



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ARPA (*HORDEUM VULGARE* L.) BİTKİSİNDE BAKIRIN
IN VITRO KOŞULLARDA KÖK GELİŞİMİ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

BARIŞ EREN

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

Danışman

Prof.Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ARPA (*HORDEUM VULGARE* L.) BİTKİSİNDE BAKIRIN
IN VITRO KOŞULLARDA KÖK GELİŞİMİ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

BARIŞ EREN

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

Danışman

Prof.Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

İSTANBUL

Bu çalışma/...../ 2003 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Anabilim Dalı programında Doktora / Yüksek Lisans Tezi olarak
kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Danışman Adı (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Jüri Adı
Üniversite
Fakülte

Jüri Adı
Üniversite
Fakülte

Jüri Adı
Üniversite
Fakülte

Jüri Adı
Üniversite
Fakülte

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin
T-573/170305 numaralı projesi ile desteklenmiřtir.

ÖNSÖZ

Tahıllar temel besin kaynağıdır. Değişen çevre koşullarına karşı geliştirilecek toleranslı ırklar üretimin dengede olmasını sağlayacaktır. Arpa Türkiye’de en çok üretilen tahıllar arasında ikinci sırada yer almaktadır. Sanayileşmenin getirdiği olumsuz etkilerin en önemlilerinden biri topraklarımızın ağır metallerle kirlenmesidir. Bu tez çalışmada bakırın arpa bitkisinde doku kültürü koşullarında gelişim üzerine etkilerini anlamaya yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca değerli bilgi ve deneyimleri ile destek olan İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi Sayın **Prof.Dr.Nermin GÖZÜKIRMIZI**ya çok teşekkür ederim.

Şubat, 2007

Barış EREN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	v
SEMBOL LİSTESİ	vi
ÖZET	vii
SUMMARY	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1. ABİYOTİK STRES	4
2.2. AĞIR METALLER	5
3. MALZEME VE YÖNTEM	9
3.1. BİTKİ MATERYALİ.....	9
3.2. <i>HORDEUM VULGARE</i> L. EMBRİYOLARININ DOKU KÜLTÜRÜNDE ÇİMLENDİRİLMESİ	11
4. BULGULAR	12
4.1 <i>HORDEUM VULGARE</i> L.'NİN DOKU KÜLTÜRÜNDE ÇİMLENDİRİLMESİ.....	12
4.2. CuSO_4 İÇEREN ORTAMDA EMBRİYO ÇİMLENMESİ VE GELİŞMESİ.....	12
4.3. <i>HORDEUM VULGARE</i> L. KÖK VE GÖVDELERİNDE BAKIR BİRİKİMİ ANALİZİ.....	15

5. TARTIŞMA VE SONUÇ	16
KAYNAKLAR	18
ÖZGEÇMİŞ	21

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 4.1** : Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda CuSO_4 içeren MS besiyerlerinde çimlenen arpa embriyolarının günlere göre kök uzunlukları..... 13
- Şekil 4.2** : Kontrol (C), 1000 μM (A) ve 10 (B) μM CuSO_4 içeren MS besiyerlerinde çimlenen arpa embriyolarının 17.günde Magenda kültür kaplarındaki morfolojik görünüşleri.....13
- Şekil 4.3** : Kontrol (C), 1000 μM (A) ve 10 (B) μM CuSO_4 içeren MS besiyerlerinde çimlenen arpa embriyolarının 17.gündeki morfolojik görünüşleri.....14
- Şekil 4.4** : Kök ve gövdede bakır birikim değerleri. 15

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1	: 2005 yılı verilerine göre dünyada ilk on arpa üreticisi ülke(milyon ton).....	1
Tablo 2.1	: Bitkilerde bakırın dağılımı ve görevi	7
Tablo 3.1	: Doku kültürü çalışmalarında kullanılan MS besiyerinin içeriği(konsantrasyonlar mg/l olarak verilmiştir).....	10
Tablo 4.1.	: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda CuSO_4 içeren MS besiyerlerinde çimlenen arpa embriyolarının günlere göre kök uzunlukları.....	12

SEMBOL LİSTESİ

Cu	: Bakır
Zn	: Çinko
Pb	: Kurşun
Cd	: Kadmiyum
Na	: Sodyum
Al	: Alüminyum
B	: Bor
As	: Arsenik
Mn	: Mangan
Ni	: Nikel
Cr	: Krom
SOD	: Super Oksit Dismutaz
PSI	: Foto Sistem 1
CuSO₄	: Bakır Sülfat

ÖZET

ARPA (*HORDEUM VULGARE* L.) BİTKİSİNDE BAKIRIN IN VITRO KOŞULLARDA KÖK GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Bu çalışmada *Hordeum vulgare* L. cv. Zafer-160'ın *in vitro* koşullar altında bakır stresine karşı verdiği yanıtlar araştırıldı ve bakır birikimi analizi yapıldı. *Hordeum vulgare* L. ye ait olgun tohum embriyoları farklı bakır sülfat(CuSO_4) konsantrasyonları (10-10000 μM) içeren Murashige ve Skoog (MS) besiyerine ekildiler. Tüm kültürler 25 °C 'de 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık periyodundaki bitki büyütme kabinlerinde tutuldular. Bitkilerin besiyerine alınmalarından sonraki 3, 6, 10, 13, ve 17. günlerde kök ve gövde uzunlukları ölçüldü. Kök uzunluklarının yüksek bakır konsantrasyonunda azaldığı gözlemlendi.

Bakır birikimi analizi için atomik absorpsiyon spektrofotometresi'nde kontrol ve üç farklı konsantrasyonda CuSO_4 uygulanmış ortamda yetişen bitkiler kullanıldı. 1000 μM CuSO_4 içeren besiyerindeki bitkilerde en fazla bakır birikimi olduğu tespit edildi. 10.000 μM CuSO_4 içeren besiyerindeki bitkilerde ise gelişim gözlenmedi. Köklerdeki bakır birikiminin gövdeden daha fazla olduğu saptandı. Bu araştırma *Hordeum vulgare* L. cv. Zafer-160 arpasında doku kültürü koşullarında bakır stresinin köklerin gelişimi üzerine ve bakır birikimi üzerine etkilerini gösteren bir ön çalışmadır.

