

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.) VE ARPA (*Hordeum vulgare* L.)
BİTKİLERİNDE KISA SÜRELİ AĞIR METAL UYGULAMASININ BAZI
ANTİOKSİDAN ENZİMLERİN EKSPRESYON SEVİYELERİ VE LİPİD
PEROKSİDASYONU ÜZERİNE ETKİLERİ

HÜLYA YILDIR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI: YRD.DOÇ.DR. FİLİZ SANAL

EDİRNE- 2018

Hülya YILDIR'ın hazırladığı “Buğday (*Triticum aestivum* L.) ve Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Bitkilerinde Kısa Süreli Ağır Metal Uygulamasının Bazı Antioksidan Enzimlerin Ekspresyon Seviyeleri ve Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkileri” başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoloji Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:

İmza

Doç.Dr. Özlem AKSOY



Doç.Dr. Utku GÜNER



Yrd.Doç.Dr. Filiz SANAL



Tez Savunma Tarihi: 16/02/2018

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Yrd.Doç.Dr. Filiz SANAL

Tez Danışmanı



Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı



Prof.Dr.Murat YURTCAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

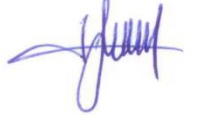
T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALIYÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

16 / 02 /2018

Hülya YILDIR

İmza



Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi

Buğday (*Triticum aestivum* L.) ve Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Bitkilerinde Kısa Süreli Ağır Metal Uygulamasının Bazı Antioksidan Enzimlerin Ekspresyon Seviyeleri ve Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkileri

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Araştırma Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından 2014 yılında tescil edilen bir ekmeklik buğday çeşidi olan “Saban” ve bir arpa çeşidi olan “Hasat” üzerinde arsenik, kurşun ve kadmiyum karışımlarının etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

Arpa ve buğday tohumları 20 °C’de fotoperiyot uygulanarak bitki büyüme kabininde 10 gün süreyle büyütüldü. 10. günün sonunda, kontrol grubu distile su ile sulanırken, diğer gruplar 1. gün grubu 1 gün süre ile 5. gün grubu 5 gün süre ile taze hazırlanmış 15 µM, 30 µM ve 60 µM konsantrasyonlar da arsenik, kurşun ve kadmiyum içeren karışım solüsyonları ile sulandı. Arpa ve buğday bitkilerinde çimlenme yüzdeleri, kök gövde uzunlukları, kök gövde taze ve kuru ağırlıkları, total protein miktarları, bazı hormon seviyeleri ve MDA içerikleri ölçüldü. Bitkilerdeki SOD, CAT, GS ve GPX antioksidan enzimlerinin metal stresi sırasında ekspresyon seviyelerinin nasıl etkilendiği araştırıldı. Araştırma için bitkilerin çimlendirilmesi T.Ü Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde yapıldı. Bitkilerdeki ağır metal ve enzim ekspresyon analizleri Trakya Üniversitesi Araştırma ve Geliştirme Merkezi (TUTAGEM)’inde gerçekleştirildi.

15 µM, 30 µM ve 60 µM (Arsenik, kurşun ve kadmiyum) metal iyonu karışımı uygulanan deney gruplarında konsantrasyon artışına bağlı olarak çimlenme oranında, bitkilerin kök ve gövde kuru ağırlıklarında tüm gruplarda kontrol grubuna göre azalma gözlemlendi. MDA seviyelerinin tüm dozlarda yükseldiği tespit edildi. Ağır metal iyonu uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre ağır metallerin konsantrasyon artışına bağlı olarak dokularda artarak biriktiği tespit edildi. Sonuç olarak çalışmada ağır metale maruz kalan bitkide oksidan stresin primer cevabı olan antioksidan enzimlerin ekspresyon seviyelerinde strese bağlı olarak anlamlı değişikliklerin olduğu belirlendi.

Yıl : 2018

Sayfa Sayısı : 110

Anahtar Kelimeler: Buğday, Arpa, Ağır metal, Antioksidan, Lipid Peroksidasyonu

Institute of Natural Sciences

Master's Thesis

Effects of the Short-Term Heavy Metal Application on the Expression Levels of Some Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Barley (*Hordeum vulgare* L.) Plants

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Biology

ABSTRACT

This study was conducted to determine the effects of the arsenic, lead, and cadmium mixtures on "Saban", a variety of bread wheat, and "Hasat", a variety of barley, which were registered by Trakya Agricultural Research Institute in 2014.

Barley and wheat seeds were grown in the plant growth cabinet at 20°C for 10 days by applying photoperiod. At the end of the 10th day, while the control group was watered with distilled water, among the other groups, the 1st day group and the 5th day group were watered with the freshly prepared solutions of the mixture containing arsenic, lead, and cadmium at the concentrations of 15 µM, 30 µM, and 60 µM for 1 day and 5 days, respectively. The germination percentages, root stem lengths, root stem wet and dry weights, total protein contents, some hormone levels, and MDA contents in barley and wheat plants were measured. How the expression levels of SOD, CAT, GS, and GPX antioxidant enzymes in plants are affected during metal stress has been investigated. The germination of plants for the study was performed at T.U. Faculty of Science, Department of Biology. Heavy metal and enzyme expression analyses in plants were carried out at Trakya University Research and Development Center (TUTAGEM).

A decrease was observed in the experimental groups, in which 15 µM, 30 µM, and 60 µM (arsenic, lead, and cadmium) metal ion mixture was applied, in terms of the germination rate depending on the increased concentration, and a decrease was observed in the root and stem dry weights of the plants in all groups compared to the control group. MDA levels were determined to increase at all doses. It was determined that heavy metals accumulated by increasing in the tissues due to the increased concentration of heavy metals in the heavy metal ion-applied groups compared to the control group. As a result, it was determined in the study that there were significant changes in the expression levels of antioxidant enzymes, which are the primary response to oxidative stress in plants exposed to heavy metals, depending on the stress

Year : 2018

Number of Pages : 110

Keywords Wheat, Barley, Heavy metal, Antioxidant, Lipid Peroxidation

TEŞEKKÜR

Bu konuyu bana veren ve çalışmalarım boyunca, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bilimsel çalışmalarında yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen, sonuçlarını kontrol ederek, tezin şekillenmesine katkı sağlayan, değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Filiz SANAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sürecinde yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nün değerli öğretim elemanlarından Doç.Dr. Utku GÜNER'e, Doç.Dr. Burhan ŞEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

TÜBAP 2015-38 nolu proje ile tezimi maddi olarak destekleyen T.Ü. Bilimsel Araştırma Projeler Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca ve çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan maddi ve manevi desteğini esirgemeyen annem ve babama teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.....	6
GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. TAHİLLAR VE ÖNEMİ.....	6
2.2. BİTKİLERDE STRES.....	9
2.3. AĞIR METAL KİRLİLİĞİ.....	10
2.4. KADMİYUM (Cd).....	13
2.5. KURŞUN (Pb)	14
2.6. ARSENİK (As)	15
2.7. AĞIR METALLERİN MEMBRANLAR ÜZERİNE ETKİLERİ	16
2.8. SERBEST RADİKALLER.....	17
2.9. ANTİOKSİDANLAR.....	21
2.10. ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR.....	24
2.11. BİTKİSEL HORMONLAR.....	29
2.12. DİĞER HORMONLAR.....	31
BÖLÜM 3.....	32
MATERYAL VE YÖNTEM.....	32
3.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Ağır Metal Uygulanması.....	32
3.2. Ağır Metal Karışımının Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi.....	33
3.3. Ağır Metal Karışımının Kök ve Gövde Uzunluklarına Etkisi.....	34
3.4. Lipit Peroksidasyonunun Ölçülmesi.....	38

3.5. Ağır Metal Karışımının Kök ve Gövde Protein Miktarları Üzerine Etkisi.....	38
3.6. Antioksidan Enzimlerin Gen Ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi:....	38
3.7. Bitki örneklerinde Ağır Metal Tayini.....	40
3.8. LC-MS/MS ile Hormon Tayini.....	41
BÖLÜM 4.....	43
BULGULAR.....	43
4.1. Ağır Metal Karışımının Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi.....	43
4.2. Ağır Metal Karışımının Kök Gövde Uzunluklarına Etkisi:.....	44
4.3. Ağır Metal Karışımının Kök ve Gövdenin Taze ve Kuru Ağırlıkları Üzerine Etkisi:	48
4.4. Bitki Kök ve Gövdelerinde Total Protein İçeriğinin Belirlenmesi... ..	50
4.5. Ağır Metal Karışımının Kök ve Gövdede MDA İçeriği Üzerine Etkisi.....	54
4.6. Buğday ve Arpa’da Ağır Metal Birikimi.....	58
4.7. Ağır Metal Karışımının Buğday ve Arpa’da Hormonlar Üzerine Etkisi.....	60
4.8. Ağır Metal Karışımının Antioksidan Enzimlerin Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisi.....	67
BÖLÜM 5.....	71
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	71
KAYNAKLAR.....	80
ÖZGEÇMİŞ.....	96

SİMGELER VE KISALTMALAR

¹O₂	: Singlet Oksijen
ABA	: Absisik asit
APX	: Askorbat Peroksidaz
As	: Arsenik
CAT	: Katalaz
Cd	: Kadmiyum
cDNA	: Komplementer deoksiribonükleik asit
cm	: Santimetre
DNA	: Deoksiribonükleik asit
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
GSH-P_x	: Glutasyon Peroksidaz
GSSG	: Okside Glutasyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
IAA	: Indol-3-asetik asit
JA	: Jasmonik asit
MDA	: Malondialdehit
Mg	: Miligram
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
O₂[·]	: Süperoksit
O₃	: Ozon
OH	: Hidroksil
Pb	: Kurşun
Ppb	: Parts per billion
Ppm	: Parts per million
RNA	: Ribonükleik asit
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
RT-PCR	: Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SH	: Tiyoil Grubu

SOD	: Süperoksit Dismutaz
TBA	: Thiobarbituric asit
TCA	: Trikloroasetik asit
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
μM	: Mikromolar



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2. 1: Bir tahıl tanesinin yapısı.....	7
Şekil 2. 2: Ağır metal bağımlı reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretim yolları.....	12
Şekil 2. 3: Lipit peroksidasyonunun temel prensipleri.....	17
Şekil 2. 4: Serbest oksijen radikallerinin oluşumu	18
Şekil 2. 5: Serbest radikallerin kaynakları	19
Şekil 2. 6: Serbest radikallerin hücrel hedefleri.....	19
Şekil 2. 7: Oksidatif stres.....	20
Şekil 2. 8: Antioksidan tarafından serbest radikalın nötralize edilmesi.....	21
Şekil 2. 9: Antioksidan savunma mekanizması.....	22
Şekil 2.10: Antioksidanların çeşitleri.....	23
Şekil 2.11: Glutasyon biyosentezi.....	27
Şekil 2.12: Glutasyon sentezi ve siklusu.....	28
Şekil 2.13: Redükte ve okside glutasyonun yapısı.....	29
Şekil 3. 1:a) Bitki büyütme kabinde genel görünüş b) Ekim yapılmış petri kapları.....	33
Şekil 3. 2: Kontrol 1. gün grubu (a: Arpa; b: Buğday).....	34
Şekil 3. 3: Deney 1. gün grubu 15 µM metal karışımı (a: Arpa; b: Buğday).....	34
Şekil 3. 4: Deney 1. gün grubu 30 µM metal karışımı (a: Arpa; b: Buğday).....	35
Şekil 3. 5: Deney 1. gün grubu 60 µM metal karışımı (a: Arpa; b: Buğday).....	35
Şekil 3. 6: Kontrol 5. gün grubu (a: Arpa; b: Buğday).....	36
Şekil 3. 7: Deney 5. gün grubu 15 µM metal karışımı (a: Arpa; b: Buğday).....	36
Şekil 3. 8: Deney 5. gün grubu 30 µM metal karışımı (a: Arpa; b: Buğday).....	37
Şekil 3. 9: Deney 5. gün grubu 60 µM metal karışımı (a: Arpa; b: Buğday).....	37
Şekil 4. 1: Ağır metal karışımının tohum çimlenmesi üzerine etkisi....	44
Şekil 4. 2: 1.gün sonunda arpa kök ve gövde uzunluklarının kontrol grubuna göre değişimi	45

Şekil 4. 3: 1.gün sonunda buğday kök ve gövde uzunluklarının kontrol grubuna göre değişimi	46
Şekil 4. 4: 5.gün sonunda arpa kök ve gövde uzunluklarının kontrol grubuna göre değişimi	47
Şekil 4. 5: 5.gün sonunda buğday kök ve gövde uzunluklarının kontrol grubuna göre değişimi	48
Şekil 4. 6: 1.gün sonunda arpa kök ve gövdedeki total protein içerikleri.....	51
Şekil 4. 7: 1.gün sonunda buğday kök ve gövdedeki total protein içerikleri.....	52
Şekil 4. 8: 5.gün sonunda arpa kök ve gövdedeki total protein içerikleri.....	53
Şekil 4. 9: 5.gün sonunda buğday kök ve gövdedeki total protein içerikleri.....	54
Şekil 4. 10: 1.gün sonunda arpa kök ve gövdedeki MDA içeriği.....	55
Şekil 4.11: 1.gün sonunda buğday kök ve gövdedeki MDA içeriği.....	56
Şekil 4.12: 5.gün sonunda arpa kök ve gövdedeki MDA içeriği.....	57
Şekil 4. 13: 5.gün sonunda buğday kök ve gövdedeki MDA içeriği.....	58
Şekil 4.14: Ağır metal karışımının 1.gün ve 5.gün sonunda arpa’da jasmonik asit üzerine etkisi.....	60
Şekil 4.15: Ağır metal karışımının 1.gün ve 5.gün buğday’da jasmonik asit üzerine etkisi.....	61
Şekil 4. 16: Ağır metal karışımının 1.gün ve 5.gün sonunda arpa’da Indol-3-asetik asit üzerine etkisi.....	62
Şekil 4. 17: Ağır metal karışımının 1.gün ve 5.gün sonunda buğday’da Indol-3-asetik asit üzerine etkisi.....	63
Şekil 4. 18: Ağır metal karışımının 1.gün ve 5. gün sonunda arpa’da absisik asit miktarları üzerine etkisi.....	64
Şekil 4. 19: Ağır metal karışımının 1.gün ve 5.gün sonunda buğday’da absisik asit miktarları üzerine etkisi.....	65
Şekil 4. 20: Ağır metal karışımı uygulanan arpa’da 1.gün ve 5.gün sonunda redükte glutatyon seviyeleri.....	66
Şekil 4. 21: Ağır metal karışımı uygulanan buğday’da 1.gün ve 5.gün sonunda redükte glutatyon seviyeleri.....	67
Şekil 4. 22: Ağır metal karışımı uygulanan buğday’da 1.gün sonunda antioksidan enzimlerin gen ekspresyon seviyeleri	68

Şekil 4. 23: Ağır metal karışımı uygulanan buğday’da 5.gün sonunda antioksidan enzimlerin gen ekspresyon seviyeleri	69
Şekil 4. 24: Ağır metal karışımı uygulanan arpa’da 1.gün sonunda antioksidan enzimlerin gen ekspresyon seviyeleri	70
Şekil 4. 25: Ağır metal karışımı uygulanan arpa’da 5.gün sonunda antioksidan enzimlerin gen ekspresyon seviyeleri	70



TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2. 1: Radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri.....	20
Tablo 2. 2: Bitkilerde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların bulundukları yerler ve görevleri.....	24
Tablo 4. 1: Ağır metal karışımının 1.gün sonunda buğday ve arpada kök gövde taze ve kuru ağırlıkları üzerine etkisi (gr).....	49
Tablo 4. 2: Ağır metal karışımının 5.gün sonunda buğday ve arpada kök gövde taze ve kuru ağırlıkları üzerine etkisi (gr).....	50
Tablo 4.3: 1.gün sonunda arpa’da ağır metal birikimi (ppb).....	59
Tablo 4.4: 5.gün sonunda arpa’da ağır metal birikimi (ppb).....	59
Tablo 4.5: 1.gün sonunda buğday’da ağır metal birikimi (ppb).....	59
Tablo 4.6: 5.gün sonunda buğday’da ağır metal birikimi (ppb).....	59

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Ülkemiz ekonomisinde önemli bir rolü olan tahıl ürünleri insan beslenmesi açısında da büyük öneme sahiptir. Tahıllar insanoğlunun temel besinlerinden olan ekmeğin ham maddesi olmasının yansira, hayvanların beslenmesin de yem olarak ve birçok endüstriyel ürünlerin üretiminde de temel madde olarak kullanılmaktadır. Ayrıca biyolojik değerleri yüksek protein içermesi nedeniyle en çok tüketilen besin kaynaklarındanıdır. Bu nedenle yeryüzünde insanların besin ihtiyacını karşılamak için yaygın bir biçimde tahıl üretimi yapılmaktadır. Dünyada yaklaşık olarak 674,3 milyon hektarlık bir alanda ekim yapılırken bu alanda tahıl üretiminin ise yaklaşık 2.075 milyon ton civarındadır (Anonim, 2003). Dünyada olduğu gibi ülkemizde de iklimin tahıl ürünlerinin üretime uygun olması nedeniyle özellikle buğday ve arpa üretimi yaygın bir biçimde yapılmaktadır.

Tahıl üretimi arasında önemli bir yeri olan arpa, insanoğlunun ilk kültüre aldığı bitkiler arasındadır. İlk başlarda sadece beslenme için kullanılırken, günümüzde genel olarak hayvanların beslenmesinde yem olarak aynı zamanda maltlık olarak gerek dünya gerekse ülkemiz endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Arpa gibi buğday da dünyada en yaygın olarak yetiştirilen kültür bitkisidir. Yüksek adaptasyonu sayesinde her türlü iklim ve ekosistemde yetişebilme özelliğine sahip olan buğday insanoğlunun ilk çağlardan beri en önemli besin kaynağı olmuştur (Anonim, 2003).

Dünya nüfusunun artışına bağlı olarak artan besin ihtiyacını karşılamak için gelişen teknoloji, sanayileşme ve modern tarıma bağlı olarak son yüzyılda tahıl ürünlerinin üretim alanlarında ve üretilen ürünlerde gözle görülebilir değişikliklerin olmasına neden olmuştur. Ancak bu değişimin sonucunda meydana gelen olumsuzluklardan en çok etkilenen yine insanoğlu olmuştur. Sanayileşme nedeniyle tarım alanları azalmış ve ekim yapılan alanlarda da üretimi artırmak amacıyla özellikle kimyasal gübre, herbisit, pestisit gibi kimyasal maddelerin kullanımında büyük bir artış olmuştur.

Tarımsal üretimin artmasına neden olan bu kimyasal maddelerden bazıları bitki gelişiminde hormon etkisi göstererek tahıl üretiminde önemli bir yer tutmaktadır. Ancak bu maddeler ekosistemde tahıl ürünleri ile beslenen diğer canlılara besin zinciri ile geçerek bu canlılarda hücresel hasarların yanı sıra kalıtsal yapının da bozulmasına neden olmaktadır. Ayrıca bu kimyasal maddeler ekosistemde tamamen yok olmamakta ekosistemde ve burada yaşayan canlılarda sürekli birikmekte ve ekosistemde yaşayan canlılara toksik etki yapmaktadır (Erdin vd., 2004).

Tarım alanlarının giderek azalmasına neden olan bu kimyasal maddelerden bazıları bitki gelişiminde hormon etkisi göstererek tahıl üretiminde önemli bir yer tutmaktadır. Ancak bu maddeler ekosistemde tahıl ürünleri ile beslenen diğer canlılara besin zinciri ile geçerek bu canlılarda hücresel hasarların yanı sıra kalıtsal yapının da bozulmasına neden olmaktadır. Ayrıca bu kimyasal maddeler ekosistemde tamamen yok olmamakta ekosistemde ve burada yaşayan canlılarda sürekli birikmekte ve ekosistemde yaşayan canlılara toksik etki yapmaktadır (Erdin vd., 2004).

