



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ARPA (*Hordeum vulgare* L.) KÖKLERİNDE
ALÜMİNYUM İLE UYARILMIŞ
PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜNÜN
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZİ

BÜŞRA HURİ GÖLGE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Filiz VARDAR

İSTANBUL, 2018



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ARPA (*Hordeum vulgare* L.) KÖKLERİNDE
ALÜMİNYUM İLE UYARILMIŞ
PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜNÜN
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZİ

BÜŞRA HURİ GÖLGE

520115009

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Filiz VARDAR

İSTANBUL, 2018

MARMARA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Öğrencisi Büşra Huri Gölge'nin "Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Köklerinde Alüminyum ile Uyarılmış Programlı Hücre Ölümünün İmmünohistokimyasal Analizi" başlıklı tez çalışması, 28 Haziran 201 tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Filiz VARDAR (Danışman)

Marmara Üniversitesi

Doç.Dr. Yıldız AYDIN (Üye)

Marmara Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Özlem AYTÜRK (Üye)

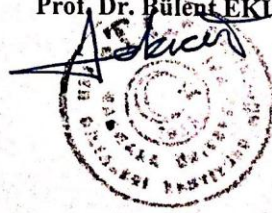
Maltepe Üniversitesi

ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 6./08/2018 tarih ve 108/19-0.2 sayılı kararı ile Büşra Huri Gölge'nin Biyoloji Ana Bilim Dalı Biyoloji Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Bülent EKİCİ



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bana rehberlik eden, ilgisi ve hoşgörüsüyle her zaman yanımda olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. Filiz VARDAR'a sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans sürecimde bana değerli fikirleri ile katkıda bulunan Doç. Dr. Yıldız AYDIN'a, laboratuvar çalışmalarında bana destek olan Arş. Gör. Dr. Aslıhan ÇETİNBAS GENÇ'e, deneysel ve teorik çalışmalarında bana her daim yardımcı olan Fatma YANIK'a, ELISA ölçümlerinde yardımcı olan Barış GÖKALSIN'a, akım sitometrisi çalışmalarında yardımcı olan Prof. Dr. Ahu ALTINKUT UNCULOĞLU'na ve Emre AKTAŞ'a, tez sürecimde ilgi ve desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Gamze KURTULUŞ ve Orçun TOKSÖZ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan, beni destekleyen, ilgi ve anlayışlarını esirgemeyen sevgili aileme tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Marmara Üniversitesi, BAPKO, FEN-C-YLP-091116-0501 numaralı proje tarafından desteklenmiştir.

Haziran, 2018

Büşra Huri GÖLGE

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
Teşekkür	i
İçindekiler	ii
Özet	iv
Abstract	v
Semboller	vi
Kısaltmalar	vii
Şekil Listesi	ix
Tablo Listesi	xi
1. GİRİŞ	1
1.1.Programlı Hücre Ölümü	2
1.1.1. Nekroz	3
1.1.2.Otofaji	4
1.1.3.Apoptoz	5
1.2.Bitkide Programlı Hücre Ölümü	7
1.2.1.Bitkilerde Gelişim Sırasında Meydana Gelen Programlı Hücre Ölümü	9
1.2.2.Bitkilerde Stres Sırasında Görülen Programlı Hücre Ölümü	10
1.2.3.Bitkilerde Reaktif Oksijen Türlerinin Hücre Ölümündeki Rolü	11
1.2.4.Bitkilerde Kaspaz Benzeri Aktiviteler	13
1.3.Bitkilerde Programlı Hücre Ölümünün Analizi	15
1.4.Alüminyum Toksisitesi ve Bitkiler Üzerindeki Etkisi	17
1.4.1.Alüminyum Toksisitesinin Bitki Kökleri Üzerindeki Etkileri ve Mekanizmaları	19
2. MATERYAL VE YÖNTEM	21
2.1. Bitki Materyali	21
2.1.1. Arpa (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	21
2.1.2. Arpa tohumlarının sterilizasyonu ve çimlendirme şartları	22
2.1.3. Alüminyum çözeltisinin uygulanması	22
2.2. Araştırma Yöntemleri	24
2.2.1. Sitokimyasal yöntemler	24

2.2.1.1. Al ³⁺ iyon alınımının tayini	24
2.2.1.2. Hücre zarının bütünlüğünün bozulması	25
2.2.1.3. Lipid peroksidasyonunun analizi	26
2.2.1.4. Kaspaz-1 benzeri enzimlerin analizi	27
2.2.1.5. Sitokrom C miktarının analizi	29
2.2.1.6. Akım sitometrisi (flow cytometry) yöntemi ile DNA fragmentasyonunun belirlenmesi	30
2.2.1.7. İstatistiksel analizler	30
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	31
3.1. Arpa Köklerinde Al³⁺ İyon Birikimi	31
3.2. Arpa Köklerinde Plazma Zarı Bütünlüğünün Belirlenmesi	33
3.3. Arpa Köklerinde Lipid Peroksidasyonu Analizi	36
3.4. Arpa Köklerinde Kaspaz-1 Benzeri Enzim Aktiviteleri	39
3.5. Arpa Köklerinde Mitokondriden Sitoplazmaya Sitokrom c Salınımı	41
3.6. Arpa Köklerinde DNA Fragmentasyonu	43
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	63

ÖZET

Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Köklerinde Alüminyum ile Uyarılmış Programlı Hücre Ölümünün İmmünohistokimyasal Analizi

Alüminyum (Al) toksisitesi, yeryüzünde bitkiler açısından en çok tehlike oluşturan toksisitelerden biridir. Al, toprakta en fazla bulunan üçüncü elementtir. Bir takım çevresel faktörler sebebi ile toprağın asiditesi artarsa Al çözünür ve toksik forma dönüşür. Bu çalışmada, 100 µM konsantrasyondaki AlCl₃ çözeltisinin, arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkisi köklerine kendi içerisinde kısa süreli (½ sa., 1 sa., 2 sa., 3 sa., 4 sa., 5 sa., 6 sa. ve 7 sa.) ve uzun süreli (24 sa., 48 sa., 72 sa. ve 96 sa.) olarak uygulandığında meydana gelen biyokimyasal değişimlerin ortaya konması amaçlanmıştır. Uygulanan süreler sonunda, her iki uygulama grubunda hücre içerisinde Al⁺³ iyon birikimi, hücre zarı bütünlüğündeki değişim ve lipid peroksidasyonu analizleri yapıldı. Her iki uygulama grubunda da, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Al⁺³ iyon birikiminde, hücre zarı bütünlüğünün bozulmasında ve lipid peroksidasyonunda zaman bağımlı artış gözlemlendi. Bununla birlikte, kaspaz-1 benzeri enzim aktiviteleri de kolorimetrik olarak ölçüldü ve AlCl₃ toksisitesinde kaspaz-1 benzeri enzim aktivitesinde de ilk 30 dakikadan itibaren artış olduğu gözlemlendi. Hayvanlarda görülen apoptoz ile benzer olarak, hücre ölümü sırasında mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c salınımı da kolorimetrik olarak ölçüldü. Bu deney sonucunda da, programlı hücre ölümünün göstergelerinden biri olan mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c salınımında zaman bağımlı artış olduğu gözlemlendi. Son olarak AlCl₃ stresi altında, genomik DNA hasarı Akım Sitometrisi tekniği ile ölçüldü ve Al stresinde arpa hücrelerinde DNA fragmentasyonunun özellikle uzun süreli Al uygulamasında şiddetlendiği tespit edildi. Sonuç olarak; AlCl₃ stresi arpa köklerinde zamanla artarak hücresel ve moleküler değişimlere sebep oldu. Bu çalışma aynı zamanda, Al toksisitesinin bitki gelişimi üzerinde tehlikeli etkilerine dikkat çekmekte ve Al toksisitesi ile programlı hücre ölümü mekanizması arasındaki ilişkinin aydınlatılmasının önemine vurgu yapmaktadır.

Anahtar sözcükler: Alüminyum, Al toksisitesi, lipid peroksidasyonu, DNA fragmentasyonu, kaspaz-1 benzeri enzim aktivitesi, programlı hücre ölümü, sitokrom c.

Haziran, 2018

Büşra Huri GÖLGE

ABSTRACT

Immunohistochemical Analysis of Al-Induced Programmed Cell Death in Barley (*Hordeum vulgare* L.) Roots

Aluminum (Al) toxicity is one of the most dangerous toxicants in terms of plants on the earth. Al is the third most found element in the earth. As soil acidity increases due to a number of environmental factors, Al is soluble and transforms into a toxic form. In this study, 100 μ M AlCl_3 solution was added to the roots of barley (*Hordeum vulgare* L.) for a short term (½ h., 1 h., 2 h., 3 h., 4 h., 5 h., 6 h. and 7 h.) and long term (24 h., 48 h., 72 h. and 96 h.), it is aimed to reveal the biochemical changes that occur. At the end of time periods, Al^{+3} ion accumulation, changes in cell membrane integrity and lipid peroxidation in the cells were analyzed in both treatment groups. In compare to the control group, in both groups of treatment, an increase in the loss of cell membrane integrity, lipid peroxidation and Al^{+3} ion accumulation time dependently. On the other hand, caspase-1 like enzyme activities were also measured colorimetrically and an increase in caspase-1 like enzyme activity was observed in AlCl_3 toxicity beginning from 30 min. Similar to apoptosis seen in animals, cytochrome c release from mitochondria to cytoplasm was also measured colorimetrically. As a result of our research, it was observed that there was a time dependent increase in cytochrome c release from mitochondria to cytoplasm, one of the indicators of programmed cell death. Finally, under AlCl_3 stress, genomic DNA damage was measured by Flow Cytometry technique, and it was determined that DNA fragmentation was more significant after long term application in barley cells. To sum up; AlCl_3 stress caused time dependent cellular and molecular changes in barley roots. The study also highlights the dangerous affects of Al toxicity on plant development and highlights the importance of clarifying the relationship between Al toxicity and programmed cell death mechanism.

Key words: Aluminum, Al toxicity, caspase-1 like enzyme activity, cytochrome c, DNA fragmentation, lipid peroxidation, programmed cell death.

June, 2018

Büşra Huri GÖLGE

SEMBOLLER

μM	: Mikromolar
μl	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
M	: Molar
ml	: Mililitre
gr	: Gram
cm	: Santimetre
nm	: Nanometre
N	: Normal
rpm	: Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)

KISALTMALAR

AlCl₃	: Alüminyum klorür
APX	: Askorbat peroksidaz
ATP	: Adenozin trifosfat
CAT	: Katalaz
CHAPS	: 3 – [(3 – kolamidopropil) dimetilamonyo] – 1 – propansülfonat hidrat
DAPI	: 4',6 – diamidino – 2 – fenilindol
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DTT	: Dittireol
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
ER	: Endoplazmik retikulum
GA	: Giberellik asit
GPX	: Glutasyon peroksidaz
HCl	: Hidroklorik asit
HEPES	: 4 – (2 – hidroksietil) – 1 – piperazineetansülfonik asit
HNE	: Hidroksinonenal
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HR	: Hypersensitive responsa – Aşırı duyarlılık yanıtı
IAP	: İnhibitör of apoptosis – Apoptoz inhibitörleri
KIO₃	: Potasyum iyodat
KOH	: Potasyum hidroksit
MDA	: Melondialdehit
MPT/MPTP	: Mitochondrial permeability transition pores – Mitokondriyal permeabilite geçiş porları
NCDD	: Nomenclature Committee on Cell Death – Hücre Ölümü Bilimsel Adlandırma Komitesi
¹O₂	: Singlet oksijen
O₂⁻	: Süperoksit anyonu
OH⁻	: Hidroksil radikali
PAMP	: Pattern-Associated Molecular Patterns
PBS	: Fosfat tampon tuzu
PHÖ	: Programlı hücre ölümü
PRRs	: Pattern recognition receptors

PS	: Fosfatidilserin
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SA	: Salisilik asit
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiobarbitürik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
TE	: Trake elemanları
TMV	: Tobacco mosaic virüs – Tütün mozaik virüsü
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UV	: Ultraviole
VPE	: Vacuolar processing enzyme – Vakuoler işlem enzimleri

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.1** Sitoplazmada otolizozomun oluşumu
- Şekil 1.2** Memeli kazpazları ve apoptozda üstlendiği görevler
- Şekil 1.3** Moleküler oksijenin indirgenmesi sonucu ROT oluşumu
- Şekil 1.4** ROT'ların abiyotik stres koşullarının şiddetine göre etkileri
- Şekil 1.5** Dünyadaki toprakların pH'sındaki değişimler **A.** Toprak yüzeyinin (0-30 cm) pH dağılımı, **B.** Yüzeyin altındaki toprağın (30-100 cm) pH dağılımı. Kuvvetli asit topraklar: $pH \leq 4,5$, orta derecede asitli topraklar: $pH 4,6 - 5,5$.
- Şekil 2.1** *Hordeum vulgare* L. (arpa)'nın sistematikteki yeri.
- Şekil 2.2** 100 μM $AlCl_3$ 'te bekletilen arpa (*H. vulgare*) tohumları
- Şekil 2.3** 1N HCl içerisinde bekletilen kontrol ve uygulama (24, 48, 72 ve 96 sa) gruplarına ait arpa kökleri (ok)
- Şekil 2.4** Evans mavisi içerisinde bekletilen kontrol ve uygulama (24, 48, 72 ve 96 sa) gruplarına ait arpa kökleri
- Şekil 2.5** **a-**Kromojen solüsyonu içeren kör ve örnek kuyucukları, **b-** Durdurma solüsyonu eklendikten sonra kör ve örnek kuyucukları (A1 Kör; A2-B12 Örnekler)
- Şekil 2.6** DNA fragmentasyonunun belirlendiği Sysmex marka akım sitometrisi cihazı
- Şekil 3.1** Kontrol ve kısa süreli $AlCl_3$ uygulaması sonucunda arpa köklerindeki Al^{+3} iyon alımı ($\pm SS$, $*p < 0,05$)
- Şekil 3.2** Kontrol ve uzun süreli $AlCl_3$ uygulaması sonucunda arpa köklerindeki Al^{+3} iyon alımı ($\pm SS$, $*p < 0,05$)
- Şekil 3.3** Kontrol ve kısa süreli $AlCl_3$ uygulaması sonucunda arpa köklerindeki Evans mavisi alınımı ($\pm SS$, $*p < 0,05$)
- Şekil 3.4** Kontrol ve uzun süreli $AlCl_3$ uygulaması sonucunda arpa köklerindeki Evans mavisi alınımı ($\pm SS$, $*p < 0,05$)
- Şekil 3.5** Kontrol ve kısa süreli $AlCl_3$ uygulaması sonucunda arpa köklerindeki Lipid peroksidasyonu ($\pm SS$, $*p < 0,05$)
- Şekil 3.6** Kontrol ve uzun süreli $AlCl_3$ uygulaması sonucunda arpa köklerindeki Lipid peroksidasyonu ($\pm SS$, $*p < 0,05$)
- Şekil 3.7** Kontrol ve kısa süreli $AlCl_3$ uygulaması sonucunda arpa köklerindeki kaspaz-1 benzeri aktiviteler ($\pm SS$, $*p < 0,05$)

- Şekil 3.8** Kontrol ve uzun süreli AlCl_3 uygulaması sonucunda arpa köklerindeki kaspaz-1 benzeri aktiviteler ($\pm\text{SS}$, $*p<0,05$)
- Şekil 3.9** Kontrol ve kısa süreli AlCl_3 uygulaması sonucunda arpa köklerindeki sitoplazmik ve mitokondriyal sitokrom c miktarları ($\pm\text{SS}$, $*p<0,05$)
- Şekil 3.10** Kontrol ve uzun süreli AlCl_3 uygulaması sonucunda arpa köklerindeki sitoplazmik ve mitokondriyal sitokrom c miktarları ($\pm\text{SS}$, $*p<0,05$)
- Şekil 3.11** Kontrol ve kısa süreli AlCl_3 uygulaması sonucunda arpa köklerindeki DNA fragmentasyonu
- Şekil 3.12** Kontrol ve uzun süreli AlCl_3 uygulaması sonucunda arpa köklerindeki DNA fragmentasyonu



TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1	Apoptoz, otofaji ve nekrozun morfolojilerinin karşılaştırılması
Tablo 1.2	Bitkilerde hücre ölümü tiplerinin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri bakımından karşılaştırılması
Tablo 1.3	Bitkilerde PHÖ ile ilişkili proteinazlar
Tablo 2.1	<i>Hordeum vulgare</i> L. Çetin 2000 (arpa)'nın tarımsal özellikleri
Tablo 2.2	Alüminyum içeren stok ve çalışma çözeltilerinin hazırlanışı
Tablo 2.3	Hematoksilen çözeltisinin hazırlanışı
Tablo 2.4	Evans mavisinin hazırlanışı
Tablo 2.5	Kaspaz-1 benzeri enzim analizinde kullanılan çözeltilerin içeriği ve hazırlanışı



1. GİRİŞ

Yer kabuğunda bitkiler açısından tehlike oluşturan en yaygın toksisitelerden biri Alüminyum (Al) toksisitesidir (Vitorello ve ark., 2005). Al, bitkilerin beslenmesi için gerekli olmamasına rağmen, toprakta oksijen ve silikondan sonra en fazla bulunan üçüncü elementtir. Al, yalnızca asidik topraklarda toksik formda bulunur. Eğer toprağın bir takım çevresel faktörler (elektrik santralleri, endüstriyel faaliyetler, egzoz gazı, asit yağmurları, organik madde birikimi vb.) nedeni ile asiditesi artarsa alüminyum çözünür ve fitotoksik forma dönüşür (Matsumoto ve ark., 2000; Wang ve ark., 2006; Vardar ve ark., 2007). Dünyadaki ekilebilir durumda olan toprakların neredeyse %30'u asidiktir. Bu durum toprakta yoğun bir şekilde bulunan kompleks Al bileşiklerinin çözünerek bitkiler tarafından alınmasına sebep olmaktadır (Von Uexküll ve ark., 1995). Asiditesi yüksek topraklar çoğunlukla gıda üretiminin kritik olduğu Güney Amerika, Orta Afrika, Güneydoğu Asya gibi az gelişmiş ülkelerde yer almaktadır (Vitorello ve ark., 2005). Ülkemizde ise kuzey kıyılarımız olan Karadeniz Bölgesi'nde toprak doğal olarak asidiktir (Kornosor ve ark., 1999). Ekilebilir toprakların asiditesinin yüksek olması, dünya genelinde özellikle tahıl üretimini olumsuz yönde etkilemektedir (Silva ve ark., 2012).

Asidik toprak içerisinde, çözülebilir Al'nin oldukça reaktif olduğu ve birçok hücrenel komponentle kuvvetli reaksiyonlara girdiği tespit edilmiştir (Singh ve ark., 2017). Al toksisitesinin en belirgin göstergesi, kök gelişiminde meydana gelen gerilemedir. Yapılan çalışmalara göre mikromolar seviyesindeki konsantrasyonlar bile kök gelişimini ilk yarım saat içerisinde olumsuz yönde etkileyerek hücre ölümüne yol açmaktadır (Vardar ve ark., 2007).

Programlı hücre ölümü (PHÖ), tüm prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda olduğu gibi, bitkilerde de gelişim ve strese yanıt açısından önemli bir role sahiptir (Kabbage ve ark., 2017). PHÖ, bitkilerin Al toksisitesine verdiği yanıtlardan biridir. Ancak Al toksisitesi ile uyarılmış PHÖ mekanizması, henüz tam olarak aydınlatılamamış olan bir konudur.

Bu tez çalışmasın da tarımsal ve ticari açıdan önemli olan arpa (*Hordeum vulgare* L.) köklerine 100 µM AlCl₃ (pH 4.5) uygulanarak, Al toksisitesinin arpa köklerindeki biyokimyasal etkileri incelenecektir. Çalışmada kullanan uygulama grupları kendi içerisinde kısa süreli (½ sa., 1 sa., 2 sa., 3 sa., 4 sa., 5 sa., 6 sa. ve 7 sa.) ve uzun süreli (24 sa., 48 sa., 72 sa. ve 96 sa.) olarak belirlenmiştir. Yapılacak olan deneysel çalışmalar ile Al toksisitesinin kök hücrelerinde hücre zarı bütünlüğü, hücre içerisinde Al⁺³ birikimi, lipid peroksidasyonu, DNA fragmentasyonu, kaspaz-1 benzeri aktiviteler ve mitokondriyal aktiviteler üzerindeki etkisi

incelenerek, Al toksisitesi ile bitkide PHÖ mekanizması arasındaki ilişki aydınlatılarak literatüre katkı sağlamak amaçlanmıştır.

1.1.Programlı Hücre Ölümü

Çok hücreli ve kompleks yapıdaki organizmaların hücreleri, iyi derecede organize olmuşlardır (Palavan-Unsal ve ark., 2005). Bu organizmalarda bir hücre zarar görürse veya o hücreye daha fazla ihtiyaç duyulmazsa, hücre içi ölüm programı devreye girer ve hücre aşamalı bir şekilde ölür. Bu yüzden bu süreç '**Programlı Hücre Ölümü**' adını almıştır (Palavan-Unsal ve ark., 2005). Hücrenin kontrollü ve organize bir şekilde yıkımına bağlı olarak gerçekleşen bir olaylar dizisi olan programlı hücre ölümü (PHÖ), organizmanın doku homeostazisi ve gelişimi açısından kritik bir role sahiptir (Zimmermann ve ark., 2001; Reape ve ark., 2015). Bu ölüm süreci bir hücrenin, tüm organizmanın yararı için kendisini eleme sürecini yönetir (Kabbage ve ark., 2017). Hücre, PHÖ'yü aktive edip etmeyeceğine birçok kaynaktan aldığı hücre yaşam/gelişim sinyalleri, patojen tanımlanması, stres sinyalleri, hücrenin aldığı hasarlar ve metabolik durumu gibi sinyallere göre karar verir (Reape ve ark., 2015).

PHÖ, bu zamana kadar en iyi hayvan hücrelerinde aydınlatılmıştır ve hücre morfolojilerine göre 3 temel gruba ayrılmıştır (Tablo 1.1): Apoptoz, otofaji ve nekroz (Dauphinee ve ark., 2015).

Tablo 1.1.: Hayvan hücrelerinde apoptoz, otofaji ve nekrozun morfolojilerinin karşılaştırılması (Kroemer ve ark., 2009)

Hücre Ölümü Tipi	Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri
Apoptoz	Hücrenin büzülmesi Kaspaz aktivitesi ATP tüketimi DNA fragmentasyonu Apoptotik cisimlerin oluşumu Komşu hücreler tarafından fagosite edilme
Otofaji	Sitoplazmada yoğun vakuolleşme Otofajik vakuollerde organel yıkımı
Nekroz	Sitoplazmada ve organellerde şişme Plazma membranında ani parçalanma Organellerde ani parçalanma Doku içerisinde inflamasyon

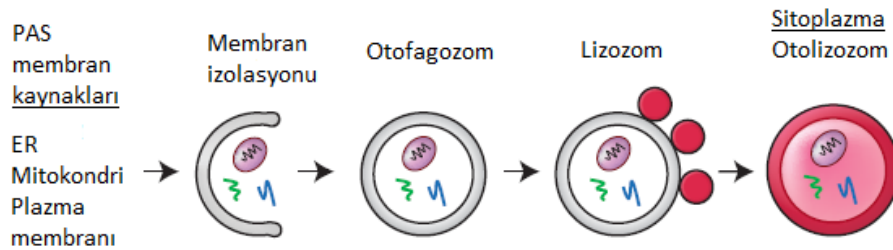
1.1.1. Nekroz

Ani hasar gören hücreler şişme ve patlama şeklinde ölerak içeriklerini etrafa saçarak ve yangısal (iltihaplı) bir yanıt oluşturlar. Bu tip ölüm şekline '**nekroz**' denir (Palavan-Unsal ve ark., 2005). Nekrotik hücre ölümü, morfolojik olarak hücre hacmindeki artış, organellerde şişme, plazma membranının parçalanması ve daha sonra hücre içi komponentlerin kaybı ile karakterize olur (Kroemer ve ark., 2009). Uzun bir süre, nekroz yalnızca kazara meydana gelen ve kontrolsüz bir şekilde gerçekleşen bir hücre ölümü tipi olarak kabul edilmiştir. Ancak sonraki yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki, nekrotik hücre ölümü, çok iyi bir biçimde düzenlenen bir dizi sinyal iletim yolağına ve katabolik mekanizmaya sahiptir (Golstein ve ark., 2007). Nekrotik hücre ölümü birçok düzenleyiciyi, organeli ve hücrenel süreci içeren bir mekanizma ile düzenlenir, ancak tüm bu faktörlerin arasında nasıl bir ilişki olduğu hala net olarak bilinmemektedir. Bunlar arasında mitokondriyal değişimler (örneğin; reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi, mitokondriyal membran geçirgenliği oluşumu vb.), lizozomal değişimler, nüklear değişimler, lipidlerin yıkımı, kalsiyumun (Ca^{2+}) sitozoldeki konsantrasyonunun artması gibi faktörler yer almaktadır (Nicotera ve ark., 2004; Golstein ve ark., 2007). Nekrozda hücrenel içerikler hücre dışına çıkarak tehlikeli bir sinyal oluşturlar,

bu sebeple nekroz, oluşturduğu inflamasyonla da karakterize olur (Proskuryakov ve ark., 2003).