SUMMARY

EFFECTS OF COPPER STRESS ON ROOT DEVELOPMENT OF BARLEY (*HORDEUM VULGARE* L.) UNDER *IN VITRO* CONDITIONS

In this study response to copper stress on *Hordeum vulgare* L. cv. Zafer-160 was investigated under *in vitro* conditions and analysis of copper accumulation were performed. Mature embryos of *Hordeum vulgare* L. were cultured on Murashige and Skoog (MS) media supplemented with different concentrations of copper (CuSO_4) (10-10 000 μM). All the cultures were kept under 25 °C 16 hours light , 8 hours dark period in a controlled growth chamber. Root and stem lengths were measured at 3, 6, 10, 13, and 17 days after cultivation of explants. Root lengths were decreased with increasing concentrations of copper.

Copper accumulation analyses were performed by using atomic absorption spectrophotometry on control and copper treated plants with three different concentrations. The highest copper accumulation was determined in plants grown on MS medium containing 1000 μM CuSO_4 . Plants cultured on 10.000 μM CuSO_4 containing MS medium did not show development. Copper accumulation was higher in roots when compared to shoots. This study is a preliminary work for copper stress on root development and copper accumulation *in vitro* grown *Hordeum vulgare* L. cv. Zafer-160.

1.GİRİŞ

Arpa (*Hordeum vulgare* L.), Poaceae (buğdaygiller) familyasından buğdayla beraber dünyanın en eski kültür bitkisidir. Günümüzde tarımı yapılan arpa Orta Doğuda yetişen yabani türünden (*H. spontaneum* L.), köken almıştır. Arpanın kromozom sayısı $2n=14$ 'tür. Arpa tek yıllık bir uzun gün bitkisidir. Bitki boyu ortalama 35-100 cm kadardır.

Arpa (*Hordeum vulgare* L.) dünyada tahıllar arasında üretim bakımından dördüncü sırada, Türkiye'de ise buğdaydan sonra ikinci sırada yer almaktadır. Türkiye'de; arpa ekim alanı 3.5 milyon ha, üretim 7 milyon ton, ortalama verim ise 200 kg/da' dır. 2005 yılı verilerine göre dünyada ilk on sıradaki arpa üreticisi olan ülkeler Tablo-1.1 de verilmiştir (<http://en.wikipedia.org/wiki/Barley>) .

Tablo1.1 2005 yılı verilerine göre dünyada ilk on arpa üreticisi ülke (milyon ton).

Rusya	16.7
Kanada	12.1
Almanya	11.7
Fransa	10.4
Ukranya	9.3
Türkiye	9.0
Avusturalya	6.6
İngiltere	5.5
Amerika	4.6
İspanya	4.4
Dünya toplamı	138

Arpa yüksek oranda karbonhidratın yanı sıra protein, kalsiyum, fosfor ve az miktarda B vitamini içerir. Bileşimindeki gluten (esnek bir protein) yüzdesi düşük olduğu için, arpa unu gözenekli ve yumuşak ekmek yapımında kullanılmaya uygun değildir. Dünya arpa üretiminin büyük kısmı hayvan yemi geri kalanı insanlar için besin ve malt yapımında kullanılır. Bira maltı çimlendirilmiş arpadan yapılır ve çimlendirilmiş arpa ayrıca damıtık içkilerin üretiminde de kullanılır.

Doğada genellikle bakır miktarı düşüktür fakat madenlerin çıkartıldığı, işlendiği, eritildiği alanlarda bu miktar artmaktadır. Toprakta bulunan büyük miktardaki bakır formu organik maddeler ile ve toprak kolloidleriyle yapmış olduğu güçlü bağlardan dolayı bitkinin alabilmesi için uygun bir form değildir. Bitkinin bakıra toleransı bakırı köklerinde tutması, ret veya boşaltması şeklinde, hücre duvarında immobilizasyon şeklinde, organellerde biriktirme şeklinde ve hücre içi metal bağlayıcı kelatörlerin(metallotionin ve fitokelatin) bağlanması şeklinde olmaktadır. [Wojcik ve Tukiendorf., 2003]. Bakır çözünürlüğü, düşük pH'ta artar ve bakır toksisitesi toprak pH'ının 5'e ulaşması ile gözükür. Bakır bitki için gerekli bir mikroelementtir, oksidatif reaksiyonları katalizleyen çeşitli metabolik yollarda rol oynar. Fazla miktarda absorblanan bakır ise bitki büyümesine ket vurur. Bu büyüme gerilemesi; kök uzamasının gerilemesi, kök epidermal hücrelerinin ve kök hücre membranlarının tahrib edilmesi şeklinde olur. Bakır ayrıca fotosentezde önemli rol oynayan ribulose-1,5-bis fosfat karboksilaz ve fosfoenol piruvat karboksilaz gibi enzimleri de inhibe eder [Jiang veLiu, 2001].

Bitki toleransı bakırca zengin doğaya karşı bir veya birden fazla mekanizmayla gerçekleşmektedir. Topraktaki bakırın çeşitli seviyelerde olması geniş ölçüde bakırın pestisit olarak kullanılmasından da kaynaklanır. Metal toleransı çok sayıda mekanizma ile açıklanmaya çalışılmaktadır. Bu mekanizmalar arasında; metallerin hücre duvarına bağlanması, vakuoldeki aktif transport iyonlarıyla taşınma ve organik asitlerle veya peptidlerle kompleksler oluşturma gibi farklı yollar vardır.