Tarım alanlarının giderek azalmasına neden olan bu kimyasal maddelerden bazıları bitki gelişiminde hormon etkisi göstererek tahıl üretiminde önemli bir yer tutmaktadır. Ancak bu maddeler ekosistemde tahıl ürünleri ile beslenen diğer canlılara besin zinciri ile geçerek bu canlılarda hücresel hasarların yanı sıra kalıtsal yapının da bozulmasına neden olmaktadır. Ayrıca bu kimyasal maddeler ekosistemde tamamen yok olmamakta ekosistemde ve burada yaşayan canlılarda sürekli birikmekte ve ekosistemde yaşayan canlılara toksik etki yapmaktadır (Erdin vd., 2004).

Çeşitli faaliyetler sonucu ekosisteme atılan ve besin zinciri yoluyla da tüm canlılara ulaşan ve canlılarda birikime neden olan bu toksik maddeler canlılarda serbest radikal oluşumuna yol açmakta ve bu serbest radikallerde canlılarda pek çok hastalıkların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Mercan, 2004). Serbest oksijen radikalleri (SOR) yüksek düzeyde reaktif özellik taşıyan ve oksijen içeren küçük moleküllerdir. Aslında SOR canlıda meydana gelen normal metabolik reaksiyonları sırasında küçük miktarda üretilen bir maddedir. Normal şartlarda metabolik reaksiyonları sırasında az miktarda üretilen bu radikaller canlıya zarar vermezler. Ancak fazla miktarda birikmeleri durumunda hücre içerisindeki yer alan temel organik maddelerden protein, yağ ve DNA gibi maddelerle reaksiyona girerek canlıda önemli zararların ortaya çıkmasına neden olurlar (Wu ve Cederbaum, 2003). SOR üretimi organizma içerisinde, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistem tarafından düzenlenir. Hücre içerisindeki SOR'nin artması, hücredeki oksidan ve antioksidan dengesinin bozulmasına neden olurken, bu durum canlının hücre

yapısında ve moleküllerinde çeşitli hasarların oluşmasına yol açar. Canlılarda oksidatif stres oluşumu canlının hızlı yaşlanmasına, canlıda nörolojik bozukluklara ve kanser gibi pek çok hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur (Liu vd.,2003).

Bitkilerin gelişip büyümesi için ekolojik şartların optimum olması gerekmektedir. Ancak bazı bitkiler, ortam şartlarında bir değişim olduğu zaman metabolizmalarını bu şartlara göre ayarlayarak (ortama uyum sağlayarak) gelişimlerini devam ettirebilirler. Ancak bu tolerans sınırlarının üzerinde beklenmedik koşullara maruz kalmaları durumunda, bu koşullar bitkinin gelişimini, verimliliğini ve hayatta kalmasını etkiler. Bitkide hasarların ve fizyolojik değişimlerin meydana gelmesine neden olur (Shao vd., 2008). Bitkilerin gelişimi sırasında elverişsiz şartlara sebep olan, bitki gelişimini ve fizyolojik olaylarını etkileyen bunun gibi çevresel faktörlerin tümüne Stres adı verilir. Bitkileri strese sokan çevresel faktörlerden en önemlileri madencilik, kentsel ve endüstriyel atıklar, tarımda kullanılan çeşitli pestisit, herbisit ve yapay gübreler gibi maddeler ve trafikte açığa çıkan egzoz gazları aracılığıyla ekosisteme verilen aşırı miktarda ağır metallerdir. Ekosistemde kirliliğe neden olan kadmiyum, kurşun, arsenik gibi ağır metaller bitkilerde özellikle ekonomik öneme sahip tahıl ürünlerinde ağır metal stresine neden olurken, bu ürünlerin büyümesini sınırlamakta ve ürün verim ve kalitesini düşürmektedir (Shanker vd, 2005).

Bu ağır metallerden kadmiyum bitkilerin yapısında bulunan azot ve karbohidrat gibi temel maddelerin metabolizmasında da değişikliklere neden olmaktadır. Ayrıca proteinlerin yapısındaki-SH gruplarını ve enzimleri etkilemekte, fotosentezde görev yapan enzimlerin sentezini bozarak fotosentezi engellemekte ve stomalarda kapanmaya yol açarak transpirasyon ile su kaybının azalmasına ve bitki fizyolojisinde bir takım değişimlere yol açmaktadır (Sheoran vd, 1990; Zengin ve Munzuroğlu, 2005).

Endüstriyel ve madencilik faktörleri gibi kirlenme kaynaklarına ek olarak kireç taşı, kurşun yatakları gibi faaliyetlerle de ekosisteme verilen kurşun bitkilerde doğal olarak bulunur ancak bitki gelişimi için mutlak gereken bir element değildir. Kurşunun toksik etkisi ortamdaki yoğunluğuna, diğer maddelerle tuz oluşturma şekline, bulunduğu toprağın niteliğine ve bitki türüne bağlı olarak değişmektedir. Kurşun'un bitkilerdeki toksik etkisi genel olarak bitkideki makromoleküllerin fonksiyonel gruplarında yer alan metal iyonlarıyla birleşmesi ile olur. Böylece fotosentez ve bitkinin su içeriğini

düzenleyen çeşitli enzimlerin aktivitesini değiştirerek bitkinin çimlenmesi, köklerin sürgün vermesi gibi bitki gelişim olaylarını etkilemektedir (Lamhamdi, vd.,2011).

Arsenik yer kabuğunda en çok bulunan ağır metallere biridir. Tarımda, eczacılıkta, sanayi endüstrisinde hammadde olarak kullanılan arsenik ekosistemde bulunan canlılar için oldukça toksik etkisi olan ağır metallere dendir. Özellikle inorganik arsenik (arsenat ve arsenit) bitkiler için yüksek derecede toksiktir. Çünkü bu maddeler bitkilerdeki fosforilasyonu çözer ve bitkinin fosfat alımını engeller. Hatta bu madde bitkilerde yüksek konsantrasyonlara eriştiğinde bitki büyümesini engelleyerek bitkinin ölümüne dahi neden olur (Chun-Nu vd., 2006). Arseniğin ekosisteme girdiği en önemli kaynaklar, insektisitler, herbisitler, ahşap koruyucular, kokusuz boya üretimi, madencilik ve kömür yataklarıdır (Castillo-Michel, vd., 2007). Çevresel kirlenmenin bir sonucu olarak arsenik karasal ekosistemlerde olduğu gibi sucul ekosistemleri de etkileyerek içme suyu ve beslenme yoluyla insanlara kadar ulaşmaktadır. Çin’de arsenik madeni civarındaki yerel halkın % 35’inden fazlasının arsenik toksisitesi ile karşı karşıya olduğu bilinmektedir (Wang, vd.,1999). Bu alanda yapılan çalışmalar buğday, pirinç ve topraklardaki arsenik konsantrasyonu ile insanların saçlarındaki arsenik konsantrasyonu arasında anlamlı bir ilişkinin olduğunu göstermiştir (Lin, vd., 2001).

Çeşitli çevresel stresler süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türlerinde artışa sebep olur. Reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi hücre yapısı ve metabolizma üzerinde negatif etkilere yol açar. Reaktif oksijen türleri proteinler, DNA ve hücre membranlarında oksidatif hasara sebep oldukları için hücreyi ölüme dahi götürebilmektedirler. Birçok canlı türü gibi bitki hücreleri de belli seviyeye kadar ROT ile enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla mücadele edebilirler. Bitkilerdeki enzimatik antioksidan savunmanın temel elemanları Süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), Katalaz (CAT) ve glutatyon sentaz (GS) tir (Bucova vd., 2012) Vasküler bitkiler çevre şartlarındaki değişikliklere hızlı şekilde cevap vermek zorundadırlar. Oluşan strese en erken cevap Reaktif oksijen türlerinin artmasına bağlı olarak kök büyümesinin inhibisyonudur (Potters vd., 2009) Arsenik kadmiyum ve kurşun biyolojik proseslerde esansiyel olmayan canlılar için toksik olduğu birçok çalışma ile gösterilmiş ağır metallere dendir.

Çevre kirliliği sebebi ile su topraktaki konsantrasyonları tolere edilebilir sınırların üzerine çıkmıştır ve canlılığı tehdit etmektedir. Bu nedenle bu çalışmada Trakya Trımsal

Araştırma Enstitüsü tarafından 2014 yılında tescil edilen bir ekmeklik buğday çeşidi olan “Saban”,ve bir arpa çeşidi olan “Hasat” çeşitleri üzerinde arsenik kadmiyum ve kurşunun kısa süreli uygulamasının bitkilerde stres koşulları sırasında önemli rolü olduğu birçok yayında ifade edilen antioksidan enzimler SOD, CAT ve GS enzimlerinin metal stresi sırasında ifade düzeylerinin nasıl etkilendiği araştırılmıştır.



BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. TAHİLLAR VE ÖNEMİ

Tarla bitkileri, tarım alanlarında yetiştirilen genelde otsu yapıda tek yıllık, bazen de çalimsı veya odunumsu yapıda çok yıllık kültür bitkileridir. Tarla bitkileri genel olarak; tahıllar, yemeklik baklagiller, endüstri bitkileri ve yem bitkileri olarak dört ana grup altında toplanır. Buna ilave olarak hayvan beslenmesinde kullanılan doğal ve yapay oluşturulmuş çayır ve meralar da yetişen bitkilerde tarla bitkileri grubunda yer alır. Tohumlarının büyük bir bölümü nişastadan oluşan ve bu tohumların öğütülmesi sonucunda insanların temel besinini oluşturan un ve kepek elde edilen, buna ilave olarak protein, yağ ve mineral maddeleri de bünyesinde bulunduran, yetiştirilmesi için belirli ekolojik faktörlere (Sıcaklık, nem, ışık vb) gereksinim duyan ürünlerin bulunduğu gruba tahıl (Hububat) adı verilir. Tahılların tümü buğdaygiller (Gramineae =Poaceae) familyası içerisinde yer alır. Bu tahıl çeşitlerinden buğday (*Triticum sp*), arpa (*Hordeum vulgare* L.), yulaf (*Avena sativa* L.), çavdar (*Secale cereale* L.) ve tritikale (*Triticosecale* Wittm.) gibi tahıllar serin iklim tahılları olarak isimlendirilirken; çeltik (*Oryza spp.* L.), mısır (*Zea mays* L.), kocadarı (*Sorghum bicolor* L.), kumdarı (*Arena milium*), cindarı (*Panicum italicum* L.) ve kuşyemi (*Phalaris canariensis* L.) ise sıcak iklim tahılları olarak isimlendirilir.

İnsanoğlunun var oluşundan bu yana beslenmesinde önemli bir yeri olan tahıl bitkilerine yüksek oranda karbonhidrata dayalı enerji ve protein sağlayıcı özelliği nedeniyle büyük önem verilmiştir. Bunun yansısı insanlara verdiği doyum hissi nedeniyle de ayrı bir öneme sahiptir. Tahıl ürünlerinin tat ve aroma yönünden nötr (etkisiz) özellikte olması ve bu özelliği sayesinde de ilk çağlardan bu yana sürekli yenilen temel bir gıda maddesi olma özelliklerini korumuştur. İnsan beslenmesinde bu kadar

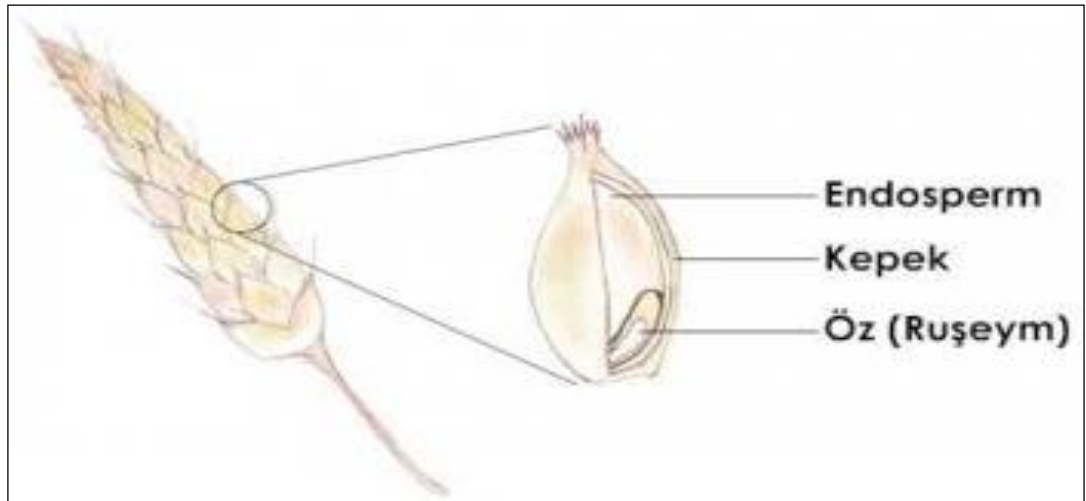
önemli bir yere sahip olan tahıl ürünlerinde lif oranının yüksek olması az yağ içermesi nedeniyle insan vücudunu bazı hastalıklara karşı korumaya da yardım etmektedir. Ancak tahıl ürünlerinin insan sağlığı üzerine bu olumlu etkilerinin yanı sıra azda olsa bazı kişilerde çölyak ve fenilketonuri gibi hastalıklara da neden olabilmektedir (Köksel ve Demiralp, 1994).

Bir tahıl tanesinin yapısına baktığımızda genel olarak kepek, rüşeym ve endosperm olmak üzere 3 kısımdan oluşmaktadır (Şekil 2.1).

1) Kepek: Tahıl tanesinin dış kısmında bulunur ve taneyi dıştan örten katmanlı lifli bir örtüdür. Tohumun içerisinde kalan diğer iki kısmı kapatarak tohum tanesini dıştan gelecek zararlara karşı korur. Besin olarakta, antioksidan, demir, çinko, bakır, magnezyum ve B vitamini gibi çeşitli bitkisel besinleri içerir.

2) Rüşeym: Tahıl tanesinin çimlenerek yeni bir bitkiyi meydana getirecek olan bölümü yani embriyodur. Bu bölümde B ve E vitaminleri, doymamış yağlar gibi çeşitli bitkisel besinler vardır.

3) Endosperm: Tohumun çimlenmesi sırasında bitki fotosentez yapana kadar bitkinin beslenmesi için gerekli olan karbonhidratlar, proteinler vitamin ve bazı mineralleri sağlayan bölümdür. Beyaz un sadece endosperm içerir.



Şekil 2.1: Bir tahıl tanesinin yapısı.(<http://yadelfin.blogcu.com/bugdayin-anatomisi/13437311> 23.09.2016 de alınmıştır.)

ARPA: Gramineae familyasında *Hordeum* cinsine ait olan arpa ilk kültüre alınan tarla bitkilerinden biridir. *Hordeum* cinsi kendi içinde *Hordeum*, *Anisolepis*, *Critesion* ve *Stenostachys* olmak üzere 4 seksiyona ayrılır. *Hordeum* seksiyonu ise *Hordeum vulgare* L. *Hordeum bulbosum* L. ve *Hordeum murinum* L. olmak üzere 3 tür içermektedir. Dünyada ve ülkemizde kültürü yapılan arpa çeşidi *Hordeum vulgare* türüne girmektedir. Temelde arpa, hayvanların beslenmesinde yem bitkisi olarak kullanılırken un ve bira sanayinde de kullanılan önemli bir tahıl bitkisi olmasının yanısıra çoraklaşan toprakların ıslah edilmesi amacıyla bu alanlara ekilen önemli bir kültür bitkisidir. Arpa Türkiye'de daha çok hayvan yemi olarak, az bir kısmı da malt sanayinde kullanılmaktadır.

BUĞDAY: Gramineae familyasında *Triticum* cinsine ait olan buğday, tüm dünya da temel gıda maddesi olarak insanlarca en fazla kullanılan ve tarımı yapılan kültür bitkilerinden biridir.

Buğdaylar 3 grup altında sınıflandırılmaktadır.

- 1) Makarnalık Buğday (*Triticum durum*)
- 2) Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum*)
- 3) Topbaş veya Bisküvilik Buğday (*Triticum compactum*)

Ancak halk arasında ve buğday piyasasında buğdaylar genel olarak tohum tanesinin karakterine göre sınıflandırılır (Armutlu 2013).

- 1) Tane sertliğine göre: Sert ve Yumuşak Buğday
- 2) Tane rengine göre: Kırmızı ve Beyaz Buğday
- 3) Ekiliş zamanına göre: Yazlık ve Kışlık Buğday

Buğday diğer tahıl ürünlerine göre dünya'da 217 milyon hektarlık alanda ekimi yapılırken, 629 milyon tonluk üretim miktarı ile ilk sırada yer almaktadır (Fao, 2005). Ülkemizdeki ekili alanlarının yaklaşık % 50'sini tahıl ürünleri oluştururken bunun da %70 lik gibi büyük bir bölümünü buğday oluşturmaktadır (Güleç, vd., 2010). Ülkemizde artan nüfusla birlikte ve buğdaydan elde edilen ekmek, bulgur, makarna, irmik, bisküvi, nişasta gibi ürünlere de ihtiyaç giderek artmaktadır. Son 20 yılda Türkiye'de ekilen alan 6,6- 9,8 milyon hektar iken, bu alanlarda elde edilen üretim 15,7 – 22,05 milyon ton civarındadır. Ülkemizin Trakya bölgesinde 550.000 hektarlık bir alanda ekim yapılmakta ve 2 milyon ton civarında ürün elde edilmektedir (TÜİK, 2017)

2.2. BİTKİLERDE STRES

Bitkilerin gelişimi sırasında elverişsiz şartlara sebep olan, bitki gelişimini ve fizyolojik olaylarını etkileyen çevresel faktörlerin tümüne stres adı verilir. Genel olarak biyotik faktörler patojenler, mikroorganizmalar, böcekler, hayvanlar gibi canlıların meydana getirdiği değişimlerdir. Abiyotik faktörler ise fiziksel ve kimyasal faktörlerdir. Stres, bitkilerin metabolik ve fizyolojik olaylarını etkileyerek büyüme ve gelişmeyi olumsuz şekilde etkilerken, ürün kalitesi ve verimin azalmasına neden olarak bitkinin ya da organlarının ölümüne sebep olmaktadır. Bitkilerde görülen başlıca stres çeşitleri aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır.

- a) Su Stresi (Kuraklık Stresi)
- b) Tuz Stresi
- c) Sıcaklık Stresi
- d) Don Stresi
- e) Işık Stresi
- f) Hastalık Stresi
- g) Su Taşkını (Fazla Su) Stres
- h) Oksidatif Stres
- i) Hava Kirliliği Stresi
- j) Ağır Metal Stresi

Biyotik ve abiyotik olarak gruplandırılan stres faktörlerinin etkisi altında olan bitkilerde birtakım savunma mekanizmaları geliştirmektedir. Bu mekanizmalar 1) Makro moleküllerin ve iyonların homeostasisi; 2) Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) oluşumu; 3) Detoksifikasyon dur (Büyük, vd.,2012). Abiyotik stres şartları bitkide oldukça toksik etkisi olan reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumuna neden olmaktadır. Hücrelerde bulunan reaktif oksijen türleri, Singlet oksijen ($1O_2$), Süperoksit anyonu (O_2^-), Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve Hidroksil radikali ($OH^\cdot$) gruplarıdır. Normal koşullar altındaki bir bitki hücresindeki bu maddelerin miktarları denge halinde olması nedeniyle hücreye her hangi bir zararı olmaz (Halliwell ve Gutteridge, 1998).

Normal koşullar altında ROT'lar; bitkilerin gelişmesinde rol oynayan bitki hormonlarının üretiminde, hücre duvarındaki polimerlerin yapısının değişiminde ve bitkinin çevredeki değişiklikleri algılaması gibi bitkinin birçok önemli metabolik ve

fizyolojik olaylarında “oksidatif sinyal molekülü” olarak görev alırlar. Ancak bitkilerde oluşan stres sonucunda artan ROT bitki hücresinde lipid, protein ve enzim yapısının bozulmasına, klorofilin parçalanmasına, DNA ve RNA’nın yanısıra hücrenin zarar görmesine neden olmaktadır (Swanson ve Gilroy, 2010).