1.1.2.Otofaji

Otofaji, evrimsel olarak korunmuş olan, sitoplazmik materyallerin, örneğin; organeller ve proteinlerin, yıkılmak üzere lizozoma götürülmesini içeren katabolik bir süreçtir (Das ve ark., 2012). Otofaji, besin yetersizliği veya diğer stres faktörleri esnasında, hücre içi homeostaziyi sağlama görevi görmektedir. Tanımlanmış olan üç otofaji tipi vardır; makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji (Mizushima ve ark., 2011). Şaperon aracılı otofaji, proteinlerin lizozoma getirildiği biyokimyasal bir süreçtir. Mikrotofaji çok az miktarda aydınlatılabilmiş bir süreçtir; bu süreçte materyallerin lizozoma pinositoza benzer bir süreçle direkt olarak alındığı düşünülmektedir (Das ve ark., 2012). PHÖ ile ilişkilendirilen makrotofaji ise, üzerinde en çok çalışılan otofaji tipidir. Bu süreç, otofagozom denilen büyük, çift membranlı veziküllerin oluşumu ile karakterize olur (Hofius ve ark., 2011). Bu yapılar, fagoporlar adı verilen tekli zarlardan meydana gelirler. Otofagozomların kaynağının granülsüz ER olduğu düşünülmektedir ve yapılan bazı çalışmalar da bu ihtimali destekler niteliktedir (Dunn ve ark., 1990). İlk önce otofagozom oluşur, daha sonra bu yapı, lizozom ile birleşerek otolizozom yapısını oluşturur (Das ve ark., 2012). Daha sonra bu yapı, hidrolitik yıkımı gerçekleştirir (Şekil 1.1). Otofajik hücre ölümü, bir diğer hücre ölümü tipi olan apoptotik hücre ölümünden, otofajik yapılar bulundurması, kaspazlara ihtiyaç duymaması ve fagositoz gibi sebeplerden ötürü ayrılmaktadır (Clarke ve ark., 1990; Baehrecke ve ark., 2005; Das ve ark., 2012).



Şekil 1.1.: Sitoplazmada otolizozomun oluşumu (Das ve ark., 2012).

1.1.3.Apoptoz

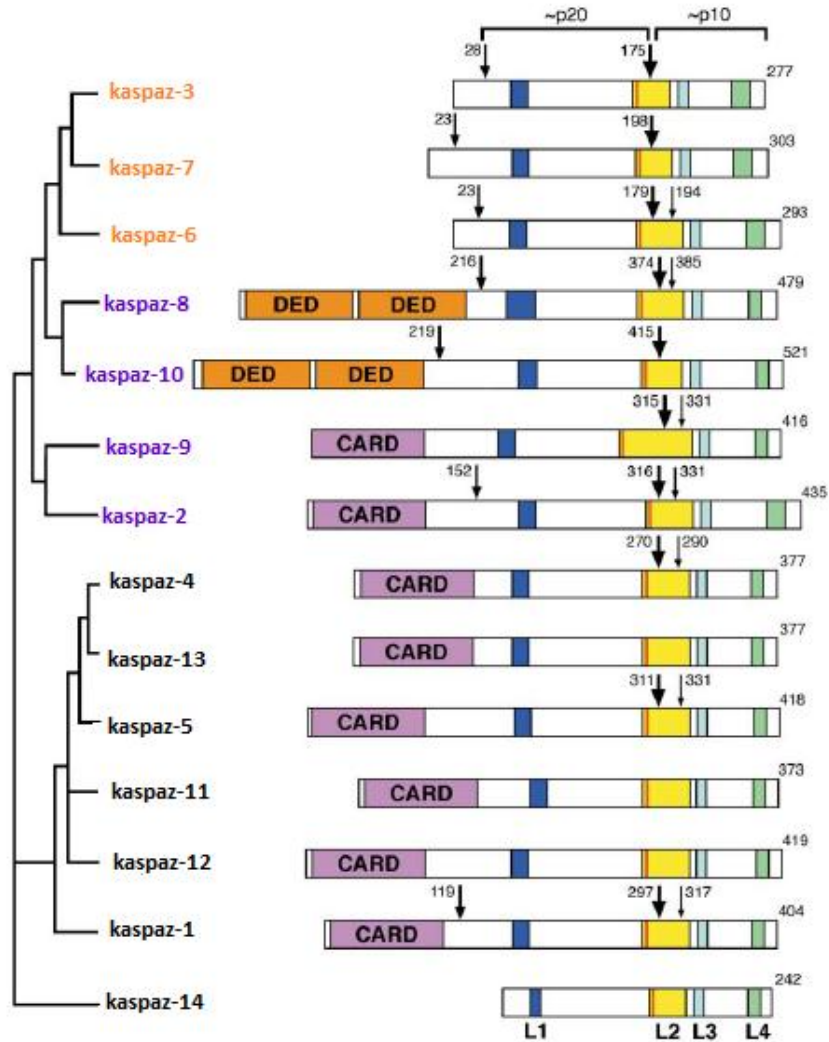
Terim olarak Apoptoz (a-po-toe-sis) ilk kez Kerr ve ark. (1972) tarafından, morfolojik açıdan farklı bir ölüm tipini tanımlamak amacıyla kullanılmıştır (Elmore ve ark., 2007). Apoptoz, normal şartlarda organizmanın gelişimi ve yaşlanma sürecinde homeostaziye sağlama görevi görüyor olsa da görevi yalnızca bununla sınırlı değildir. Apoptoz aynı zamanda organizmanın savunma mekanizmasında da görev alır. Örneğin, immünolojik reaksiyonlarda veya hücre bir hastalıktan yahut herhangi bir dış etkenden dolayı zarar gördüğünde apoptoz devreye girer (Norbury ve ark., 2001). NCCD (Nomenclature Committee on Cell Death-Hücre Ölümü Bilimsel Adlandırma Komitesi)'ye göre bir hücrenin 'ölü hücre' sayılabilmesi için, hücrede aşağıdaki göstergelerden en az birinin gözlemlenebilmesi gerekir:

1. Hücre membranının bütünlüğünün kaybolmuş olması.
2. Hücrenin, nükleusu da dahil olmak üzere, fragmente olarak zarla çevrili keselere ayrılması.
3. Bu keselerin komşu hücreler tarafından fagosit edilmesi (Kroemer ve ark., 2009).

Apoptotik hücreler, hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, genomik DNA'nın nükleozomlar arası bölgelerden kesimi, hücre zarında sitoplazmik yüzeyden hücre dışına fosfatidilserin (PS) göçü ve proteolitik aktivite gibi bazı morfolojik ve biyokimyasal değişimler ile karakterize olmuşlardır (Zimmermann ve ark., 2001). Hayvanlarda görülen apoptozun, temel olarak iki yolak üzerinden ilerlediği kabul edilmektedir. Bu yollar, hücre içi ve hücre dışından gelen sinyallerle uyarılırlar. Dış yolak, hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile işlemektedir; bu yüzey reseptörlerine ölüm ligandları bağlanır ve hücre içerisinde bir ölüm sinyali başlatılır (Bao ve ark., 2007). Bunun aksine, iç yolak, mitokondri kontrolünde işleyen bir süreçtir, genel olarak stres sinyallerine yanıt olarak ortaya çıkar. Mitokondri dış zarı, Bcl-2 protein ailesinin üyelerini içerir. Bu protein ailesi pro- ve anti- apoptotik üyelere sahiptir. Birbirine zıt çalışan bu üyeler arasındaki denge, mitokondriyal membran potansiyelini etkiler. Apoptoz indükleyici şartlar altında, mitokondriyal membran geçirgenliği artar ve sitokrom-c gibi apoptotik düzenleyiciler sitoplazmaya salınır (Elmore ve ark., 2007).

Sonuç olarak, iç ve dış her iki yolak da kaspazları (caspases - cysteinyl aspartate specific proteases) aktive eder. Kaspazlar, hücresel komponentlerin belli bir ölüm sırasına göre yıkımını sağlar (Parrish ve ark., 2013). Kaspazların inaktivasyonu, apoptoz sinyallerinin olmadığı durumlarda PHÖ'yü engellemeye yönelik olarak çalışırlar. Örneğin, IAP (inhibitor of apoptosis-apoptoz inhibitörü) protein ailesi kaspaz aktivitesinde negatif düzenleyici olarak görev görürler (Kabbage ve ark., 2017).

Kaspazlar, hayvan hücrelerinde apoptozun başlatılmasında ve devam etmesinde görev alan proteazlardır. Hücre içerisinde inaktif bir formda salgılanıp, herhangi bir apoptotik sinyal algılandığında iki büyük ve iki küçük alt birimlerinin bir araya gelerek bir tetramer oluşturmaları sonucu olgun forma dönüşürler (Hu ve ark., 1999). Olgun forma dönüşen kaspazlar, hedefledikleri proteinleri aspartik asit birimlerinden kesen sistein proteazlardır (Bao ve ark., 2007). Bu enzimlerin ilk önce *C. elegans* üzerinde yapılan genetik çalışmalar esnasında açığa çıkmıştır. Memelilerde tanımlanmış 14 adet kaspaz vardır (Şekil 1.2). İnsanda tanımlanan ilk kaspaz ise, yangısal yanıtı aracılık eden kaspaz-1 enzimidir (Norbury ve ark., 2001; Bao ve ark., 2007).



Şekil 1.2.: Memeli kaspazları ve apoptozda üstlendiği görevler (Shi ve ark., 2002).

Apoptoz kaspaz-8, 9 gibi başlatıcı kaspazlar tarafından aktive edilir ve kaspaz-3, -7 gibi diğer efektör kaspazlar tarafından yürütülür (Shi ve ark., 2002). Memelilerde, kaspaz-9'un aktivasyonu Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1), sitokrom c ve dATP kompleksinden oluşan apoptozom oluşumu ile gerçekleşir (Cain ve ark., 1999).

Hücre dışı kaynaklı apoptoz yolağı, Fas gibi özel transmembran ölüm reseptörlerine, ölüm ligandlarının (FasL) bağlanması sonucu uyarılır (Parrish ve ark., 2013). Ölüm sinyali alan hücrelerin sitoplazma tarafında DISC adını alan büyük bir protein kompleksi oluşur (Kischkel ve ark., 1995). Bu kompleksin en önemli bileşenlerinden biri FADD (Fas-associated death domain), ve başlatıcı kaspazlardan olan kaspaz-8'dir. Başlatıcı kaspazların aktive olmasıyla birlikte hücre içinde bir ölüm zinciri başlamakta (Bao ve ark., 2007).

Hücre içi (veya mitokondriyal) kaynaklı apoptoz yolağının aktivasyonu iç mitokondri zarı boşluğundan sitokrom c salınması ile başlar. Sitokrom c, Apaf-1 ile kompleks oluşturur ve daha sonra prokaspaz-9'u sisteme dahil ederek kaspaz-9 aktive olur (Zou ve ark., 1997). Apoptozom olarak bilinen bu yapı, bir iskele görevi görür (Zou ve ark., 1999).

1.2.Bitkide Programlı Hücre Ölümü

Programlı Hücre Ölümü (PHÖ) diğer ökaryotik organizmalarda olduğu gibi, bitkilerin hem gelişimi için ve hem de çevresel strese verdikleri cevap açısından önemli bir role sahiptir. Çevresel streslere karşı verilecek cevaplarda, PHÖ bitkiler için özellikle önemlidir çünkü bitkinin zor çevresel koşullardan ve patojenlerden kaçamayan durağan doğaları vardır (Kabbage ve ark., 2017).

Hayvanlarda görülen apoptoz ile bitkilerde görülen PHÖ arasında DNA fragmentasyonu, kaspaz benzeri proteolitik aktivite ve mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c salınması gibi morfolojik ve biyokimyasal açıdan ortak özelliklerin varlığı keşfedilmiştir (Palavan-Unsal ve ark., 2005). Ancak bitkide PHÖ'nün kendine mahsus özellikleri vardır. Apoptotik özelliklerinin bulunması, bazı araştırmacılara bu sürecin apoptoz benzeri PHÖ sınıfına dahil edilmesi gerektiğini düşündürse de, bitkide PHÖ'nün apoptotik bir süreç olmadığına yönelik genel bir mutabakat vardır (Dominguez ve ark., 2015).

PHÖ, diğer çok hücreli organizmalarda olduğu gibi, bitkilerde de büyüme, gelişme ve çevreyle etkileşim açısından önemli fonksiyonlara sahip olan genetik bir mekanizma tarafından kontrol edilen bir süreçtir (Lam ve ark., 2004). Bitkilerde PHÖ gelişimsel olarak, savunma mekanizması olarak ve strese yanıt olarak ortaya çıkabilir (Reape ve ark., 2015). Gelişimsel sürece ilişkin olarak, PHÖ doku oluşumunun son aşamasında görev alır. Örneğin, trake elemanlarının oluşumu, havalandırma parankimasının oluşumu, eşey belirlenmesi, eşey

organlarının olgunlaşması, ayrıca yaprakların dökülmesinde önemli bir rolü vardır (Dauphinee ve ark., 2015). Çevreyle etkileşimi açısından ise, bitkiler biyotik strese neden olan patojenlere farklı PHÖ tipleriyle cevap verebilirler (Dominguez ve ark., 2015). Aşırı duyarlılık yanıtında (HR-Hypersensitive Response), enfeksiyonun meydana geldiği bölgede hızlı bir hücre ölümü meydana gelir, böylece patojenin çoğalıp diğer hücre ve dokulara yayılması sınırlandırılmış olur (Hatsugai ve ark., 2018). Bunun yanında abiyotik stres nedeni olan hipoksi, yüksek veya düşük sıcaklık, kuraklık ve UV ışınları gibi elverişsiz ortam koşullarına maruz kaldıklarında da PHÖ savunma mekanizması olarak kullanılır (Dominguez ve ark., 2015).

Bitkilerde görülen PHÖ iki grupta sınıflandırılır; vakuoler hücre ölümü ve nekrotik hücre ölümü (Tablo 1.2.) (Yanık ve ark., 2018). Çoğu olgun bitki hücresi, hücre hacminin büyük bölümünü oluşturan vakuollere sahiptir. İki çeşit vakuol vardır; litik vakuol ve protein depo vakuolü. Litik vakuoller, işi bitmiş ve kullanılmayacak olan hücresel materyallerin yıkımından sorumlu olan hidrolitik enzimleri içerir; protein depo vakuolleri ise, birçok proteinin depo edildiği yerdir, örneğin; savunma proteinleri ve tohum çimlenmesinde görev alan depo proteinleri gibi (Hatsugai ve ark., 2004). Bitki hücrelerinde litik vakuollerin hacminin artması sonucu, vakuol zarı olan tonoplast parçalanır ve içerisindeki hidrolitik enzimler sitoplazmaya geçer. Bu şekilde hücre ölümü gerçekleşir. Tonoplastın parçalandığı aşamaya kadar kromatin yoğunlaşır ve DNA fragmentasyonu gözlemlenir ancak henüz bozulmaya uğramamış olan mitokondri ve plastitler gibi sitoplazmik organeller, hücre içerisinde varlığını ve aktivitesinin sürdürür. En sonunda vakuol parçalanır ve bunun sonucunda hücredeki tüm yapıların yıkımı gerçekleşir (Yanık ve ark., 2018).

Nekrotik hücre ölümünü, vakuoler hücre ölümünden ayıran bazı nitelikler vardır. Bunlar mitokondriyal şişme, litik vakuollerin bulunmaması ve protoplastın büzüşmesine bağlı olarak hücre membranının erken yıkımı gibi özelliklerdir (Doorn ve ark., 2011). Bitkilerde vakuoler hücre ölümü gelişim sırasında veya stres koşullarında gerçekleşen fizyolojik bir olaydır, ancak nekrotik hücre ölümü, bitki ani ve şiddetli stres koşulları ile karşılaştığında gerçekleşir ve patolojik bir süreçtir (Yanık ve ark., 2018).

Tablo 1.2.: Bitkilerde hücre ölümü tiplerinin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri bakımından karşılaştırılması (Yanık ve ark., 2018).

Hücre Ölümü Tipi	Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikler
Vakuoler Hücre Ölümü	•Otofagozomların, küçük ve büyük litik vakuollerin oluşumu •Sitoiskelet elemanlarının yeniden düzenlenmesi •DNA fragmentasyonu •Kromatin yoğunlaşması •Nukleus zarının bozulması •Vakuoler işlem enzimlerinin (VPE) aktivasyonu •Tonoplastın parçalanmasına kadar organellerin bütünlüğünün ve turgorun korunması •Tonoplastın parçalanması •Hücre içeriğinin tamamen sindirilmesi
Nekrotik Hücre Ölümü	•Hücrenin şişmesi •Mitokondrilerde şişme •Hücre solunumu ve ATP üretiminin durması •Plazma zarının erken ve ani parçalanması •Hücre içeriği sindirilemeden artıklar halinde kalması

1.2.1.Bitkilerde Gelişim Sırasında Meydana Gelen Programlı Hücre Ölümü

İletim demetine sahip bitkiler gelişimleri sırasında -örneğin; embriyogenez, döllenme, doku ve organların gelişimleri- PHÖ'ye uğrarlar (Yanık ve ark., 2018). Ksilem, bitkinin topraktan kökleriyle aldığı su ve minerali yapraklara ileten ve bitkinin organlarının duruşunu mekanik olarak destekleyen bir dokudur. Yapısında çeşitli tipte hücreler bulunur: (1) Trake elemanları (TE), (2) Fibriller, (3) Parankima. Trake elemanlarının hidro-mineral özsuğunu iletebilmeleri için, bu hücreler PHÖ'ye uğrayarak daha işlevsel bir forma dönüşürler. Trake elemanlarının PHÖ'nün ortaya çıkışı, ölüm-öncesi ve ölüm-sonrası denilen süreçlerde gerçekleşen olayların sıkı bir şekilde koordine edilmesine bağlıdır. Ölüm-öncesi, örneğin; sekonder hücre duvarının oluşumu için selüloz ve ksilan birikimi gibi olaylar gerçekleşirken, ölüm-sonrası dediğimiz süreçte, sekonder hücre duvarının odunlaşması gibi olaylar gerçekleşir. Trake elemanlarının ölümünde merkezi rolü üstlenen olay, vakuolün yıkımıdır. TE ölümü, tonoplastın patlamasıyla uyarılır. Daha sonra protoplastın kalıntıları birkaç saat içerisinde hızlıca temizlenir. Ancak kloroplast gibi bazı organeller ise, vakuol yıkımından uzun bir süre sonra bile gözlemlenebilir (Menard ve ark., 2015).

Embriyo kesesi oluşumundan önce megaspor ana hücresinin gelişimi için fonksiyonel megaspor hücrenin seçimi, konuma bağlı bir olaydır ve türlere göre değişkenlik gösterir (Rodkiewicz, 1970). Bu seçim, gelişimsel olarak kontrol edilen bir süreçtir. Fonksiyonel olmayan megasporların seçiminde ve elenmesinde, gelişimsel PHÖ'nün rol oynadığı

düşünüyor (Hautegeem ve ark., 2015). Dişi gametofitin gelişiminde ve erken büyüme evresinde destek sağlayan kısa ömürlü bir doku olan nucellusun ölümünün PHÖ ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Arpa (*Hordeum vulgare*) bitkisinde vakuoler işlem enzimlerinin (VPE-vacuolar processing enzymes) ekspresyonunun nucellar PHÖ ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (Radchuk ve ark., 2006). Hintyağı (*Ricinus communis*) bitkisinde yapılan çalışmalarda ise, nucellar PHÖ'de rol oynadığı düşünülen 30 proteaz enzimi tanımlanmıştır (Nogueira ve ark., 2012). Embriyo kesesinde yer alan sinerjit ve antipot hücreleri de, döllenmeden önce, döllenme esnasında veya döllenmeden sonra gelişimsel PHÖ'ne uğramaktadırlar (Heydlauff ve ark., 2014).

Anter çeper tabakalarından tapetum gelişim sırasında PHÖ'ne uğrar. Özellikle Giberellik Asit (GA) olmak üzere birçok bitkisel hormon, tapetumda hücre ölümünün başlamasında önemli bir role sahiptir. Bunun yanında çifte döllenme sırasında, sperm hücrelerinin salınması için polen tüpünde gerçekleşen patlama sonrasında polen tüpü ölüme uğrar. Döllenmeden sonra endospermde görülen hücre ölümünün hangi aşamada gerçekleştiği ise, türlere göre farklılık göstermektedir: birçok dikotil ve monokotil, embriyo çevresinde litik endosperm yıkımı veya tahılların sert (nişasta) endospermelerinde litik olmayan PHÖ gerçekleşir. Tohum kabuğu, farklılaşan ve son olarak ölüme uğrayan birçok tabakadan oluşur. Tohum kabuğunun ölümü, koruyucu ve sağlam bir tohum kabuğu oluşturabilmek için tabaka tabaka, spesifik bir sıra ile gerçekleşir (Hautegeem ve ark., 2015).

1.2.2.Bitkilerde Stres Sırasında Görülen Programlı Hücre Ölümü

Çevresel koşulların, bitkilerde büyüme ve gelişmeyi negatif olarak etkileyecek derecede farklılaşması durumunda, bu koşullara maruz kalan bitkide meydana gelen duruma "stres" denir (Büyük ve ark., 2012). Stres faktörleri, biyotik ve abiyotik olmak üzere iki gruba ayrılır: (1) Biyotik stres faktörleri; bitkiye zararlı hayvanların saldırıları ve bazı mikroorganizmaların (fungus, bakteri ve virüs) enfeksiyonu sonucu ortaya çıkan stres faktörleri, (2) Abiyotik stres faktörleri ise; kuraklık, radyasyon, sıcaklık ve kimyasallar gibi çevresel faktörlerdir (Lichtenhaler ve ark., 1996).

Hayvanlarda olduğu gibi adaptif ve dolaşımda olan bir immun sistemi bulunmayan bitkilerin her bir hücresi, mikroorganizmaları tanıma kabiliyetine sahiptir. Herhangi bir saldırı durumunda, organizmanın geri kalanının zarar görmemesi için kendilerini feda ederler. "Aşırı Duyarlılık Yanıtı (HR-Hypersensitive Response) denilen bu mekanizmada görülen PHÖ'de, klasik hücre ölümünde görülen DNA fragmentasyonu, kaspaz benzeri proteolitik aktivite, mitokondriden sitokrom c salınması gibi belirtiler görülür. Sitotoksik sinyal moleküllerinin

dağılması sonucu hem konak hücre hem de patojen hücre zarar gördüğü halde, nekrotik hücre ölümü kategorisine girmez. Bunun sebebi, bu süreçte, hücrenin metabolik ve transkripsiyonel olarak aktif olması, litik vakuollerin oluşumu, otofajik aktivitenin artışı, ROT artışı ve tonoplast parçalanması sonucunda ortaya çıkan hücresel bozulma gibi özelliklere sahip olarak vakuoler hücre ölümü ile ortak özellikler göstermesidir (Feechan ve ark., 2015; Yanık ve ark., 2018). Fakat nekrotik hücre ölümünde görüldüğü gibi, ölüm sonrasında hücresel artıklar tamamen sindirilmeden kalır (Yanık ve ark., 2018).