Bitkilerde metal detoksifikasyonu ile ilgili önemli mekanizmalardan biri düşük molekül ağırlıklı proteinlerden metallotionin ve peptid ligand familyasından fitokelatinle metallerin bağlanmasıdır. Bitkilerde de hayvan hücrelerinde ki gibi dizi benzerliğine sahip metallotionin sentezleyen birden fazla gen olduğu bulunmuştur. Fitokelatin ise birçok metale yanıt olarak enzimatik olarak glutatyondan sentezlenir [Cobbet., 1999].

Bitkiler metal kirliliği gösteren veya metal yönünden zengin topraklarda büyümek için üç temel mekanizma geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalardan ilkinde bitkiler metallerin üst dokularına taşınmasını engellemişlerdir sadece köklerinde metal biriktirirler. İkinci mekanizmada ise bitkiler üst dokularında da metal biriktirirler ve dokulardaki metal seviyesi toprakta bulunan seviyeyi yansıtır. Üçüncü mekanizmayı uygulayan bitki türlerine de biriktiriciler denilmektedir, bu bitki türleri toprakta bulunan metal seviyesinden daha fazla metali tüm dokularında biriktirebilirler [Memon ve diğ., 2001].

Birçok bitkinin optimum büyümesi, üretimi ve hatta tarımı toprakta bulunan farklı seviyelerdeki bir veya birden fazla inorganik iyonla sınırlandırılmaktadır. Abiotik stres faktörlerinden olan ağır metallerin ve ağır metallerden de bakırın arpa bitkisi üzerinde yarattığı stress *in vitro* koşullarda tolerans sınırlarını belirlemek amacıyla incelenmiştir. Bu amaçla *Hordeum vulgare L.*'ye ait yurdumuz kökenli Zafer-160 kültür varyetesinin olgun tohum embiriyoları farklı bakır konsantrasyonları içeren Murashige ve Skoog (MS) [Murashige ve Skoog., 1962] besiyerinde kültüre alınarak bakıra dayanıklılık sınırları saptanmış ve farklı bakır konsantrasyonlarda yetişen bitkiler alınarak bakırın hangi organlarda biriktiği atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile tayin edilmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ABİYOTİK STRES

Anormal çevre koşulları; kuraklık, tuzluluk, ağır metaller, soğuk, don, yüksek ısı, yüksek ışık yoğunluğu ve besin dengesizliği bitki gelişimini etkileyen abiyotik stres etmenleridir. Bitki gelişiminin çeşitli aşamalarında bitki fenotipinin belirmesi bitkinin genotipiyle çevre arasındaki etkileşime bağlıdır. Abiyotik stres bitki gelişimini etkileyerek zirai önemi olan bitkilerde ürünü de olumsuz etkiler. Bu durum küresel ölçekte artan popülasyonun gıda güvenliğini tehlikeye sokar.

Bitkiler çeşitli abiyotik stres koşullarına yanıt olarak anatomik, morfolojik, hücresel ve moleküler seviyelerde mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu yanıtlardan bazıları türe özgü bir davranış gösterirken bazıları ise farklı taksonlardan olan bitkilerde bile ortaktır [Dhariwal ve diğ.,1998]. Abiyotik stres koşullarına karşı bitki tarafından geliştirilen toleransın moleküler temellerini anlayabilmek için yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bitkilerde değişik abiyotik stres koşullarına yanıt geliştirmede absisik asit (ABA) hormonu önemli bir rol oynar. ABA sinyal iletimi yolu ile birçok abiyotik stres koşulluna karşı bitki savunma mekanizmasını başlatır. Sinyal molekülleri olarak ABA ve salisilik asidin çeşitli abiyotik stres koşullarına yanıt olarak bitki savunmasını aktif hale getirmeleri yönünden büyük benzerlikleri olduğu bildirilmiştir [Kawai ve diğ., 1998]. Abiyotik stres sonucunda aktif olan birçok gen absisik asit (ABA) tarafından kontrol edilir. Bazı genlerde ise absisik asit kontrol mekanizması yoktur. Bu mekanizmada strese yanıt gen anlatımında ABA bağımlı düzenleyici sistem ve ABA' dan bağımsız düzenleyici sistem bulunmaktadır. [Yamaguchi ve diğ., 2005].

Hücrel ve moleküler biyoteknolojide ki gelişmeler ekonomik önemdeki genlerin klonlanıp mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlar arasındaki genetik sınırları aşarak gen transferine ve genin yerleştirilmesine olanak sağlamıştır. Çok sayıdaki bitki türünün etkin bitki regenerasyon yöntemlerinin geliştirilmesi ve *Aqrobacterium*'daki Ti plazmidi üzerinden geliştirilen vektör sistemleri, direkt DNA transfer yöntemleri, transposable elementler, çok sayıdaki promotörler, marker genler ve çok sayıdaki klonlanmış genler genetik değişimlerin isteğe uygun biçimde yönlendirilmesine olanak vermiştir. Bu gelişmelerin sonucunda abiyotik stres koşullarıyla bağıntılı genler klonlanıp bu koşullara toleranslı bitkiler oluşturulması yolunda önemli adımlar atılmıştır [Dhariwal ve diğ.,1998].

2.2. AĞIR METALLER

Topraktaki ağır metallerin (Cu, Zn, Pb ve Cd gibi) ve diğer inorganik iyonların (Na, Al, B, As ve Mn) fazlalığı dünya topraklarının dörtte biri üzerindeki bitkilerin normal tarımını kısıtlamaktadır. Bu topraklardan tuzlu olanlarda Na birikimi, asidik olanlarda Al ve Mn birikimi ve ağır metal yönünden zengin olanlarda ise Cu, Zn, Pb, Ni, Cd birikiminin fazla olduğu görülür. Bazı inorganik iyonlara (B, Cd ve Cu) karşı tolerans sağlayan genler belirli tahıllarda tanımlanmıştır. Bezelyeden klonlanan metalotionin geninin (PsMTA) farklı organizmalardaki anlatımı araştırılmıştır. Transgenik *E.coli* ve transgenik *Arabodopsis*'te PsMTA geninin kalıcı anlatımının fenotipik etkisi araştırıldığında PsMTA pozitif *E.Coli* hücrelerinin kontrol hücrelerine nazaran sekiz kat fazla bakır biriktirdiği bulunmuştur. Benzer şekilde PsMTA geni aktarılan *Arabidopsis* bitkisinin kontrol bitkilere göre birkaç kat fazla bakır biriktirdiği gözlenmiştir. Bu durum PsMTA geninin bakır detoksifikasyonu ile bağıntılı olduğunu göstermektedir [Dhariwal ve diğ.,1998].