2.3. AĞIR METAL KİRLİLİĞİ

Günümüzde özellikle kimya sanayinin gelişimiyle birlikte kimyasal maddelerde çeşitlenmeler olmuş ve bu gün yaklaşık 9 milyon kimyasal maddenin 7600’ü günlük yaşamda kullanılmaktadır. Bu kimyasal maddeler içerisinde ekosistemde ağır tahribatlara neden olan ağır metaller önemli bir yer tutmaktadır. Ağır metal, atom ağırlığı 40’tan fazla olan ve eksenindeki elektron dağılımı benzerlik gösteren ve özgül ağırlığı 5 g/cm³’ten fazla olan kimyasal maddelerdir. Bu ağır metaller canlıların kullanımı açısından iz elementler olarak isimlendirilir. Ancak canlılar bu elementlere isminden de anlaşılacağı gibi çok düşük miktarlarda gereksinim duyarlar. Bu elementlerden bazılarının eksikliğinde veya yokluğunda canlılık faaliyetleri sekteye uğrar ve canlıdaki büyüme ve üreme durur. Bu ağır metallerden Bakır (Cu), Çinko (Zn), Demir (Fe), Mangan (Mn), Molibden (Mo), Nikel (Ni) ve Kobalt (Co) bitkilerin büyümesi ve gelişmesi için gerekli elementler grubunda yer alırken, Arsenik (As), Civa (Hg), Kadmiyum (Cd), Kurşun (Pb) ve Krom (Cr) gibi elementler ise bitki gelişimi için gerekli değildir (Köse, 2007; Niess, 1999).Ancak bazı ağır metal elementlerinin canlılar açısından önemi canlı türlerine göre değişim göstermektedir. Nikel bitkilerde toksik bir etki gösterirken, hayvanlarda eser miktarda bulunması gereken bir elementtir (Kahvecioğlu, vd.,2009).

Günümüzde gelişen teknoloji ve sanayileşmeye bağlı olarak artan çevresel kirlenme sonucunda insanlar için gerekli olan gıda kaynaklarında kirlenmesi insan sağlığını tehdit eder bir duruma gelmiştir. Çeşitli yollarla çevreye atılan kirletici maddelerin bazıları besin zinciri yoluyla tüm canlılara geçerek bu canlılarda bir birikime neden olmaktadır. Bazı kirleticiler besin zincirinin ilk halkalarında az miktarda bulunsalarda, birbirini izleyen halkalarda yoğunlukları artabilir ve bu biyolojik birikim olarak adlandırılır. Bitkiler çeşitli yollarla (atmosfer, organik gübre ve tarımsal ilaçlar, atık sular vb) toprağa bulaşan kirleticileri özelliklede ağır metalleri organizma içerisinde biriktirme eğilimindedir. Organik kirleticilerin aksine ağır metaller toprakta parçalanmadıkları için birikime neden olmakta ve yüksek seviyelere ulaştığında canlıya zarar vermesinin yanı

sıra toprak kalitesinide etkileyerek üretim miktarında ve ürün kalitesinde bozulmalarda da neden olmaktadır (Blaylock ve Huang, 2000; Wu vd.,2010).

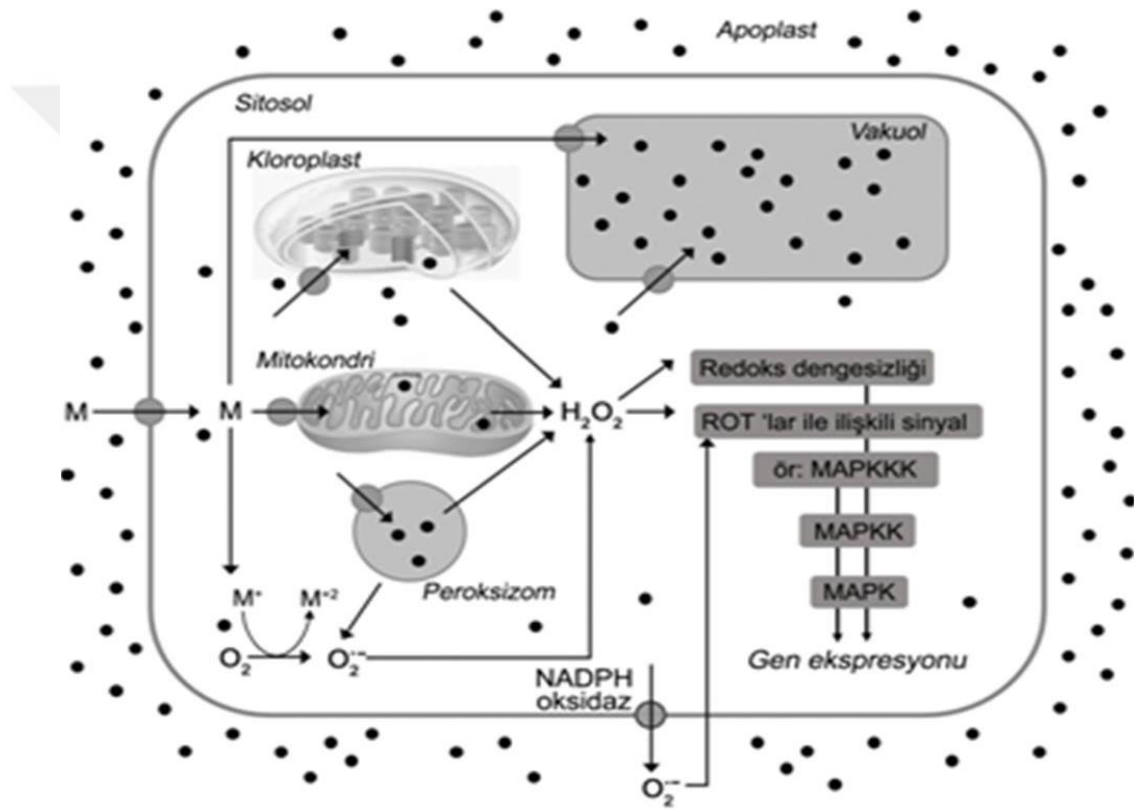
Bazı ağır metaller tüm canlıların yapısında belirli limit değerlerinde bulunan ve yapısal olarak metabolizmada bazı görevler üstlenen elementlerdir. Bu nedenle eksikliğinde canlı yapısında ve fizyolojisinde bazı bozukluklar gelişebilir. Ancak ağır metaller yüksek dozda ya da düşük dozlarda alındığında canlılarda birtakım reaksiyonların gelişmesine neden olabilirler.

Özellikle toprak ekosistemini etkileyerek bitki gelişimini olumsuz yönde etkileyen, ağır metaller endüstriyel veya evsel atık sular, maden işletmeleri, matbaacılık, fotoğrafçılık, tekstil, elektrik-elektronik, kimya ve boya sanayi gibi faaliyetler sonucunda ekosisteme verilmektedir (Sağlam ve Cihangir,1995). Endüstri kuruluşları çeşitli imalat ve üretim için kullandıkları civa, çinko, kobalt, bakır, demir, kurşun, krom, arsenik ve gümüş gibi ağır metalleri atık sular ya da başka yollarla ekosisteme vermektedir. (Wong ve Kwok 1992; Gadd ve Griffiths 1978; Ting vd.,1991). Aynı şekilde; tahıl bitkilerinin üretimi için kullanılan pestisitlerinde ekosistemdeki kadmiyum, kurşun ve arsenik gibi ağır metallerin artışına neden olduğu belirlenmiştir. Polonya, Bulgaristan ve İtalya gibi ülkelerin bazı bölgelerindeki üretimi yapılan ürünlerden elde edilen şarap ve alkol gibi içeceklerde, ağır metal seviyesinin Avrupa Birliği'nin yasal olarak izin verdiği değer aralığından yüksek olduğu tesbit edilmiştir (Formicki, vd.,2012).

Çeşitli faaliyetler sonucunda ekosisteme verilen tüm kirletici maddeler bu ekosistemde yaşayan bitkiler de strese neden olarak bitkinin fizyolojisinde ve genetik yapısında bir takım değişiklikler meydana getirmekte ve bitkide ürün kaybına ve hatta ölümüne neden olmaktadır (Zengin ve Munzuroğlu, 2003). Bitki gelişimi için mutlak gerekli olsada, olmasada ağır metallerin canlıda aşırı birikimi bitkinin fizyolojisini etkileyerek organizmada, besin maddelerinin iletimini, fotosentezi ve enzim aktivitesini, nükleik asit yapısını, klorofil oluşumunu, olumsuz etkilemekte membranlarda hasar oluşumuna ve hormon dengesinin bozulmasına neden olmaktadır (Yıldız ve Aksu, 2005).

Ekosistemde bulunan birçok ağır metal, beslenme, solunum faaliyetleri sonucu organizma içerisine girmektedir (Lauwerys, vd.,1993). Organizma içerisine alınan bu ağır metaller, canlı metabolizması ve fizyolojisi üzerine etkisi değişik yollarla olmaktadır. Organizmada ağır metaller proteinlerle etkileşime girerek proteinlerin enzimatik özelliğine ya da yapısal ve fonksiyonel değişimine neden olarak onları inhibe edebildiği

gibi temel moleküllerin yerini alarak ta toksik etki göstermektedir (Bremner, 1974). Değişik yollarla alınan ağır metaller taşıyıcılar tarafından hücre içine alınmakta ve ağır metallerin redoks aktiviteleri veya hücre içine özgü şekilde metabolizmayı etkileyerek organellerde ROT oluşumuna neden olmaktadır. Plazma membranında lokalize olmuş NADPH oksidaz enziminin ağır metal bağımlı aktivasyonu da ROT üretilmesine neden olmaktadır. ROT'ların aşırı üretimi, bitki büyümesi inhibisyonuna ve hücre zararına neden olabilen redoks dengesizliklerine ve sinyal işlevlerinde (MAPK yolları gibi) bozukluklara neden olmaktadır (Şekil 2.2)



Şekil 2.2:Ağır metal bağımlı reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretim yolları. (Siyah noktalar, apoplastta ve hücredeki ağır metal dağılımını göstermektedir). Sharma ve Dietz, 2008 de alınmıştır.

2.4. KADMİYUM (Cd)

Kadmiyum doğada nispeten nadir bulunan ağır metallere aittir. Cd, canlılar için gerekli elementler grubuna girmemektedir. Bu nedenle de çok küçük konsantrasyonlarda bile toksiktir ve biyolojik yarı ömrü uzun olan önemli bir kirleticidir. Cd diğer ağır metaller arasında, suda iyi çözündüğünden dolayı doğada yayılma hızı yüksek bir elementtir (Goyer, 1991; Lyons vd.,1996). Cd önemli enzimlerde ve organlarda eser miktarda bulunan çinkonun yerini alarak, enzimlerin ve bu organlardaki görevlerini etkilemektedir.

Cd'un toprakta doğal olarak bulunmasının dışında tarımda kullanılan ilaç ve gübreler, sanayi ve evsel atıklar antropojenik kaynaklar vasıtası ile toprağa karışmaktadır (Manta, vd.,2002; Komarnicki, 2005). Son yıllarda topraklar da bulunan Cd miktarında fosforlu gübre ve arıtma sistemlerinde elde edilen çamurlar yoğun olarak kullandığı için önemli bir artış olmuştur (Özbek, vd.,1995).

Buna ilave olarak yirminci yüzyılın ikinci yarısından sonra endüstriyel gelişimlere ve kentleşmeye bağlı olarak ortaya çıkan hava kirliliği günümüzde önemli bir çevresel sorundur. Havaya karışan Cd partikülleri yağmurların etkisiyle yeryüzüne inerek toprağa ve suya karışırlar. Cd suda çözünür olması nedeniyle bitki kökleri tarafından alınmakta ve diğer dokulara taşınmaktadır. Bitkilerde biriken Cd besin zinciri yoluyla insanlara kadar erişmektedir. İnsanlarda nörotoksik, mutajen ve karsinojen etkiler göstermektedir (Dalcorsio, vd., 2010; Gill, vd., 2011).

Toprakta bulunan Cd ve Pb'un yüksek dozlarda bitkiler tarafından alınması durumunda bitkilerin gelişmesini etkileyerek, ürün ve verim kalitesinin düşmesine ayrıca insan için besin olma özelliğinin azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca Cd, yaprakların klorozuna ve yaprak yaşlanmasının artmasına neden olurken fotosentez hızında bir düşüş ve metabolik olaylarda da bir değişim meydana getirmektedir (Wang, vd., 2006; Zheljaskov, vd., 2006). Cd bitkiler tarafından aşırı dozda alınması durumunda bitkilerde fotosentezi olumsuz etkileyerek bir dizi reaksiyonlar meydana getirmektedir. Bu klorofil sentezinde görevli protoklorofil reduktaz ile aminolevulinik asit sentezinin engellenmesiyle başlar. Buna ilave olarak serbest radikal oluşumuna yol açarak tilakoid membran lipidlerinin oksidatif yıkımına bağlı olarak ta klorofil yıkımının artmasına ve sentezinin engellenmesine neden olmaktadır. Cd genel olarak protein kökenli bileşiklerle

yani aminoasitlerle bağ kurarak metabolizmaların işleyişini durdurmakta veya yavaşlatmaktadır (Zengin ve Munzuroğlu, 2005.)

Normalde, Cd iyonları bitkilerin köklerinde tutunur ve az bir kısmı gövdeye geçer. Buna bağlı olarak bitki dokusundaki Cd konsantrasyonu kök>gövde>yaprak>meyve>tohum şeklindedir. Ancak bazı çalışmalarda Cd bitkinin kök, gövde, yaprak gibi kısımlarında bulunmasına rağmen bitki meyvesinde bulunmadığı da belirtilmektedir (Benavides, vd.,2005).Bitkiler tarafından absorbe edilen Cd, çeşitli hücresel işlemleri olumsuz olarak etkileyerek bitki büyümesinde azalmaya yaprakların klorozuna ve yaprak yaşlanmasının artmasına neden olduğu bildirilmiştir. Bu görünür septomlar fotosentez hızında bir düşüş ve metabolik yollardaki değişimleri yansıtmaktadır (Gonzalez vd.,2017). Özellikle besin zinciri yoluyla insanlara kadar ulaşan Cd ve bileşenleri insan böbreğinde ve karaciğer gibi bazı dokularda birikime neden olarak insanlarda tansiyon, akciğer kanseri ve kemik erimesi gibi hastalıklara neden olurken, protein, lipid bozulmasına ve DNA hasarına neden olan serbest radikallerin artışına neden olmaktadır (Lin, vd., 2001; Aravind ve Prasad, 2005; Bertin ve Auerbeck, 2006).

2.5. KURŞUN (Pb)

Kurşun doğada doğal olarak bulunmasına rağmen petrol sanayi (özellikle benzine eklenmesi) çeşitli kimya ve boya sanayinde, gıda sanayinde (konserve üretimi), matbaacılık, cam ve plastik üretiminde yaygın olarak kullanılmakta ve bu faaliyetler sonucu çevreye verilmektedir (Nriagu ve Pacyna,1988; Kaya, vd.,1998). Ancak son yıllarda kurşunsuz benzin üretimi ve kullanımı ekosisteme verilen kurşun miktarında bir azalmaya neden olmuştur.

Pb, temel tahıl ürünlerinde, meyve ve sebzelerde, et ve deniz ürünlerinde, su ve bazı içecek türleri ile baharatlar gibi temel gıdalarda doğal olarak ya da kontamine olarak bulunmaktadır (Tayfur, 2009). Genel olarak gıda işleme yöntemleri ve kullanılan ekipmanlar, gıdalardaki Pb'nun kaynağı olarak görülürken son yıllarda işletmelerde kullanılan yüksek kaliteli metal malzemeler Pb'nun bu temel gıdalara bulaşmasını büyük ölçüde azaltmıştır. Ayrıca bu malzemelerin temizlenmesinde kullanılan deterjanlar, bu malzemelerin yapısında bulunan As, Pb ve Cd gibi ağır metallerin çözünmesini sağlayarak besin maddelerinin kontaminasyonuna neden olmaktadır (Conor, 2006).

Pb elementi bitkiler için mutlak gerekli olmayan elementlerden biri olmamasına rağmen bütün bitkilerde doğal olarak bulunmaktadır. Ancak canlılardaki Pb miktarı 150 ppm'i aşmadığı sürece bir tehlike oluşturmaz. Bunun üzerinde bitkiler için, özellikle de 300 ppm'i aşması durumunda insan sağlığını tehdit etmektedir (Dürüst, vd., 2004).

Bitkilerde Pb konsantrasyonu normal değerleri aşması durumunda bitkinin fizyolojik ve morfolojik özelliklerinde bir takım değişiklikler meydana gelerek bitkinin büyümesini ve gelişmesini engellemektedir. Örneğin kök büyümesinin inhibisyonu, cüce büyüme ve kloroz bunlardan bazılarıdır. Buna ilave olarak hücre turgorunu ve hücre duvarını etkilemesinin yanı sıra stomaların açılıp kapanmasını, yaprak miktarında azalmaya ve bitkideki su rejiminin bozulmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda kök gelişiminin yavaşlaması ve köklerin besin alma özelliklerinin azalması nedeniyle bitkilerin katyon ve anyon alımını etkileyerek bitki beslenmesinin bozulmasına neden olmaktadır (Sharma ve Dubey, 2005). Ayrıca bitkide toksik seviyede Pb bulunması bitkideki makromoleküllerin yapısında bulunan metal iyonlarını etkileyerek çeşitli enzimlerin aktivitesini değiştirmek suretiyle çimlenme, sürgün ve kök gelişimi, fotosentez gibi olaylarda bitkinin tolerans sınırlarını değiştirmektedir (Lamhamdi, vd., 2011). Pb'un bitkilerdeki zararlı etkilerden biri de, ROT oluşumunun sonucundan kaynaklanan oksidatif strestir. Bitkilerin bu oluşan oksidatif stres karşısında savunmasında, antioksidan enzimlerin yanı sıra askorbik asit, glutatyon ve α -tokoferol gibi antioksidan maddeler görev almaktadır (Mishra, vd.,2006).

Özellikle besin zinciri yoluyla insanlara kadar ulaşan Pb'un insanlardaki yüksek konsantrasyonu sinir sistemi ile ilgili sorunlar böbrek yetersizliği, anemi, körlük, D vitamini bozukluklara neden olmaktadır (Järup, 2003).

2.6. ARSENİK (As)

Bileşikleri gri ve sarı kristaller olarak iki ayrı biçimde bulunan arsenik, M.Ö. 4. Yüzyıl'dan beri bilinmesine rağmen, element olarak ancak 17. Yüzyıl'da tanımlanmıştır. Doğada genellikle kristal formda yer alan arsenik inorganik ve organik bileşikler şeklinde bulunur. İnorganik arsenik bileşikleri sülfür, oksijen, klor elementleriyle birlikte bulunurken, organik arsenik bileşikleri karbon ve hidrojen ile bulunur ve oldukça fitotoksiktir. Çünkü fosforilasyonu çözer ve fosfat alımını inhibe ederek bitki büyümesini

engeller ve hatta bitkiyi ölüme götürür (Kumaresan ve Riyazuddin, 2001; Dousova, vd., 2003; Geng, vd.,2006; Sun, vd.,2008).

As endüstri sanayinde cam yapımı, kurşunun sertleştirilmesi, antimikrobiyal madde üretimi gibi alanlarda ve ilaç sanayinde, radyoaktif izotopları tıp alanında ve tarımsal insektisit üretimi gibi alanlarda kullanılmaktadır (Yağmur ve Hancı, 2002; Omaye, 2004). As'ın canlıların yaşam alanları olan ekosistemlere küresel ısınma, volkanik hareketlilik, mineral-kayaç çözünmesi gibi doğal yollarla dahil olmasının yansısı, orman yangınları, endüstriyel atıklar, evsel atıklar ve tarımsal ilaçlar yoluyla bulaşmaktadır.

As endüstriyel, zirai, eczacılık alanında bazı maddelerin üretimi için yararlı olmasına rağmen insan ve çoğu canlı organizmalar için oldukça toksik bir etkiye sahiptir ve kanserojendir (Duker, vd., 2005). İnsanlarda gıda yoluyla alınan arseniğin deri kanseri ve yumuşak doku kanserleri, solunum ile alındığında akciğer kanserine sebep olabileceği bildirilmiştir (Cheville,1983; Chakraborti, vd.,2010).