Patojenik veya yararlı tüm mikroorganizmalar, bitkinin tanıyabileceği bir dizi kimyasala sahiptir. Orijinal tanımı "Pattern-Associated Molecular Patterns (PAMPs)" olan bu kimyasallar, normal şartlarda bitkinin hayatta kalması için gerekli moleküllerdir. Bu moleküller evrimsel olarak korunurlar ve kolayca mutasyona uğramazlar. PAMP'lar, bitkilerde bulunan bazı reseptörler tarafından tanınırlar, bu reseptörlere "Pattern Recognition Receptors (PRRs)" denir. Fonksiyonel olarak, PRR'ler üç gruba ayrılır: plazmada dolaşan humoral proteinler, hücre yüzeyinde ifade edilen endositik reseptörler ve hücre içerisinde veya hücre yüzeyinde ifade edilebilen sinyal reseptörleri. PRR'ler tarafından herhangi bir PAMP tespit edildiği zaman, Aşırı Duyarlılık Yanıtı (HR) devreye girer ve patojenin organizmanın tümüne zarar vermesi engellenir (Medzhitov ve ark., 1997; Brunner ve ark., 2002; Feechan ve ark., 2015).

Bitkiler yaşamları boyunca, onların dokularına zarar verebilecek, hatta hayatlarını tehlikeye atabilecek abiyotik stres koşullarına maruz kalırlar. Durağan bir doğaları olması sebebiyle, bu koşullara maruz kaldıklarında yer değiştirmek gibi bir seçenekleri yoktur, bu yüzden olumsuz şartlara direnmelerini sağlayacak farklı stratejiler geliştirmişlerdir (Petrov ve ark., 2015). Araştırmacılar yaptıkları çalışmalardan elde ettikleri veriler sonucunda, bitkilerin stres koşullarına karşı oluşturduğu moleküler yanıtları üç grup altında toplamışlardır: (1) makromoleküllerin ve iyonların hücre içerisinde dengesi, (2) koruyucu maddelerin/moleküllerin sentezi, (3) reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumu ve detoksifikasyonu (Büyük ve ark., 2012). Stres koşulları altında ROT üretiminin artışı lipid peroksidasyonuna, protein oksidasyonuna, nükleik asitlerde hasara, enzim inhibisyonuna sebep olur ve sonuç olarak hücrede PHÖ mekanizması devreye girer (Yanık ve ark., 2018).

1.2.3.Bitkilerde Reaktif Oksijen Türlerinin Hücre Ölümündeki Rolü

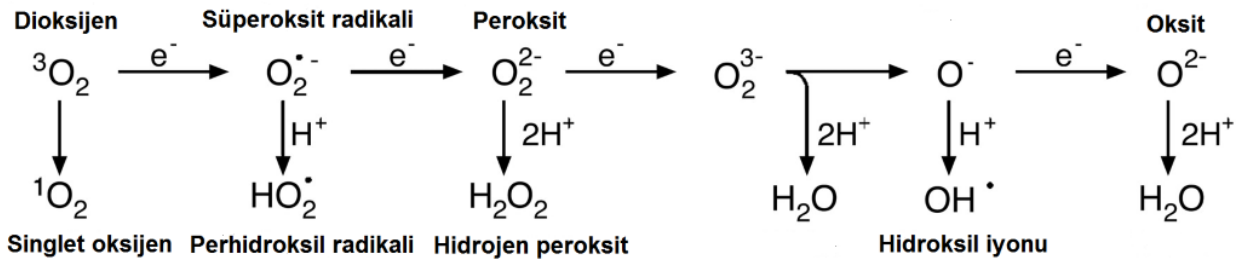
Bitkilerde abiyotik stres içeren koşullar altında PHÖ görülür. Yapılan çalışmalar, bitkilerde görülen PHÖ'de de hayvanlarda görülen apoptozdaki gibi reaktif oksijen türlerinin (ROT) rolü olduğunu göstermiştir. ROT, normal şartlarda hücre içerisinde, enerji üretimi,

solunum, fotosentez gibi olaylarda yan ürün olarak açığa çıkmaktadır (Van Breusegem ve ark., 2006).

Hayvanlarda ROT'a bağlı apoptotik hücre ölümünde, mitokondri merkezi bir role sahiptir. Bitkilerde de mitokondri, ROT homeostazisinin artışıdaki ilk değişimde, mitokondriyal geçiş porlarının açılması vasıtasıyla sitokrom c salınımının uyarılmasında ve morfolojik değişimlerde önemli bir rol oynar (Tiwari ve ark., 2002). Bitkilerde mitokondrinin yanı sıra kloroplast da bir ROT üreticisidir ve orta derecede PHÖ sinyali oluşturabilir (Rusterucci ve ark., 1999).

Bitkide PHÖ sırasında ROT ile diğer sinyal molekülleri (fitohormonlar gibi) arasında karşılıklı etkileşim görülür (Overmyer ve ark., 2005). ROT'a bağlı PHÖ'nün hem salisilik asit (SA) hem de etilen seviyesinin artmasıyla ilişkili olduğu bir gerçektir (de Jong ve ark., 2002). Diğer taraftan, jasmonik asit, başlangıçtaki ROT sinyalinin tekli oksijen veya süperoksit olmasına bağlı olarak oksidatif-bağlantılı hücre ölümünün artmasına yönelik de etki gösterebilir, zıt bir etki de gösterebilir (Van Breusegem ve ark., 2006).

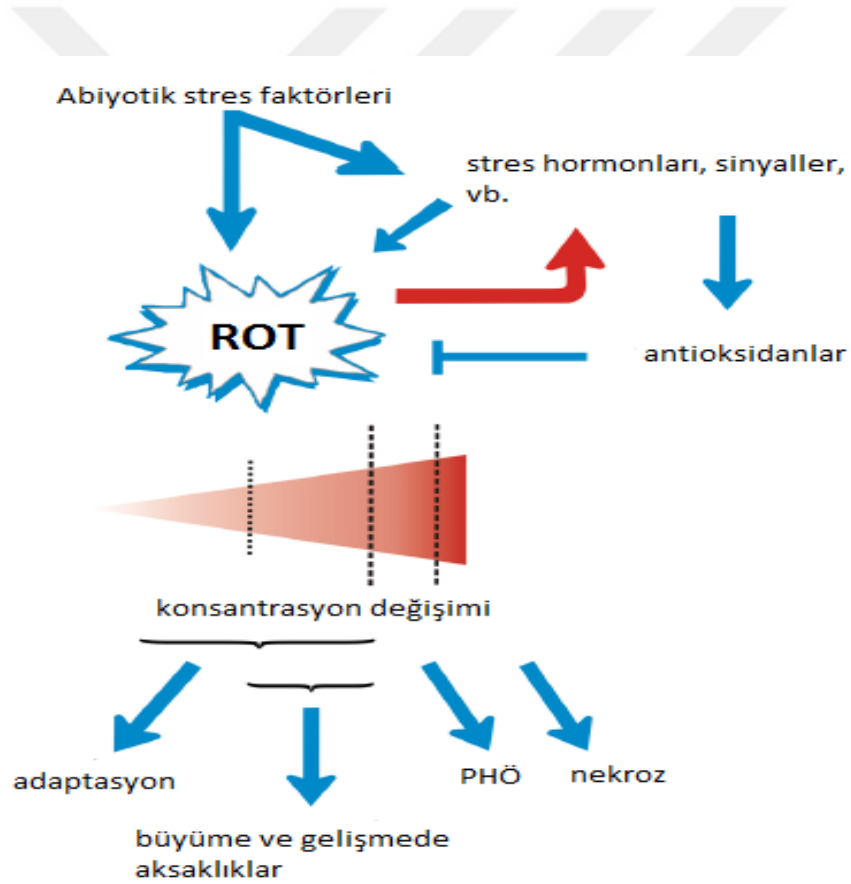
ROT, radikal olmayan bir atom veya molekülden, bir adet elektron eksilmesi sonucu veya atom ya da moleküle bir adet elektron eklenmesi sonucu meydana gelir. Diğer moleküllere elektron verme ya da onlardan elektron alma özellikleri nedeniyle, canlıda indirgeyici veya yükseltgeyici role sahiptirler (Yanık ve ark., 2018). Hücrelerde üretilen en önemli reaktif oksijen türleri; tekli (singlet) oksijen (1O_2), süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^\bullet$)'dir. Ancak normal şartlar altında bu radikallerin hücre içerisindeki seviyeleri denge halindedir (Şekil 1.3) (Büyük ve ark., 2012).



Şekil 1.3.: Moleküler oksijenin indirgenmesi sonucu ROT oluşumu (Yanık ve ark., 2018).

Bitki hücreleri, stres faktörleri ile başa çıkabilmek için ROT'u kontrol altına alan ve onların detoksifikasyonu ile görevli birçok antioksidan içermektedir. Bu antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda oksidasyon yapabilen ve bir diğer substrat molekülün oksidasyonunu azaltan ya da tamamen inhibe eden maddelerdir (Büyük ve ark., 2012). Antioksidanlar,

enzimatik olanlar ve enzimatik olmayanlar olarak iki gruba ayrılır. Enzimatik olmayanlar; vitamin C (askorbik asit), vitamin E (tokoferoller), karotenoidler, antosiyaninler, fenolik bileşikler ve glutatyondur. Enzimatik olan antioksidanlar ise; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), gayakol peroksidaz (GPX) ve glutatyon peroksidaz (GPx) olarak tanımlanmaktadır (Gill ve Tuteja, 2010). ROT üretimi ile detoksifikasyonu arasındaki denge, herbisitler ve patojen saldırıları gibi birçok biyotik stres faktörleri veya tuzluluk, kuraklık, radyasyon, çok yüksek sıcaklık, ağır metaller ve besin yetersizliği gibi çeşitli abiyotik stres faktörleri tarafından bozulur (Şekil 1.4). Sonuç olarak ROT miktarı arttığında hücre yapısında oksidatif hasar meydana gelir ve hücre ölümü başlar (Yanık ve ark., 2018).



Şekil 1.4.: ROT'ların abiyotik stres koşullarının şiddetine göre etkileri (Petrov ve ark., 2015).

1.2.4.Bitkilerde Kaspaz Benzeri Aktiviteler

Bitki genomları, direkt olarak hayvan hücrelerinde bulunan kaspazların kodlarını genomlarında bulundurmasalar da, bitkilerde PHÖ sırasında kaspaz benzeri aktiviteler gözlenmiştir (Hatsugai ve ark., 2018). Bu kaspaz benzeri aktivitelerin varlığı, sentetik spesifik

kaspaz substratları ile yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (de Jong ve ark., 2000; Mlejnek ve ark., 2002; He ve ark., 2003). Ayrıca, spesifik kaspaz inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda da, kaspaz benzeri enzimlerin, bitkide PHÖ'ye katıldığını gösteren sonuçlar elde edilmiştir (Woltering ve ark., 2002). Ancak tam olarak kaç tane proteazın kaspaz benzeri aktivite gösterdiği henüz bilinmemektedir. Dahası, hangi proteazın gelişimsel ve senesense bağlı PHÖ'ye, hangilerinin strese bağlı PHÖ'ye katıldığı aydınlatılmayı bekleyen bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır (Piszczek ve ark., 2007).

Yapısal açıdan ele alındığında, bitki proteaz ailelerinden biri olan metakaspazlar, kaspazlara en çok benzeyen proteazlardır. Metakaspaz ailesi, N-terminal prodomain bulundurması durumuna göre tip1 (N-terminal prodomain bulunduran) ve tip2 (N-terminal prodomain bulundurmayan) olmak üzere iki alt gruba ayrılır. Her bir metakaspaz, küçük (p10) ve büyük (p20) katalitik alt birimlerinden oluşur. Bu alt birimler, sistein ve histidin rezidülerinin katalitik bir çiftidir (Kabbage ve ark., 2017). Metakaspazların PHÖ'de başlatıcı olarak mı yoksa yürütücü olarak mı rol aldıkları ve diğer kaspaz benzeri enzimlerle etkileşime geçtiklerinde nasıl davrandıkları henüz tam olarak açıklanamamıştır. Biyokimyasal çalışmalar, yalnızca tip II metakaspazın büyük ve küçük alt birimlerin oluşumuna bağlı olarak otokatalitik aktivasyona uğradığını göstermiştir. Tip I metakaspazda ise herhangi bir otokatalitik aktivite gözlenmemiştir. Tip I metakaspazın, sinyal transdüksiyonunun erken evrelerinde başlatıcı kaspaz olarak hareket ettiği, tip II metakaspazın aktivasyon sürecinin ise daha çok hayvanlardaki yürütücü kaspazlarınkine benzediği görülmüştür (Piszczek ve ark., 2007).

Bitkilerde PHÖ'de rol oynayan bir diğer proteaz ailesi vakuoler işlem enzimleri (VPE-vacuolar processing enzyme) ailesidir. Vakuoler proteinlerin çoğu, ER üzerinde proprotein öncüsü olarak sentezlenir; bu proproteinler kofullara taşınırlar ve Asn (asparjin) rezidülerinin C-terminal bölgelerindeki proteolitik kesim ile olgun formlarına dönüştürülürler (Yamada ve ark., 2005). VPE, 1987 yılında balkabağı tohumlarında, protein depo kofullarında yer alan çeşitli depo proteinlerin olgunlaşmasından sorumlu bir enzim olarak keşfedildi ve 1991 yılında ilk kez tanımlandı (Hara-Nishimura ve ark., 1987; 1991). Daha sonraki yıllarda VPE'nin biyotik stres, abiyotik stres ve gelişimle ilgili PHÖ'nün düzenlenmesinde görev aldığı tespit edilmiştir (Cai ve ark., 2015). Bunun yanında 3 boyutlu yapısı incelendiğinde hayvanlardaki kaspaz-1 ile yakın benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. VPE'nin ilk olarak TMV-kaynaklı PHÖ'de rol oynadığı gösterilmiştir (Hatsugai ve ark., 2004). Ayrıca, *Arabidopsis* köklerinde *Piriformospora indica*'ların yararlı bir koloni oluşturduğunda ortaya çıkan, ER-kaynaklı stres sonucu oluşan PHÖ'de de VPE'nin pozitif bir düzenleyici olarak rol oynadığı

tespit edilmiştir (Qiang ve ark., 2012). Abiyotik strese ilişkin olarak ise, VPE ekspresyon verileri göstermiştir ki, sıcaklık stresi altında kırmızı turplar çiçek tomurcuğu oluşturmamışlardır (Zhang ve ark., 2013). VPE'nin aynı zamanda *N. tabacum* bitkisinin BY-2 hattında, Al kaynaklı PHÖ'de de rol oynadığına ilişkin veriler mevcuttur. 150 µM Al, VPE ekspresyonunda artışa sebep olmuştur (Kariya ve ark., 2013). Ancak tüm bu verilere rağmen, VPE'nin PHÖ'de nasıl bir yolak üzerinden rol oynadığı tam olarak bilinmemektedir.

Coffeen ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada, yulaf bitkisinde viktorin kaynaklı PHÖ'ye katılan, subtilisin ailesine ait SAS-1 ve SAS-2 serin proteaz enzimlerini elde etmişlerdir. Serin proteazlar olmaları ve kaspaz substratlarını hidrolize etmelerinden dolayı onlara "saspaz" adını vermişlerdir. Dahası, bu enzimlerin aktivitesi, spesifik kaspaz inhibitörleri tarafından inhibe edilebilmektedir (Coffeen ve ark., 2004). Bu enzimler, bir sinyal peptidi içeren ve daha sonra endoplazmik retikulumda uzaklaştırılan preproprotein formunda sentezlenirler. Propeptidin uzaklaştırılması ile aktivasyon gerçekleşir; aktifleşen enzim apoplasta geçer ve PHÖ'yü aktive eden substratlara katılır (Piszczek ve ark., 2007).

Tablo 1.3.: Bitkilerde PHÖ ile ilişkili proteinazlar (Yanık ve ark., 2018).

Proteinaz adı	Proteinaz ailesi	Substrat	Etki ettikleri kaspaz substratı
VPE	Sistein proteinaz	Asparjin Aspartik asit	YVAD (kaspaz-1 substratı)
26S proteozom β1 alt ünitesi	Treonin proteinaz	Glutamik asit	DEVD (kaspaz-3 substratı)
Saspaz	Serin proteinaz	Aspartik asit	VKMD (kaspaz-6 substratı)
Fitaspaz	Serin proteinaz	Aspartik asit	IETD (kaspaz-8 substratı)
Metakaspaz	Sistein proteinaz	Arjinin, lizin	VEID (kaspaz-6 substratı)

1.3.Bitkilerde Programlı Hücre Ölümünün Analizi

Bitkide PHÖ, birçok analiz ile belirlenebilmektedir. PHÖ, temel olarak mikroskopik teknikler ile tespit edilir. Nukleusun morfolojisinde meydana gelen değişimleri tespit etmek için toluidin mavisi, hematoksilen gibi boyalar, plazma membranındaki değişimlerin tespiti için ise Evans mavisi gibi boyalar kullanılır (Yanık ve ark., 2015; 2017). Kökteki mitoz bölünme indeksi ve kromozomal değişimler için ışık mikroskopunun yanı sıra, yine nukleus ve kromatinde meydana gelen değişimler, DAPI, propidium iodit gibi işaretleyiciler yardımıyla floresan mikroskopta gözlemlenebilirler (An ve ark., 2004; Riccardi ve ark.,

2006). DNA fragmentasyonunun tespit edildiği bir diğer yöntem TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) yöntemidir. Bu yöntem, TdT enziminin bir şablondan bağımsız olarak, çift iplikli DNA kırıklarının uçlarını etiketleme prensibine dayanmaktadır (Krylkova ve ark., 2012). PHÖ analizinde kullanılan bir diğer yöntem akım sitometrisi yöntemidir. Klasik apoptotik özelliklerin çoğunluğu nicel olarak akım sitometrisi ile incelenebilir. Akım sitometrisinin en büyük avantajları arasında, birden fazla parametrenin ölçülebilmesi (aynı anda farklı hücresel olaylar arasındaki korelasyon), tek hücre analizi ve hızlı analiz yapabilme özellikleri sayılabilir. Akım sitometrisi ile, hücrenin mitokondriyal transmembran potansiyeli, kaspaz aktivasyonu, DNA fragmentasyonu ve plazma membranındaki apoptotik değişimler gibi göstergeler de incelenebilir (Wlodkowic ve ark., 2009).

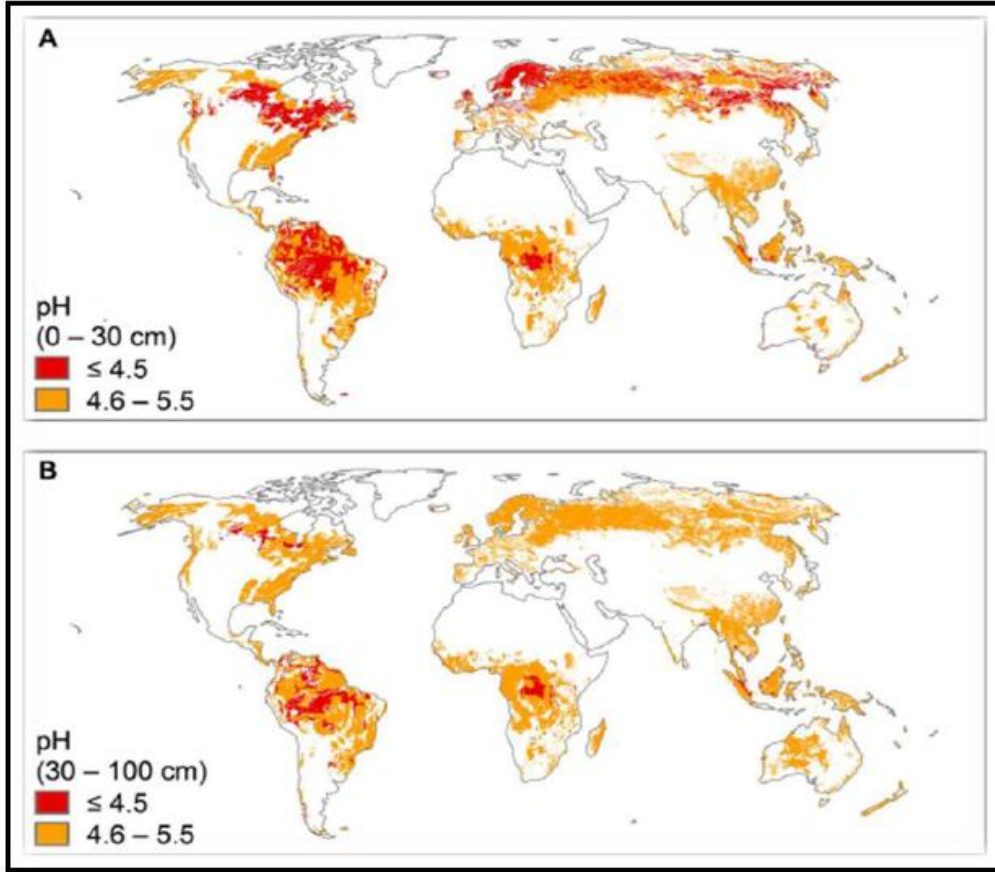
PHÖ'nün göstergelerinden biri olan DNA fragmentasyonunun belirlenmesi için, genomik DNA agaroz jel elektroforezinde yürütülür. PHÖ'ye uğramayan hücrelerde genomik DNA'nın jelde ilerlemediği, PHÖ'ye uğrayan örneklerde ise, fragmente olmuş farklı büyüklüklerdeki DNA parçalarının jelde farklı hızlarda ilerleyerek basamaklı bir görüntü oluşturduğu gözlemlenmiştir (Yanık ve ark., 2018). Yanık ve ark. (2015), nanopartikül stresine maruz kalan kök hücrelerinde, zaman ve doz farklılığına bağlı olarak, DNA fragmentasyonunun varlığını jel elektroforezi yöntemini kullanarak tespit etmişlerdir. Yaptıkları bir diğer çalışmada ise, farklı Gramineae türlerinde, Al toksisitesinin PHÖ'nün ilk olarak kaçınıcı saatte başladığını tespit etmek için agaroz jel elektroforez yöntemini kullanmışlardır. Bu çalışma sonucunda Al toksisitesinin tritikale, arpa, çavdar ve yulafta ilk 2 saat içinde DNA fragmentasyonuna sebep olduğunu gözlemlemişlerdir (Vardar ve ark., 2016). DNA hasarı belirlemede kullanılan bir diğer teknik ise Tek Hücre Jel Elektroforez (Komet) tekniğidir. Bu teknik, DNA sarmal kırıklarının tespiti için kullanılan bir tekniktir. Alkali ortamda farklı molekül ağırlıklarına ve elektrik yükü içeren DNA'nın, elektriksel alanda farklı hareket etmeleri gerçeğine dayanır (Fidan ve ark., 2008). Vardar ve ark. (2015) buğday, çavdar ve tritikalede Al toksisitesi sonucunda ilk 15 dakikada DNA kırıkları sonucunda oluşan kuyruk oluşumunu komet tekniği ile göstermişlerdir.

Bitki hücrelerinde, hayvan hücrelerindeki kaspaz aktivitelerine benzer aktivitelerin keşfedildiği daha önce belirtilmişti. Çoğu bilim insanı bitki hücrelerinde, özellikle abiyotik stres koşulları altında oluşan kaspaz benzeri aktiviteleri kaspaz-1 (YVAD), kaspaz-3 (DEVD), kaspaz-8 (IETD) ve kaspaz-9 (LEHD) substratları ile kolorimetrik ve florometrik olarak ölçmüştür (Yanık ve ark., 2018). Aynı zamanda hayvan hücrelerinde olduğu gibi bitki hücrelerinde de mitokondriyal permeabilite geçiş (MPT) porlarının oksidatif stres ve Ca^{2+}

tarafından uyarılması sonucu açılmasıyla birlikte, sitokrom c ve diğer matriks proteinleri sitozole salınır ve bu da PHÖ'ye sebep olur (Panda ve ark; 2008). Panda ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada, Al stresine maruz bıraktıkları tütün bitkisinin hücrelerindeki, mitokondriyal değişimleri gözlemlemişlerdir. Bu çalışma sonucunda, hücrede ROT miktarının artması ile mitokondri iç zarı potansiyelinde bazı değişimlerin meydana geldiğini ve bunun sonucunda sitozole sitokrom c'nin salındığını tespit etmişlerdir.