Bakırın serbest haldeki iyonik formu bileşik halindeki formundan çok daha toksiktir [Florence ve diğ., 2004]. Hücre içi metal bağlayıcıları fitokelataınler (PCs) ve metallotioninler (MTs) olarak bilinen bileşiklerdir. Fitokelatinler fitokelatin sentaz enziminin etkisiyle glutatyondan sentezlenirler. *Arabidopsis thaliana* 'da fitokelatin sentaz enzimini kodlayan gen klonlanmıştır [Cobbett., 1999]. Birçok farklı tür bitkinin ise örneğin *Triticum aestivum*, *Lemna minor*, *Silene vulgaris*, *Oryza sativa* gibi bakıra maruz kalması sonucu prolin biriktirerek yanıt verdikleri rapor edilmiştir [Chen-Teh ve diğ., 2004]. Bitkilerde (*Arabidopsis thaliana*) bakır toleransı sırasında plastosiyanin ve plastidlerdeki iki bakır taşıyıcısı; PAA1 ve PAA2'nin transkripsiyonunda azalma, sitosolik Cu/Zn süperoksit dismutazda (CSD1) artış izlenmiştir [Schiavon ve diğ., 2007]. Süper oksitdismutaz aktivitesi artışı *Schizosacharomcyes pombe*'de da gösterilmiştir [Tarhan, 2003]. Bitkilerde bakırın metabolizmada çok önemli görevleri bulunmaktadır, bu görevlerle ilgili bazı bilgiler ve bakırın bitkilerde bulunduğu başlıca organeller Tablo-2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2. Bitkilerde bakırın dağılımı ve görevi.

İSİM	YER	GÖREV	KAYNAK
Plastosiyenin	Kloroplastlar (PSI e transfer zinciri)	Elektron transferi	a
Superoksid Dismutaz (Cu-Mn SOD)	Mitokondri, glikozom ve kloroplastlar	Superoksid radikal detoksifikasyonu ve lipid peroksidasyonu	b,c,d,e
Sitokrom Oksidaz	Mitokondri	Elektron taşıma zincir ucu molekülünün yükseltgenmesi	f
Askorbat Oksidaz	Hücre duvarları	Askorbik asidin indirgenmesi ve yükseltgenmesi(hücre gelişimi ve bitki savunması)	g,h
Diamin Oksidaz	Epidermis hücrelerindeki apoplazm ve ksilem dokusu	Poliamin indirgenmesi(lignifikasyon ve suberizasyon)	i,j
Polifenol oksidaz	Hücre duvarları ve kloroplastlar	Lignin, alkoloidler ve plastosiyanin biyosentezi	k,l,m

a= Ayala ve Sandmann (1988), b= Elstner (1982), c= Duke ve Salin (1985), d= Sandalio ve Del Rio (1987), e= Palma ve ark. (1986), f= Bligny ve Douce (1977), g=Pignocchi ve Foyer (2003), h= Smimoff (1996), i= Angelini ve ark. (1990), j= Scalet ve ark. (1991), k= Mayer (1987), l= Vaughn ve Duke (1984), m= Vaughn ve ark. (1988).

Metallotionin proteinleri metallerle bileşik oluşturup bitki hücrelerini koruyarak bu metalleri detoksifiye ederler. Bitkilerin serbest iyonik formdaki bakırla muamelesi dokularda MT mRNA anlatımını uyarır. Serbest iyonik formdaki bakırla muamele edilmemiş normal bitki dokularında ise MT mRNA anlatımı düşüktür [Memon ve diğ., 2001].

Bu tez çalışmasında arpa embriyoları kültüre alınmış ve farklı konsantrasyonlarda bakır içeren besiortamlarında ki kök ve gövde gelişim özellikleri incelendi. Bu amaçla bakırın arpa kök ve gövde gelişimi üzerine etkileri ile bakırın hangi organlarda biriktirildiği araştırıldı. Bu veriler arpa bitkisinde bakırın kökler üzerine moleküler etkilerinin araştırılacağı çalışmalar için önem taşımaktadır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 BİTKİ MATERYALİ

Bu çalışmada arpa (*Hordeum vulgare L.*) bitkisine ait Zafer-160 kültür varyetesi kullanıldı.

3.2 *HORDEUM VULGARE L.* EMBRİYOLARININ DOKU KÜLTÜRÜNDE ÇİMLENDİRİLMESİ

Hordeum vulgare L.'ye ait tohumlar yüzey sterilizasyonu için %20'lik sodyum hipoklorit solusyonunda 20 dakika tutulup 3 kez steril destile su ile yıkandılar. Yüzey sterilizasyonu yapılan arpa tohumlarının testaları alkol ile yıkanmış eller yardımıyla çıkarıldıktan sonra steril pens ve bistüri ile embriyolar tohumlardan izole edildi. Embriyolar %70'lik etil alkolde 5 dakika bekletilerek 3 kez steril destile su ile yıkandılar.