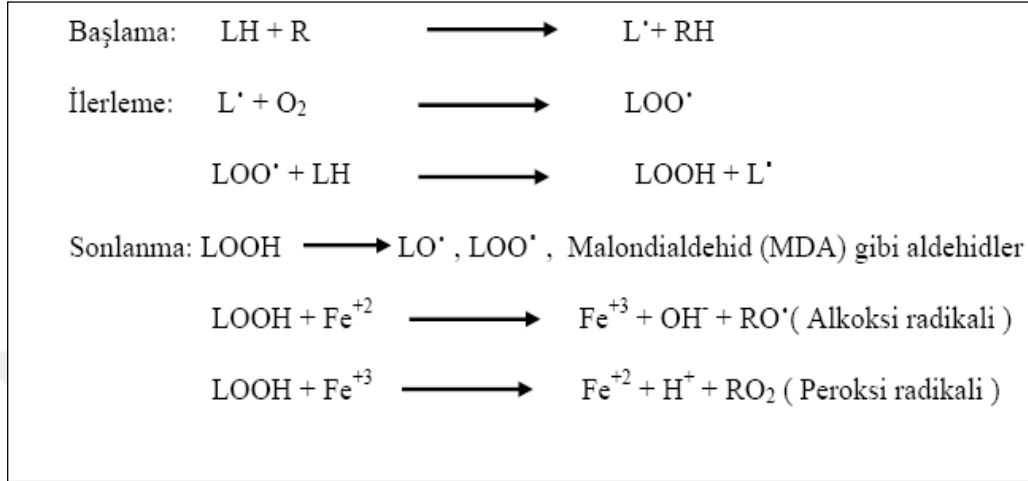
As'ın insanlara erişimi genel olarak gıdalar ile olmaktadır. İçsularında ve içme sularında 0.5-1.0 mg/L bulunması zehirlenmelerine neden olmaktadır. As zehirlenmeleri sonucunda insanlarda yutma güçlüğü, karın ağrısı, bulantı ve kusma, ishal, kaslarda kramp şeklinde kasılmalar, susuzluk hissi, koma ve ölüm görülmektedir (Demirci, 2007).

2.7. AĞIR METALLERİN MEMBRANLAR ÜZERİNE ETKİLERİ

Ağır metallere maruz kalan bitkilerde görülen en önemli değişimlerden biri lipid peroksidasyonudur. Bu durum bitki hücresinde doğrudan membran hasarına neden olmaktadır (Yadav,2010). Bitkilerde oluşan bu membran hasarı, bitki hücrelerinde dengesiz besin ve su alınımlarına neden olarak ve stoma iletkenliğini azaltır (Garg, 2011).

Hücre zarlarının yapısı genel olarak lipit ve proteinden oluşmaktadır. Ağır metaller, hücrede bulunan doymamış yağ asitlerinden reaktif oksijen türleri aracılığı ile hidrojen çıkartarak hücre duvarındaki lipidlerde peroksidasyona neden olmaktadır. Ağır metaller aracılıyla hücrede bulunan yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu açığa çıkan Malondialdehit (MDA) sitotoksik bir aldehit olup, DNA ve hücre proteinlerine zarar vermektedir. MDA içeriği, lipit peroksidasyonu için önemli bir belirteç kabul edilmekte ve MDA miktarındaki artış aşırı lipit peroksidasyonunu göstermektedir (Panda ve Choudhury,2005; Zhou vd.,2009).

Yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda ortaya verilen ürünler hücre zarının geçirgenliğini ve akışkanlığını etkileyerek hücre ve hücre organellerinin birbirinden ayrılmasına yol açmaktadır (Nyska ve Kohen, 2002). (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Lipit peroksidasyonunun temel prensipleri (URL2).

2.8. SERBEST RADİKALLER

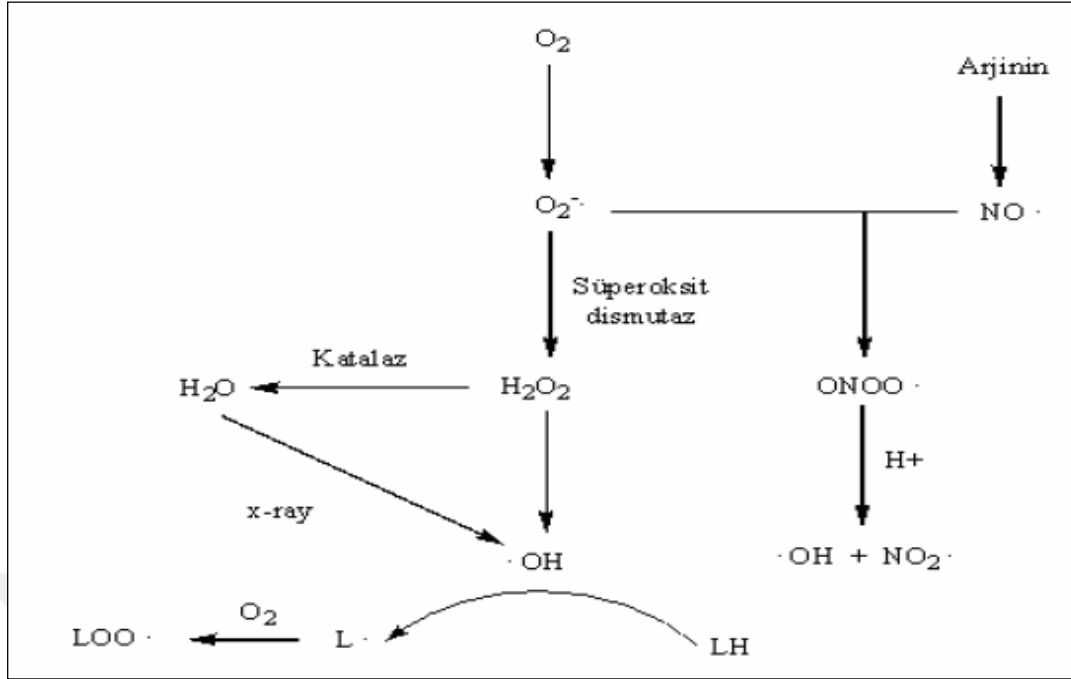
Serbest radikal, atomik ya da moleküler yapılarda çiftleşmemiş bir yada birden fazla tek elektron taşıyan ve genellikle bir elektronunu kaybetmiş olan oksijen atomu bulunduran kararsız moleküllerdir. Yüksek enerjiye sahip olan bu moleküller diğer moleküllerle elektron alışverişi yapabilirler. Bu moleküllere reaktif oksijen türleri (ROT) adı verilmektedir (Çavdar ve Sifil, 1997).

Serbest radikaller oluşum şekillerine göre aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir (Akkuş, 1995) (Şekil 2.4).

1) Homolitik ayrılma: Kovalent bağlı bir molekülün her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak radikal oluşumu.

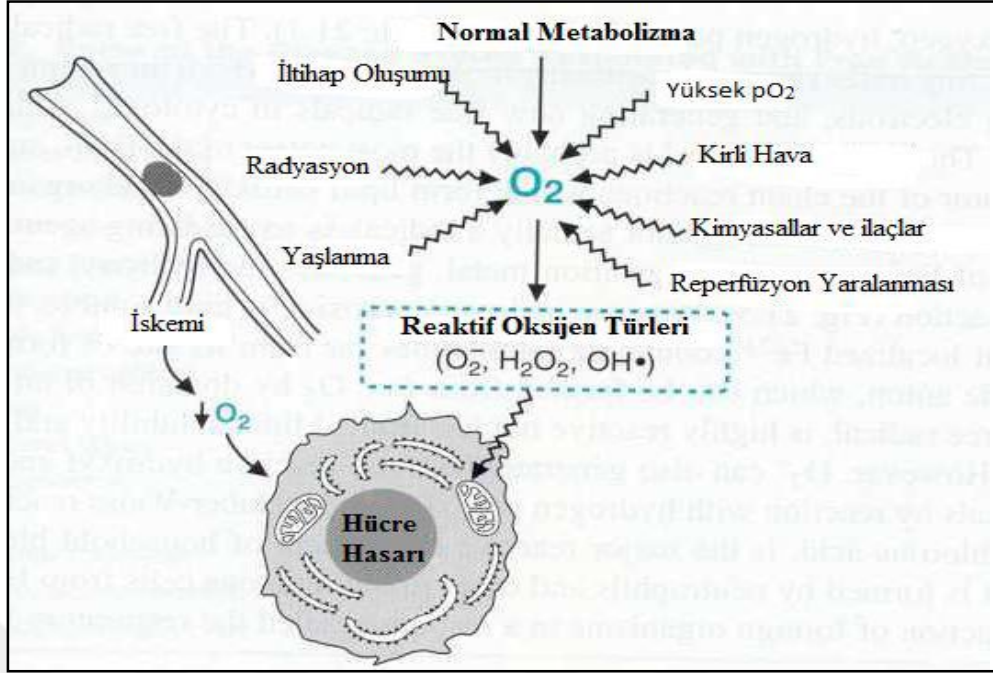
2) Heterolitik ayrılma: Kovalan bağlı bir molekülden tek bir elektron kaybının gerçekleşmesi ile radikal oluşumu.

3) Elektron transferi: Normal bir moleküle tek bir elektron eklenmesi veya transferi ile de radikal oluşu şeklindedir.

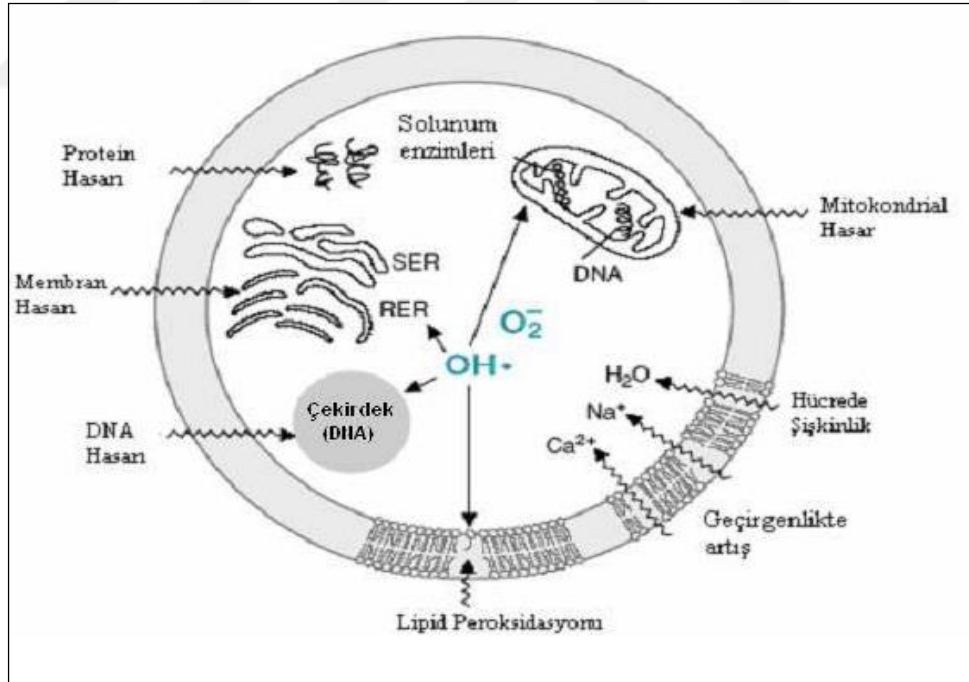


Şekil 2.4: Serbest oksijen radikallerinin oluşumu (Stahl ve Sies, 2002 de alınmıştır).

Oksijen, doğadaki tüm canlılar için hayati önem taşıyan vazgeçilmez bir moleküldür. Bu kadar önemli olan oksijenin hücrede herhangi bir nedenle eksik indirgenmesi sonucu hücre içerisinde oldukça zararlı ROT ve serbest radikaller oluşmaktadır. Hücrede bu maddelerin aşırı miktarda oluşması "oksidatif stres" olarak tanımlanır. Oluşan bu oksidatif stres hücre üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Oksidatif stres sonucu oluşan özellikle serbest radikallerden hidroksil (OH) başta olmak üzere serbest radikaller, DNA'daki bazıları'nın değişmesine ve DNA kırıklarına sebep olarak kanser oluşumu ve hücre yaşlanmasına neden olmaktadır (Moldovan ve Moldovan, 2004) (Şekil 2.5 ve Şekil 2.6). Bu nedenle de serbest radikaller hücresel hasarlardan, mutasyonlardan, kanser ve biyolojik yaşlanmadan sorumlu tutulmaktadır (Büyükgüzel, 2013). Radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri ise Tablo 2.1de verilmiştir.



Şekil 2.5: Serbest radikallerin kaynakları (Altınışik, 2000 de alınmıştır).

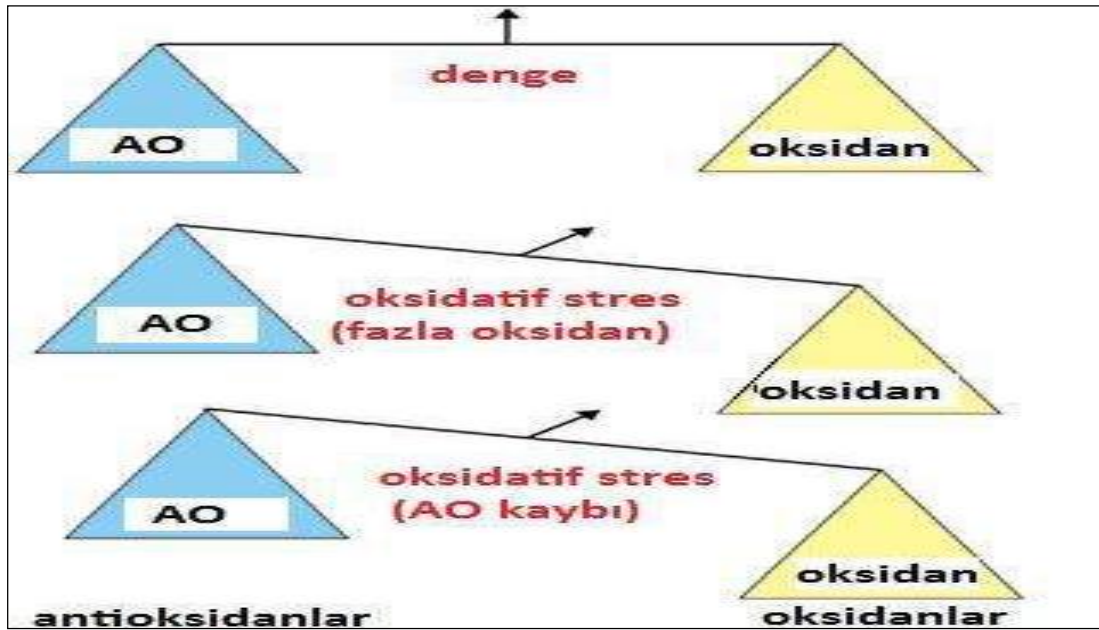


Şekil 2.6: Serbest radikallerin hücresel hedefleri (Onat, vd.,2002 de alınmıştır).

Tablo 2.1: Radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri (Yeum, vd.,2004 de alınmıştır).

Reaktif Türleri	
Radikal	Non-Radikal
Hidroksil ($\cdot\text{OH}$)	Peroksinitrit (ONOO-)
Alkoksil ($\text{L(R)O}\cdot$)	Hipoklorit ($-\text{OCl}$)
Hidroperoksil ($\text{HOO}\cdot$)	Hidroperoksit (L(R)OOH)
Peroksil ($\text{L(R)OO}\cdot$)	Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)
Nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Süperoksit ($\text{O}_2\cdot$)	Ozon (O_3)

Serbest radikaller hücrenin normal fizyolojik aktivitesinin doğal bir ürünü olmasının yansıra, organizma geliştirdiği mekanizmalarla oksidan-antioksidan dengesini ayarlamaya çalışır. Ancak bu dengenin herhangi bir çevresel faktörlerle bozulması durumunda hücrede oksidatif stres ortaya çıkar (Ranjbar, vd., 2005; Pena-Llopis, vd.,2003; Dünder ve Aslan, 1999).(şekil 2.7).



şekil 2.7: Oksidatif stres (Serafini ve Del Rio, 2004 de alınmıştır).

Bitkilerde oluşan aktif oksijen türleri normal şartlar altında organizmanın bir savunma mekanizması olarak patojenlere karşı geliştirdikleri bir sistemdir. Bitki herhangi bir patojene karşı savunmaya geçtiğinde ilk olarak aktif oksijen ürünlerini üretmeye başlar. Aktif oksijen ürünlerinin en yaygın olanları Hidrojen peroksit ve Süperoksit anyonlarıdır.

Üretilen aktif oksijen türleri bitkide şu görevlerde yer alır.

a) Patojenin enfekte ettiği bölgedeki hücreleri öldürür ve böylece patojenin sadece enfekte olduğu bölgede kalmasını sağlayarak hastalığın bitkiye yayılması önlenir.

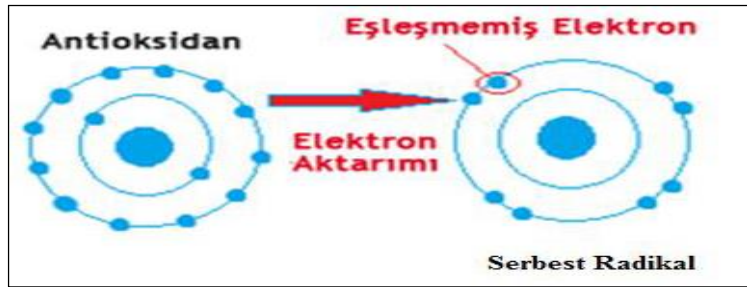
b) Hastalık etmenine karşı doğrudan öldürücü etki gösterir.

c) Hücredeki lignifikasyonda rol oynar. Oluşan lignin bitkileri diğer enfeksiyonlara karşı korur.

d) Bitkilerde sinyal molekülü olarak görev yapmaktadır. Patojene karşı bitki hücresinde üretilen serbest radikaller bitkinin dayanıklılık mekanizmasını uyarır ve bitkinin enfekte olmayan bölgelerine giderek oradaki genlerin aktif hale gelmesini sağlar (Stadtman, 2002).

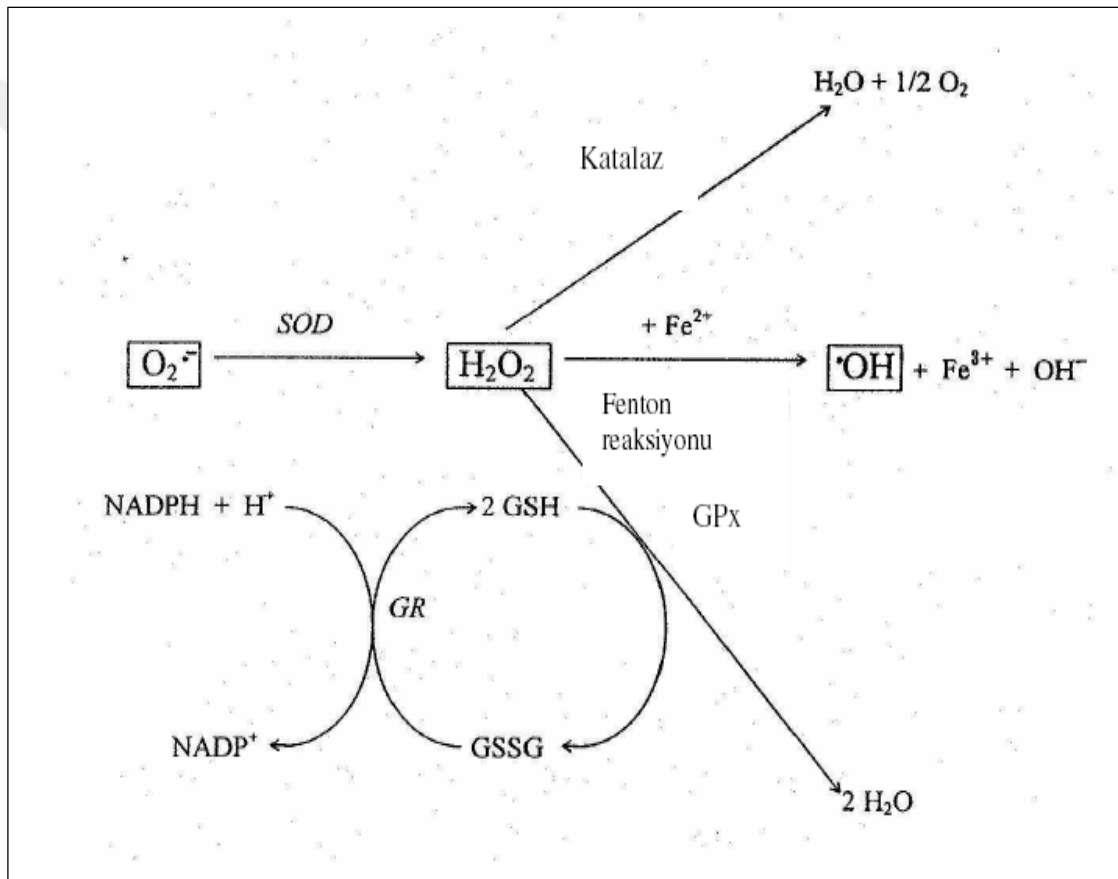
2.9. ANTIOKSİDANLAR

Canlı hücrelerde yer alan ve temel maddelerden olan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi maddelerin oksidasyonunu önleyen ya da okside olmasını geciktiren maddelere antioksidan maddeler ve bu olaya da antioksidan savunma denir. Diğer bir deyişle antioksidanlar substratın oksidasyonunu elektron aktarımıyla azaltır veya engeller (Aydın, vd, 2012). (Şekil 2.8). Bu antioksidan maddeler hücredeki lipid peroksidasyonunu, proteinlerin çapraz bağlanmasını ve DNA mutasyonunu engeller (Başer, 2002).