1.4.Alüminyum Toksisitesi ve Bitkiler Üzerindeki Etkisi

Yeryüzünde bitkiler için tehlike oluşturan en yaygın metal toksisitelerinden birisi Alüminyum (Al) toksisitesidir (Vitorello ve ark., 2005). Al toksisitesi yalnızca asidik topraklarda karşılaşılabilen bir durumdur. Dünyadaki ekilebilir toprakların yaklaşık %30'unun asidik olması yerkabuğunda yoğun olarak bulunan kompleks Al bileşiklerinin çözünerek bitkiler tarafından alınmasına yol açmaktadır (Von Uexküll ve ark., 1995). Asidik topraklar çoğunlukla, gıda üretiminin kritik olduğu Güney Amerika, Orta Afrika, Güneydoğu Asya gibi az gelişmiş ülkelerde yer almaktadır (Vitorello ve ark., 2005). Tropikal bölgelerde toprak asiditesi, doğal bir durumdur; ancak ılıman bölgelerde bu durum hızla büyüyen bir problem haline gelmektedir. Bunun yanında ABD, Kanada ve Avrupa gibi endüstrinin gelişmiş olduğu bölgelerde asit yağmurları topraktaki Al'nin çözünmesine sebep olmaktadır (Vitorello ve ark., 2005). Asidik topraklar dünya genelinde özellikle tahıl üretimini olumsuz yönde etkilemektedir (Silva ve ark., 2012). Tüm bu sebeplerden dolayı, Al toksisitesi karşımıza çözülmesi gereken, göz ardı edilemeyecek bir problem olarak çıkmaktadır.



Şekil 1.5.: Dünyadaki toprakların pH'sındaki değişimler **A.** Toprak yüzeyinin (0-30 cm) pH dağılımı, **B.** Yüzeyin altındaki toprağın (30-100 cm) pH dağılımı. Kuvvetli asit topraklar: pH $\leq 4,5$, orta derecede asitli topraklar: pH 4,6 - 5,5 (Kaval, 2016).

Alüminyum, oksijen ve silikondan sonra toprakta en fazla bulunan üçüncü elementtir (Silva ve ark., 2012). Asidik koşullar altında toprak minerallerinden ayrıldığında, genellikle $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Al}(\text{OH})^{3+}$ ve $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})^{3+}$ formlarında bulunur ve bu durum Al toksisitesine sebep olur (Singh ve ark., 2017). Uygun koşullarda, Al doğada en az toksik olan formlarında yer alır, örneğin; alüminosilikat veya killi topraklarda alüminyum oksit formunda bulunur; fakat toprağın asiditesi normalin üzerine çıktığında, bu bileşikler çözünebilir hale gelir ve bu durum bitkilerde toksisiteye sebep olabilir (Vitorello ve ark., 2005).

Al^{3+} toksisitesi, alüminyumun bitkilerde metal toksisitesine sebep olduğu tespit edilen en yaygın formudur. Asidik toprakta, çözünebilir Al^{3+} 'ün birçok hücresel komponentle güçlü bağlar kurabildiği gözlenmiştir (Singh ve ark., 2017). Al stresinden olumsuz etkilenen hücresel komponentler ve süreçlerden bazıları şunlardır; nukleus, hücre bölünmesi, plazma membranının yapısı, Ca^{2+} ve diğer iyonların alımı, fosfoionisitid aracılı sinyal iletimi ve sitoplazmik kalsiyum homeostazisi, hücre iskeleti ve oksidatif stres (Vardar ve ark., 2007).

1.4.1. Alüminyum Toksisitesinin Bitki Kökleri Üzerindeki Etkileri ve Mekanizmaları

Al bitkide tohum çimlenmesini etkilemez, ancak kök ve gövde gelişimini olumsuz yönde etkileyebilir (Nosko ve ark., 1988). Al toksisitesinin en belirgin göstergesi, kök gelişiminin azalmasıdır; mikromolarlık konsantrasyonlardaki Al'ye maruz kalsa bile, bitkinin kök gelişimindeki azalma ilk 30 dakikada gözlemlenebilir (Vardar ve ark., 2007).

Başlarda, Al toksisitesine maruz kalan birçok bitkinin kök uçlarında mitotik aktivitenin düştüğü tespit edilmiştir (Frantzios ve ark., 2001; Doncheva ve ark., 2005; Li ve ark., 2008). Daha sonraki yıllarda Yi ve ark. (2010) yaptıkları bir çalışmada, *Vicia faba* bitkisinin köklerini Al toksisitesine maruz bıraktıklarında, köklerde mitoz boyunca anormal süreçlerin işlediğini ve mikronükleus oluşumlarının meydana geldiğini tespit etmişlerdir (Yi ve ark., 2010). Yapılan bir başka çalışmada ise Al toksisitesine maruz kalan buğday köklerinde kromozom anormalliklerine rastlanmıştır (Bulanova ve ark., 2001).

Bitki ve Al arasındaki ilk etkileşim, Al'nin bitkiye nüfuz edişiyle gerçekleşir; bitki Al'yi topraktan kökleri ile alır (Singh ve ark., 2017). Topraktan absorbe edilen Al'nin bir kısmı, kök şapkası ve meristematik bölgeden nüfuz eder; ancak büyük bir kısmı epidermis ve korteks aracılığıyla içeri girer ve apoplazmik ve simplazmik hedeflerle etkileşime girer (Rout ve ark., 2001).

Al toksisitesinin ilk hedefi, hücre çeperidir (Singh ve ark., 2017). Bitki Al'ye maruz kaldıktan sonra Al, çoğunlukla hücre çeperinin pektik matriksine bağlanır, bu bağı negatif yüklü karboksil gruplarıyla kurar (Blamey ve ark., 1993). Al birikiminin az veya çok olması, hücre tipine bağlıdır; hücre duvarının pektinlerindeki karboksilik ve hidroksilik grupların ayrışma derecesi ile ilişkilidir (Godbold ve ark., 1998). Al alımının en fazla göze çarpan etkisi, kökler tarafından besin alımının ve su ile çözünmüş maddelerin apoplazma boyunca taşınmasında düşüşüne sebep olmasıdır (Singh ve ark., 2017). Bitkinin su ve besin alımının sınırlandırılması ise tüm bitkinin büyümesini sınırlandırır.

Al, hücre membranının lipidlerine bağlanarak, membranın elektrik potansiyelini değiştirebilir, bununla beraber kök hücrelerinin iyon taşımakla görevli proteinlerini direkt olarak tıkayarak iyon hareketlerini de etkileyebilir. Aynı zamanda Ca^{+2} , Mg^{+2} ve K^{+} gibi katyonların, köklerden alınımını azaltarak bitkinin büyüme ve gelişmesini olumsuz bir şekilde etkilemektedir (Kaval, 2016).

Al alımının hücrede oluşturduğu en önemli olumsuz etkilerden biri lipid peroksidasyonudur. Arpa (Guo ve ark., 2004), darı (Peixoto ve ark., 1999), tritikale (Liu ve ark., 2008), pirinç (Kuo ve ark., 2003) ve buğday (Hossain ve ark., 2005) gibi birçok bitki

üzerinde yapılan çalışmada Al toksisitesinin hücre membranının lipidlerinde peroksidatif hasara sebep olduğu tespit edilmiştir. Bitkilerde, aerobik metabolizmanın sonucu olarak, O_2^- ve H_2O_2 gibi ROT'lar bulunur (Peixoto ve ark., 1999). Normal koşullar altında, ROT'lar hücrelere zarar vermemeleri için, hücresel bir mekanizma sayesinde, örneğin; bazı enzimler ve antioksidanlar yardımıyla, belli bir seviyenin altında tutulur (Scandalios ve ark., 1993).

Yapılan çalışmalar, Al'nin genotoksik bir etkiye sahip olduğunu ve uzun süre maruz kalmaları durumunda bitkilerin DNA'larında bir takım değişimlerin meydana gelebileceğini göstermiştir (Singh ve ark., 2017). Alüminyum etkileşimi hücre duvarı, hücre membranı, DNA yapısı ve aktivitesi üzerinde tehlikeli sonuçlar açığa çıkarabilir (Gupta ve ark., 2013). Al aynı zamanda DNA'nın çift zincirli heliks yapısının rijiditeyi artırarak DNA replikasyonunu kısıtlayabilir (Gupta ve ark., 2013).



2. MATERİYAL ve YÖNTEM

2.1. Bitki Materyali

2.1.1. Arpa (*Hordeum vulgare* L.)

Tez çalışmamızda zamana bağımlı olarak Al toksisitesinin şiddetinin belirlenebilmesi için Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nün (Ankara) tescilli arpa (*Hordeum vulgare* L.) tohumunun Çetin 2000 çeşidi kullanıldı. Arpa'nın taksonomik sınıflandırması Şekil 2.1.'de ve arpa Çetin 2000 çeşidinin tarımsal özellikleri Tablo 2.1.'de gösterildi.



Alt âlem:	Tracheobionta (Damarlı bitkiler)
Üst bölüm:	Spermatophyta
Bölüm:	Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)
Sınıf:	Liliopsida (Tek çenekliler)
Alt sınıf:	Commelinidae
Takım:	Poales
Familiya:	Poaceae
Alt familiya:	Pooideae
Oymak:	Triticeae
Cins:	<i>Hordeum</i>
Tür:	<i>Hordeum vulgare</i> L.

Şekil 2.1. *Hordeum vulgare* L. (arpa)'nın sistematikteki yeri.

Tablo 2.1. *Hordeum vulgare* L. Çetin 2000 (arpa)’nın tarımsal özellikleri (<https://arastirma.tarim.gov.tr/tarlabitkileri/Sayfalar/Detay.aspx?SayfaId=26>).

Genel özellikler	
Tescil Yılı	2000
Morfolojik Özellikleri	6 sıralı, geniş ve uzun başaklı, kılçıklı, geniş koyu yapraklı, kavuzlu, beyaz daneli, 95-110 cm boyunda
Tarımsal Özellikleri	Kışlık, yatmaya dayanıklı, kardeşlenme kapasitesi yüksek, suya ve azota tepkisi iyi, yüksek biyolojik verimli, orta-geççi, başak kırılıcılığı olmayan ve kolay harmanlanabilir
Verim Özellikleri	Destek sulamalı koşullarda 450-550 kg/da
Teknolojik Özellikleri	1000 dane ağırlığı 38-40 g
Protein Oranı	% 11-13
Hastalık Durumu	Arpa yaprak lekesi, arpa çizgili yaprak lekesi ve kar küfü hastalıklarına dayanıklı
Ekimi Tavsiye Edilen Bölgeler	İç Anadolu ve Geçit Bölgelerinin yüksek alanlarındaki, arpa yetiştirilen /yarı taban ve destek sulama yapılan alanlarına yalın ve Fiğ ile karışımlarda tavsiye edilir.

2.1.2. Arpa tohumlarının sterilizasyonu ve çimlendirme şartları

Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü’nden (Ankara) elde edilen arpa tohumlarından görünüşü düzgün olan ve yakışık aynı boyutlardakiler seçildi. Sterilizasyon için tohumlar ticari olarak satılan sodyum hipoklorit çözeltisinde (%1) 10 dakika bekletildi. Daha sonra birkaç kez distile sudan geçirildi. Her bir petri kabında (15cm) 20 adet arpa tohumu, otoklavda steril edilmiş ve içlerinde distile su ile nemlendirilmiş filtre kağıdı üzerinde 36 saat karanlıkta çimlendirmeye bırakıldı. Yaklaşık 0.5-1 cm boyundaki köklere sahip çimlenmiş tohumlar çalışma materyali olarak seçildi.

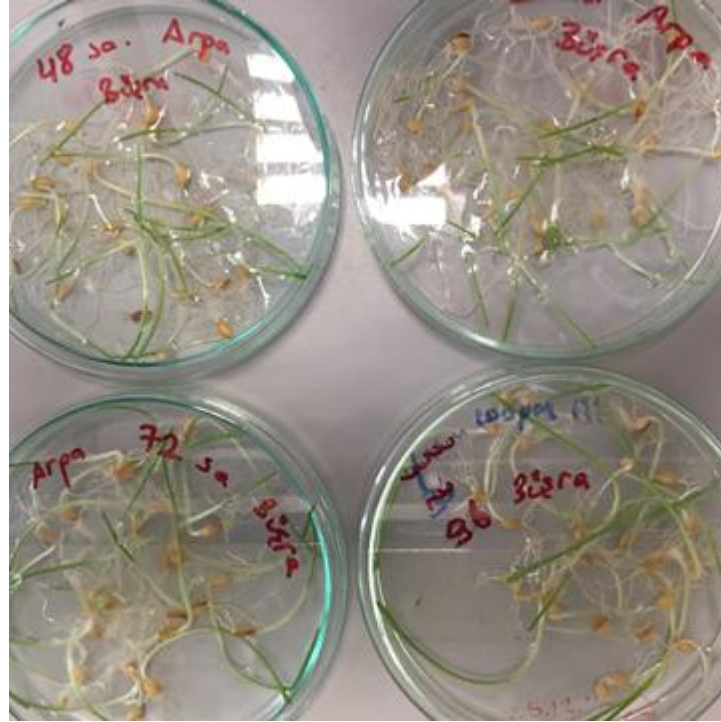
2.1.3. Alüminyum çözeltisinin uygulanması

Yaklaşık olarak 0.5-1 cm boyları arasındaki arpa köklerine önceki çalışmalardan yola çıkılarak (Vardar ve ark., 2016; Yalçın ve Vardar, 2016) 100 μ M $AlCl_3$ çözeltisi uygulandı. Uygulamaya başlamadan önce, stok ve çalışma çözeltileri hazırlandı (Tablo 2.2). 20 adet çimlenmiş arpa fidesi bulunan her bir petri kabına stoktan seyreltilerek hazırlanmış çözeltiler eklendi. Örnekler 0 (kontrol), 1/2, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca 100 μ M $AlCl_3$ çözeltisi içerisinde bekletildi (Şekil 2.2). Her saate ait

uygulama grubu ve analiz metodu en az 3 kez tekrarlandı. Kontrol ve 24 saatten fazla süren uygulama gruplarının çözeltileri her gün tazeşi ile değıştirildi.

Tablo 2.2. Alüminyum içeren stok ve çalışma çözeltilerinin hazırlanışı.

Çözelti	Konsantrasyon	Hazırlanışı
Stok Çözeltisi	100 mM $AlCl_3$	13.334 gr $AlCl_3.6H_2O$ üzerine son hacim 100mL olacak şekilde distile su eklendi. $+4^{\circ}C$ 'de buzdolabında saklandı.
Çalışma Çözeltisi	100 μ M $AlCl_3$	500 μ L stok 100 mM $AlCl_3$ çözeltisinden alınarak 500 mL distile suya tamamlandı. Daha sonra çözeltinin pH'sı 4.5'te sabitlendi. $+4^{\circ}C$ 'de buzdolabında saklandı.



Şekil 2.2.: 100 μ M $AlCl_3$ 'te bekletilen arpa (*H. vulgare*) tohumları

2.2. Araştırma Yöntemleri

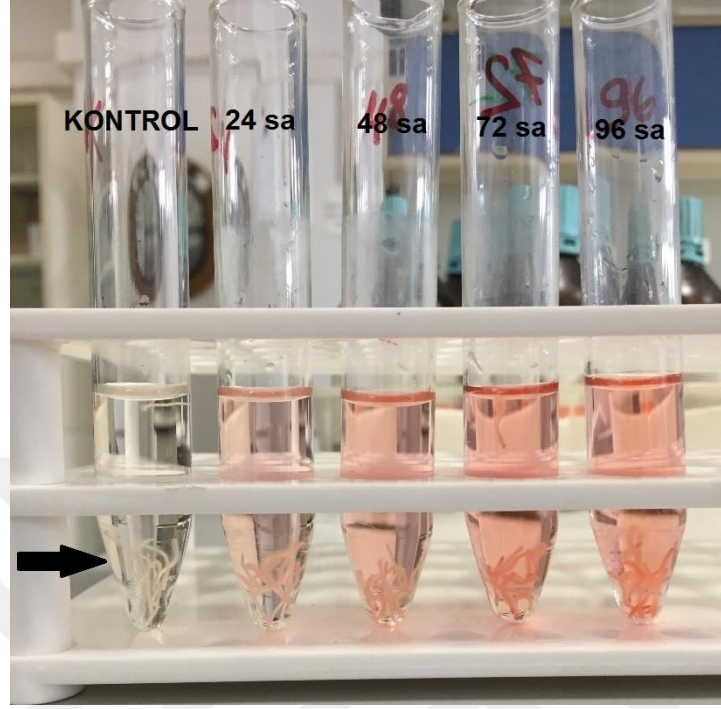
2.2.1. Sitokimyasal yöntemler

2.2.1.1. Al^{+3} iyon alınımının tayini

Arpa köklerinde Al^{+3} iyonlarının miktarının belirlenmesi için hematoksilen ile boyama yöntemi uygulandı (Ownby, 1993). Bunun için kontrol ve her bir uygulama grubundaki kökler, yüzeye adsorbe olmuş iyonların giderilmesi için 10 dakika süresince akan su altında yıkandı. Yıkanmış kontrol ve uygulama gruplarına ait 10'ar adet kök %2 hematoksilen ve %0.02 KIO_3 (Tablo 2.3) içeren tüplerde oda sıcaklığında, karanlıkta 15 dakika boyanmaya bırakıldı. Boyanan köklerdeki fazla boyanın uzaklaştırılması için kökler 10 dakika distile su içerisinde çalkalandı. Bu aşama sonrasında 1 cm'lik kök uçları kesilerek yeni tüplere alındı ve üzerine 4ml 1N HCl eklendi (Şekil 2.3). 1 saat sonra kökler solüsyon içerisinde pens yardımı ile alındı. Geriye kalan çözelti dalga boyu 490 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri kontrol grubu ve uygulama grupları arasında karşılaştırılarak değerlendirildi.

Tablo 2.3. Hematoksilen çözeltisinin hazırlanışı

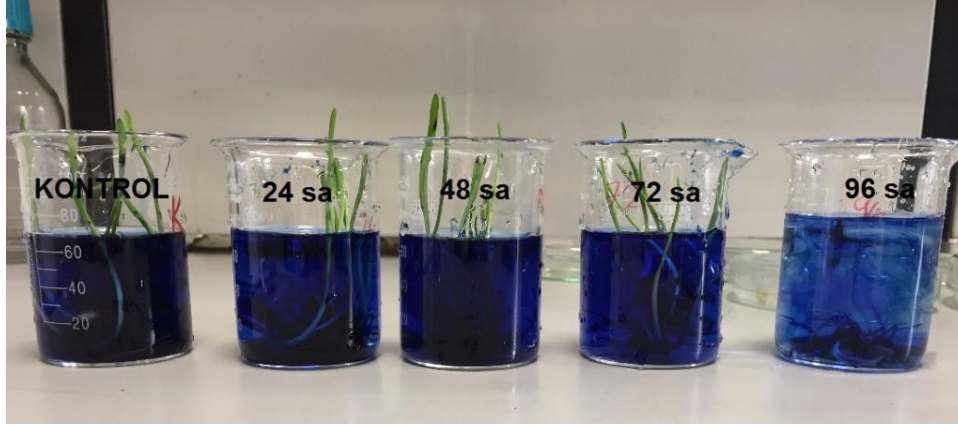
Adı	Konsantrasyonu	Hazırlanışı
Hematoksilen	%2	100 ml dH ₂ O içerisinde toz haldeki 2 gr hematoksilen çözülür.
KIO₃	%0.02	Hematoksilen çözeltisine toz haldeki 0.02 gr KIO ₃ eklenir. Çözeltinin iyice karışması için alüminyum folyo ile kaplı haldeyken manyetik karıştırıcıda iyice karıştırıldı. Daha sonra +4°C'de buzdolabında saklandı.



Şekil 2.3. 1N HCl içerisinde bekletilen kontrol ve uygulama (24, 48, 72 ve 96 sa) gruplarına ait arpa kökleri (ok).

2.2.1.2. Hücre zarının bütünlüğünün bozulması

Al toksisitesi nedeniyle arpa köklerinde meydana gelen hücre tahribatın seviyesi Schützendübel ve arkadaşlarının (2001) yöntemi kullanılarak belirlendi. Kontrol ve uygulama gruplarına ait arpa köklerin boyanması için %0,25'lik Evans mavisi hazırlandı (Tablo 2.4). Kontrol ve uygulama grubuna ait 1 cm uzunluğundaki arpa kökleri 30 dakika Evans mavisi çözeltisinde bekletildi. Daha sonra kökler distile su içerisinde boyanın fazlasının giderilmesi için iyice çalkalandı. Her bir gruba ait 15'er adet 1'er cm'lik kök uçları kesilerek 1.5 ml %1 SDS (sodyum dodesil sülfat) içerisinde havanda homojenize edildi (Şekil 2.4). Mikrosantrifüj tüplerine alınan homojenatlar 10 dakika boyunca 13.500 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üst sıvı dalga boyunda 600 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede ölçüldü. Kontrol ve uygulama gruplarının absorbans değerleri birbirleriyle karşılaştırılarak değerlendirildi.



Şekil 2.4.: Evans mavisi içerisinde bekletilen kontrol ve uygulama (24, 48, 72 ve 96 sa) gruplarına ait arpa kökleri.

Tablo 2.4. Evans mavisinin hazırlanışı.

Çözelti	Konsantrasyon	Hazırlanışı
Evans mavisi	% 0.25	100 ml dH ₂ O içerisinde 0.25 gr toz haldeki Evans mavisi çözüldü. Solüsyon +4°C’de buzdolabında saklandı.

2.2.1.3.Lipid peroksidasyonunun analizi

Lipid peroksidasyonu analizi Çakmak ve arkadaşlarının (1991) yöntemine göre yapıldı. Kontrol ve uygulama gruplarına ait arpa köklerinden 0,2 gr tartılarak, 1 ml %0,1 trikloroasetik asit (TCA) ile soğuk havanda homojenize edildi. Elde edilen homojenat mikrosantrifüj tüplerine alınarak 12.000 g hızında 20 dakika +4°C’de santrifüj edildi. Süpernatant malondialdehit (MDA) kaynağı olarak kullanıldı. İçerisinde 1 ml %20 (w/v) TCA’da hazırlanmış %0,6 tiobarbitürük asit (TBA) içeren tüplere 250 µl süpernatant konuldu. Kapağı iğne ile delinen tüpler 95°C’lik ısıtma tablasında 30 dakika bekletildi. Daha sonra buz içerisinde 30 dakika bekletildi. Tüpler tekrar 12.000 rpm hızında 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantın absorbansı spektrofotometrede 532 ve 600 nm’de ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formülde kullanılarak MDA miktarı hesaplandı.

$$MDA = (\Delta 532 - \Delta 600)/1.56 \times 10^5$$

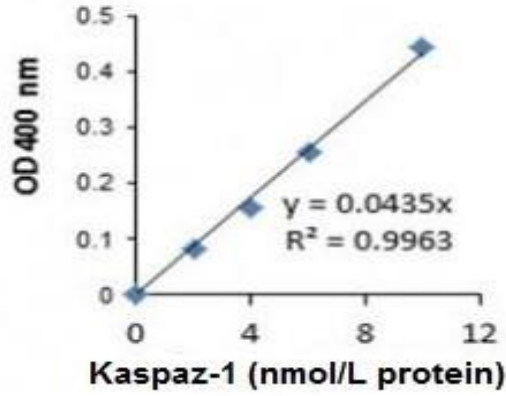
2.2.1.4. Kaspaz-1 benzeri enzimlerin analizi

Kaspaz-1 benzeri enzim aktivitesinin belirlenmesi için Kaspaz-1/ICE Kolorimetrik Proteaz Analiz Kiti (ENZO) kullanıldı. Bu kit içerisinde hayvanlardaki kaspaz-1 enziminin substratı olan YVAD tespit etmek için kullanılmaktadır. Bu analiz, chromophore *p*-nitroanilide (*p*NA) ile işaretlenmiş olan substrat YVAD- *p*NA'nın kaspaz-1 ile kesildikten sonra *p*NA bölgesinin spektrofotometrik olarak tespitine dayanan bir yöntemdir.

Kontrol ve uygulama gruplarına ait 0,3 gr (~30 adet) kök 1 ml ekstraksiyon tamponu (Tablo 2.5) içerisinde soğuk havanda homojenize edildi. Tüp içerisine alınan homojenatlar 10 dk buzda bekletildikten sonra 14.000 rpm'de 10 dk boyunca +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant alındıktan sonra nanodrop ile protein miktarı ölçüldü. Protein miktarlarının eşitlenmesi için gerekli sulandırmalar yapıldı. 200 µl hacimli kuyu içeren plakalara kontrol ve uygulama örneklerinden 50'şer µl konuldu. Kör için örnek yerine 50 µl distile su konuldu. Daha sonra tüm kuyucukların üzerlerine 50 µl DTT-2X reaksiyon tamponu karışımı eklendi. Son olarak karanlık ortamda 5 µl işaretli YVAD substratı konuldu. Plaka 37°C'lik etüv içerisinde 90 bekletildi. Daha sonra mikropilaka okuyucusunda 400 nm'de ölçüm yapıldı. Elde edilen absorbans değerleri standart eğride ($y=0.0435x$) yerine konularak kaspaz-1 miktarları belirlendi (Şekil 2.5).