In vitro koşullarda arpa embriyolarının çimlendirilmesi amacıyla hormon içermeyen MS besiyeri kullanıldı. Bu ortamın içeriği Tablo 3.1'de verilmiştir. Bir litre MS besiyeri hazırlamak için 4.4g/l MS tuzu, 30 g sukroz tartılarak destile suda çözüldükten sonra 1 ml MS vitamin solusyonu eklendi. Ortamın pH'ı 1 N NaOH ile 5.8 olarak ayarlandı. Ortama 9 g agar eklenerek hacim 1 litreye tamamlandı ve 121 °C'lik otoklavda 1 atmosfer basınç altında 20 dakika steril edildi. Vitamin solusyonları sterilizasyondan sonra eklendi.

Embriyolar her bir petride veya magenda kabında 5 tane olacak şekilde kültür ortamına(besiyerine) ekildiler. Farklı CuSO₄ konsantrasyonlarının embriyo çimlenmesi ve gelişmesi üzerine etkilerinin belirlenebilmesi amacıyla 10.000, 1000, 100, 10 µM CuSO₄ içeren MS besiyerleri kullanıldı. Embriyolar 25 °C deki kontrollu bitki büyüme kabininde 16 saat ışık, 8 saat karanlık periyodunda tutuldu. 3, 6, 10, 13, 17. günlerde olgun embriyoların çimlenmeleri ve büyümeleri izlendi. Bakırın kök ve gövde uzamasına etkisi araştırıldı.

Tablo 3.1. Doku kültürü çalışmalarında kullanılan MS besiyerinin içeriği (konsantrasyonlar mg/l olarak verilmiştir).

İÇERİK	<i>mg/l</i>
<i>MS TUZLARI</i>	
NH ₄ NO ₃	1650.0
KNO ₃	1900.0
CaCl ₂	332.2
MgSO ₄	180.0
KH ₂ PO ₄	170.0
Na ₂ EDTA	37.26
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.80
MnSO ₄ .H ₂ O	16.90
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60
H ₃ BO ₃	6.20
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
<i>VİTAMİNLER</i>	
Thiamin.HCl	0.1
Nikotinik Asit	0.5
Pridoksin. HCl	0.5
Glisin	2.0
Myo-inositol	100.0
<i>DİĞERLERİ</i>	
Sukroz	30000
Agar	9000

pH	5.7-5.8
----	---------

3.2. BİTKİLERİN BAKIR BİRİKİMİ ANALİZİ

Kontrol ve bakır uygulanmış bitkilerde bakır birikimi analizi için atomik absorpsiyon spektrofotometresinde ölçüm yapılmıştır. Örnekler atomik absorpsiyon spektrofotometresi için Çayır (2004) tarafından önerilen yöntemle göre hazırlandı. Önceden kurutulmuş ve besiyeri artıklarından temizlenmiş kontrol ve farklı konsantrasyonlarda bakır içeren ortamda gelişen arpa bitkisinin kök ve gövdesinden ayrı ayrı 1'er g tartılarak 100 ml'lik cam beherlere konuldu. Her cam behere 5 ml konsantre H_2SO_4 ilave edilerek beherler üzerine saat camı konuldu ve $70-80\ ^\circ C$ 'de 3-4 saat kadar ısıtma tablası üzerinde tutuldu. Örnekler ısıtma tablası üzerinde ve sıcakken konsantre HNO_3 damla damla ilave edildi. HNO_3 eklendiğinde, örnekler sıvı hale geçmeye başladı. Örnekler tamamen koyu kahve rengini alınca sıcaklık $120\ ^\circ C$ 'ye çıkarıldı ve belli aralıklarla HNO_3 eklenmeye devam edildi. Örneğin rengi sarı beyaz olana kadar HNO_3 eklendi. Daha sonra hidrojen peroksit damla damla eklenmeye başlandı ve sıcaklık $150\ ^\circ C$ 'ye çıkarıldı.

Hidrojen peroksit eklenmesi sonucu örneklerin rengi tamamen beyazlaşır. Örnekler kurumaya yakinken ısıtma tablasından alındı ve soğutuldu. Hazırlanan %2'lik HNO_3 'den her behere 20 ml eklendi. Saat camı konularak $60-70\ ^\circ C$ 'de kaynatmadan ısıtıldı. Örnekler berraklaşıp tuzlar çözülünceye kadar ısıtmaya devam edildi. Kurumaya yakın, örnekler alınıp süzüldü ve son hacim 10 ml'ye tamamlandı.

Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda bakır uygulanmış arpa kök ve gövdelerinden hazırlanan örnekler atomik absorpsiyon spektrofotometresi cihazında bakır birikimi analizi için tek tek ölçüldü. Sonuçlar kontrolleri ile karşılaştırmalı olarak incelendi.

4. BULGULAR

4.1. *HORDEUM VULGARE L.*'nin doku kültüründe çimlendirilmesi

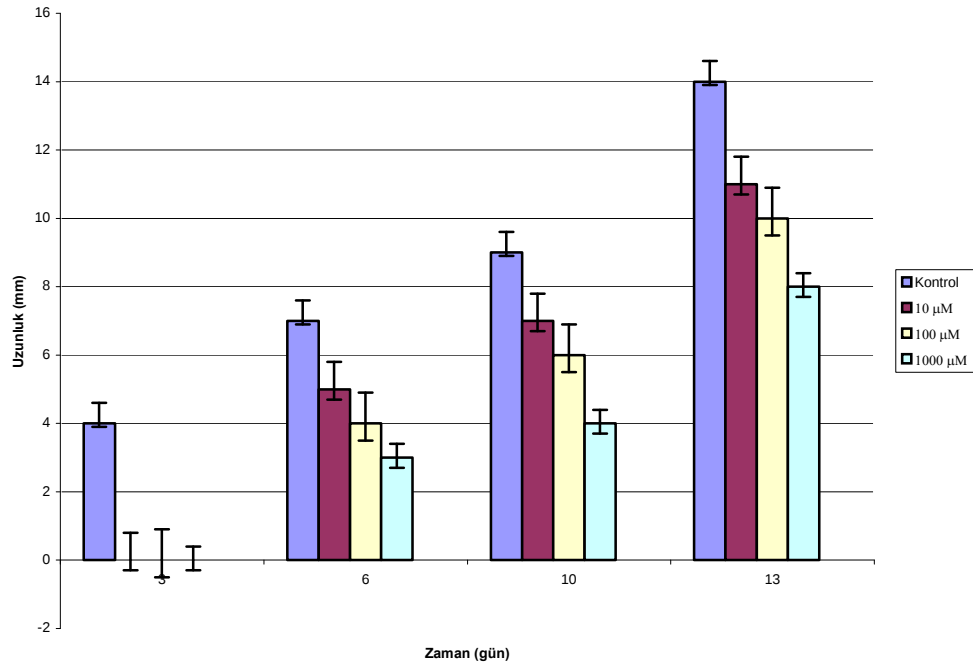
Arpa (*Hordeum vulgare L.*) bitkisinin Zafer-160 varyetesine ait embriyoları kontrol ve 10000, 1000, 100, 10 μM CuSO_4 içeren MS besiyerinde çimlendirilerek bitki gelişimi sağlandı.