Şekil 2.8: Antioksidanların serbest radikali nötralize etmesi (Polat, 2007 de alınmıştır).

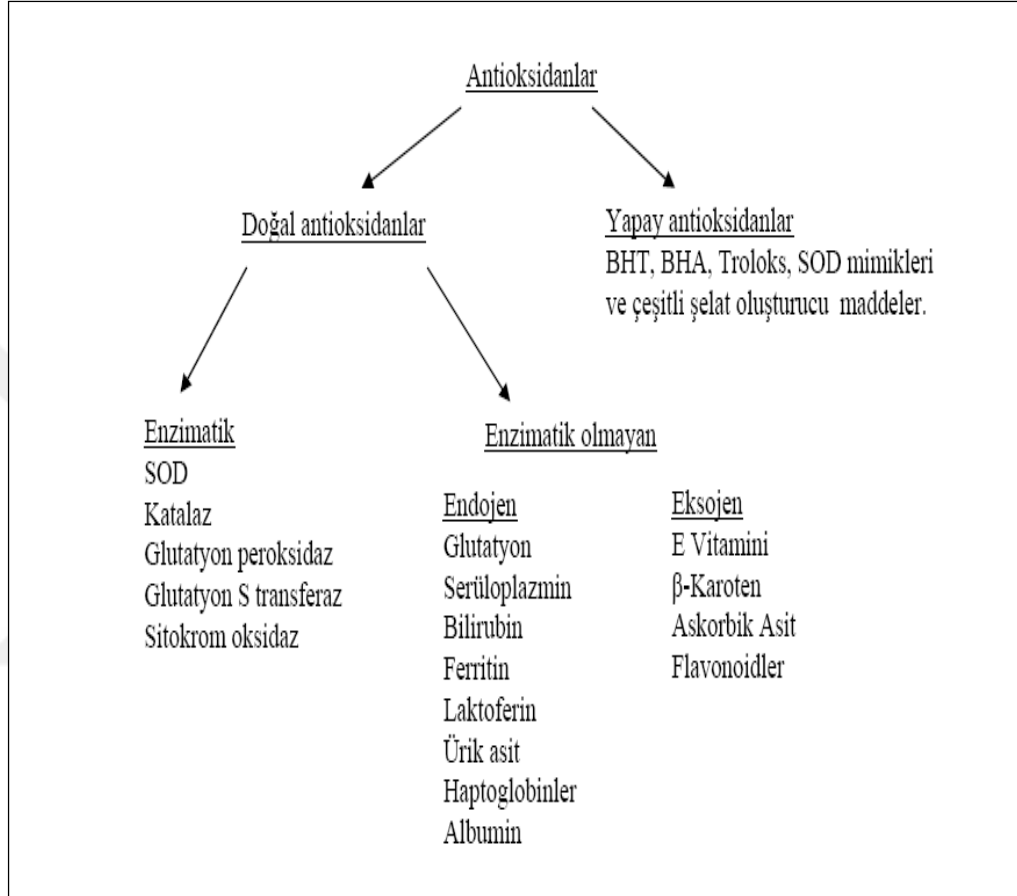
Bu nedenle, antioksidan enzimler hücrenin metabolik ve fizyolojik olaylarının düzenlenmesinde önemli rol oynayan yaşamsal bir öneme sahip olan maddelerdir ve hücreye giren kirleticilere karşı verilen bir tepkidir (Doyotte, vd., 1997). Antioksidanlar, oluşan serbest radikalleri toplayıp zararsız hale getirerek, serbest radikal oluşumuna neden olan kimyasal reaksiyonları durdurarak ya da baskılayarak etki gösterirken aynı zamanda biyolojik molekülleri onarma ve antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezini artırma gibi görevleri de yapar (Dündar ve Aslan 2000). (Şekil 2.9).



Şekil 2.9: Antioksidan savunma mekanizması (Armstrong, 1998 de alınmıştır).

Antioksidanlar yapılarına, bulundukları yere, çözünürlüklerine, kaynaklarına göre çeşitli şekilde sınıflandırılabilir. (Valko, vd., 2007). Ancak genel olarak antioksidanlar doğal ve yapay antioksidanlar olarak ikiye ayrılır Doğal antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak gruplandırılır. Enzimatik antioksidanlar,

Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GPx), Katalaz (CAT) enzimlerini içerir. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise Askorbik asit (Vitamin C), Alfatokoferol (Vitamin E), Glutasyon (GSH), karotenoidler, flavonoidler ve diğer antioksidanlardan oluşur (Şekil 2.10).



Şekil 2.10: Antioksidanların çeşitleri (Akyüz, 2007 de alınmıştır).

Bitkilerde bulunan antioksidan sistem sayesinde bitkiler kendilerini çevreden gelebilecek zararlı etkilere (sıcaklık, radyasyon, ağır metal kirliliği vb.) karşı korurlar. Bitkilerde bulunan enzimatik, enzimatik olmayan antioksidanlar ve görevleri Tablo 2.2 de verilmiştir.

Tablo 2.2: Bitkilerde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların bulundukları yerler ve görevleri (Büyük, vd.,2012 de alınmıştır).

Enzimatik ve Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	Rolü	HücreSEL Lokasyonu
Askorbik Asit	Direk olarak O_2^- , OH^- ve H_2O_2 'yu temizler.	Kloroplast, apoplast, vakuol, sitozol
Tokoferoller	Lipit peroksidasyonunu kırar. Lipit peroksidlerini O_2^- ve OH^- 'i temizler.	Bitkilerin tüm kısımlarında bulunur. Kloroplast membranlarında tokoferol yoğun olarak bulunur.
Karotenoidler	Peroksi radikalleri ile O_2^- ve OH^- 'i temizler.	Sitozol, vakuol
Glutasyon	Redoks döngüsünün bir substratı olarak, OH^- ile $1O_2$ 'nin direk temizlenmesinde yararlıdır.	Sitozol, endoplazmik retikulum, vakuol, mitokondri
Fenolik Bileşikler	Antioksidan özelliklerini iyi birer hidrojen veya elektron vericisi olmaları, zincir kırıcı özellikleri ve geçiş metalleri ile şelat oluşturmaları ile gösterirler.	Sitozol, vakuol
Süperoksit Dismutaz (SOD)	O_2^- 'i H_2O_2 'ye dönüştürür.	Kloroplast, sitozol, mitokondri, peroksizom
Askorbat Peroksidaz (APX)	H_2O_2 'yi H_2O 'ya çevirir.	Kloroplast, sitozol, mitokondri, peroksizom
Katalaz (CAT)	H_2O_2 'yi H_2O 'ya çevirir.	Peroksizom
Glutasyon Peroksidaz (GPX)	H_2O_2 'yi ve lipit peroksidlerini etkisizleştirir.	Kloroplast, sitozol, mitokondri, endoplazmik retikulum

2.10. ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR

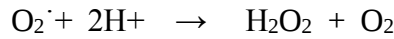
Antioksidant sistem antioksidant enzimler ve antioksidant bileşiklerden oluşmaktadır. Antioksidant enzimler; süperoksit dismutaz, katalaz, askorbat peroksidaz ve glutasyon redüktaz gibi çok sayıda enzimi içermektedir. Antioksidant bileşikler ise

karotenoidler, ksantofiller, askorbik asit, glutatyon ve tokoferoller gibi çok sayıda bileşikten meydana gelir.

1) Süperoksit dismutaz (SOD) (EC. 1.15.1.1)

SOD'lar yüksek katalitik aktiviteye sahip metalloproteinlerdir (Fridovich, 1986). Süperoksit dismutaz, süperoksit serbest radikalının hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir.

SOD



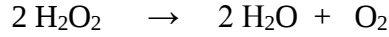
Bitkilerde Süperoksit dismutaz (SOD) ve Katalaz (CAT) enzimlerinin teşviki ve aktivasyonu metal detoksifikasyon mekanizmalarındandır (Shanker, vd., 2005). SOD ve CAT enzimlerinin birlikte bulunması oksidatif stresin etkilerini azaltmaktadır. Çünkü SOD enzimi $O_2^{\cdot -}$ 'in diğer bir reaktif aracı olan hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürülmesinde rol alırken, CAT enzimi, H_2O_2 'in suya ve oksijene dönüşmesini sağlar (Kono ve Fridovich, 1983; Liskay, vd.,2004).

Bitkilerde Mn, Fe ve Cu/Zn gibi metal kofaktörlerine bağlı olarak sınıflandırılan 3 tip SOD izoenzimi vardır. Mn-SOD'lerin peroksizom, mitokondride ve bazı bitkilerin kloroplastlarında da bulunurken, Fe-SOD'nin bütün bitkilerde bulunmadığı fakat kloroplastlarla ilgili olduğu düşünülmektedir (Ferreira, vd., 2002; Alscher, vd.,2002).

2) Katalaz (CAT) (EC. 1.11.1.6)

Her aerobik hücrede CAT enzimi , %80 oranında hücrenin peroksizomlarında bulunurken %20 sitozolde bulunur. CAT enzimi dört alt üiteden meydana gelmektedir. Her bir alt ünitesi de bir hem Fe (III) grubu bulunduran 240 000 dalton molekül ağırlığında bir proteinden oluşur. SOD enziminin etkisiyle meydana gelen ve hücre için toksik olan hidrojen peroksit (H_2O_2) CAT enzimi sayesinde su ve oksijene dönüştürülmektedir (Valko, vd.,2007; Singh, vd.,2009). CATenziminin reaksiyon hızı oldukça yüksektir, ve optimum şartlar altında bir mol CAT enzimi bir dakika içerisinde 500 bin hidrojen peroksidi ayrıştırabilir (Antunes, vd.,2002).

Katalaz



CAT enziminin temel görevi, metabolizmasının bazı basamaklarında sentezlenen, H_2O_2 veya ROOH gibi herhangi bir peroksitin radikal özelliklerini değiştirerek hücrede oluşabilecek zararları engellemektir. Çünkü hücrede oluşan H_2O_2 , singlet oksijen ve hidroksil radikal ($\text{OH}\cdot$)'lerinin temel kaynağıdır (Öztürk, 2002).

Genel olarak H_2O_2 gidericisi olan CAT enzimi, fotosentez sürecinde üretilen H_2O_2 'nin giderilmesini sağlayan katalazlar; lignifikasyonda önemli rol oynayan katalazlar; tohum ve genç bitkilerde bol bulunan katalazlar olarak üç gruba ayrılır (Breusegem, vd.,2001).

3) Askorbat peroksidaz (APX) (EC.1.11.1.11)

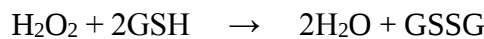
Askorbat peroksidazlar sitozolde, peroksizomlarda ve kloroplastların tilakoid zarlarında bulunurlar ve fotosentez sırasında oluşan H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında katalaza yardımcı olurlar. APX, askorbatı elektron vericisi olarak kullanarak H_2O_2 'i suya indirger (Demiral, 2003). APX enzimi yüksek bitkilerde keşfedilmiştir. APX izoenzimleri hücrede dört farklı şekilde bulunur. Kloroplastlarda stromada APX (sAPX); tilakoid membrana bağlı (tAPX); peroksizom membranlarında (mAPX); sitosolik APX (cAPX); mitokondri membranına bağlı olarak (mitAPX) bulunmaktadır.

4) Glutatyon peroksidaz GSH-Px

Glutatyon peroksidaz. Selenyum bağımlı GSH-Px (EC.1.11.1.19) ve Selenyum bağımsız GSH-Px (EC.2.5.1.18) olmak üzere iki izoform içerir (Cnubben, vd., 2001) GSH-Px enzimi hücrede oluşan H_2O_2 'i suya ve oksijene çevirerek hücrel lipitleri peroksidasyondan korumasının yanı sıra hemoglobini de oksidatif strese karşı koruyan ve fagositik hücrelerin zarar görmesini engelleyen önemli bir enzimdir (Akkuş, 1995).

GSH-Px ile E vitamini birbirlerini tamamlayarak birlikte serbest radikallere karşı etki gösterirler. Bunlardan GSH-Px hücrede var olan peroksitleri yok ederken, E vitamini peroksitlerin hücrede sentezini engeller (Masella, vd.,2005).

GSH-Px



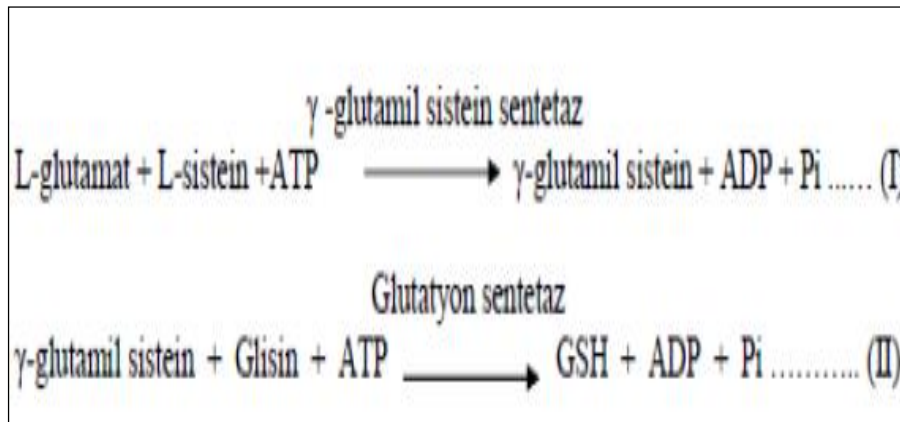
Bu reaksiyonlarda glutatyon (GSH) hidrojen vericisi olarak görev yapmaktadır. H_2O_2 ve lipid hidroperoksitler indirgenirken, GSH oksitlenmiş (GSSG) şekline dönüşmektedir.

GSH-Px bitkilerde H_2O_2 , organik ve lipid hidroperoksitlerin miktarını azaltmada kullanılan enzimlerdir. Oksidatif stres karşısında bitkilerdeki önemli savunma mekanizmalardan birisidir. *Arabidopsis* bitkisinde sitozolde, kloroplastlarda, mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunurlar. *Capsicum annuum* L. (Biber), *Pisum sativum* (Bezelye) ve *L. esculentum* (Domates) gibi pek çok bitkide çeşitli streslerin varlığında GPX'in koruyucu bir rolü olduğu bildirilmiştir (Büyük vd.,2012).

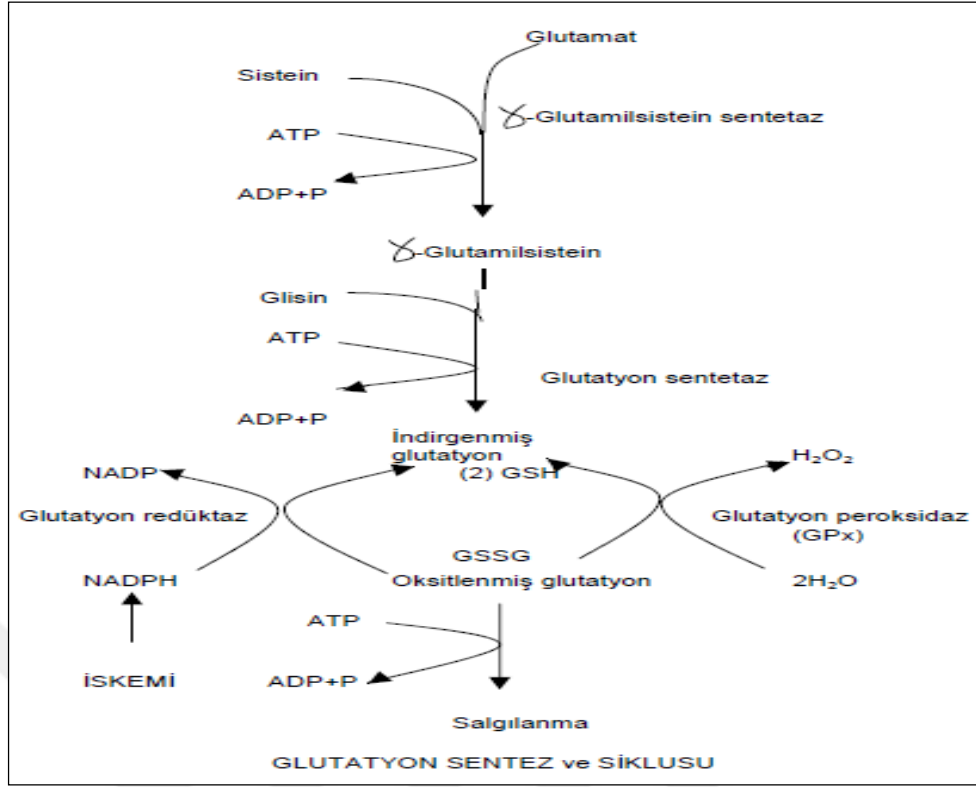
5) Glutatyon (GSH) ve Glutatyon Sentetaz

Glutatyon; glutamik asit, sistein ve glisinden meydana gelir. Hücrenin sitozolünde fazla bulunan bir tripeptiddir (Kidd, 1997). Organizmanın bütün hücrelerinde bulunan GSH'un temel görevi oksidatif strese ve çevreden gelen streslere karşı hücreyi korumaktır. Özellikle peroksidazlar ve indirgenme reaksiyonlarını katalizleyen redüktazlar hücreyi hidrojen peroksidin sebep olduğu stresten koruyan aktiviteleri için önemlidir. Bitkilerde tüm organellerde yoğun olarak bulunur. Yapılarındaki sülfür sebebiyle GSH konjugasyonu ile ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunu gerçekleştirir (Lamb ve Dixon, 1997).

GSH biyosentezi, glutatyon sentetaz ve γ -glutamilsistein sentetaz enzimlerinin katalizörlüğünde, ATP'ye bağımlı bir reaksiyondur ve iki basamakta gerçekleşir (Anderson, 1998). (Şekil 2.11 ve Şekil 2.12)



Şekil 2.11: Glutatyon biyosentezi (Anderson, 1998 da alınmıştır).