Tablo 2.5.: Kaspaz-1 benzeri enzim analizinde kullanılan çözeltilerin içeriği ve hazırlanışı.

Solusyon Adı	Solusyon İçeriği	Hazırlanışı
Ekstraksiyon Tamponu	50 mM HEPES-KOH (pH 7) %10 süktroz %0.1 CHAPS 5 mM DTT 1 mM EDTA	100 ml tampon için 11,9 gr HEPES tartıldı. Distile su içerisinde çözündükten sonra 10 N KOH ile pH ayarı yapıldı. Daha sonra üzerine 0,077 gr DTT, 0,037 gr EDTA, 10 gr sukroz ve 0.1 gr CHAPS eklendi. Homojen bir karışım elde edildikten sonra çözelti 100 ml'ye tamamlandı. +4°C'de buzdolabında saklandı.
DTT-2X reaksiyon tamponu	2X reaksiyon tamponu (hazır) 10 mM DTT (hazır)	1 ml 2X reaksiyon tamponuna 10 µl DTT eklendi. Solüsyon +4°C'de buzdolabında saklandı

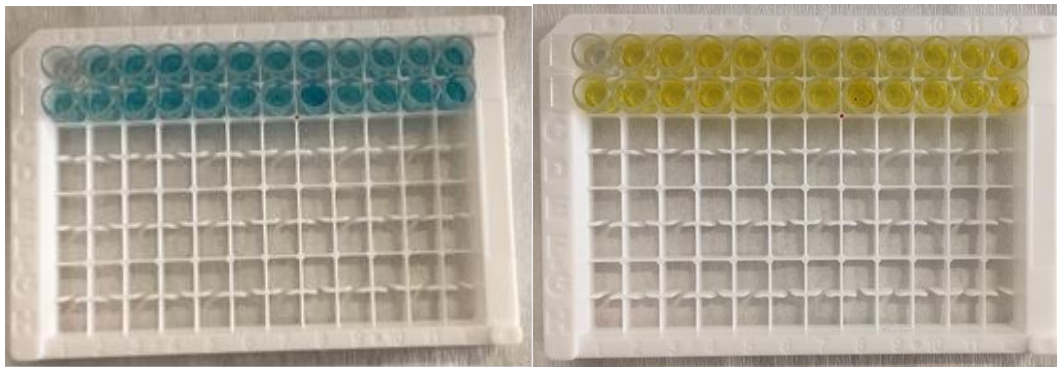


Şekil 2.5. Kaspaz-1 aktivitesi için kullanılan standart eğri.

2.2.1.5. Sitokrom C miktarının analizi

Kontrol ve uygulama gruplarındaki sitoplazmik ve mitokondriyal Sitokrom C (Cyt c) miktarı MyBioSource marka Plant Cytochrome C (CytC) ELISA Kit kullanılarak belirlendi.

Bu amaçla kontrol ve uygulama gruplarından 0,2 gr kök alınıp, 2 ml 0.1 M fosfat tamponu (PBS, pH 7.7) içerisinde homojenize edildi. +4°C'de 3000 rpm hızında 15 dakika santrifüj edildi ve pellet atılıp süpernatant tekrar 15 dakika, 16000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üst sıvı sitoplazmik faz, pellet ise mitokondriyal faz olarak etiketlendi. Mitokondriyal protein içeren pellet üzerine 200 µl PBS eklendi ve çözündürüldü. 200 µl hacimli kuyu içeren plakalara kontrol ve uygulama örnekleri için sitoplazmik ve mitokondriyal olmak üzere 2'şer grup oluşturuldu. Her bir örnekten kuyucuklara 50'şer µl konuldu. Kör için örnek yerine 50 µl distile su konuldu. Daha sonra her bir kuyuya 100 µl HRP-konjugat ayırıcı eklendi. Plaka kapatma membranı ile üstü kapatılarak, 37°C'ye ayarlanmış etüvde 60 dakika bekletildi. Örnekler etüvden alınarak yıkama solüsyonu ile dört kez yıkandı. Daha sonra karanlık ortamda her birine 50 µl kromojen A çözeltisi ve 50 µl kromojen B çözeltisi eklendi. Tekrar üzerleri membran ile kapatılarak 37°C sıcaklıkta 15 dakika bekletildi (Şekil 2.6). Daha sonra her bir kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklendi ve 5 dakika içerisinde mikroparka okuyucusunda 450 nm'de ölçüm yapıldı. Elde edilen absorbans değerleri kit içerisinde hazır olarak sunulan standartların absorbans değerlerine göre mikroparka okuyucusunda otomatik olarak hesaplanarak sitokrom c miktarları belirlendi.



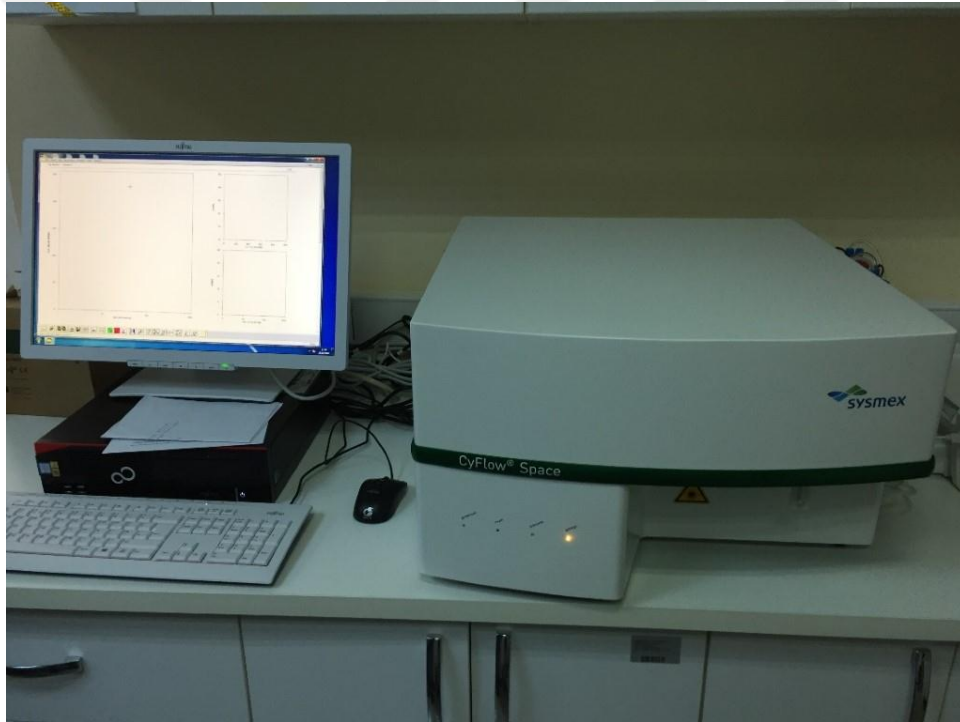
-a-

-b-

Şekil 2.6.:a-Kromojen solüsyonu içeren kör ve örnek kuyucukları,b- Durdurma solüsyonu eklendikten sonra kör ve örnek kuyucukları (A1 Kör; A2-B12 Örnekler).

2.2.1.6. Akım sitometrisi (flow cytometry) yöntemi ile DNA fragmentasyonunun belirlenmesi

Bu deneyde kullanılan *CyStain[®] UV Precise P* kiti, farklı bitki türleri ve bitkisel dokuların, genom büyüklüğü ve ploidi seviyesini tespit etmek amacıyla nukleus ekstraksiyonu ve DNA boyamasında kullanılan bir belirteç kitidir. Kontrol ve uygulama gruplarına ait arpa köklerinden 1 cm uzunluğunda 6'şar adet kök steril petri kabı içerisinde 0.4 ml Çekirdek Ekstraksiyon Tamponu (*Nuclei Extraction Buffer*) eklenerek jilet yardımı ile parçalandı. Pipet yardımı ile tüplere alınan ekstre üzerine nukleus boyaması için 1.6 ml DAPI eklendi. 1-2 dakika buzun üzerinde bekletildikten sonra izole edilmiş nukleuslar filtreden geçirilerek deney tüplerine koyuldu. 1-2 dakika bekletildikten sonra, Sysmex marka akım sitometrisi cihazı ile DNA fragmentasyonu analizi gerçekleştirildi (Şekil 2.7).



Şekil 2.7.: DNA fragmentasyonunun belirlendiği Sysmex marka akım sitometrisi cihazı

2.2.1.7. İstatistiksel analizler

Kontrol ve uygulama gruplarına ait deney gruplarından elde edilen biyokimyasal parametrelerin Excel programında (Microsoft Office 2010) ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı. Elde edilen deneysel veriler SPSS 13.0 paket programında bağımsız grup T testi $p < 0,05$ düzeyinde (%5) anlamlılık derecesine göre hesaplandı.

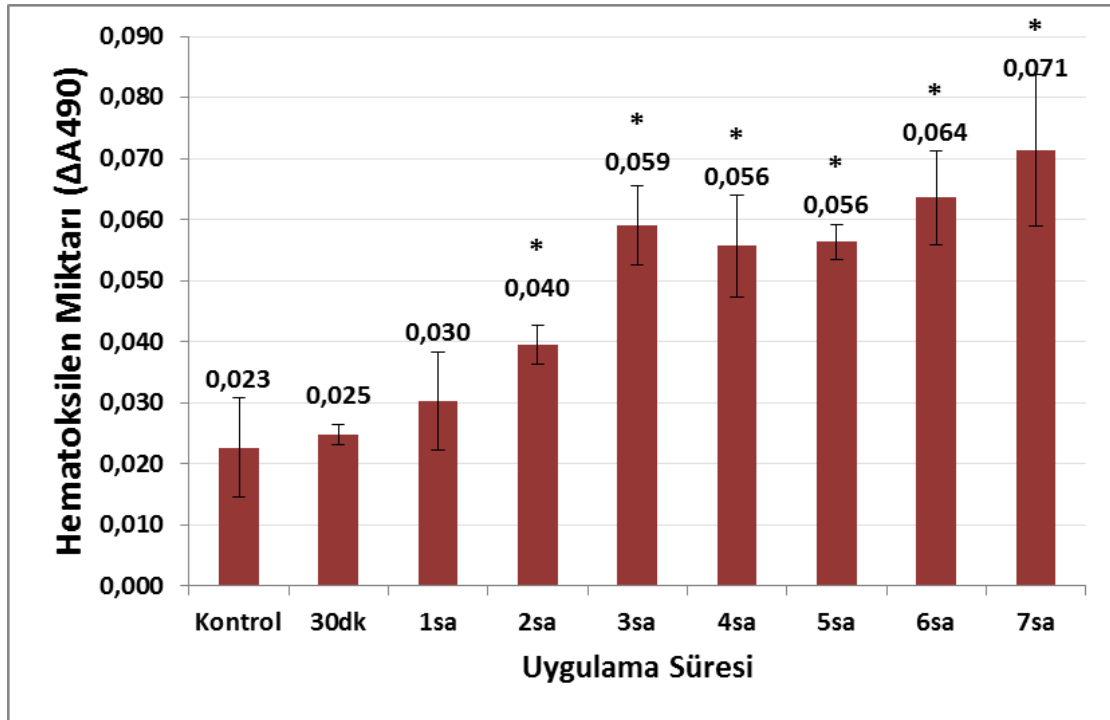
3. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında zamana bağımlı olarak Al toksisitesinin şiddetinin belirlenmesi amacıyla çimlenmiş arpa kökleri 0 (kontrol), ½, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca 100 µM AlCl₃ çözeltisi içerisinde bekletildi. Kontrol ve uygulama gruplarına ait köklerden Al iyon birikimi, plazma zarının bütünlüğünün bozulması, lipid peroksidasyonu, kaspaz-1 benzeri aktiviteler, mitokondriden sitokrom c salınımı ve DNA fragmentasyonu analizleri gerçekleştirildi.

3.1. Arpa Köklerinde Al⁺³ İyon Birikimi

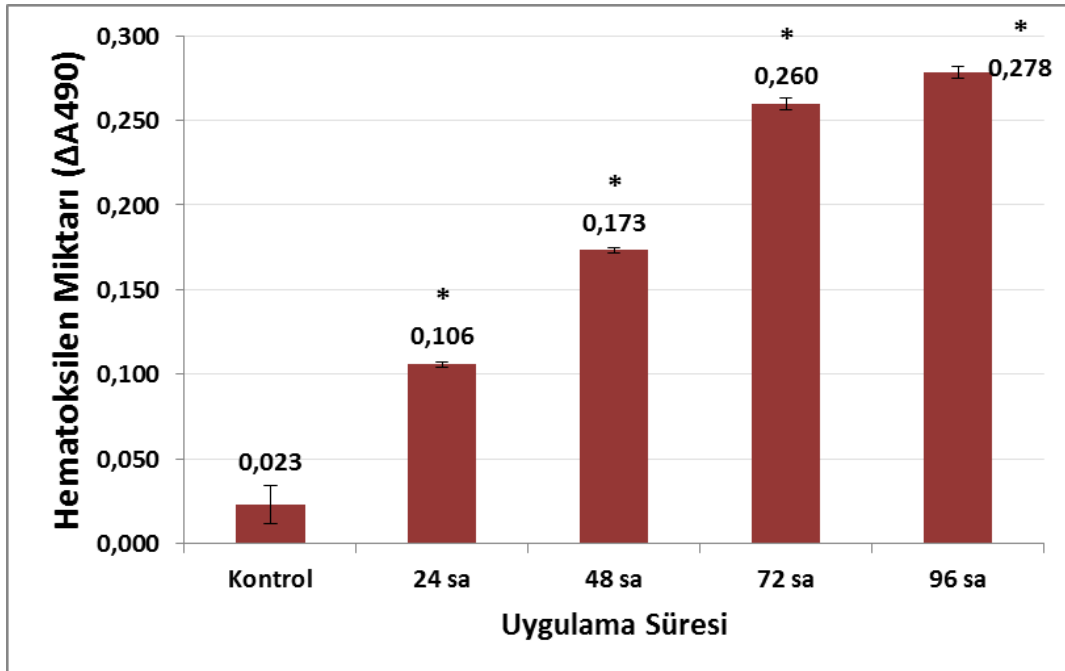
Bitkilerde kök uçları Al⁺³ iyonlarının en fazla alınıp biriktiği bölgedir. Yapılan çalışmalara göre Al⁺³ iyonlarının kökün en dış tabakası olan korteks (kabuk) bölgesinde epidermis ve parankima dokularına ait hücreler tarafından alınmaktadır (Vardar ve ark., 2011). Bitki kökleri tarafından alınan Al⁺³ iyonlarının miktarı morfolojik, sitolojik veya biyokimyasal yöntemler ile belirlenebilir. Bun yöntemlerden biri de hematoksilen ile boyama yöntemidir. Bu yöntemin temelinde hematoksilen boyası mordan (metal veya metalleri bağlayan madde) gibi davranarak Al iyonlarını bağlar ve koyu mor renkli hemateine okside olur.

Çalışmamızda kontrol, kısa süreli uygulama (½, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 sa) ve uzun süreli uygulama (24, 48, 72 ve 96 sa) gruplarına ait bitki kökleri, AlCl₃ stresine maruz kaldıktan sonra hematoksilen ile boyandı ve spektrofotometrik olarak ölçüm alındı. Elde edilen sonuçlara göre kontrol ve kısa süreli Al uygulaması sonrasında kontrole göre kökler tarafından alınan Al miktarı 3 saate kadar sırasıyla %8.7, %30.4 ve %73.9 oranında artmıştır. Ancak 3. saat ve sonrasında Al iyon alımı büyük artış göstermiştir. 3, 4 ve 5. saatlerde Al alımı yaklaşık olarak 1.5 kat artarken, 6. ve 7. saatlerde Al alımı 1.8 ve 2.1 kat oranında artmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1.: Kontrol ve kısa süreli AlCl_3 uygulaması sonucunda arpa köklerindeki Al^{+3} iyon alımı ($\pm\text{SS}$, * $p<0,05$).

Kontrol ve uzun süreli Al uygulaması sonrasında ise kontrole göre kökler tarafından alınan Al miktarı kısa süreli uygulamaya göre çok daha fazla artmıştır. Elde edilen sonuçlara göre Al alınımlı 24 saat sonra 4.6 kat, 48 saat sonra 7.5 kat, 72 saat sonra 11.3 ve 96 saat sonra ise 12.1 kat artış göstermiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2.: Kontrol ve uzun süreli AlCl_3 uygulaması sonucunda arpa köklerindeki Al^{+3} iyon alımı ($\pm\text{SS}$, * $p<0,05$).

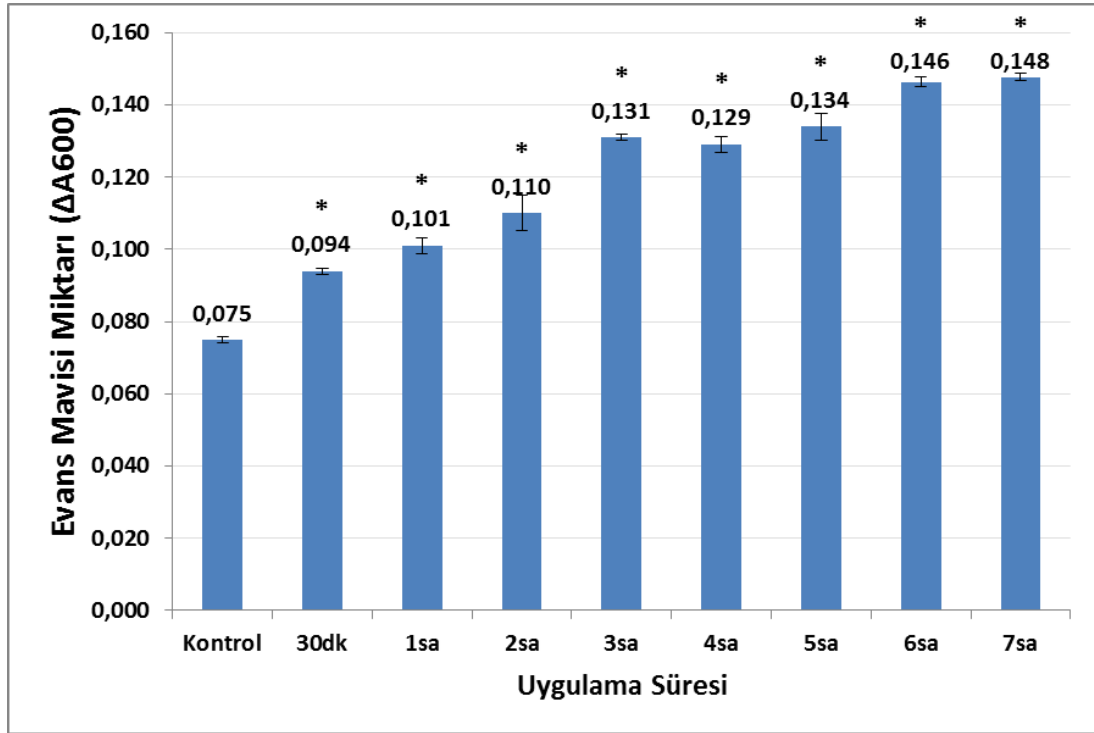
Birçok araştırmacı Al toksisitesi ile ilgili çalışmalarda hematoksilen kullanılarak birçok türe ait hedef organ köklerde morfolojik (Giaveno ve Filho, 2000), histokimyasal (Yamamoto ve ark., 2001; Vardar ve ark., 2011) ve biyokimyasal analiz yoluyla (Achary ve ark., 2012) Al^{+3} iyonlarının birikimini belirlemişlerdir.

Achary ve ark. (2012) yaptıkları bir çalışmada, arpa köklerini 12 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (0 mM, 2.5mM, 5 mM ve 10 mM) $AlCl_3$ stresine maruz bırakmışlardır ve konsantrasyon arttıkça bitki köklerindeki hücrelerde Al birikiminin arttığını tespit etmişlerdir. Doncheva ve ark. (2005) ise mısır bitkisi ile yaptıkları bir çalışmada, Al'ye hassas ve Al'ye toleranslı mısır bitkilerini 50 μM 'lık $AlCl_3$ stresine maruz bırakmışlardır. Sonuç olarak Al'ye hassas olan bitki hücrelerinde daha fazla Al birikiminin olduğunu tespit etmişlerdir (Doncheva ve ark., 2005). Yapılan diğer birçok çalışma da, Al stresi arttıkça bitki hücrelerinde Al birikiminin arttığını göstermekte ve elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir (Wang ve ark., 2009; Yao ve ark., 2016; Riaz ve ark., 2018).

3.2. Arpa Köklerinde Plazma Zarı Bütünlüğünün Belirlenmesi

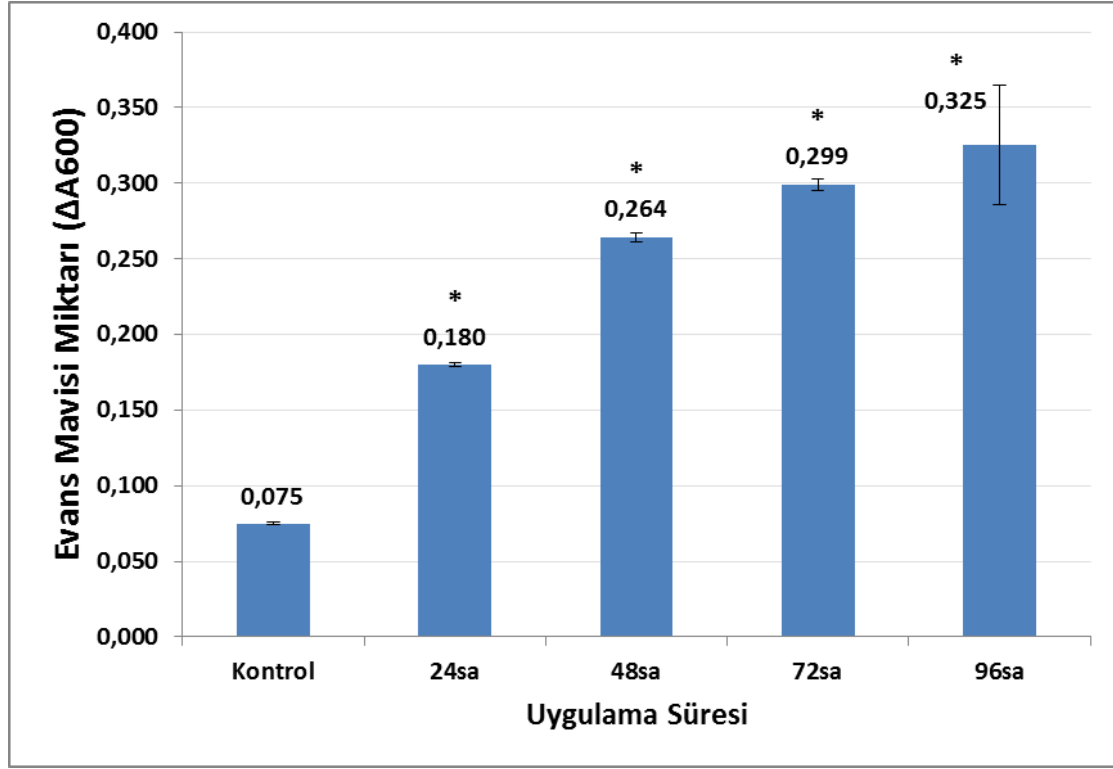
Büyük molekülü bir boya olan Evans mavisi zarar görmemiş hücre zarlarında içeri giremediği için hücre dışında kalır. Hücre zarının herhangi bir sebeple zarar görmesi ile birlikte zarda oluşan gediklerden hücre içerisine nüfuz eder. Evans mavisinin bu özelliğinden faydalanılarak birçok çalışmada canlı ve ölü hücreler, boyanın alınımı karşılaştırılarak morfolojik, sitolojik veya biyokimyasal yöntemlerle birbirinden ayrı edilebilir. Bunun yanında Evans mavisi programlı hücre ölümü sırasında gerçekleşen hücre zarlarında oluşan bozulmaların ve şiddetinin belirlenmesinde de indikatör olarak kullanılır. Bu tez çalışmasında Al toksisitesi sonucunda oluşan hücre ölümünün şiddetinin saptanması için kontrol, kısa ve uzun uygulama gruplarına ait arpa kökleri Evans mavisi ile boyandı.

