science of The Total Environment* (442); 86–95.
218. Wojas, S., Ruszczynska A., Bulska E., Wojciechowski, M. ve Antosiewicz, D. M. (2007) Ca²⁺-dependent plant response to Pb²⁺ is regulated by LCT1. *Environ Pollut.*, 147 (3): 584–592
219. Wu, G., Kang, H., Zhang, X., Shao, H., Chu, L. ve Ruan, C. (2010) A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities. *Journal of Hazardous Materials*, 174 (1); 1-8.
220. Xia, X., Zhao, Y. ve Zhang P. (2010) Heavy metal concentrations in roadside soils and correlation with urban traffic in Beijing, China, *Journal of Hazardous Materials*, 18; 640–646.
221. Xiong, Z. T. (1998). Lead uptake and effects on seed germination and plant growth in a Pb hyperaccumulator *Brassica pekinensis* Rupr. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 60(2), 285-291.

222. Yang, X., Feng, Y., He, Z. ve Stoffella, P. J. (2005) Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18(4), 339-353.
223. Yeşilyurt, C. ve Akcan, N. (2000) *Air Quality Monitoring Methods and Sampling Criteria*. Refik Saydam National Public Health Agency, Ankara.
224. Yıldız, A., Genç, Ö. (1993) *Enstrümental Analiz*. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, A-64.
225. Yılmaz, C. (2004) *Bitkisel Üretimde Besin Elementleri*. Hasad Yayıncılık, Kayseri, 16-17.
226. Yılmaz, R., S. Sakcalı, C. Yarı, A. Aksoy ve M. Ozturk (2006) Use of *Aesculus hippocastanum* L. as a biomonitor of heavy metal pollution. *Pak. J. Bot.*, 38(5): 1519-1527.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sezen İĞDELİOĞLU

Doğum Yeri ve Tarihi : Üsküdar 11.07.1988

Yabancı Dili : İngilizce

E-Posta : sezenigdelioglu@gmail.com

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise	Fen-Matematik	Suadiye H.M.T. Anadolu Lisesi	2006
Ön Lisans	Sağlık Yüksekokulu Laborant ve Veteriner Sağlık	Anadolu Üniversitesi (AÖF)	2010
Lisans	Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği	Marmara Üniversitesi	2011

AKADEMİK ÇALIŞMALAR

S. İğdelioğlu, İ. Doğan, İ. İ. Özyiğit, E. Filiz, S. Karadeniz, Z. Uzunova, Ş. Kulaç, G. Demir, Evaluation of Molecular, Physiological and Nutritional Alterations Caused By Lead In Rye (*Secale cereale* L.), 5th International Symposium on Sustainable Development, ISSD 2014, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina on May 15-18, **2014** (Oral Presentation).

Z. Uzunova, İ. İ. Özyiğit, E. Filiz, İ. Doğan, S. Karadeniz, **S. İğdelioğlu**, G. Demir, İ. E. Yalçın, Monitoring Genotoxic, Physiological and Nutritional Damages in Oat (*Avena sativa* L.) Induced by Lead, 5th International Symposium on Sustainable Development, ISSD 2014, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina on May 15-18, **2014** (Oral Presentation).

İ. İ. Özyiğit, İ. Doğan, **S. İğdelioğlu**, E. Artam-Tarhan, G. Demir, İ. E. Yalçın, Growth and Nutrient Uptake in Boron Induced Sunflower, International Conference of Young Scientist, “Advances in Botany and Ecology”, Shcholkine, Leninsky District of Crimea, Kazantip Nature Reserve, June 18-22, **2013** (Oral Presentation).

İ. İ. Özyiğit, İ. Doğan, Z. Severoğlu, M. Keskin, S. Karadeniz, G. Demir, **S. İğdelioğlu**, İ. E. Yalçın, Mineral Nutrient Uptake Statuses of Selected Weed and Maize (*Zea mays* L.) Samples in A Newly Planted Cornfield, 4. International Weed Science Congress, Agricultural University Peshawar, Pakistan, September 06-08, **2012** (Oral Presentation).

İ. İ. Özyiğit, A. Öztürk, E. Artam-Tarhan, **S. İğdelioğlu**, G. Demir, The effects of Ni on *Helianthus annuus* L. tissue cultures in different developmental phases, 12. National and 3. International Conference of Botany Quaid-i-Azam University, Islamabad, Pakistan, September 1-3, **2012** (Oral Presentation).

İ. Doğan, İ. İ. Özyiğit, A. Öztürk, S. Sakçalı, G. Kekeç, G. Demir, F. Vardar, E. Artam-Tarhan, **S. İğdelioğlu**, Physiological and Genotoxic Alterations Induced by Boron in *Helianthus annuus* L. (Sunflower), 12. National and 3. International Conference of Botany Quaid-i-Azam University, Islamabad, Pakistan, September 1-3, **2012** (Oral Presentation).

N. Bakır, **S. İğdelioğlu**, E. E. Akkan, İznik Gölü (Bursa) Tatlı Su Istakozu (*Astacus leptadactylus* Eschscholtz, 1823)’nın Büyüme ve Morfometrik Özelliklerinin İncelenmesi, 16. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, Niğde Üniversitesi, Temmuz 1-4, **2009** (Poster).