Şekil 2.12: Glutatyon sentezi ve siklusu

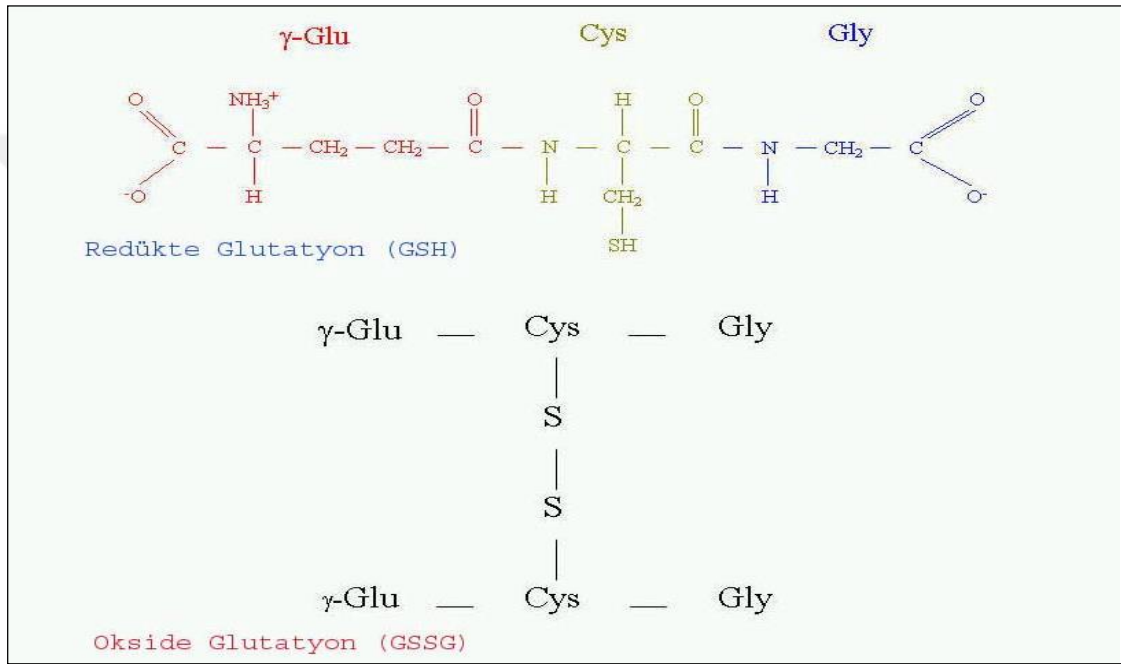
Hücrelerde GSH serbest ya da % 15 oranında proteinlere bağlı olarak bulunur. Serbest glutatyon genellikle redükte formdadır ve oksidatif streste durumunda okside forma dönüştürülür. Hücrelerde redükte edilen GSH ile bunun okside formu olan GSSG nin oranı oldukça önemlidir. Memeli hücrelerinde normal şartlarda glutatyon redoks çifti 1-10 mM konsantrasyon aralığında bulunur ve redükte glutatyon, okside forma göre yüksek seviyededir (Chai, vd.,1994).

GSH peroksidaz enzim, askorbik asit metabolizmasında, hücreler arası iletişimin sağlaması ve proteinlerin sülfidril (-SH) gruplarının okside olmasını ve çapraz bağlanmasını engelleyen birçok metabolik olayda görev yapar. Ayrıca GSH, bakır iyonlarının serbest radikal oluşturma kapasitelerini azaltır. GSH protein katlanmasına ve insülin hormonu gibi disülfid bağları taşıyan proteinlerin yıkımında katılır (Halliwell ve Gutteridge, 1999; Forman, vd., 2009).

GSH'un insanlarda temel kaynağı karaciğerdir, ayrıca kan hücreleri, beyin, akciğer, böbrekler gibi birçok doku ve organda bulunur. Karaciğerdeki GSH'un yarı ömrü 2-4 saattir, mitokondride ise daha uzun olup yaklaşık 30 saatlik yarı ömre sahiptir. Karaciğer

ksenobiyotiklerin detoksifiye edildiği en önemli organdır ve GSH normal karaciğer hücrelerinde en yüksek hücre içi konsantrasyonu yaklaşık 20 milimolardır.

GSH dokularda birbiriyle denge halinde, indirgenmiş glutatyon (GSH) ve okside glutatyon (GSSG) olarak iki şekilde bulunur (Şekil 2.13). GSH, GSH peroksidaz enzimi tarafından okside glutatyon (GSSG) dönüştürülmektedir. Hücrede bulunan glutatyon'un %95'i GSH oluştururken, geri kalan az bir kısmını da okside glutatyon (GSSG) oluşturmaktadır (Reed, 2000).



Şekil 2.13: Redükte ve okside glutatyonun yapısı (Halliwell ve Gutteridge, 1999 de alınmıştır).

2.11. BİTKİSEL HORMONLAR

1) Oksinler

Organizmada bulunan oksinler hücrelerin gelişip büyümesini ve böylece de bitkilerde doku gelişimini ve kök oluşumunu sağlayan maddelerdir. Bu hormon tüm yüksek bitkilerce sentezlenir. Bitkilerde en fazla yer alan oksin çeşidi, Indol-3-asetik asit (IAA)'tir (Grunewald, vd.,2009). Bu hormon bitkilerde kimyasal aktiviteyi, bitki

gövdesinin sert yapı kazanmasını ve meyve oluşumunu sağlamaktadır. Oksinler solunumu hızlandırmakta ve hücrel bölünmede görev yapmaktadırlar. Ayrıca oksinler; bitkisel embriyonun oluşumunda, vasküler dokuların farklılaşmasında ve bitkinin uyarıcılara tepki aktivitelerinde etkili olmaktadır (Evans, 1984; Chen, vd.,2001; Davies, 2004; Christian, vd., 2006; Christian, vd.,2008; Huang, vd.,2008).

2) Sitokininler

Sitokininlerin ana görevi hücre bölünmesini denetlemek ayrıca besin elementlerin taşınması apikal dominansi yaprak gelişimi ve kloroplast farklılaşması tohum çimlenmesi gibi birçok olayda etkilidir (Türkan, 2008).

3) Gibberellinler

Gibberellinler, 1926 yılında çeltik bitkisinin aşırı boylanmasına neden olan *Gibberella fujikuroi* adlı parazitte bulunması nedeniyle bu isimle anılmaktadır. Daha sonra bu madde parazitten izole edilmiş ve gibberellik asit olarak adlandırılmıştır. Gibberellinler, gövde uzaması, büyümesi, yaprak büyümesi, çiçeklenmeyi etkilediği gibi bitkinin gelişme ve farklılaşma olaylarında etkili olmaktadır (Kılıç, 2007).

Bitki gelişiminin düzenlenmesinde doğal büyümeyi sağlayan düzenleyici hormonların yanı sıra bu hormonlara aksi yönde çalışan ve etki eden büyümeyi engelleyici doğal maddelerde bulunmaktadır ve bunlara Bitki Büyümesini Engelleyici (BBE) hormonlar adı verilir. Bunlardan en önemlileri Absisik Asit (ABA) ve Jasmonik Asit (JA veya MeJA)' dir.

4) Absisik asit (Dorminler) (ABA):

Bitkilerde uygun bir gelişme ve büyümeyi teşvik edici hormonların yanı sıra ABA'nında uygun oranlarda bulunması gerekmektedir. Bitkilerin büyümesi sırasında büyümeyi teşvik eden maddeler bitkide yoğun olarak bulunurken büyümenin sonuna doğru ABA konsantrasyonu yükselmekte ve büyüme kontrol altında tutulmaktadır. (Çimen, 1988; Akgül, 2008). Bitkiler tarafından oluşturulan ABA hormonu bitki tohumunun çimlenmesine engel olduğu gibi tohumun çimlenmesinden sonrada bitki gelişiminide engelleyici rol oynamaktadır. ABA hormonu bitkilerdeki strese karşı olan

mekanizmaların gelişmesinde etki göstererek tomurcuk ve tohumlarda dormansiye, çiçek ve meyvelerde absisyona neden olmaktadır. ABA hormonu genel olarak bitkide yüksek dozlarda bulunduğu zaman büyümeyi engelleyici ya da durdurucu olarak görev yapmasına rağmen çok düşük dozlarda bitkide bulunması durumunda ise bitki büyümesini teşvik edici bir hormondur. Bu nedenle de stres altında bulunan ya da meyvelerin olgunlaşma dönemlerinde hormon miktarında artış görülür (Tsai vd., 1997; Rajasekaran ve Blake, 1999; Sharp,2002).

5) Etilen

Etilenin (C₂H₄) bitkinin kendisi tarafından gaz formunda üretilip yüksek etkili bir bitki büyüme düzenleyicisi (BBD) olduğu bilinmektedir (Westwood, 1993). Genelde meristematik bölgelerde ve nodyumlarda sentezlenmekte olup meyve olgunlaşması çiçek senesensi sırasında üretimi artmaktadır (Türkan, 2008).

2.12. DİĞER HORMONLAR

Bitkilerde bulunan diğer bazı hormonlar ise

- 1) Brassino steroidler
- 2) Salisilik asit
- 3) Jasmonatlar
- 4) Poliaminler

Jasmonik Asit (JA veya MeJA):

Eğreltiler, yosunlar, bazı mantar grupları ve algler olmak üzere 206 bitki türünde bu hormonun bulunduğu bilinmektedir. Bitkilerin büyümesini ve gelişimini yavaşlatırken bitki yapraklarının sararmasına ve kopmasına neden olmaktadır. Buna ilave olarak ve polen çimlenmesi, bitkilerde kallus oluşumu, bitki köklerinin gelişimi, klorofil oluşumu gibi faktörlerde de etkili olduğu bilinmektedir (Meyer, vd.,1984; Sembdner ve Parthier, 1993).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

Araştırmada, Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından adaptasyon çalışmaları sonucu geliştirilen arpa *Hordeum vulgare* L (Hasat), ve buğday *Triticum aestivum* L. Emend Fiori et paol. (Saban) çeşitlerinin tohumları kullanıldı. Tohumlar Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsünden sağlandı. Araştırma 2015-2017 yılları arasında T.Ü Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü ve Trakya Üniversitesi Araştırma ve Geliştirme Merkezi (TUTAGEM)'inde gerçekleştirildi.

3.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Ağır Metal Uygulanması:

Çalışmada kullanılan tüm tohumlar petrilerde çimlenmeye bırakılmadan önce 10 dakika süre ile %1,5'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde yüzey sterilizasyonuna tabi tutuldu. Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar distile su ile bir kaç kez yıkandı. Aynı şekilde ekim yapılacak petri kapları da 120 C° de 1 saat süreyle pastör fırınında sterilize edildi. Her bir petride 25 tohum olacak şekilde petri kapları hazırlandı. Steril edilen arpa ve buğday tohumları her petriye 25 adet tohum olmak üzere kurutma kağıtları arasına yerleştirilerek 20 °C de fotoperiyot uygulanarak bitki büyütme kabinde çimlemeye bırakıldı. (Şekil 3.1) Deney grupları için taze hazırlanmış 15 µM, 30 µM ve 60 µM konsantrasyonlarda (As, Pb, Cd) metal karışım solüsyonları kullanıldı. Kontrol grubu için sulama suyu olarak distile su kullanıldı.



a



b

Şekil 3.1: a) Bitki büyütme kabininde genel görünüş b) Ekim yapılmış petri kapları

3.2. Ağır Metal Karışımının Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi:

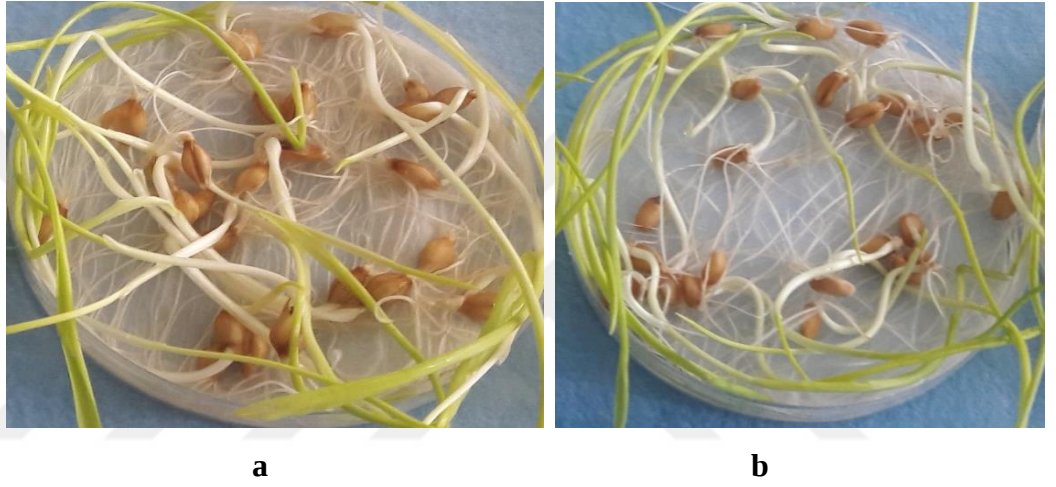
Araştırmada kullanılan As, Pb ve Cd'un tohum çimlenmesi üzerine etkisini belirlemek için petri kaplarına ekilen arpa ve buğday tohumları 15 μ M 30 μ M ve 60 μ M konsantrasyonlarda (As, Pb, Cd) metal karışımı içeren taze hazırlanmış solüsyonlar ile sulandı 20° C de karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Yine kontrol grubu için tohumlar distile su ile sulandı. Çimlenmenin 4. gününde radikula ve plumula uzunlukları 2-5 mm den uzun olanlar çimlenmiş olarak kabul edilerek çimlenen tohum sayısı belirlendi. Kontrol petrilerinde çimlenen tohum sayısı baz alınarak çimlenme yüzdeleri hesaplandı.

3.3.Ağır Metal Karışımının Kök ve Gövde Uzunluklarına Etkisi:

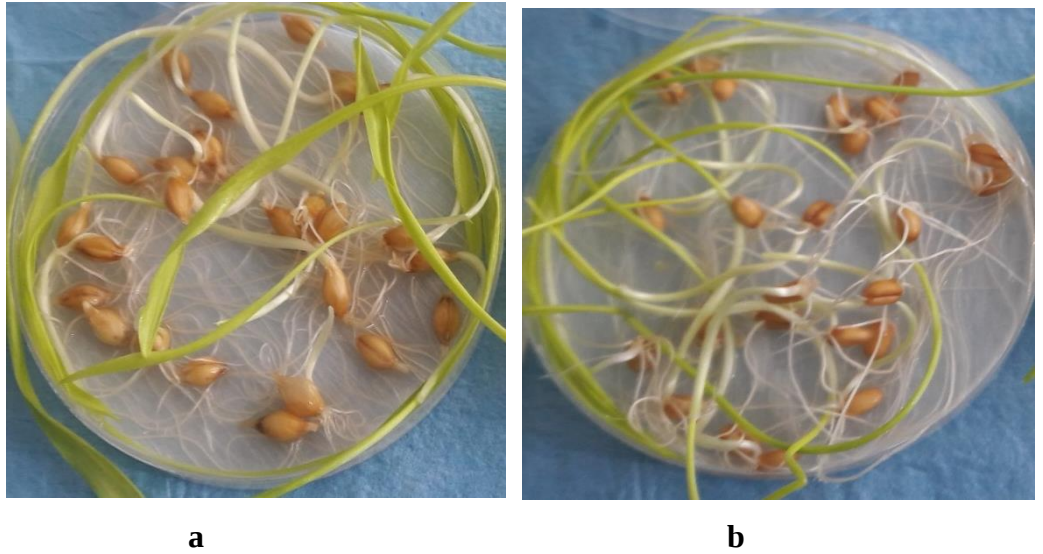
Bu çalışma için farklı konsantrasyonlarda ağır metal iyonu karışımlarına maruz bırakılmadan önce arpa ve buğday tohumları 10 gün süre ile sadece distile su ile sulandı. 10.günün sonunda 1.ve 5. günlerde örnekler alındı.

Kontrol 1. gün grubu: Deney süresince distile su ile sulandı.

Deney 1. gün Grubu:15, 30 ve 60 μ M dozlarda (As, Pb, Cd) metal karışımı ile sulandı.1. günün sonunda kök ve gövde örnekleri alındı.



Şekil 3.2: Kontrol 1. gün grubu (a: Arpa; b: Buğday)



Şekil 3.3: Deney 1. gün grubu 15 μ M metal karışımı (a: Arpa; b: Buğday)



a



b

Şekil 3.4: Deney 1. gün grubu 30 μ M metal karışımı (a: Arpa; b: Buğday)



a



b

Şekil 3.5: Deney 1. gün grubu 60 μ M metal karışımı (a: Arpa; b: Buğday)

Kontrol 5. gün grubu: Deney süresince distile su ile sulandı.

Deney 5. gün grubu: 15, 30 ve 60 μ M dozlarda (As, Pb, Cd) metal karışımı ile 5 gün süre ile sulandı.



a



b

Şekil 3.6: Kontrol 5. gün grubu (a: Arpa; b: Buğday)

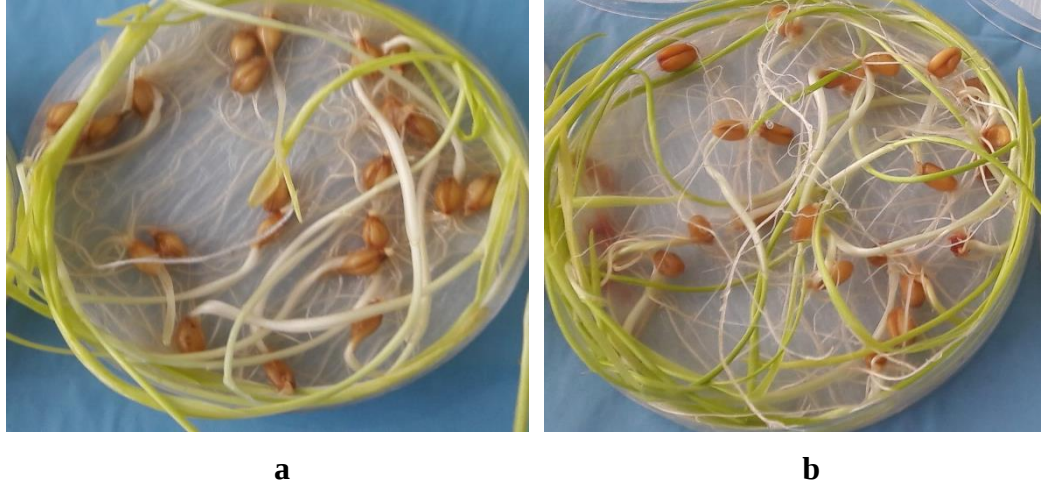


a

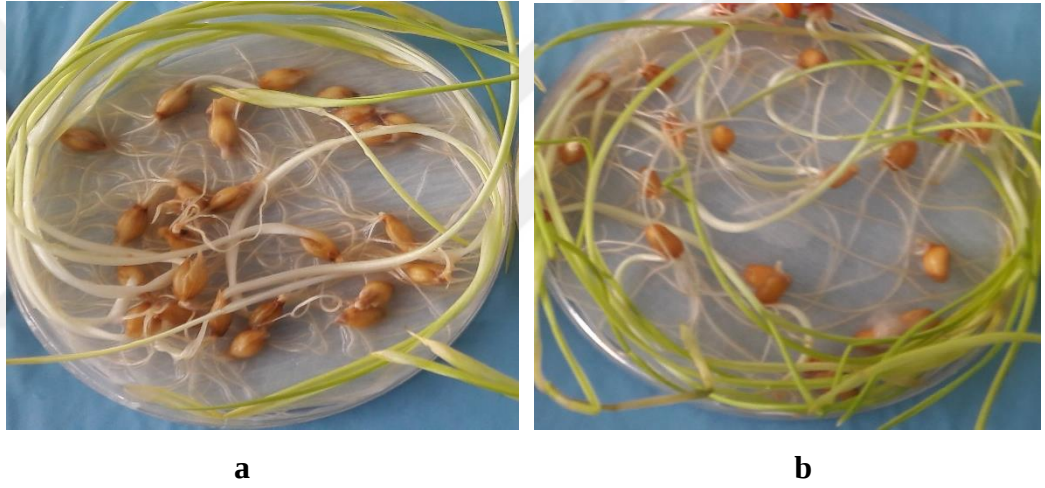


b

Şekil 3.7: Deney 5. gün grubu 15 μ M metal karışımı (a: Arpa; b: Buğday)



Şekil 3.8: Deney 5. gün grubu 30 µM metal karışımı (a: Arpa; b: Buğday)



Şekil 3.9: Deney 5. gün grubu 60 µM metal karışımı (a: Arpa; b: Buğday)

Grupların kök, gövde uzunluklarını ve taze- kuru ağırlıklarını tespit etmek için saçak köklerinden en uzun kök ve gövde kısmı ölçülerek kök ve gövde uzunlukları kaydedildi. Gelişen kökler hipokotilden kök saçağı ve gövde kesildikten sonra kurutma kağıdı ile suyu alındı ve hassas terazide tartılarak taze ağırlıkları bulundu. Kuru ağırlık için kök ve gövdeler 80°C’de 24 saat süreyle etüvde kurumaya bırakıldı. Kurutma işleminin sonunda kök ve gövdeler tartılıp kuru ağırlıkları belirlendi.