4.2. CuSO_4 İçeren Ortamda Embriyo Çimlenmesi ve Gelişmesi

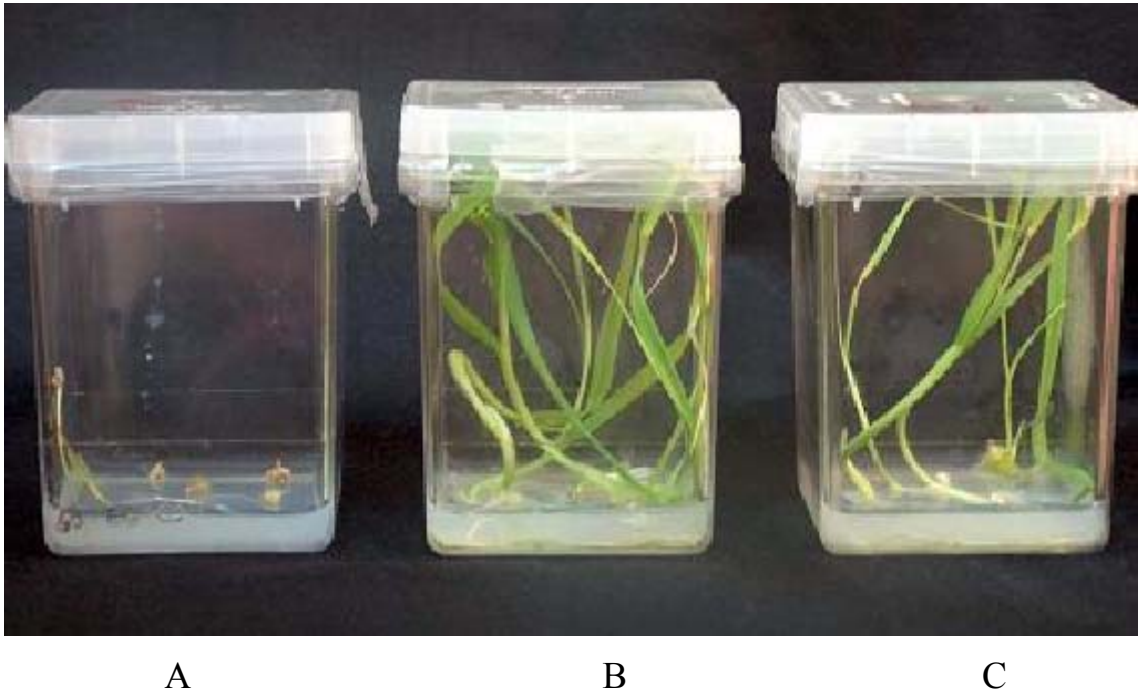
Arpa embriyoları farklı konsantrasyonlarda CuSO_4 içeren MS besiyerlerine ekilerek, bakırın çimlenme ve bitki gelişimi üzerine olan etkileri incelendi. Embriyolar 10000, 1000, 100, 10 μM CuSO_4 içeren MS besiyerine ekildi ve 3, 6, 10, 13, 17. günlerde bitkiler izlendi. 3. Günde sadece kontrol materyelde kök gelişim izlenirken, bakır uygulamaları kök oluşumunu ve gelişimini geciktirdi. Bu kök oluşum gecikmesi ve gelişim geriliği artan bakır konsantrasyonları ile daha fazla etkilendi. 10000 μM CuSO_4 içeren MS besiyerinde yetişen arpa embriyolarında kök ve gövde gelişimi gözlenmedi. 1000 μM CuSO_4 içeren MS besiyerinde yetişen arpa embriyolarının gelişiminin zayıf olduğu ve kök, gövde uzamasının düşük olduğu tespit edildi. 100 ve 10 μM CuSO_4 içeren MS besiyerlerinin ise arpa embriyoları için nispeten tolere edilebilecek konsantrasyonlar olduğu tespit edildi. 10 μM CuSO_4 içeren MS besiyerlerindeki arpa embriyolarının çimlenmesinin 3. günden itibaren kontrol bitkiyle aralarında çok az bir fark olacak şekilde gelişim gösterdiği izlendi. (Şekil 4.1-4.3).

Tablo 4.1. Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda CuSO_4 içeren MS besiyerlerinde çimlenen arpa embriyolarının günlere göre kök uzunlukları(mm).

	3.Gün	6.Gün	10.Gün	13.Gün
Kontrol	4 $\pm$ 0.4	7.2 $\pm$ 0.39	9 $\pm$ 0.40	14 $\pm$ 0.40
10 μM	—	5.4 $\pm$ 0.50	7.5 $\pm$ 0.50	11.5 $\pm$ 0.52
100 μM	—	4 $\pm$ 0.70	6 $\pm$ 0.72	10 $\pm$ 0.66
1000 μM	—	3.3 $\pm$ 0.35	4 $\pm$ 0.34	8 $\pm$ 0.35



Şekil 4.1. Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda CuSO_4 içeren MS besiyerlerinde çimlenen arpa embriyolarının günlere göre kök uzunlukları.