Elde edilen spektrofotometrik sonuçlara göre kontrol ve kısa süreli Al uygulaması sonrasında kontrole göre kökler tarafından alınan Evans mavisi miktarı sırasıyla %25.3, %34.6, %46.7, %74.7, %72, %78.7, %94.7 ve %97.3 oranında artış göstermiştir (Şekil 3.3.). tüm gruplarda hücre zarının bütünlüğünün bozulması ve hücre ölümü zaman bağımlı olarak artış göstermiş, en fazla artış ise 6 ve 7. saatlerde belirlenmiştir.



Şekil 3.3.: Kontrol ve kısa süreli AlCl_3 uygulaması sonucunda arpa köklerindeki Evans mavisi alınımı ($\pm\text{SS}$, $*p<0,05$).

Kontrol ve uzun süreli Al uygulaması sonrasında ise kontrole göre kökler tarafından alınan Evans mavisi miktarı kısa süreli uygulamaya göre daha fazla artış göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre Evans mavisi alınımı 24 saat sonra 2.4 kat, 48 saat sonra 3.5 kat, 72 saat sonra 4 ve 96 saat sonra ise 4.3 kat artmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4.: Kontrol ve uzun süreli $AlCl_3$ uygulaması sonucunda arpa köklerindeki Evans mavisi alınımı ($\pm$ SS, * $p < 0,05$).

Xu ve ark. (2012) yaptıkları bir çalışmada, 30 μM $AlCl_3$ 'e maruz bırakılan buğday kök uçlarında hücre zarı bütünlüğünün bozulduğunu Evans mavisi ile tespit etmişlerdir. Kariya ve ark. (2018) ise, 50 μM $AlCl_3$ stresine maruz bıraktıkları tütün kök ucunda, 24 saat sonunda plazma zarı bütünlüğünün bozulmasında, kontrol grubuna nazaran artış olduğunu aynı yöntemle belirlemişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada ise, süspansiyon kültüründeki tütün hücreleri, farklı konsantrasyonlarda (50 μM , 100 μM ve 150 μM) $AlCl_3$ 'e maruz bırakılmış ve kontolle karşılaştırıldığında en yüksek Evans mavisi alımının 150 μM 'lık uygulama grubunda gerçekleştiği ortaya çıkarılmıştır (Ikegawa ve ark., 2012). Elde ettiğimiz sonuçlarla da uyumlu olarak yapılan birçok abiyotik stres ilişkili hücre ölümü çalışmasında Evans mavisi yöntemi kullanılmış ve hücre ölümü ilişkili hücre zarı bütünlüğünün bozulması

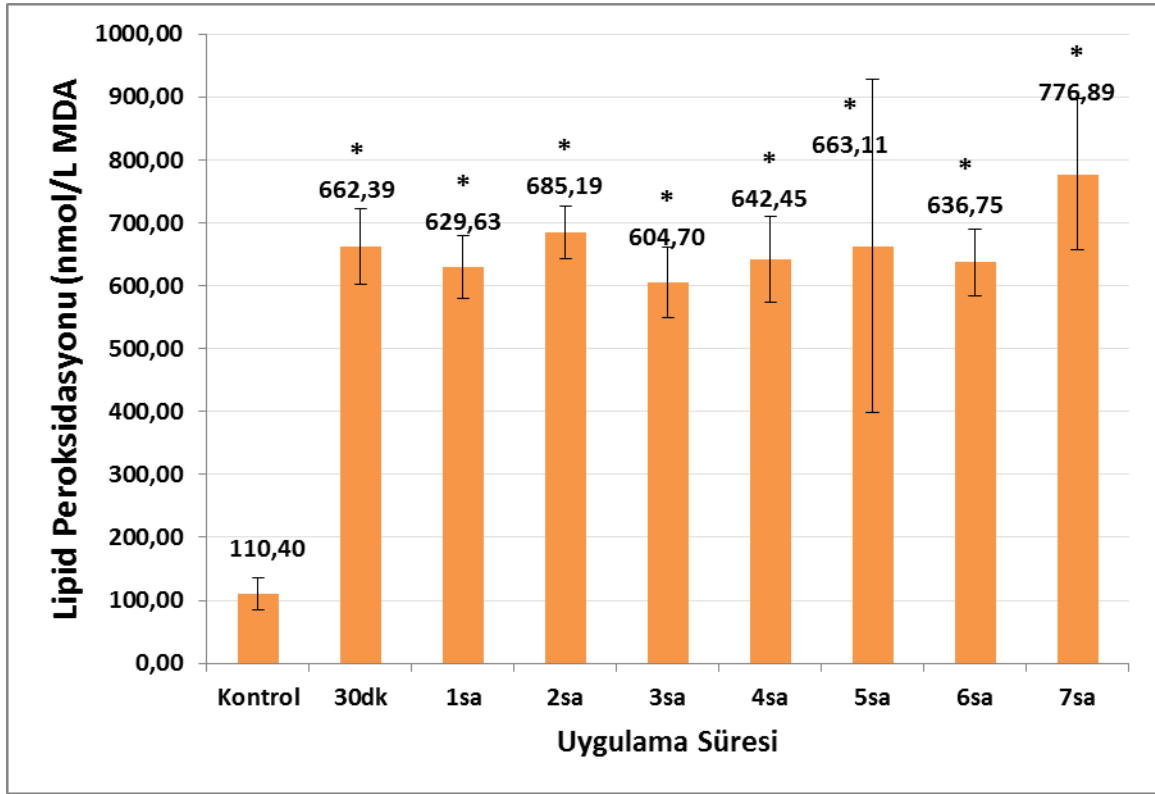
ve şiddetinin arttığı gösterilmiştir (Abdel-Basset ve ark., 2010; Yamamoto ve ark., 2001; Kariya ve ark., 2013; Danon ve ark., 2004; Motoda ve ark., 2010).

3.3. Arpa Köklerinde Lipid Peroksidasyonu Analizi

Reaktif oksijen türleri (ROT) solunum ve fotosentez gibi rutin enerji dönüşümleri sırasında, non-radikal (radikal olmayan) bir atom veya molekülden bir elektron ayrılmasıyla veya bir elektron eklenmesiyle oluşan ve hücrede en yoğun rastlanan serbest radikallerdir. Bu radikaller diğer moleküllerden elektron alabildikleri veya elektron verebildikleri için hücre içerisinde indirgeyici veya oksitleyici (yükseltgeyici) olarak rol alırlar (Van Breusegem ve Dat, 2006; Flora, 2007). ROT'lar bitkilerde normal büyüme-gelişme sürecinde de sentezlenmektedirler. Ancak hücredeki antioksidan mekanizmanın serbest radikal miktarını dengelemesi sayesinde hücreye zararlı etki oluşturmamadan hızlıca yok edilirler (Levitt, 1972). Hücre içerisinde sık rastlanan reaktif oksijen türleri tekli (singlet) oksijen (1O_2), süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^\cdot$)'dir (Gutteridge ve Halliwell, 1990).

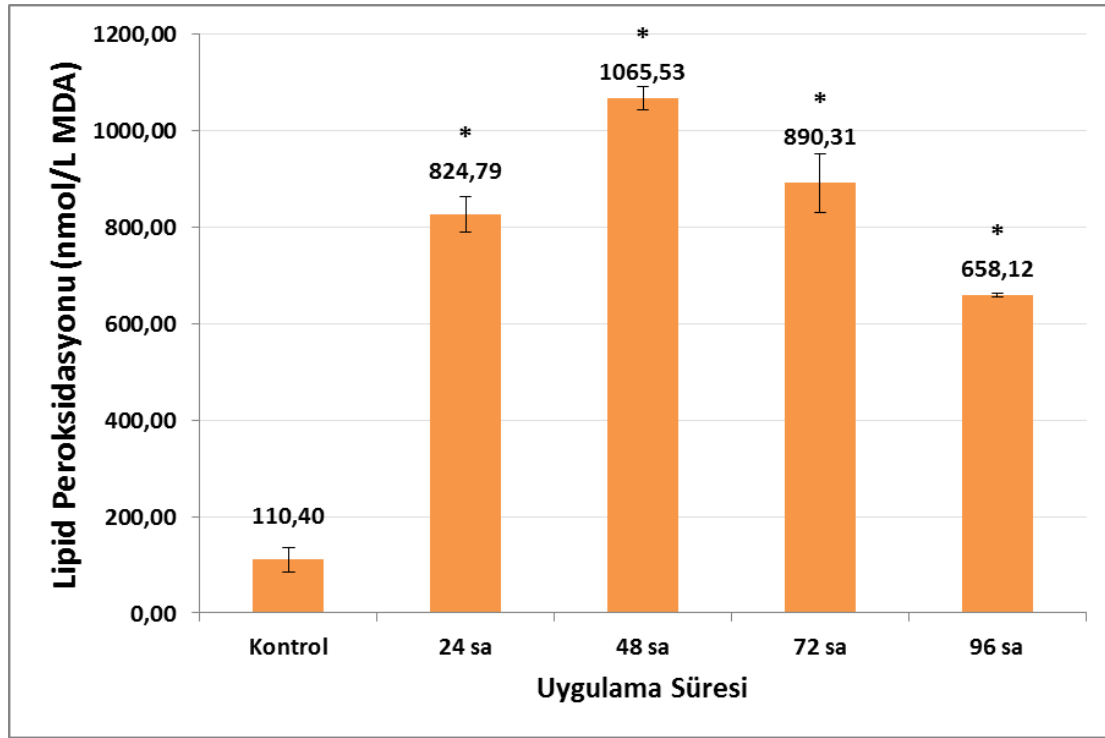
Düşük konsantrasyonlu ROT'lar biyotik-abiyotik stres toleransı dahil birçok hücre içi reaksiyonda sekonder mesajcılar olarak da rol oynamaktadırlar. Bitkilerde kuraklık, osmotik değişimler, donma, sıcaklık, ağır metal, UV ışınlar gibi abiyotik stres faktörleri altında ROT üretimi genellikle toksik seviyede artış göstermektedir. Hücre içerisinde ROT miktarının çok fazla artması antioksidan savunma ile aralarındaki dengenin bozulması bitkide oksidatif stres oluşumuna neden olmaktadır. Biyotik veya abiyotik stres koşulu altında ROT sentezinin kontrolsüz artışı hücrede lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, nükleik asit hasarı, enzim inhibisyonu gibi hasarlara neden olur. Uzun vadede bu hasarların tamir edilememesi ise programlı hücre ölümüne sebep olur (Smirnoff, 1993; Büyük ve ark., 2012).

ROT'ların biyolojik sistemlerdeki en önemli etkileri lipidler üzerindedir ve bu durum lipid peroksidasyonu olarak adlandırılır. Bu olay hücrelerdeki birim zarların fosfolipidlerinin yükseltgenerek peroksit türevlerine dönüşmesi olarak tanımlanabilir (Yarsan, 1999). Lipid peroksidasyonu olayının zincir reaksiyonları sonucunda son ürün olarak aldehidler, ketonlar, alkanlar, alkenler ve karboksilik asitler gibi çeşitli ürünler oluşur. Bu olay sonucunda açığa çıkan malondialdehid (MDA) gibi son ürünler spektrofotometrik ölçümler ile belirlenip lipid peroksidasyonunun şiddeti ortaya çıkarılabilir. Hücrede peroksidasyon sonucu açığa çıkan son ürünlerden özellikle MDA ve hidroksinonenal (HNE) mutajenik etki göstermektedir.



Şekil 3.5.: Kontrol ve kısa süreli $AlCl_3$ uygulaması sonucunda arpa köklerindeki Lipid peroksidasyonu ($\pm SS$, $*p<0,05$).

Çalışmamızda elde edilen spektrofotometrik sonuçlara göre kontrol ve kısa süreli Al uygulaması sonrasında lipid peroksidasyonuna bağlı MDA üretimi 30 dakikalık uygulamadan itibaren tüm saatlerde 6-7 kat artış göstermiştir. En yüksek artış kontrole göre 7 saatlik uygulamada 7 kat artış olarak gözlenmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.6.: Kontrol ve uzun süreli $AlCl_3$ uygulaması sonucunda arpa köklerindeki Lipid peroksidasyonu ($\pm SS$, * $p < 0,05$).

Kontrol ve uzun süreli Al uygulaması sonrasında ise kontrole göre tüm saatlerde MDA miktarında artış gözlemlendiği halde 72 ve 96 saatlik uygulamalarda bir miktar düşüş belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 24 saat sonra 7.5 kat, 48 saat sonra 9.7, 72 saat sonra 8.1 kat ve 96 saat sonra 6 kat artış göstermiştir (Şekil 3.6).

Lipid peroksidasyonu, bir radikal zincir reaksiyonudur ve membran bütünlüğünün bozulmasına sebep olabilir (Rath ve Barz, 2000). Toprakta en çok bulunan element olan Al ise, bitki hücrelerinde ROT'un normalin üzerinde üretilmesine ve bunun sonucunda da lipid peroksidasyonunun oluşmasına sebep olur (Rath ve Barz, 2000; Xu ve ark., 2012). Xu ve ark. (2012) yaptıkları bir çalışmada, Al stresinde buğday kök uçlarında lipid peroksidasyonunda artış meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada ise, soya fasülyesinde Al stresinde lipid peroksidasyonunda artış olduğu gözlenmiştir (Du ve ark., 2010). Bunların dışında yapılan birçok çalışmada, Al stresi gibi diğer abiyotik stres koşullarında, bitki hücrelerinde lipid peroksidasyonunun arttığını destekleyen veriler elde edilmiştir (Çakmak ve ark., 1991; Neto ve ark., 2006; Shen ve ark., 2014).

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre Al uygulaması arpa köklerinde lipid peroksidasyonunu zamana bağımlı olarak artırmıştır. En yüksek artış 48. saatte

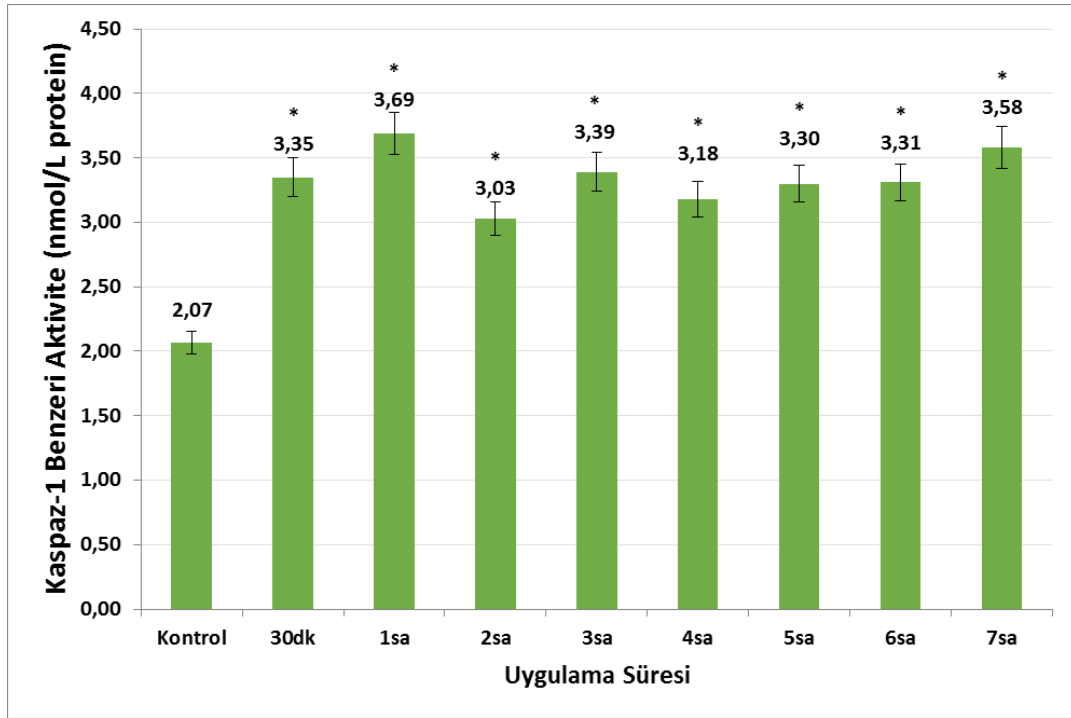
gözlemlenmiştir. Ancak 72 ve 96. Saatlerde diğer uygulamalara göre MDA oluşumunda bir miktar azalma söz konusudur. Bu da ilerleyen stres koşulları altında MDA yerine farklı son ürünlerin meydana gelmesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Evans mavisi alımının analizi ve MDA oluşumunun analizi birlikte ele alındığında, $AlCl_3$ stresinde ilk 30 dakikadan itibaren plazma zarı bütünlüğünün belirgin bir şekilde zarar gördüğü belirlenmiştir. Bu da, Al'nin ilk saatlerden itibaren kök hücreleri üzerinde olumsuz etki oluşturduğunun göstergesidir.

3.4. Arpa Köklerinde Kaspaz-1 Benzeri Enzim Aktiviteleri

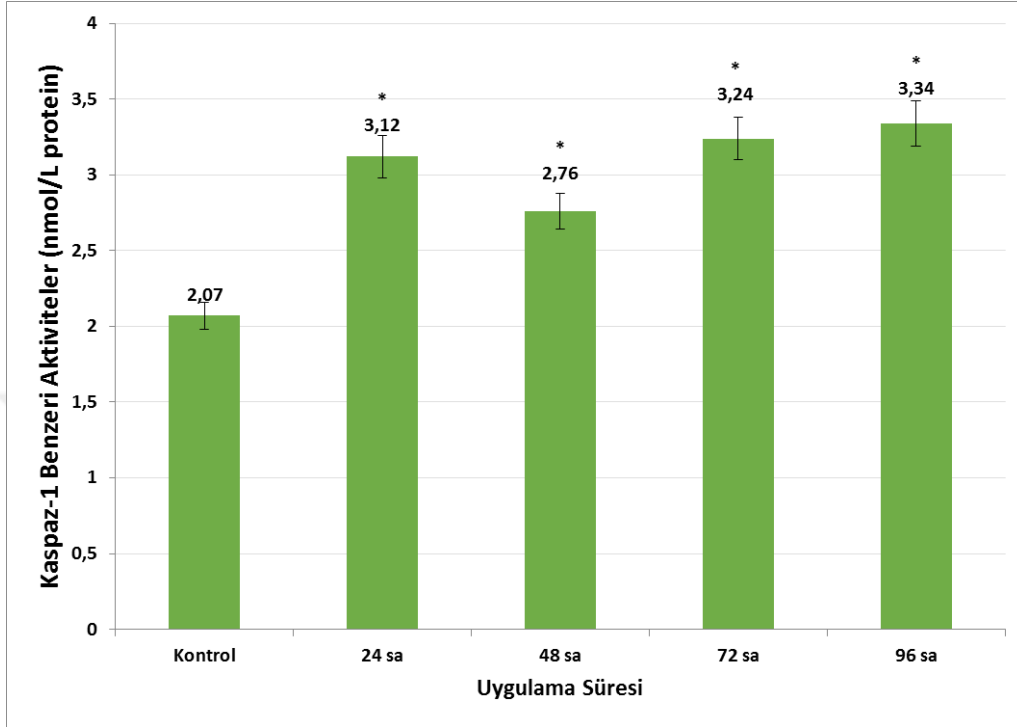
Yapılan çalışmalar bitkilerde PHÖ sırasında VPE'nin hayvanlardaki kaspaz-1 enzimine benzer aktiviteler sergilediği tespit edilmiştir (Hatsugai, 2004; Kuroyanagi, 2005). VPE, normal şartlarda çeşitli vakuoler proteinin olgunlaşmasından sorumlu olan bir sistein proteazdır (Hara-Nishimura, 1991; 1993). Kariya ve ark. (2013), yaptıkları bir çalışmada, Al stresinde tütünde VPE genlerinin ifadesinde, PHÖ ölümü ile ilişkili olarak artış meydana geldiğini belirlemişlerdir. Yine yaptıkları bir başka çalışmada, tütünde Al stresi altında önce VPE1a ve VPE1b genlerinin ifadesinde, daha sonra VPE2 ve VPE3 genlerinin ifadesinde artış olduğunu gözlemlemişlerdir (Kariya ve ark., 2018). Domates ile yapılan bir başka çalışmada ise, Al stresinde bitkide kaspaz benzeri aktivitelere rastlanmıştır (Yakimova ve ark., 2007). Bitkilerde Al stresinde VPE aktivitesine ilişkin biyokimyasal çalışmaya rastlanmamıştır, çalışmalar ağırlıklı olarak gen ifadesine yöneliktir.

Çalışmamızda kaspaz-1 kiti kullanılarak elde edilen spektrofotometrik sonuçlara göre kontrol ve kısa süreli Al uygulaması sonrasında kaspaz-1 benzeri aktiviteler 30 dakikalık uygulamadan itibaren artış gösterdi. Bu artış sırasıyla kontrole göre %61.8, %78.3, %46.4, %63.8, %53.6, %59.4, %59.9 ve %72.9'dur. (Şekil 3.7).



Şekil 3.7.: Kontrol ve kısa süreli $AlCl_3$ uygulaması sonucunda arpa köklerindeki kaspaz-1 benzeri aktiviteler ($\pm SS$, $*p < 0,05$).

Kontrol ve uzun süreli Al uygulaması sonrasında kaspaz-1 benzeri aktiviteler ise sırasıyla kontrole göre %50.1, %33.3, %56.5, %61.4 ve %61.4'dür (Şekil 3.8).



Şekil 3.8.: Kontrol ve uzun süreli $AlCl_3$ uygulaması sonucunda arpa köklerindeki kaspaz-1 benzeri aktiviteler ($\pm SS$, * $p < 0,05$).

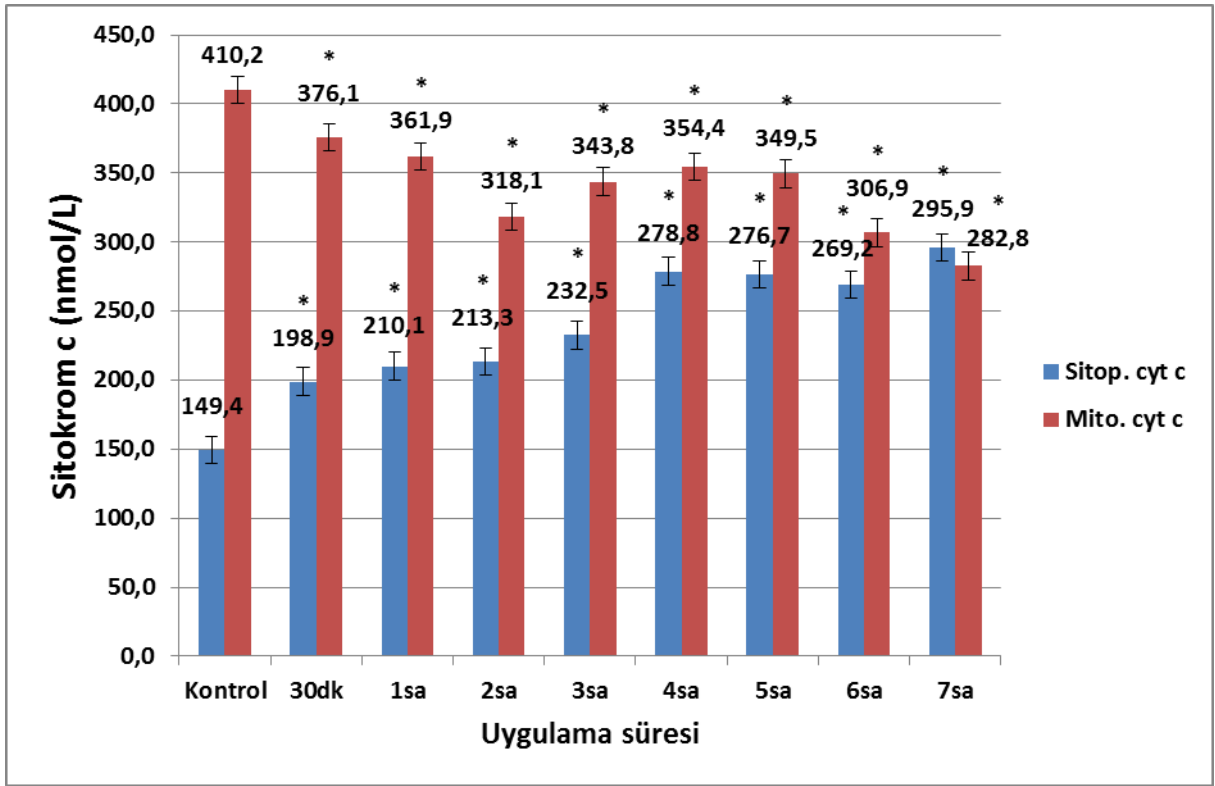
Çalışma sonuçlarımızı destekleyecek şekilde Mendes ve ark. (2013) soya fasülyesinde ER stresi ve osmotik stres altında VPE aktivitesinde artış olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada da, *Arabidopsis thaliana* bitkisinde yüksek sıcaklık stresinde VPE aktivitesine rastlanmıştır (Li ve ark., 2012). Biyotik stres altında da VPE aktivitesine rastlanan çalışmalar da mevcuttur (Rojo ve ark., 2004; Hatsugai ve ark., 2004; Kuroyanagi ve ark., 2005). Tran ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada arpa bitkisinde gelişimsel PHÖ sırasında kaspaz-1 benzeri aktivitelere rastlamışlardır.