3.4. Lipid Peroksidasyonunun Ölçülmesi:

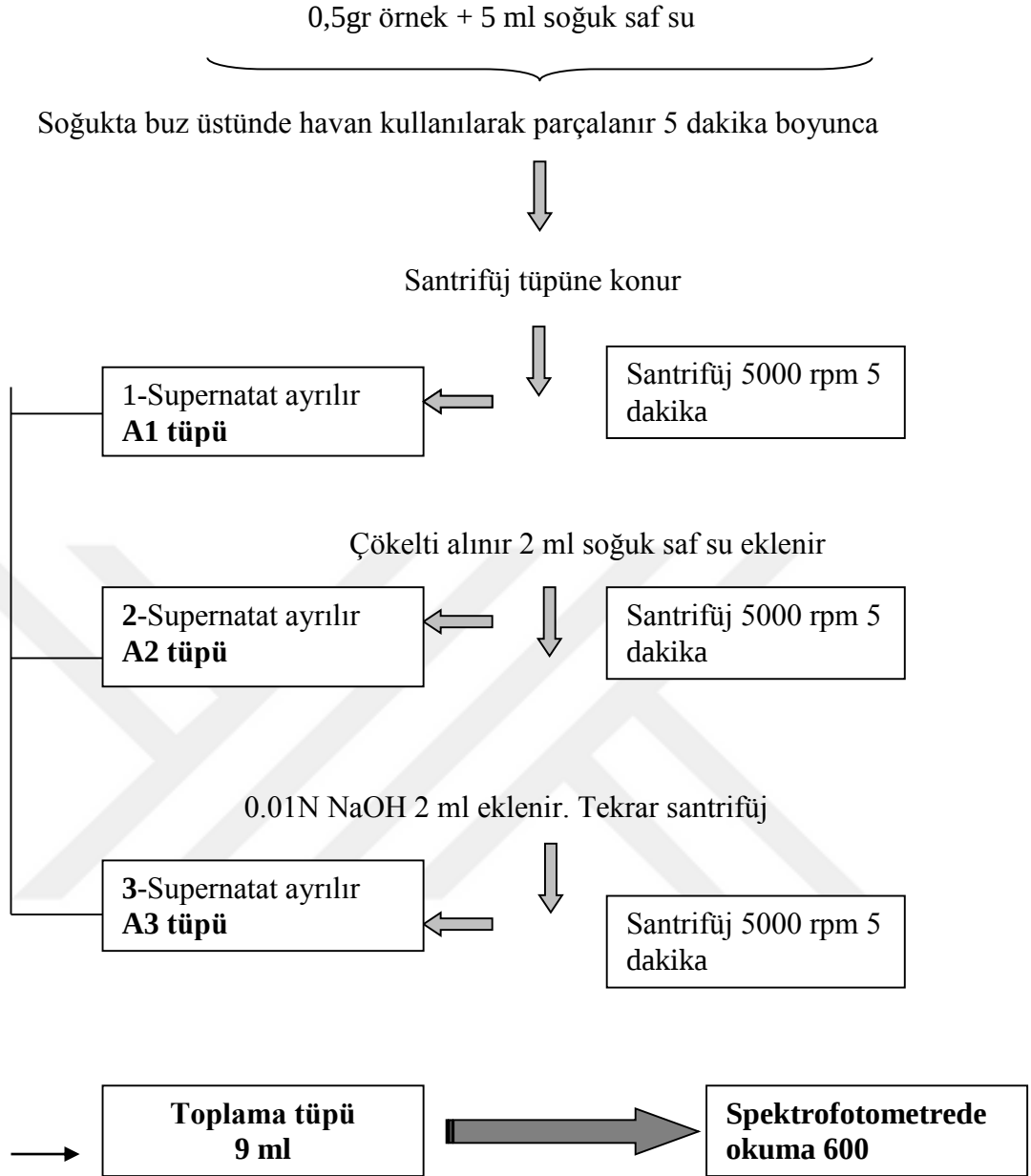
Lipid peroksidasyonunun ölçülmesi için yetiştirilen bitkiler kontrol için distile su, metal muamelesi için ise 15, 30 ve 60 μM dozlarda (As, Pb, Cd) metal karışımı içeren sulama suyu ile sulandı.

Kök ve gövdedeki lipid peroksidasyonunu ölçmek için Thiobarbutirik asit (TBA) yöntemi kullanıldı. Lipid peroksidasyonunu ölçebilmek için, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA tayini Sun, vd., , 2008' e göre gerçekleştirildi.

Çimlenen tohumlardan taze 0,5 gr kök ve gövde örnekleri ayrıldı ve $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de donduruldu. Dondurulmuş örnekler %10 'luk Trikloroasetik asitte (TCA) hazırlanmış %0,25'lik TBA 'da cam homojenizatörde homojenize edildi. Ekstrakt 95°C 'de 30 dk. kaynatıldı. Hızla soğutuldu ve $10.000 \times \text{g}$ 'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantın 532 nm ve 600 nm' deki absorbanları ölçüldü. Lipid peroksidasyonu seviyesi $1,55 \text{ mM cm}^{-1}$ ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplandı.

3.5. Ağır Metal Karışımının Kök ve Gövde Protein Miktarları Üzerine Etkisi:

$-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de dondurulmuş kök ve gövde örneklerinde protein ekstraksiyonu aşağıdaki şemaya göre gerçekleştirildi.



Bitkideki protein tayinleri Lowry yöntemine göre spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi. Kök ve gövdedeki protein miktarları mg/ml olarak ifade edildi.

3.6. Antioksidan Enzimlerin Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi:

Uygulama yapılan örneklerden enzimlerin ekspresyon analizleri için 0.2 gr taze gövde uygun tamponda sıvı azot parçacıkları ve boncuklar yardımı ile homojenize edilerek total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Dokulardan total RNA izolasyonu için Total RNA PureLink® RNA Mini Kit (Life Sciences) kullanıldı. RNA kit protokolüne göre izolasyon gerçekleştirildi. Bitki dokularından izole edilen RNA miktarları Qubit® Fluorometer (Invitrogen) ile belirlendi ve High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) kullanılarak PCR şartları Step 1: 25°C, 10 dk; Step 2: 37 °C, 120 dk; Step 3: 85 °C, 5 dk olacak şekilde programlandı cDNA sentezi yapıldı. Elde edilen cDNA'lar daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere -20 C'de saklandı.

Enzimler için uygun primerler seçilerek gen ifadelerindeki değişiklikler RT-PCR ile belirlenmeye çalışıldı. Bitki dokusundaki SOD, CAT, Glutasyon sentetaz (GS) enzimlerinin sentezinden sorumlu gen ekspresyonları RT-PCR yöntemi ile analiz edildi. Gen ekspresyon çalışmalarında "RNA izolasyonu" bölümünde açıklandığı şekilde izole edilen RNA'lardan elde edilen cDNA'lar kullanıldı. Bu cDNA'lar kullanılarak RT-PCR'da SYBR Green qPCR mastermix protokolüne uygun olarak

SOD; F (5'-GTTCGGTGACAACACCAATG-3') ve

R(5'-GGAGTCGGTGATGTTGACCT-3'),

CAT:F(5'-TACGAGCAGGCCAAGAAGTT-3') ve

R(5'-ACCTTGTACGGGCAGTTCAC-3'),

GS: F (5'-TGGGACCAGCAAGTAAAACC-3') ve

R(5'-TCGCGAATG TAGAACTCGTG-3'), primerleri kullanılarak gen ekspresyonları belirlendi.

Düzeltilme faktörü olarak housekeeping gen GAPDH: F (5'-TTGGTATCGTGGAAGGACTCA-3') ve (5'-TGTCATCATATTTGGCAGGTTT-3') primerleri kullanıldı. Eldeki syber green mix, cDNA ve primerler RT-PCR'da PCR program: 1 döngü 2 dakika 50°C ve 10 dakika 95°C, bunu takiben, 40 döngü denaturasyon (95°C 15 s) ve annelling ve uzatma (60°C 'de 1 dakika) ile çoğaltıldı.

Real Time PCR çalışmalarında gruplar arasında gen ekspresyon farklarının belirlenmesinde ▲ ▲ Ct metodu kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi ve düzeltilme faktörü olarak GAPDH ve 18S gen ekspresyonları kullanıldı.

3.7. Bitki Örneklerinde Ağır Metal Tayini:

Ağır metal tayini için çimlenme süresinin sonunda 0,5 gr bitki örneği alınarak deiyonize su ile yıkandı ve kurulandıktan sonra taze ağırlıkları kaydedildi. Her deneme grubuna ait 3 tekrarlı olarak bitki dokuları alınarak % 65'lik nitrik asit solüsyonuna konuldu. Toplamda 10 ml'ye tamamlandı. Tamamlanan bu miktar CEM Mars 6 mikrodalga yakma sisteminde kullanım protokolüne göre yakılarak homojenize edildi. (Power: 1030-1800, sıcaklık:180, Ramp Time 20.00-25.00, Hold Time: 10: 00). Elde edilen üründen 1 ml alınarak %2 nitrik aside seyreltildi ve Agilent 7700 x ICP-MS'de dokularda biriken metal miktarları belirlendi.

3.8. LC-MS/MS ile Hormon Tayini

ABA, IAA, JA ve GA tayinleri için bitki örnekleri izopropil alkol metanol (%50;%50) karışımında homojenize edildi. LC/QTOF ve LC/MS/MS ile hormon tayinleri yapıldı. 0,5 gr gövde eppendorf tüplere konuldu. Ardından sıvı azot, bilye ve homojenizatör yardımıyla toz haline getirildi. Bu numunelerin üzerine önce 100µl hidroklorik asit eklendi ardından 400µl metanol/propanol/ultra saf su (1:1:1) karışımı ilave edildi ve vorteks yardımıyla 1 dk homojen hale getirildi. Daha sonra numuneler 25 °C'de 30 dk, 70 °C'de 10 dk mixing blokta bekletildi. 10.000 rpm de 15 dk santrifüj yapıldıktan sonra, üst faz 0,22 µm por çapına sahip PTFE filtre ile süzüldü ve amber viallere aktarıldı.

Analizler Agilent 1260 infinity likit kromatografi (LC), Agilent 6460 TripleQuadrupole MS/MS Sistem (Jet Stream Electrospray iyon kaynağı) ile gerçekleştirildi.

Analizde RaptorBiphenyl 5µm (50 x 2,1mm) kolonu kullanıldı ve kolon fırın sıcaklığı 40 °C'ye ayarlandı. Mobil faz A ultra saf su, 2% formik asit ve Mobil faz B metanol, 2 mM amonyum asetat, 1 mM amonyum format karışımından oluşturuldu. Akış hızı 0,7 ml/dk, metod süresi 10dk, gradient profili (dk/A%): (0/100), (1,5/100), (3/10), (4/2), (7/2), (8/100), (10/100) ve enjeksiyon hacmi ise 5.0 µl'dir. Gaz sıcaklığı 325 °C, nebulizer gaz basıncı 45psi, capillary voltaj 3000 V, sheath gaz sıcaklığı 400 °C, sheath gaz akışı 11 L/dk, Collision gaz Azot (N²) ve basıncı 1,12 m Torr'a ayarlandı. MRM (Multiplereactionmonitoring) modu pozitif ve negative olarak çalışıldı. MS

parametrelerinden collision enerji, fragmentor voltaj, parçalanma iyonları Optimizer Programı kullanılarak optimize edildi.

Elde edilen sonuçlar, kalitatif olarak kontrol edildi. Daha sonra sonuçlar MassHunter QQQ Quantitative Analysis programında kalibrasyon grafiklerine eklenerek piklerin alanları esas alınarak kantitatif analiz sonuçları hesaplandı.

İstatiki analizler Student T testine göre yapılmıştır. Her grup kendi kontrol grubuyla karşılaştırıldı.



BÖLÜM 4

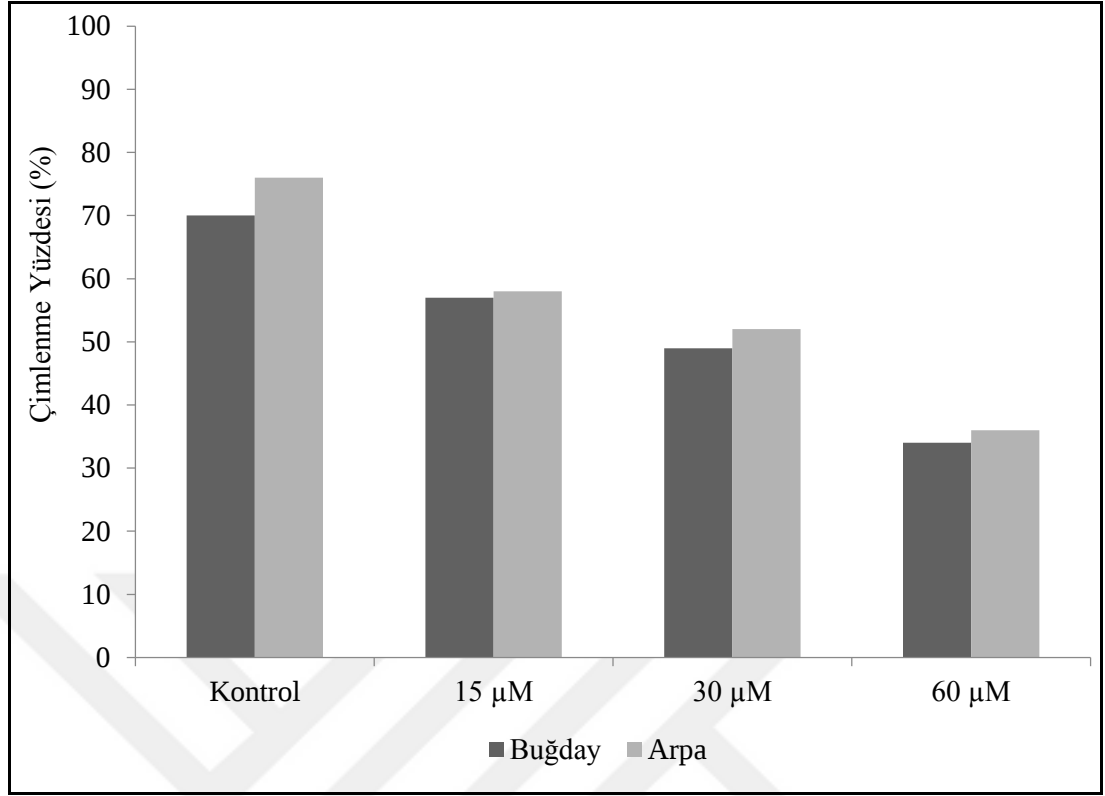
BULGULAR

Ülkemiz ekonomisi için oldukça önemli olan arpa ve buğday bitkilerinin gelişimi üzerine ağır metallerden arsenik, kurşun ve kadmiyum karışımlarının (15 μ M, 30 μ M ve 60 μ M) etkilerini belirlemek amacıyla yapılan bu çalışma sonucunda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

4.1.Ağır Metal Karışımının Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi (%):

Her bir petride 25 tohum olacak şekilde petri kapları hazırlandı. As Pb Cd'un uygun konsantrasyonlarda taze hazırlanmış çözeltileri ile sulanmış tohumlar 20° C de karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Kontrol grubu için sulama suyu olarak distile su kullanıldı. Çimlenmenin 4. gününde radikula ve plumula uzunlukları 2-5 mm den uzun olanlar çimlenmiş kabul edilerek çimlenen tohum sayısı belirlendi. Kontrol petrilerinde çimlenen tohum sayısı baz alınarak çimlenme yüzdeleri hesaplandı.

15 μ M, 30 μ M ve 60 μ M (As Pb, Cd) metal karışımı uygulanan deney gruplarında konsantrasyon artışına bağlı olarak çimlenme oranında azalma olduğu görüldü.

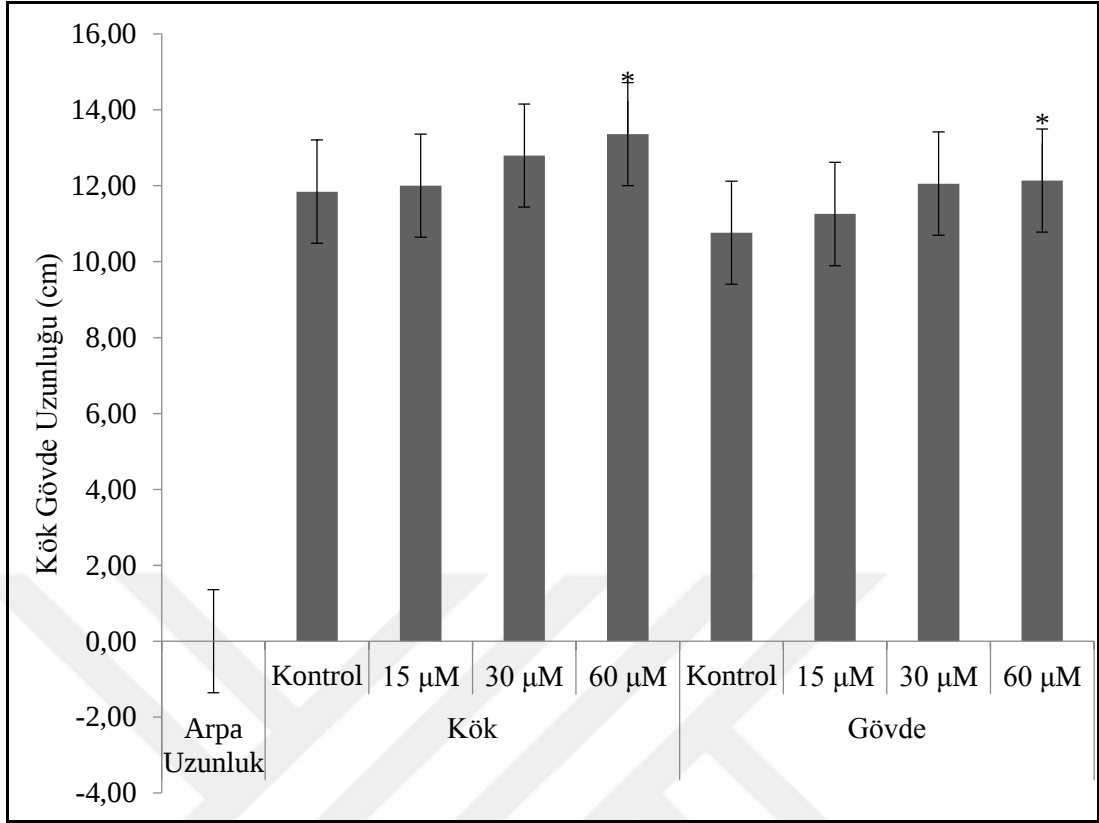


Şekil 4.1: Ağır metal karışımının tohum çimlenmesi üzerine etkisi

4.2. Ağır Metal Karışımının Kök Gövde Uzunluklarına Etkisi:

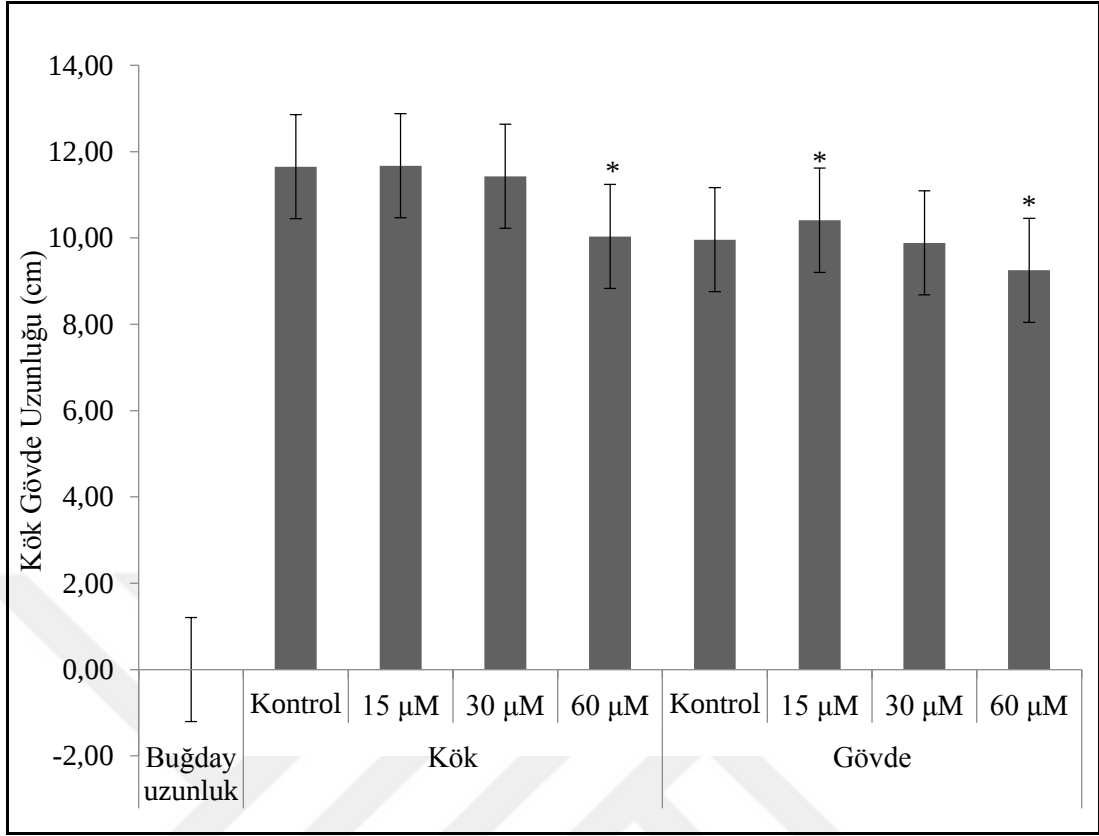
1. GÜN

a) Arpa: Uygun fidelenme süresinin sonunda kök gövde uzunlukları ölçülerek örnek ve kontrol grupları karşılaştırıldı. 1.gün arpa kök ve gövde uzunlukları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 15 µM ve 30 µM ağır metal uygulamasında kök ve gövde uzunluklarında anlamlı bir değişiklik tespit edilmezken ($p>0.05$), 60 µM doz uygulanan arpa kök ve gövde uzunlukları kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0.05$).