Şekil 4.2. 1000 µM (A), 10 (B) µM CuSO_4 ve Kontrol (C) içeren MS besiyerlerinde çimlenen arpa embriyolarının 17.günde Magenda kültür kaplarındaki morfolojik görünümleri.



Şekil 4.3 . 1000 μM (A), 10 (B) μM CuSO_4 Kontrol (C)içeren MS besiyerlerinde çimlenen arpa embriyolarının 17.gündeki morfolojik görünüşleri.

4.3. Arpa (*Hordeum vulgare* L.) kök ve gövdelerinde bakır birikimi analizi

Bakır birikimi analizi için kontrol, 1000, 100 ve 10 μM CuSO_4 içeren besiyerlerinde yetiştirilen sekiz adet bitkicik kullanıldı. Farklı konsantrasyonlarda bakır içeren MS besiyerinde yetiştirilen arpa bitkisinin kök ve gövdeleri besiyerinden çıkartılıp mekanik olarak ayrıştırılarak atomik absorpsiyon spektrofotometresinde ölçüm analizine tutuldu. Yapılan ölçümlerde köklerin gövdeden daha fazla bakır biriktirdiği daha önce yapılan çalışmalarda örtüşen sonuçlar elde edildi. Bakır konsantrasyonunun artışıyla birlikte kök ve gövdelerde daha fazla bakır birikiminin olduğu gözlemlendi. 1000 μM CuSO_4 içeren besiyerindeki arpa kök ve gövdelerinde en fazla bakır birikiminin olduğu tespit edildi.

CuSO_4 Konsantrasyonu	Kontrol	10 μM	100 μM	1000 μM
Gövde	13,65 $\mu\text{g/g}$	41,65 $\mu\text{g/g}$	195,10 $\mu\text{g/g}$	403,23 $\mu\text{g/g}$
Kök	19,02 $\mu\text{g/g}$	149,06 $\mu\text{g/g}$	1143,52 $\mu\text{g/g}$	2231,30 $\mu\text{g/g}$

Şekil 4.4. Kök ve gövdede bakır birikim değerleri.

5. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada *Hordeum vulgare* L.'nin Zafer-160 varyetesinin bitki doku kültüründe bakır stresinin bitki kök ve gövde uzamasını ve çimlenmesini azalttığı tespit edildi. 10000 μM CuSO_4 konsantrasyonunda yetişen arpa embriyolarında kök ve gövde gelişiminin olmadığı görüldü. 10 μM CuSO_4 konsantrasyonun arpa bitkisinin tolere edebildiği konsantrasyon değeri olarak gözlemlendi. Bitki kök ve gövdeleri ayrıştırılarak organlardaki bakır birikimi araştırıldı.

Hordeum vulgare L.'nin Zafer-160 varyetesine ait olgun tohum embriyoları kullanılarak oluşturulan doku kültüründe farklı CuSO_4 konsantrasyonları (10, 100, 1000, 10000 μM) içeren hormonsuz MS besiyerinde bitki çimlenmesi ve gelişmesi araştırıldığında 1000 μM CuSO_4 içeren MS besiyerindeki bitkilerde gelişimin gözle görülür bir şekilde düşük olduğu tespit edildi. Bakır konsantrasyonu arttıkça bitki çimlenmesi ve gelişiminin zayıfladığı görüldü. Benzer şekilde WOJCIK ve diğ. (2003) *Arabidopsis thaliana*'da yaptıkları çalışmada (5-100 μM) konsantrasyonlarındaki CuSO_4 'ün kök uzamasını azalttığı ve bakırın köklerde birikiminin daha fazla olduğunu göstermişlerdir. MAHMOOD ve ISLAM (2006) pirinç fidelerini 8, 16 ve 32 μM bakır içeren sıvı besiyerinde 4.5, 5 ve 5.5 pH'da yetiştirdiklerinde kök ve gövde gelişimlerinde azalmalar izlemişlerdir bakır konsantrasyonlarının yanısıra pH'nın çok önemli olduğunu ve 5.5 pH'da büyüme ve gelişmenin diğerlerine göre daha fazla olduğunu izleyerek artan pH değerleri ile bakırın zararlı etkilerinin azaltılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızdaki bakır konsantrasyonları yüksektir, fakat çalışmamız sırasında pH 5.7-5.8 arasında tutulmuştur. Bu pH değerinin daha yüksek konsantrasyonlardaki bakıra toleransın sağlanmasında etkili olduğu düşünülmektedir. JIANG ve diğ. (2001) *Zea Mays* L'de yaptıkları çalışmada 10 μM bakır konsantrasyonunda köklerin iyi gelişebildiklerini göstermişlerdir. Bizim arpa bitkisi ile gerçekleştirdiğimiz çalışmada da 10 μM CuSO_4 benzer bulgular elde edilmiştir.

ALI ve diğ. (2004) *Hordeum vulgare* L'de yaptıkları bir başka çalışmada ise Cu ve Cr daha çok köklerde biriktiğini göstermişlerdir. LIN ve diğ. (2003) ise ayçiçeği bitkisinde bakır sülfatın kök, hipokotil, kotiledon ve yapraklarda birikimini araştırmışlardır. Bakır birikiminin %73'ünün köklerde olduğunu belirterek, bakırla kirlenmiş topraklarda ayçiçeği bitkisinin yetiştirilebileceğini ve bakırın toksik etkilerinden kurtulabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bizim arpa bitkisi ile gerçekleştirdiğimiz çalışmada da bu bitkinin yüksek bakır konsantrasyonlarına tolerans gösterebileceğini ve bakırın daha çok köklerde biriktirildiğini gözledik. Bu bulguların ışığında arpa bitkisi de bakırla kirlenmiş topraklar için uygun bir seçim olabilir. Bununla birlikte toprağın asiditesi de bakır toksisitesi için büyük önem taşıdığından bu tip araştırmalarda toprak asiditesinin de izlenmesi gerekir. Çalışmamızda elde edilen bulguların arpa bitkisi ve bakır ilişkisi üzerine gerçekleştirilecek çalışmalara bir ön çalışma biçiminde destek olacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

ALI, N.A., ATER, M., SUNAHARA, G.I., ROBIDOUX, P.Y., 2004, Phytotoxicity and bioaccumulation of copper and chromium using barley (*Hordeum vulgare* L.) in spiked artificial and natural forest soils, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57, 363-374.