3.5. Arpa Köklerinde Mitokondriden Sitoplazmaya Sitokrom c Salınımı

Mitokondri, ökaryotik hücrelerin yaşamında önemli bir role sahiptir. Al stresi de dahil birçok stres faktörü, mitokondriyal yolak üzerinden ortaya çıkan apoptoza yol açar (Huang ve ark., 2014). Mitokondriye bağlı PHÖ'de çoğu zaman MPTP (Mitokondriyal Permeabilite Geçiş Porları-Mitochondrial Permeability Transition Pore)'nin açılmasına bağlı olarak,

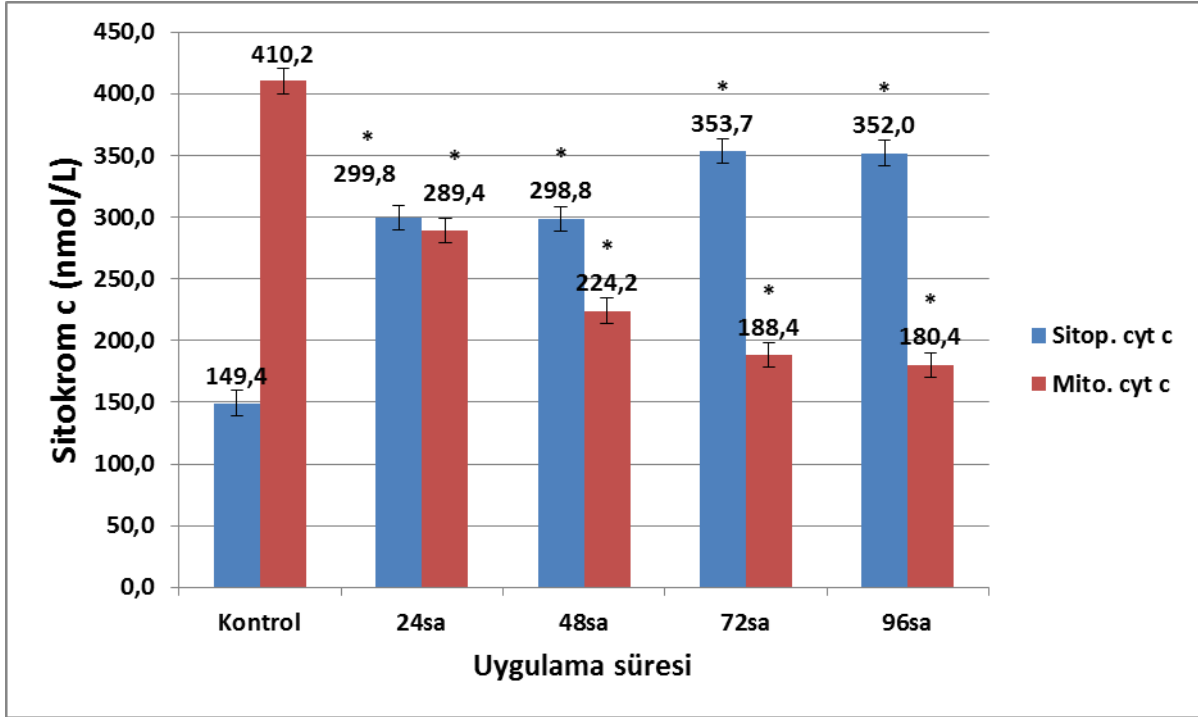
mitokondri iç zarından sitozole sitokrom c salınır. Hayvansal hücrelerde sitozole geçen sitokrom c proteinleri burada Apaf-1 molekülüne bağlanarak kaspazların aktive olmasını sağlarlar (Kim ve ark., 2006). Her ne kadar bitkilerde PHÖ sırasında sitokrom c'nin sitozole salındığı bilinse de sitoplazma içerisinde izlediği yol henüz netleşmemiştir. Dolayısıyla ökaryotik organizmalarda PHÖ analizinde sitoplazmik sitokrom c analizi önemli bir parametredir.

Çalışmamızda elde edilen spektrofotometrik sonuçlara göre, kısa süreli uygulama grubunda sitoplazmadaki sitokrom c miktarı, kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Artış oranları sırasıyla; %33.1, %40.6, %42.8, %55.6, %86.6, %85.2, %80.2, %98.1'dir. En fazla artış 7. saatte gözlenmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9.: Kontrol ve kısa süreli $AlCl_3$ uygulaması sonucunda arpa köklerindeki sitoplazmik ve mitokondriyal sitokrom c miktarları ($\pm$ SS, * $p < 0,05$).

Uzun süreli uygulama grubunda yapılan spektrofotometrik ölçümlere göre ise, sitoplazmadaki sitokrom c miktarında kontrol grubuna göre artış gözlenmiştir. Bu artış sırasıyla; 24 ve 48. saatte 2 kat, 72 ve 96. Saatte 2,4 kat artış göstermiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10.: Kontrol ve uzun süreli $AlCl_3$ uygulaması sonucunda arpa köklerindeki sitoplazmik ve mitokondriyal sitokrom c miktarları ($\pm$ SS, * $p<0,05$).

Elde ettiğimiz sonuçları destekleyecek şekilde Huang ve ark. (2014) yaptıkları bir çalışmada, yer fıstığında Al stresinde sitoplazmada sitokrom c artışı olduğunu western blot yöntemini kullanarak belirlemişlerdir. Yamamoto ve ark. (2008) ise, tütün ile yaptıkları bir çalışmada, Al muamelesi gören tütün hücrelerinin sitoplazmasında sitokrom c miktarının arttığını tespit etmişlerdir (Yamamoto ve ark., 2008). Farklı abiyotik stres koşulları altında yapılan bir başka çalışmada da salatalık bitkisinde sitozole sitokrom c salınımının arttığı, bir başka çalışmada ise buğdayda abiyotik stres koşullarında, sitoplazmada sitokrom c artışı olduğu tespit edilmiştir (Balk ve ark., 1999; Lyubushkina ve ark., 2014).

3.6. Arpa Köklerinde DNA Fragmentasyonu

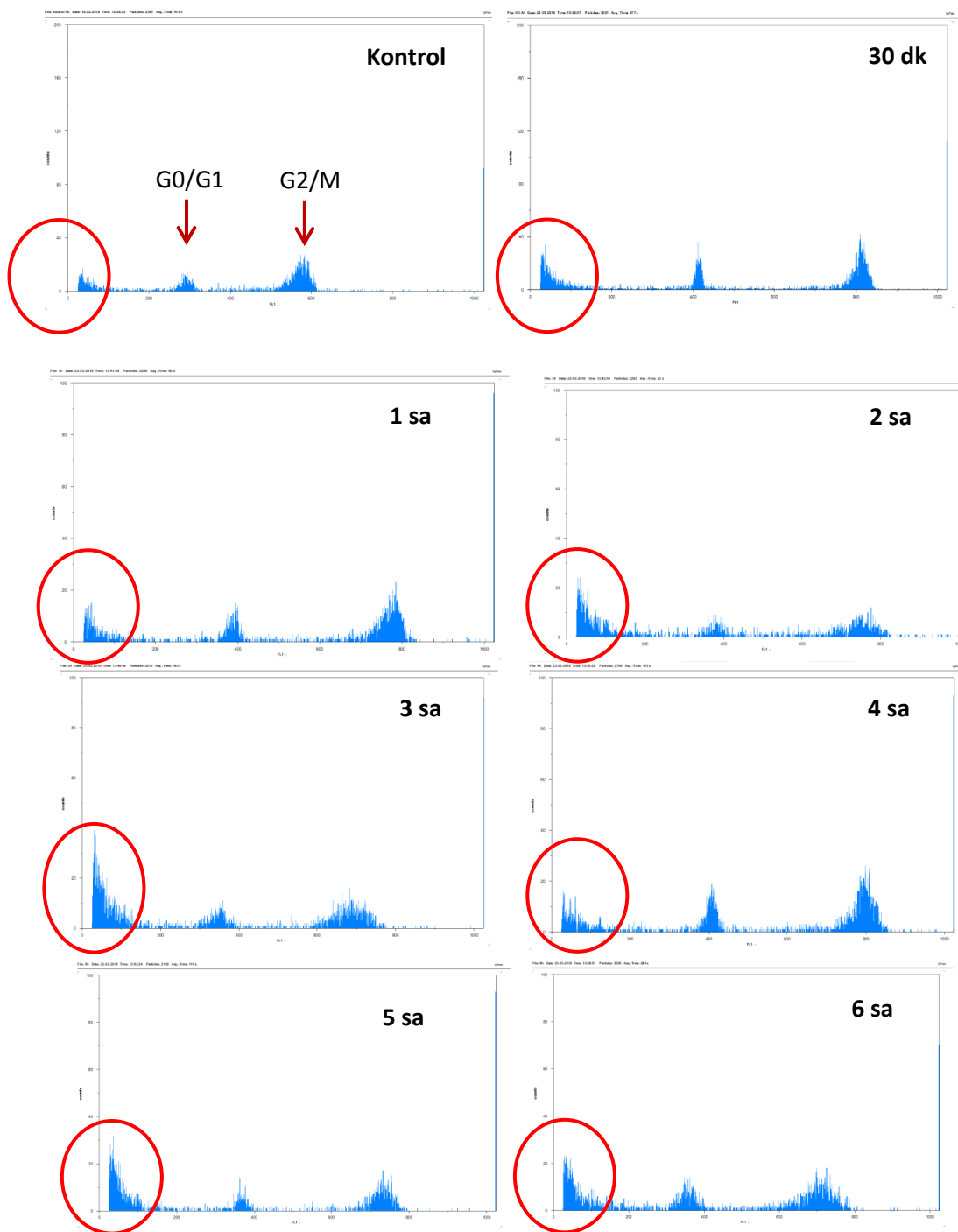
PHÖ, hayvan hücrelerinde olduğu gibi, bitki hücrelerinde de bazı hücresel değişimler ile karakterize olur. Hücredeki ölüm sürecinde meydana gelen en önemli morfolojik değişimlerden biri DNA fragmentasyonudur. Bitki hücresinde PHÖ sırasında, genomik DNA nükleozomlar arası bölgelerden kesilerek fragmente olur ve mikroskobik olarak nukleusta belli bölgelerde yığılmalar halinde gözlemlenir (Kroemer ve ark., 2008; Zimmermann ve ark., 2001).

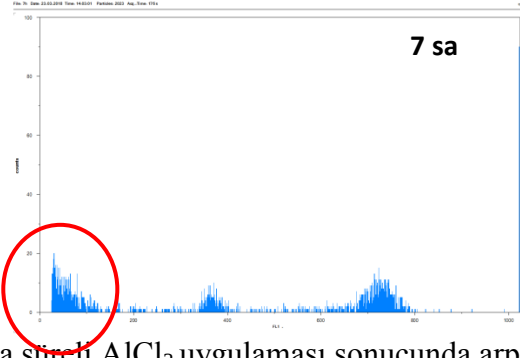
Hücredeki DNA hasarı ve fragmentasyonunun tespit edilebilmesi için birçok yöntem geliştirilmiştir (Tripathi ve ark., 2016). Bu yöntemlerden biri olan Akım Sitometrisi yöntemi, DNA içeriğinin boyanması ile hücre döngüsü analizinin yapılması prensibine dayanır (Shen ve ark., 2017). Hücre döngüsü, hücre bütünlüğünün korunması adına sıkı bir şekilde düzenlenir ve herhangi bir hücre kusurlu ise ve döngüsünü tamamlayamayacak durumda ise, hücre PHÖ'ye doğru gider. Bu durumda hücre DNA'sı oligonükleozomal büyüklüklerde fragmentlere ayrılır. Sonuçta, apoptotik hücrelerdeki DNA içeriği azalmış olur ve bu da Akım Sitometrisi yöntemi ile ölçülebilir. Akım sitometrisi ile DNA ölçümü sırasında ilk pik G0/G1 döngüsünü, ikinci pik ise G2/M döngüsünü göstermektedir. Hücre ölümünün görüldüğü hücrelerde sıfır noktası ile G0/G1 arasında görülen yığılma ise apoptotik DNA yığını ifade eder (Yamamada ve ark., 2006).

Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre kontrol ve kısa süreli Al uygulaması sonrasında 30 dakikalık uygulamadan itibaren DNA fragmentasyonu gözlemlendi. Ancak bu fragmentasyon 3. saatten itibaren daha belirgindi (Şekil 3.11). Uzun süreli Al muamelesinde ise kısa süreli Al muamelesine göre DNA fragmentasyonunda şiddetli artış görüldü (Şekil 3.12).

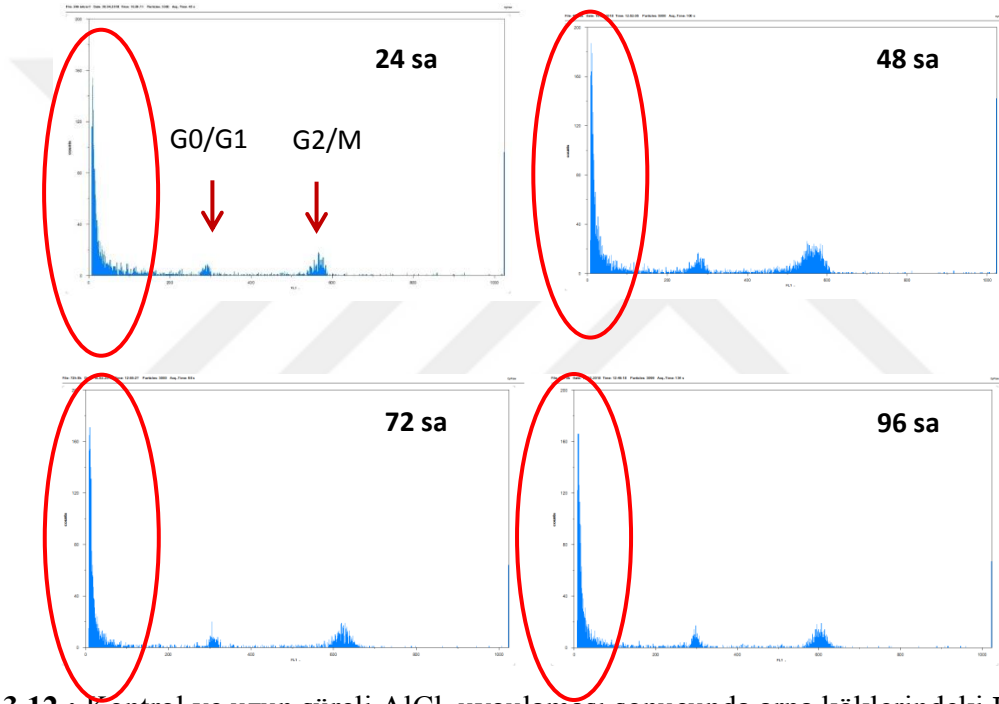
Literatür araştırması yapıldığında akım sitometrisi yöntemi kullanılarak Al toksisitesi sonucu oluşan DNA fragmentasyonu ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak Jaskowiak ve ark. (2018) akım sitometrisi yöntemini kullanarak Al toksisitesinin arpa köklerinin hücre döngüsü üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre arpa köklerinde S fazında DNA replikasyonunun azaldığı, G2/M fazında artış olduğu ancak hücre bölünme frekansının oldukça azaldığı belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçları destekler şekilde Al toksisitesi sonucu oluşan DNA fragmentasyonu Vardar ve ark. (2015, 2016) tarafından komet tekniği ve agaroz jel elektroforezi kullanılarak gösterilmiştir. Her iki çalışmada da araştırmacılar Al toksisitesinin farklı Graminea türlerine ait köklerde ilk 2 saat içerisinde DNA fragmentasyonu oluştuğunu belirlemişlerdir.

Yaptığımız diğer deneysel çalışmalarda, $AlCl_3$ stresine maruz kalan kök hücrelerinde ilk 30 dakikadan itibaren VPE aktivitesinde ve sitoplazmaya sitokrom c salınımında belirgin bir artış olduğunu gözlemledik. Ancak bu hücrelerde DNA fragmentasyonu diğer göstergelere nazaran daha geç belirginleşmiştir. Bu durum, DNA fragmentasyonunun PHÖ yolağında en son aşamada gerçekleşen olaylardan biri olduğunun göstergesidir. Bununla birlikte, hücrenin ilk saatlerde PHÖ'ye karşı bir savunma mekanizması oluşturarak yaşamsal faaliyetlerini sürdürmeye çalıştığını gösteriyor olabilir.





Şekil 3.11.: Kontrol ve kısa süreli $AlCl_3$ uygulaması sonucunda arpa köklerindeki DNA fragmentasyonu.



Şekil 3.12.: Kontrol ve uzun süreli $AlCl_3$ uygulaması sonucunda arpa köklerindeki DNA fragmentasyonu.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Ağır metallerin, bitkilerin gelişimini ve yaşamını olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir. Hızla gelişen sanayi ve artan trafik yoğunluğu, çevredeki ağır metal miktarının artmasına sebep olmaktadır. Bu durum, tüm canlıları olumsuz yönde etkilemekle birlikte, durağan bir doğaları olan bitkilerde ürün kaybı da dahil birçok olumsuz sonuç ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Ağır metaller fiziksel bakımdan yoğunluğu 5 g/cm^3 'ten daha fazla olan metaller şeklinde tanımlanabilmektedir. Yüksek konsantrasyonlara ulaşmış olan bazı ağır metaller bitkileri, dolayısıyla bitkilerle beslenen hayvanları ve insanları olumsuz bir şekilde etkileyebilmektedirler (Okcu ve ark., 2009).

Günlük hayatımızda da yaygın bir şekilde kullanılan alüminyum (Al), oksijen ve silikon elementlerinden sonra toprakta da doğal olarak en fazla bulunan üçüncü (%7) elementtir. Al toksisitesi yalnızca doğal asidik topraklarda ortaya çıkabileceği gibi yoğun olarak sanayileşmiş ülkelerde de çevre kirliliği sonucunda ortaya çıkmaktadır. Dünya üzerindeki ekilebilir toprakların yaklaşık %30'u asidiktir, bu durum yeryüzünde çok fazla bulunan kompleks Al bileşiklerinin çözünmesine ve bitkiler tarafından alınmasına yol açmaktadır (Von Uexküll ve ark., 1995). Al^{+3} toksisitesi, Al'nin bitkilerde metal toksisitesine sebep olduğu tespit edilen en yaygın formudur.

Tarımsal arazilerde toprağın asidite miktarı, yüzeysel kireçleme ile bir miktar iyileştirilebilmektedir, ancak bu yöntem ekonomik olarak zorlayıcıdır ve fiziksel olarak da yetersizdir. Yüzeysel bir şekilde uygulanan kireç, toprağın alt tabakalarına çok yavaş bir şekilde ilerlemektedir. Öte yandan, toprağın fazla kireçlenmesi de bitki gelişiminde olumsuz etkilere sebep olabilmektedir (Wang ve ark., 2006). Al toksisitesinin etkilerinin azaltılabilmesi için daha etkili ve ekonomik yöntemler bulunması gerekmektedir.

Bitkilerde büyüme ve gelişmenin yavaşlaması ve hücrel fonksiyonların bozulması, tarımsal ve ekonomik açıdan önemli olan ürünlerde verimin azalmasına ve kalitenin düşmesine neden olur. Özellikle asidik toprakların bulunduğu bölgelerde yetişen ürünler üzerindeki zararların en düşük seviyeye indirilebilmesi için, Al toksisitesi mekanizmasının aydınlatılması gerekmektedir. Al toksisitesinin mekanizmasının çözülmesine yönelik birçok çalışma mevcuttur, ancak Al ile uyarılmış PHÖ ile ilgili çok az sayıda bulgu vardır.

Bu çalışmada, AlCl_3 bileşiğinin önemli bir agronomik bitki olan *Hordeum vulgare L.* kökleri üzerindeki zaman bağımlı sitokimyasal ve biyokimyasal etkileri incelenerek, Al toksisitesinin bitkide PHÖ üzerindeki etki mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik eksik basamakların tamamlanması amaçlanmıştır. İlgili literatür rehberliğinde, $100 \mu\text{M}$ AlCl_3 (pH:

4.5) solüsyonu kendi içerisinde kısa süreli (1/2, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 sa.) ve uzun süreli (24, 48, 72 ve 96 sa.) olacak şekilde arpa köklerine uygulandı. Elde edilen sonuçlara göre, Al uygulamasının Al iyonlarının kökte birikmesinesebep olmuştur. Ayrıca biriken bu Al iyonlarının arpa köklerinde ilk 30 dakikadan itibaren zamanla artarak hücre zarlarında lipid peroksidasyonuna sebep olarak zar bütünlüğünü bozduğu, programlı hücre ölümüne sebep olarak kaspaz-1 benzeri enzimleri aktive ettiği ve mitokondri iç zarından sitozplazmaya sitokrom c salındığı gözlemlenmiştir. Bunun yanında diğer bir PHÖ belirteci olan DNA fragmentasyonuna da zamanla artarak sebep olduğu belirlenmiştir.

Bitkide PHÖ ile Al toksitesi arasındaki ilişkinin çözülmesi, bu toksik iyonla karşı dayanıklı ve iyileştirilmiş bitki türlerinin geliştirilebilmesi bakımından önem taşımaktadır. Bu çalışma ile elde edilen sonuçların, bitkilerde Al toksitesi ve PHÖ'ye ilişkin yapılacak çalışmalara ışık tutması ve Al'ye toleranslı bitki türlerinin yetiştirilmesine katkı sağlaması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

1. Abdel-Basset, R., Ozuka, S., Demiral, T., Furuichi, T., Sawatani, I., Baskin, T. I., & Yamamoto, Y. (2010). Aluminium reduces sugar uptake in tobacco cell cultures: a potential cause of inhibited elongation but not of toxicity. *Journal of Experimental Botany*, 61(6), 1597-1610.
2. Achary, V. M. M., Patnaik, A. R., & Panda, B. B. (2012). Oxidative biomarkers in leaf tissue of barley seedlings in response to aluminum stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 75, 16-26.
3. An, L. H., & You, R. L. (2004). Studies on nuclear degeneration during programmed cell death of synergid and antipodal cells in *Triticum aestivum*. *Sexual Plant Reproduction*, 17(4), 195-201.
4. Baehrecke, E. H. (2005). Autophagy: Dual roles in life and death? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(6), 505.
5. Balk, J., Leaver, C. J., & McCabe, P. F. (1999). Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants. *FEBS Letters*, 463(1-2), 151-154.
6. Bao, Q., & Shi, Y. (2007). Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death and Differentiation*, 14(1), 56.
7. Blamey, F. P. C., Asher, C. J., Edwards, D. C., & Kerven, G. L. (1993). In vitro evidence of aluminum effects on solution movement through root cell walls. *Journal of Plant Nutrition*, 16(4), 555-562.
8. Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, J. J., Geiler, C., Kauppinen, S., & Nürnberger, T. (2002). Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *The EMBO Journal*, 21(24), 6681-6688.
9. Bulanova, N. V., Synzynys, B. I., & Koz'min, G. V. (2001). Aluminum induces chromosome aberrations in cells of wheat root meristem. *Russian Journal of Genetics*, 37(12), 1455-1458.
10. Büyük, İ., Soydam-Aydın, S., & Aras, S. (2012). Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Turkish Bulletin of Hygiene & Experimental Biology/Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji*, 69(2).
11. Cai, Y. M., & Gallois, P. (2015). Programmed cell death regulation by plant proteases with caspase-like activity. In *Plant Programmed Cell Death* (pp. 191-202). Springer, Cham.

12. Cain, K., Brown, D. G., Langlais, C., & Cohen, G. M. (1999). Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (700 kDa) caspase-activating complex. *Journal of Biological Chemistry*, 274(32), 22686-22692.
13. Cakmak, I., & Horst, W. J. (1991). Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 83(3), 463-468.
14. Clarke, P. G. (1990). Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and Embryology*, 181(3), 195-213.
15. Coffeen, W. C., & Wolpert, T. J. (2004). Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *The Plant Cell*, 16(4), 857-873.
16. Danon, A., Rotari, V. I., Gordon, A., Mailhac, N., & Gallois, P. (2004). Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in Arabidopsis, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and defender against apoptotic death. *Journal of Biological Chemistry*, 279(1), 779-787.
17. Das, G., Shravage, B. V., & Baehrecke, E. H. (2012). Regulation and function of autophagy during cell survival and cell death. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(6), a008813.
18. Dauphinee, A. N., & Gunawardena, A. N. (2015). An overview of programmed cell death research: from Canonical to emerging model species. In *Plant Programmed Cell Death* (pp. 1-31). Springer, Cham.
19. De Jong, A. J., Hoeberichts, F. A., Yakimova, E. T., Maximova, E., & Woltering, E. J. (2000). Chemical-induced apoptotic cell death in tomato cells: involvement of caspase-like proteases. *Planta*, 211(5), 656-662.
20. De Jong, A. J., Yakimova, E. T., Kapchina, V. M., & Woltering, E. J. (2002). A critical role for ethylene in hydrogen peroxide release during programmed cell death in tomato suspension cells. *Planta*, 214(4), 537-545.
21. Domínguez, F., & Cejudo, F. J. (2015). Nuclear dismantling events: crucial steps during the execution of plant programmed cell death. In *Plant Programmed Cell Death* (pp. 163-189). Springer, Cham.
22. Doncheva, S., Amenos, M., Poschenrieder, C., & Barcelo, J. (2005). Root cell patterning: A primary target for aluminium toxicity in maize. *Journal of Experimental Botany*, 56(414), 1213-1220.

23. Du, B., Nian, H., Zhang, Z., & Yang, C. (2010). Effects of aluminum on superoxide dismutase and peroxidase activities, and lipid peroxidation in the roots and calluses of soybeans differing in aluminum tolerance. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(5), 883-890.
24. Dunn, W. A. (1990). Studies on the mechanisms of autophagy: Formation of the autophagic vacuole. *The Journal of Cell Biology*, 110(6), 1923-1933.
25. Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.
26. Feechan, A., Turnbull, D., Stevens, L. J., Engelhardt, S., Birch, P. R., Hein, I., & Gilroy, E. M. (2015). The hypersensitive response in PAMP-and effector-triggered immune responses. In *Plant Programmed Cell Death* (pp. 235-268). Springer, Cham.
27. Fidan, A. F. (2008). DNA Hasar Tespitinde Tek Hücre Jel Elektroforezi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8(1), 41-52.
28. Flora, S. J. S. (2007). Role of free radicals and antioxidants in health and disease. *Cellular and Molecular Biology*, 53(1), 1-2.
29. Frantzios, G., Galatis, B., & Apostolakis, P. (2001). Aluminium effects on microtubule organization in dividing root-tip cells of *Triticum turgidum*. II. Cytokinetic cells. *Journal of Plant Research*, 114(2), 157-170.
30. Giaveno, C. D., & Miranda Filho, J. B. (2000). Rapid screening for aluminum tolerance in maize (*Zea mays* L.). *Genetics and Molecular Biology*, 23(4), 847-850.
31. Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
32. Godbold, D. L., & Jentschke, G. (1998). Aluminium accumulation in root cell walls coincides with inhibition of root growth but not with inhibition of magnesium uptake in Norway spruce. *Physiologia Plantarum*, 102(4), 553-560.
33. Golstein, P., & Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: Towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 37-43.
34. Guo, T., Zhang, G., Zhou, M., Wu, F., & Chen, J. (2004). Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activities of two barley genotypes with different Al resistance. *Plant and Soil*, 258(1), 241-248.
35. Gupta, N., Gaurav, S. S., & Kumar, A. (2013). Molecular basis of aluminium toxicity in plants: A review. *American Journal of Plant Sciences*, 4(12), 21.

36. Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences*, 15(4), 129-135.
37. Hara-Nishimura, I., & Nishimura, M. (1987). Proglobulin processing enzyme in vacuoles isolated from developing pumpkin cotyledons. *Plant Physiology*, 85(2), 440-445.
38. Hara-Nishimura, I., Inoue, K., & Nishimura, M. (1991). A unique vacuolar processing enzyme responsible for conversion of several proprotein precursors into the mature forms. *FEBS letters*, 294(1-2), 89-93.
39. Hara-Nishimura, I., Takeuchi, Y., & Nishimura, M. (1993). Molecular characterization of a vacuolar processing enzyme related to a putative cysteine proteinase of *Schistosoma mansoni*. *The Plant Cell*, 5(11), 1651-1659.
40. Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., ... & Hara-Nishimura, I. (2004). A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science*, 305(5685), 855-858.
41. Hatsugai, N., & Hara-Nishimura, I. (2018). Measurement of the caspase-1-like activity of vacuolar processing enzyme in plants. In *Plant Programmed Cell Death* (pp. 163-171). Humana Press, New York, NY.
42. He, X., & Kermode, A. R. (2003). Proteases associated with programmed cell death of megagametophyte cells after germination of white spruce (*Picea glauca*) seeds. *Plant Molecular Biology*, 52(4), 729-744.
43. Heydlauff, J., & Groß-Hardt, R. (2014). Love is a battlefield: Programmed cell death during fertilization. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1323-1330.
44. Hofius, D., Munch, D., Bressendorff, S., Mundy, J., & Petersen, M. (2011). Role of autophagy in disease resistance and hypersensitive response-associated cell death. *Cell Death and Differentiation*, 18(8), 1257.
45. Hossain, M. A., Hossain, A. Z., Kihara, T., Koyama, H., & Hara, T. (2005). Aluminum-induced lipid peroxidation and lignin deposition are associated with an increase in H₂O₂ generation in wheat seedlings. *Soil Science & Plant Nutrition*, 51(2), 223-230.
46. Huang, W., Yang, X., Yao, S., LwinOo, T., He, H., Wang, A., & He, L. (2014). Reactive oxygen species burst induced by aluminum stress triggers mitochondria-dependent programmed cell death in peanut root tip cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82, 76-84.

47. Hu, Y., Benedict, M. A., Ding, L., & Núñez, G. (1999). Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *The EMBO Journal*, 18(13), 3586-3595.
48. Ikegawa, H., Yamamoto, Y., & Matsumoto, H. (2000). Responses to aluminium of suspension-cultured tobacco cells in a simple calcium solution. *Soil Science and Plant Nutrition*, 46(2), 503-514.
49. Jaskowiak, J., Tkaczyk, O., Slota, M., Kwasniewska, J., & Szarejko, I., (2018). Analysis of aluminum toxicity in *Hordeum vulgare* roots with an emphasis on DNA integrity and cell cycle. *PLOS One*, 13(2), e0193156.
50. Kabbage, M., Kessens, R., Bartholomay, L. C., & Williams, B. (2017). The life and death of a plant cell. *Annual Review of Plant Biology*, 68, 375-404.
51. Kariya, K., Demiral, T., Sasaki, T., Tsuchiya, Y., Turkan, I., Sano, T., & Yamamoto, Y. (2013). A novel mechanism of aluminium-induced cell death involving vacuolar processing enzyme and vacuolar collapse in tobacco cell line BY-2. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 128, 196-201.
52. Kariya, K., Tsuchiya, Y., Sasaki, T., & Yamamoto, Y. (2018). Aluminium-induced cell death requires upregulation of NtVPE1 gene coding vacuolar processing enzyme in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 181, 152-161.
53. Kaval A. (2016) *Bryophyllum daigremontiarum* (Raym.-Hamet & Perrier) A. Berger bitkisinde alüminyum stresine bağlı değişikliklerin fizyolojik yöntemler ve moleküler işaretleyiciler (RAPD ve ISSR) ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Düzce Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Düzce, Türkiye.
54. Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., & Currie, A.R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26, 239-257.
55. Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2006). Role of mitochondria as the gardens of cell death. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 57(5), 545-553.
56. Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO Journal*, 14(22), 5579-5588.
57. Kornosor, S. (1999, September). Entomological problems of maize in Turkey. In *Proc. XX Conf. International Working Group on Ostrinia and Other Maize Pests (Adana, Turkey)* (pp. 14-23).

58. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., & Hengartner, M. (2009). Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, 16(1), 3.
59. Kuo, M. C., & Kao, C. H. (2003). Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biologia Plantarum*, 46(1), 149-152.
60. Kuroyanagi, M., Yamada, K., Hatsugai, N., Kondo, M., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2005). Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(38), 32914-32920.
61. Kyrylkova, K., Kyryachenko, S., Leid, M., & Kioussi, C. (2012). Detection of apoptosis by TUNEL assay. In *Odontogenesis* (pp. 41-47). Humana Press.
62. Lam, E. (2004). Controlled cell death, plant survival and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(4), 305.
63. Levitt, J. (1972). *Response of plants to environmental stresses* (No. 581.24 L4).
64. Li, Y., Yang, G., Luo, L., Ke, T., Zhang, J., Li, K., & He, G. (2008). Aluminium sensitivity and tolerance in model and elite wheat varieties. *Cereal Research Communications*, 36(2), 257-267.
65. Li, Z., Yue, H., & Xing, D. (2012). MAP Kinase 6-mediated activation of vacuolar processing enzyme modulates heat shock-induced programmed cell death in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 195(1), 85-96.
66. Lichtenthaler, H. K. (1996). Vegetation stress: An introduction to the stress concept in plants. *Journal of Plant Physiology*, 148(1-2), 4-14.
67. Liu, Q., Yang, J. L., He, L. S., Li, Y. Y., & Zheng, S. J. (2008). Effect of aluminum on cell wall, plasma membrane, antioxidants and root elongation in triticale. *Biologia Plantarum*, 52(1), 87-92.
68. Lyubushkina, I. V., Grabelnych, O. I., Pobezhimova, T. P., Stepanov, A. V., Fedyaeva, A. V., Fedoseeva, I. V., & Voinikov, V. K. (2014). Winter wheat cells subjected to freezing temperature undergo death process with features of programmed cell death. *Protoplasma*, 251(3), 615-623.
69. Matsumoto H. 2000. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *International Reviews of Cytology*, 200, 1-47.
70. Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, 91(3), 295-298.

71. Ménard, D., & Pesquet, E. (2015). Cellular interactions during tracheary elements formation and function. *Current Opinion in Plant Biology*, 23, 109-115.
72. Mendes, G. C., Reis, P. A., Calil, I. P., Carvalho, H. H., Aragão, F. J., & Fontes, E. P. (2013). GmNAC30 and GmNAC81 integrate the endoplasmic reticulum stress-and osmotic stress-induced cell death responses through a vacuolar processing enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(48), 19627-19632.
73. Mizushima, N., & Komatsu, M. (2011). Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell*, 147(4), 728-741.
74. Mlejnek, P., & Procházka, S. (2002). Activation of caspase-like proteases and induction of apoptosis by isopentenyladenosine in tobacco BY-2 cells. *Planta*, 215(1), 158-166.
75. Motoda, H., Kano, Y., Hiragami, F., Kawamura, K., & Matsumoto, H. (2010). Morphological changes in the apex of pea roots during and after recovery from aluminium treatment. *Plant and Soil*, 333(1-2), 49-58.
76. Neto, A. D., Prisco, J. T., Enéas-Filho, J., de Abreu, C. E. B., & Gomes-Filho, E. (2006). Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany*, 56(1), 87-94.
77. Nicotera, P., & Melino, G. (2004). Regulation of the apoptosis–necrosis switch. *Oncogene*, 23(16), 2757.
78. Nogueira, F. C., Palmisano, G., Soares, E. L., Shah, M., Soares, A. A., Roepstorff, P., & Domont, G. B. (2012). Proteomic profile of the nucellus of castor bean (*Ricinus communis* L.) seeds during development. *Journal of Proteomics*, 75(6), 1933-1939.
79. Norbury, C. J., & Hickson, I. D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41(1), 367-401.
80. Nosko, P., Brassard, P., Kramer, J. R., & Kershaw, K. A. (1988). The effect of aluminum on seed germination and early seedling establishment, growth, and respiration of white spruce (*Picea glauca*). *Canadian Journal of Botany*, 66(11), 2305-2310.
81. Okcu, M., Tozlu, E., Kumlay, A. M., & Pehlivan, M. (2009). Ağır Metallerin Bitkiler Üzerine Etkileri/The Effects of Heavy Metals on Plants. *Alınteri Zirai Bilimler Dergisi*, 17(2).

82. Overmyer, K., Brosché, M., Pellinen, R., Kuittinen, T., Tuominen, H., Ahlfors, R., & Kangasjärvi, J. (2005). Ozone-induced programmed cell death in the Arabidopsis radical-induced cell death1 mutant. *Plant Physiology*, 137(3), 1092-1104.
83. Ownby, J. D. (1993). Mechanisms of reaction of hematoxylin with aluminium-treated wheat roots. *Physiologia Plantarum*, 87(3), 371-380.
84. Palavan-Unsal, N., Buyuktuncer, E. D., & Tufekci, M. A. (2005). Programmed cell death in plants. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 4, 9-23.
85. Panda, S. K., Baluška, F., & Matsumoto, H. (2009). Aluminum stress signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 4(7), 592-597.
86. Panda, S. K., Yamamoto, Y., Kondo, H., & Matsumoto, H. (2008). Mitochondrial alterations related to programmed cell death in tobacco cells under aluminium stress. *Comptes Rendus Biologies*, 331(8), 597-610.
87. Parrish, A. B., Freel, C. D., & Kornbluth, S. (2013). Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(6), a008672.
88. Peixoto, P. H. P., Cambraia, J., Sant'Anna, R., Mosquim, P. R., & Moreira, M. A. (1999). Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11(3), 137-143.
89. Petrov, V., Hille, J., Mueller-Roeber, B., & Gechev, T. S. (2015). ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Frontiers in Plant Science*, 6, 69.
90. Piszczek, E., & Gutman, W. (2007). Caspase-like proteases and their role in programmed cell death in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(5), 391-398.
91. Proskuryakov, S. Y., Konoplyannikov, A. G., & Gabai, V. L. (2003). Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Experimental Cell Research*, 283(1), 1-16.
92. Qiang, X., Zechmann, B., Reitz, M. U., Kogel, K. H., & Schäfer, P. (2012). The mutualistic fungus *Piriformospora indica* colonizes Arabidopsis roots by inducing an endoplasmic reticulum stress-triggered caspase-dependent cell death. *The Plant Cell*, 24(2), 794-809.
93. Radchuk, V., Borisjuk, L., Radchuk, R., Steinbiss, H. H., Rolletschek, H., Broeders, S., & Wobus, U. (2006). Jekyll encodes a novel protein involved in the sexual reproduction of barley. *The Plant Cell*, 18(7), 1652-1666.

94. Rath, I., & Barz, W. (2000). The role of lipid peroxidation in aluminium toxicity in soybean cell suspension cultures. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55(11-12), 957-964.
95. Reape, T. J., Brogan, N. P., & McCabe, P. F. (2015). Mitochondrion and chloroplast regulation of plant programmed cell death. In *Plant Programmed Cell Death* (pp. 33-53). Springer, Cham.
96. Riaz, M., Yan, L., Wu, X., Hussain, S., Aziz, O., Wang, Y., ... & Jiang, C. (2018). Boron alleviates the aluminum toxicity in trifoliate orange by regulating antioxidant defense system and reducing root cell injury. *Journal of Environmental Management*, 208, 149-158.
97. Riccardi, C., & Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols*, 1(3), 1458.
98. Rodkiewicz, B. (1970). Callose in cell walls during megasporogenesis in angiosperms. *Planta*, 93(1), 39-47.
99. Rojo, E., Martín, R., Carter, C., Zouhar, J., Pan, S., Plotnikova, J., & Ausubel, F. M. (2004). VPE γ exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens. *Current Biology*, 14(21), 1897-1906.
100. Rout, G., Samantaray, S., & Das, P. (2001). Aluminium toxicity in plants: A review. *Agronomie*, 21(1), 3-21.
101. Rustérucci, C., Montillet, J. L., Agnel, J. P., Battesti, C., Alonso, B., Knoll, A., & Triantaphylidès, C. (1999). Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogeiin on tobacco leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 274(51), 36446-36455.
102. Scandalios, J. G. (1993). Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*, 101(1), 7.
103. Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D. L. & Polle, A., (2001). Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. *Plant Physiology*, 127(3), 887-898.
104. Shen, Y., Vignali, P., & Wang, R. (2017). Rapid profiling cell cycle by flow cytometry using concurrent staining of DNA and mitotic markers. *Bio-protocol*, 7(16).
105. Shen, X., Xiao, X., Dong, Z., & Chen, Y. (2014). Silicon effects on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of peanut under aluminum stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(11), 3063-3069.

106. Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell Biology*, 9(3), 459-470.
107. Silva, S. (2012). Aluminium toxicity targets in plants. *Journal of Botany*, Article ID 219462.
108. Singh, S., Tripathi, D. K., Singh, S., Sharma, S., Dubey, N. K., Chauhan, D. K., & Vaculík, M. (2017). Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 137, 177-193.
109. Smirnov, N. (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125(1), 27-58.
110. Tiwari, B. S., Belenghi, B., & Levine, A. (2002). Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant physiology*, 128(4), 1271-1281.
111. Tran, V., Weier, D., Radchuk, R., Thiel, J., & Radchuk, V. (2014). Caspase-like activities accompany programmed cell death events in developing barley grains. *PLoS One*, 9(10), e109426.
112. Tripathi, A. K., Pareek, A., & Singla-Pareek, S. L. (2016). TUNEL assay to assess extent of DNA fragmentation and programmed cell death in root cells under various stress conditions. *Plant Physiology*, 7(16).
113. Van Breusegem, F., & Dat, J. F. (2006). Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology*, 141(2), 384-390.
114. Van Doorn, W. G., Beers, E. P., Dangl, J. L., Franklin-Tong, V. E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I., & Mur, L. A. J. (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation*, 18(8), 1241.
115. Van Hautegeem, T., Waters, A. J., Goodrich, J., & Nowack, M. K. (2015). Only in dying, life: programmed cell death during plant development. *Trends in plant science*, 20(2), 102-113.
116. Vardar, F., & Ünal, M. (2007). Aluminum toxicity and resistance in higher plants. *Advances in Molecular Biology*, 1(1), 1-12.
117. Vardar, F., İsmailoğlu, I., İnan, D., & Ünal, M. (2011). Determination of stress responses induced by aluminum in maize (*Zea mays*). *Acta Biologica Hungarica*, 62(2), 156-170.

- 118.Vardar, F., Akgül, N., Aytürk, Ö., Aydın, Y., (2015). Assessment of aluminum induced genotoxicity with comet assay in wheat, rye, and triticale roots. *Fresenius Enviromental Bulletin*, 24 (10a), 3352-3358.
- 119.Vardar, F., Çabuk, E., Aytürk, Ö., & Aydın, Y. (2016). Determination of aluminum induced programmed cell death characterized by DNA fragmentation in Gramineae species. *Caryologia*, 69(2), 111-115.
- 120.Vitorello, V. A., Capaldi, F. R., & Stefanuto, V. A. (2005). Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(1), 129-143.
- 121.Von Uexküll, H. R., & Mutert, E. (1995). Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant and Soil*, 171(1), 1-15.
- 122.Wang, J., Raman, H., Read, B., Zhou, M., Mendham, N., & Venkatanagappa, S. (2006). Validation of an Alt locus for aluminium tolerance scored with eriochrome cyanine R staining method in barley cultivar Honen (*Hordeum vulgare* L.). *Australian Journal of Agricultural Research*, 57(1), 113-118.
- 123.Wang, W., Pan, J., Zheng, K., Chen, H., Shao, H., Guo, Y., ... & Zhu, M. (2009). Ced-9 inhibits Al-induced programmed cell death and promotes Al tolerance in tobacco. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 383(1), 141-145.
- 124.Wlodkowic, D., Skommer, J., & Darzynkiewicz, Z. (2009). Flow cytometry-based apoptosis detection. In *Apoptosis* (pp. 19-32). Humana Press, Totowa, NJ.
- 125.Woltering, E. J., van der Bent, A., & Hoeberichts, F. A. (2002). Do plant caspases exist? *Plant Physiology*, 130(4), 1764-1769.
- 126.Xu, F. J., Li, G., Jin, C. W., Liu, W. J., Zhang, S. S., Zhang, Y. S., & Lin, X. Y. (2012). Aluminum-induced changes in reactive oxygen species accumulation, lipid peroxidation and antioxidant capacity in wheat root tips. *Biologia Plantarum*, 56(1), 89-96.
- 127.Yakimova, E. T., Kapchina-Toteva, V. M., & Woltering, E. J. (2007). Signal transduction events in aluminum-induced cell death in tomato suspension cells. *Journal of Plant Physiology*, 164(6), 702-708.
- 128.Yamada, K., Shimada, T., Nishimura, M., & Hara-Nishimura, I. (2005). A VPE family supporting various vacuolar functions in plants. *Physiologia Plantarum*, 123(4), 369-375.

129. Yamamada, T., Takatsu, Y., Kasumi, M., Ichimura, K., & van Doorn, W. G., (2006). Nuclear fragmentation and DNA degradation during programmed cell death in petals of morning glory (*Ipomea nil*). *Planta*, 224, 1279-1290.
130. Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., & Matsumoto, H. (2001). Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiology*, 125(1), 199-208.
131. Yalçın, G., & Vardar, F., (2016). The alleviating effects of salicylic acid application against aluminium toxicity in barley (*Hordeum vulgare*) roots. *Biologia*, 71(12), 1338-1344.
132. Yanık, F., Aytürk, Ö., & Vardar, F. (2017). Programmed cell death evidence in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots induced by aluminum oxide (Al₂O₃) nanoparticles. *Caryologia*, 70(2), 112-119.
133. Yanık, F., Çetinbaş, A., & Vardar, F. Bitkilerde Programlı Hücre Ölümü. *M.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 1, 157-166.
134. Yanık, F., & Vardar, F. (2015). Toxic effects of aluminum oxide (Al₂O₃) nanoparticles on root growth and development in *Triticum aestivum*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(9), 296.
135. Yao, S., Huang, W., Pan, C., Zhan, J., & He, L. F. (2016). Caspase-like proteases regulate aluminum-induced programmed cell death in peanut. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 127(3), 691-703.
136. Yarsan, E., Tanyuksel, M., Celik, S., & Aydin, A. (1999). Effects of aldicarb and malathion on lipid peroxidation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 63(5), 575-581.
137. Yi, M., Yi, H., Li, H., & Wu, L. (2010). Aluminum induces chromosome aberrations, micronuclei, and cell cycle dysfunction in root cells of *Vicia faba*. *Environmental Toxicology*, 25(2), 124-129.
138. Zhang, J., Li, Q. F., Huang, W. W., Xu, X. Y., Zhang, X. L., Hui, M. X., & Zhang, L. G. (2013). A vacuolar processing enzyme RsVPE1 gene of radish is involved in floral bud abortion under heat stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 13346-13359.
139. Zimmermann, K. C., Bonzon, C., & Green, D. R. (2001). The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & Therapeutics*, 92(1), 57-70.

- 140.Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., & Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, 90(3), 405-413.
- 141.Zou, H., Li, Y., Liu, X., & Wang, X. (1999). An APAF-1· cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry*, 274(17), 11549-11556.
- 142.<https://arastirma.tarim.gov.tr/tarlabitkileri/Sayfalar/Detay.aspx?SayfaId=26> (Erişim tarihi 2018).





ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Büşra Huri Gölge
Doğum Yeri ve Tarihi : Bolu, 1992
Yabancı Dil : İngilizce
E-posta : b.hurigolge@gmail.com

Öğrenim Durumu

Derece	Bölüm/Program	Üniversite/Lise	Giriş Yılı	Mezuniyet Yılı
Lise	Fen Bilimleri	Özel Maltepe Coşkun Fen Lisesi	2006	2010
Üniversite	Biyoloji (İngilizce)	Fatih Üniversitesi	2010	2015

Kongre/Sempozyum

Gölge, B. H., & Vardar, F., (2018). Temporal analysis of Al-Induced programmed cell death in barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. International Congress on Applied Biological Sciences, 3-5 May, Eskişehir, Türkiye.