ANGELINI, R., MANES, F., FEDERICO, R., 1990, Spatial and functional correlataion between diamine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chickpea stems, *Planta.*, 182, 89-96.

AYALA, M.B., SANDMANN, G., 1988, Activities of Co-containing proteins in co-depleted pea leaves, *Physiology Plantarum*, 72, 801-806.

BLIGNY, R., DOUCE, R., 1977, Mitochondria of isolated plant cells (*Acer pseudoplatanus* L.) : copper deficiency effects on cytochrome c oxidase and oxygen uptake, *Plant Phsiology.*, 60, 675-679.

ÇAYIR, A., 2004, Havadan gelen ağır metallerin Trakya'daki dağılımı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi.

CHEN, C-T., CHEN, T-H., LO, K-F., CHIU, C-Y., 2004, Effects of proline on copper transport in rice seedlings under excess copper stress, *Plant Science.*, 166, 103-111.

COBBET, CS., 1999, A family of phytochelatin synthase genes from plants, fungal and animal species. *Trends in Plant Science.*, 4, 335-337.

DHARIWAL, H., KAWAI, M., UCHIMIYA, H., 1998, Genetic Engineering for Abiotic Stress Tolerance in Plants, *Plant Biotechnology*, 15(1), 1-10.

DUKE, M.V., SALIN, M.L., 1985, Purification and charecterization of an ion containing superoxide dismutase from a eukaryote, *Ginko biloba*, *Arch.Biochem.Biophys.*, 243,305-314.

ELSTNER, E.F., 1982, Oxygen activation and oxygen toxicity, *Annual Review Plant Physiology.*, 33,73-96

JIANG, W., LIU, D., LIU,X., 2001, Effect of copper on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays*, *Biologia Plantarum*, 44(1):105-109.

LIN J., JIANG W., LIU D., 2003, Accumulation of copper by roots, hypocotyls and leaves of sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Bioresource Technology*, 86(2):151-155.

MAHMOOD T., ISLAM Kr., 2006, Response of rice seedlings to copper toxicity and acidity, *Journal of Plant Nutrition*, 29(5):943-957.

MAYER, A.M., 1987, Polyphenol oxidase in plants: recent progress, *Phytochemistry.*, 26, 11-20.

MEMON, A.R., ÖZDEMİR, A., AKTOPRAKLIGİL, D., 2001, Heavy metal accumulation in plants, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 15(2): 44-48.

MURASHIGE, T., SKOOG, F., 1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473-497.

PALMA, J.M., SANDALIO, L.M., DEL RIO, L.A., 1986, Manganese superoxide dismutase and higher plant chloroplasts: a reappraisal of a controverted cellular localization, *Journal Plant Physiology.*, 125, 427-439.

PANOU-FILOTHEOU, H., BOSABALIDIS, A., 2004, Root structural aspects associated with copper toxicity in oregano (*Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*), *Plant Science*, 166, 1497-1504.

PIGNOCCHI, C., FOYER, H., 2003, Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling, *Current Opinion Plant Biology*, 6, 379-389.

SANDALIO, L.M., DEL RIO, L.A., 1987, Localization of superoxide dismutase in glyoxysomes from *Citrullus vulgaris*, functional implications in cellular metabolism, *Journal Plant Physiology.*, 127, 395-409.

SCALET, M., FEDERICO, R., ANGELINI, R., 1991, Time course of diamine oxidase and peroxidase activities, and polyamine changes after mechanical injury of chick-pea seedlings, *Journal Plant Physiology.*, 137, 571-575.

SCHIAVON, M., ZHANG, L., ABDEL-GHANY, S.E., PİLON, M., MALAGOLI, M., 2006, Variation in copper tolerance in *Arabidopsis thaliana* accessions Columbia, Landsberg erecta and Wassilewkija, *Physiologia Plantarum*, 129, 342-349.

SMIMOFF, N., 1996, The function and metabolism of ascorbic acid in plants, *Annual Botany*, 78, 661-669.

TARHAN, Ç., 2003, *Schizosaccharomyces pombe* Lindner str. *Liquefaciens* (OSTERWALDER)'de farklı ortam koşullarının bakır metabolizması üzerine etkileri, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi

VAUGHN, K.C., DUKE, S.O., 1984, Function of polyphenol oxidase in higher plants, *Physiologia Plantarum*, 60, 106-112

VAUGHN, K.C., LAX, A.R., DUKE, S.O., 1988, Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function, *Physiologia Plantarum.*, 72, 659-665.

WOJCIK, M., TUKIENDORF, A., 2003, Response of wild type of *Arabidopsis thaliana* to copper stress, *Biologia Plantarum.*, 46(1), 79-84.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K., 2005, Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters, *Trends in Plant Science*, Vol.10, No.2.

7.ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Diyarbakır'ın Kulp ilçesinde doğdum. Orta öğrenimimi Diyarbakır Anadolu Lisesinde tamamladım. 1996 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne girdim. Biyolog ünvanıyla mezun olduktan sonra 2002 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tezsiz Yüksek Lisans programına kayıt oldum. 2003 yılında tezsiz yüksek lisans programından mezun oldum ve aynı yıl İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı yüksek lisans programına kayıt oldum. Yüksek lisans öğrenimim sırasında kaydımı bir yıl dondurup askerlik görevini yaptım.