Şekil 4.2: 1.gün sonunda arpa kök ve gövde uzunluklarının kontrol grubuna göre değişimi
*:Kontrol grubu ile karşılaştırma, $p < 0.05$.

a) Buğday: Buğday kök ve gövde uzunlukları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1.günde 15 µM ve 30 µM metal uygulanan buğday köklerinde uzunlukta artma gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). 60 µM metal uygulamasında ise anlamlı bir azalma tespit edildi ($p < 0.05$). Gövde uzunluklarında kontrol grubuna göre 15 µM dozda ($p < 0.05$) artma gözlenirken, 30 µM dozda bir değişiklik saptanmadı ($p > 0.05$) ve 60 µM dozlarda uzunlukta anlamlı bir azalma tespit edilmiştir ($p < 0.05$)

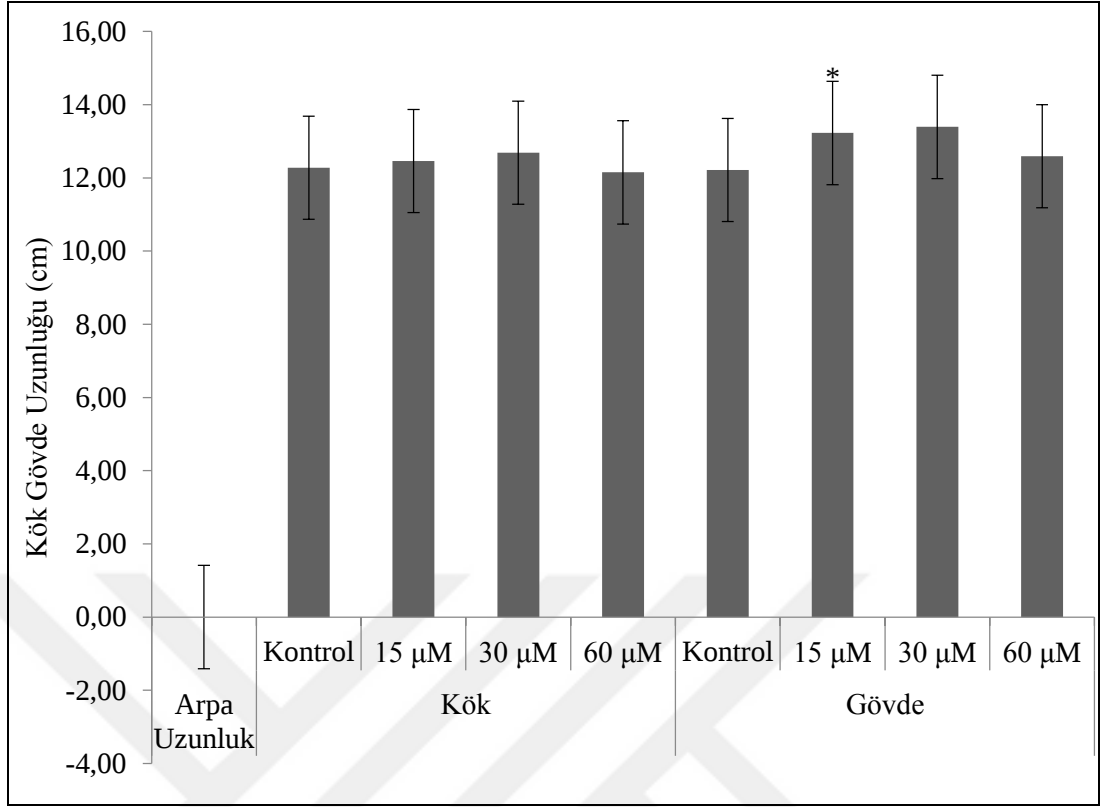


Şekil 4.3: 1.gün sonunda buğday kök ve gövde uzunluklarının kontrol grubuna göre değişimi.

*: Kontrol grubu ile karşılaştırma, $p < 0.05$

5. GÜN

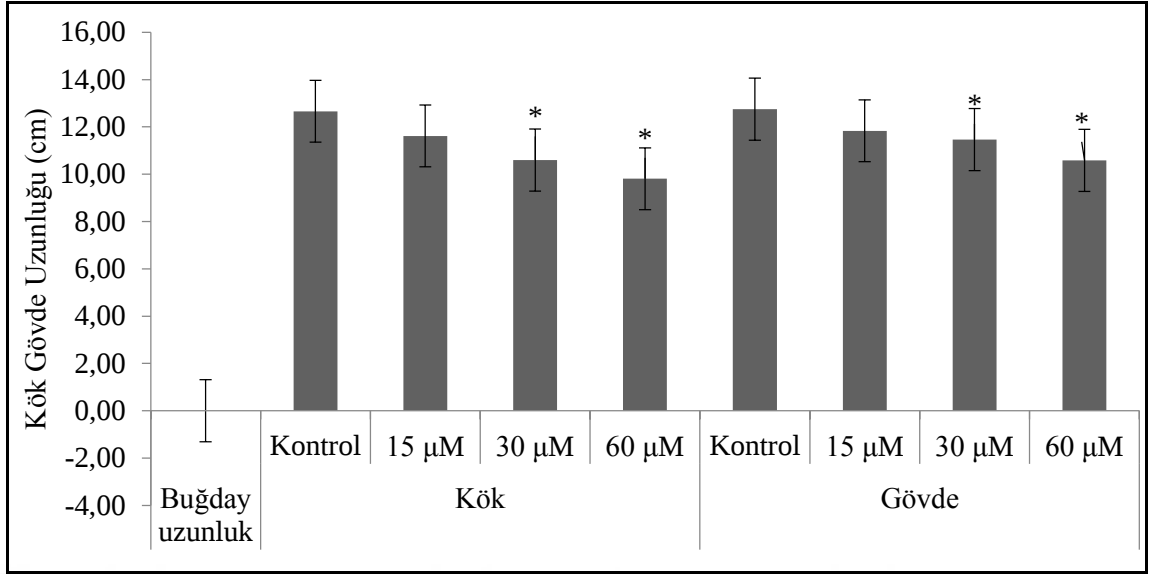
a) Arpa: 5. gün sonunda arpa kök ve gövde uzunlukları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 15 µM ve 30 µM metal uygulanan arpa kök uzunluklarında artma gözlenirken ($p > 0.05$), 60 µM dozda azalma tespit edildi ($p > 0.05$). Ancak bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Gövde uzunlukları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 15 µM ağır metal uygulamasında artma tespit edildi ($p < 0.05$). 30 µM ve 60 µM uygulamada kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik olmamıştır ($p > 0.05$).



Şekil 4.4: 5.gün sonunda arpa kök ve gövde uzunluklarının kontrol grubuna göre değişimi.

*: Kontrol grubu ile karşılaştırma, $p < 0.05$

b) Buğday: Buğday kök gövde uzunlukları 5. günde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kök uzunlukları 15 µM dozda anlamlı şekilde değişmezken ($p > 0.05$), 30 µM ve 60 µM dozlarda kök uzunlukları ($p < 0.05$) anlamlı bir şekilde azalmıştır. Benzer sonuçlar gövde uzunlukları içinde elde edildi.



Şekil 4.5: 5.gün sonunda buğday kök ve gövde uzunluklarının kontrol grubuna göre değişimi.

*: Kontrol grubu ile karşılaştırma, p<0.05

4.3.Ağır Metal Karışımının Kök ve Gövdenin Taze ve Kuru Ağırlıkları Üzerine Etkisi:

1. gün sonunda buğday kökleri taze ve kuru ağırlıkları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında taze ağırlıklarda 15 µM doz uygulamasında artma gözlenirken 30 µM ve 60 µM doz uygulamasında azalma tespit edildi. Kuru ağırlıklarının ise tüm doz uygulamalarında kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi. Buğday gövde taze ağırlıkları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 15 µM doz uygulamasında azalma 30 µM dozda artma, 60 µM doz uygulamasında tekrar azalma tespit edilmiştir. Kuru ağırlıklarında tüm gruplarda kontrol grubuna göre azalma gözlemlendi.

1. gün sonunda arpa kök taze ve kuru ağırlıkları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında taze ve kuru ağırlıklarında 15 µM doz uygulamasında azalma 30 µM ve 60 µM doz uygulamasında ise artma olduğu tespit edilmiştir. Arpa gövde taze ve kuru ağırlıkları kontrol grubuna göre 15 µM doz uygulamasında azalma 30 µM ve 60 µM doz uygulamasında ise artma olduğu gözlemlendi.

1. günde taze ve kuru ağırlıklardaki değişim kök ve gövdede benzerlik göstermektedir.(Tablo 4.1)

Tablo 4.1: Ağır metal karışımının 1.gün buğday ve arpada kök gövde taze ve kuru ağırlıkları üzerine etkisi (gr). (Değerler üç tekrarın ortalamasıdır).

(As,Pb,Cd)karışım konsantrasyonu (μ M)	Buğday Kök 1.Gün		Arpa Kök 1.Gün	
	Kök taze ağırlık (gr)	Kök kuru ağırlık (gr)	Kök taze ağırlık (gr)	Kök kuru ağırlık (gr)
Kontrol	0,97	0,09	1,83	0,08
15 μM	1	0,06	1,15	0,06
30 μM	0,95	0,07	2,07	0,12
60 μM	0,75	0,05	1,96	0,13
(As,Pb,Cd)karışım konsantrasyonu (μ M)	Buğday Gövde 1.Gün		Arpa Gövde 1.Gün	
	Gövde taze ağırlık (gr)	Gövde kuru ağırlık (gr)	Gövde taze ağırlık (gr)	Gövde kuru ağırlık (gr)
Kontrol	1,66	0,18	2,22	0,17
15 μM	1,46	0,14	1,69	0,13
30 μM	1,67	0,16	2,63	0,21
60 μM	1,55	0,16	2,56	0,2

5. gün sonunda buğday kök taze ve kuru ağırlıkları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 15 μ M, 30 μ M ve 60 μ M doz uygulanan gruplarda azalma gözlemlendi. Gövde taze ve kuru ağırlıklarında kontrol grubuna göre tüm doz uygulanan gruplarda azaldığı tespit edilmiştir.

5. gün sonunda arpa taze ağırlıkları kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında 15 μ M ve 30 μ M dozda artma 60 μ M dozda azalma gözlemlendi., Kuru ağırlıkları kontrol grubuna göre 15 μ M dozda aynı kalırken, 30 μ M dozda artma, 60 μ M dozda ise azalma tespit edildi.

Tablo 4.2: Ağır metal karışımının 5.gün sonunda buğday ve arpada kök gövde taze ve kuru ağırlıkları üzerine etkisi (gr). (Değerler üç tekrarın ortalamasıdır).

(As,Pb,Cd)karışım konsantrasyonu (μ M)	Buğday Kök 5.Gün		Arpa Kök 5.Gün	
	Kök taze ağırlık (gr)	Kök kuru ağırlık (gr)	Kök taze ağırlık (gr)	Kök kuru ağırlık (gr)
Kontrol	1,31	0,10	1,45	0,09
15 μM	0,93	0,08	1,55	0,10
30 μM	0,94	0,08	1,60	0,10
60 μM	0,92	0,09	1,32	0,09
(As,Pb,Cd)karışım konsantrasyonu (μ M)	Buğday Gövde 5.Gün		Arpa Gövde 5.Gün	
	Gövde taze ağırlık (gr)	Gövde kuru ağırlık (gr)	Gövde taze ağırlık (gr)	Gövde kuru ağırlık (gr)
Kontrol	2,39	0,24	2,63	0,20
15 μM	2,33	0,22	2,68	0,20
30 μM	2,20	0,22	2,90	0,21
60 μM	2,28	0,23	2,44	0,18

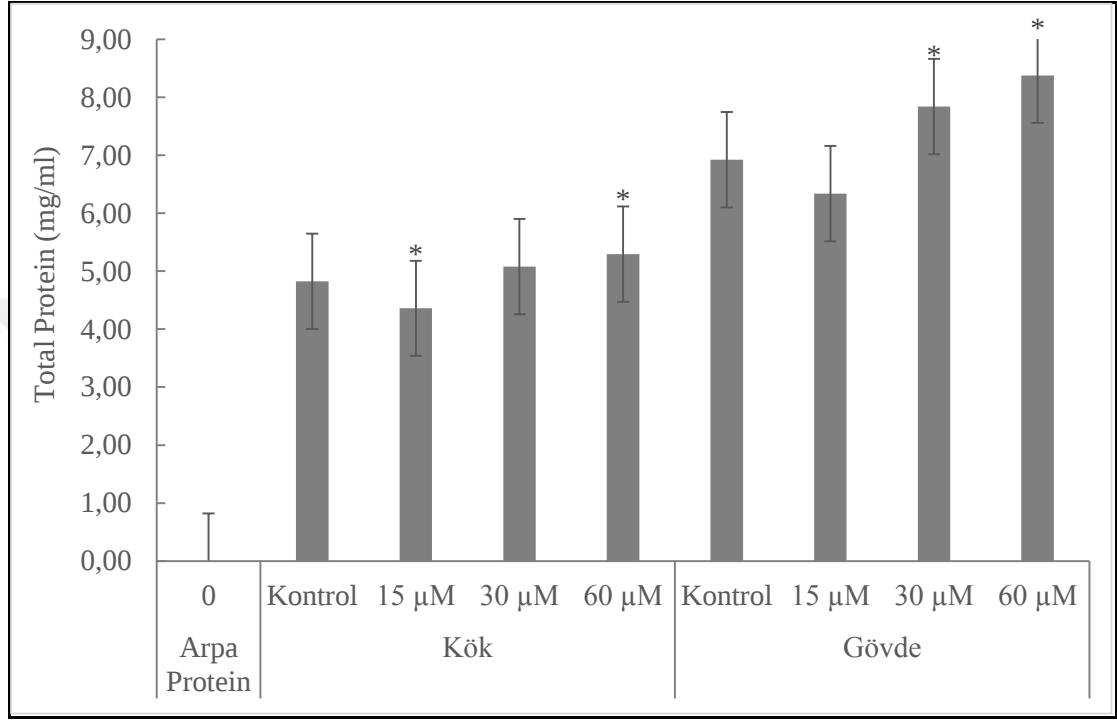
4.4. Bitki Kök ve Gövdelerinde Total Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Kök ve gövdelerdeki protein miktarları Lowry yöntemine göre belirlendi (Lowry, 1951).

1.GÜN

a) Arpa: 1. gün sonunda arpa köklerindeki protein miktarları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 15 μ M metal iyonu uygulanan arpa köklerinde total protein içeriği kontrol grubuna göre azalma gösterirken ($p < 0.05$), 30 μ M dozda değişiklik anlamlı değildi ($p > 0.05$). 60 μ M dozda metal iyonları uygulanan köklerde total protein içeriği

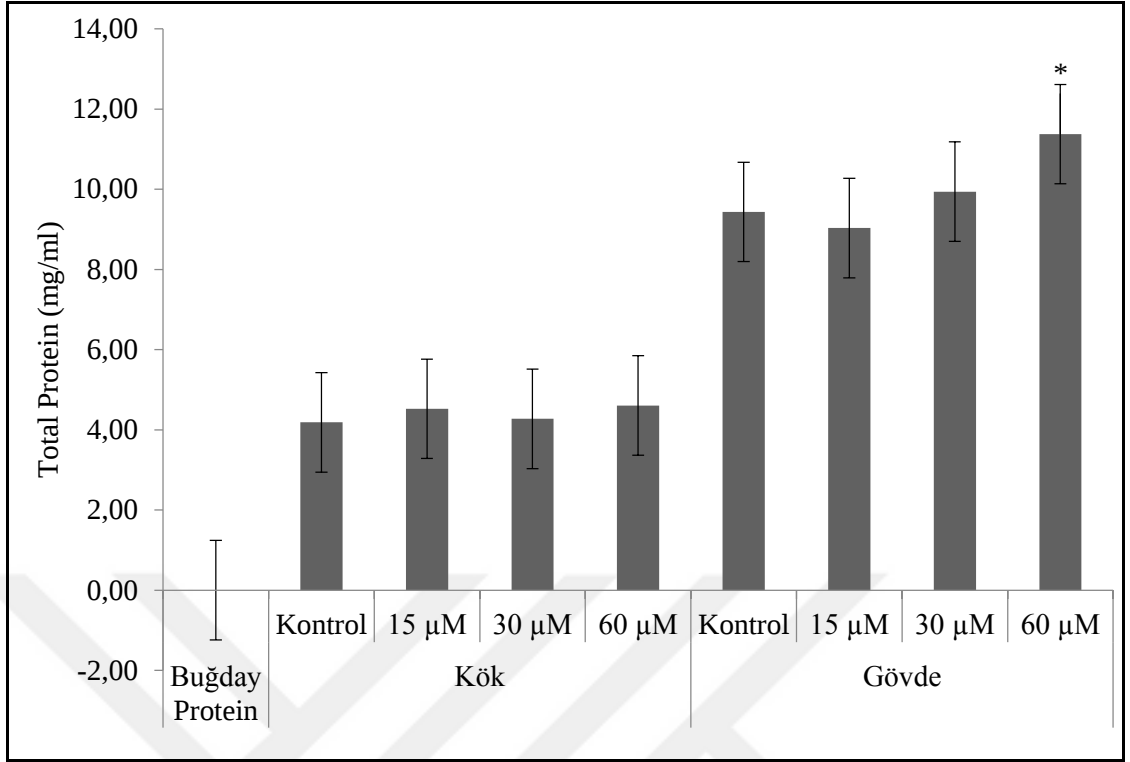
kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttı ($p<0.05$). Gövde örneklerinde ise 15 μM uygulanan dozda bir azalma olmuş fakat istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$), 30 μM ve 60 μM doz uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında protein içeriğinde anlamlı bir şekilde artış olduğu gözlemlendi ($p<0.05$).



Şekil 4.6: 1.gün sonunda arpa kök ve gövdedeki total protein içerikleri

*: Kontrol grubu ile karşılaştırma, $p<0.05$

b) Buğday: 1. gün sonunda buğday kökleri protein içerikleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 15 μM , 30 μM ve 60 μM ağır metal uygulanan gruplarda protein içeriği kontrol grubuna göre artış gösterdi. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Gövde örneklerindeki protein içeriği kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 15 μM ve 30 μM doz uygulanan grupların protein içeriğinde anlamlı bir değişiklik tespit edilmedi ($p>0.05$). 60 μM doz uygulanan grupların protein içeriğinde anlamlı bir şekilde artma gözlemlendi ($p<0.05$).

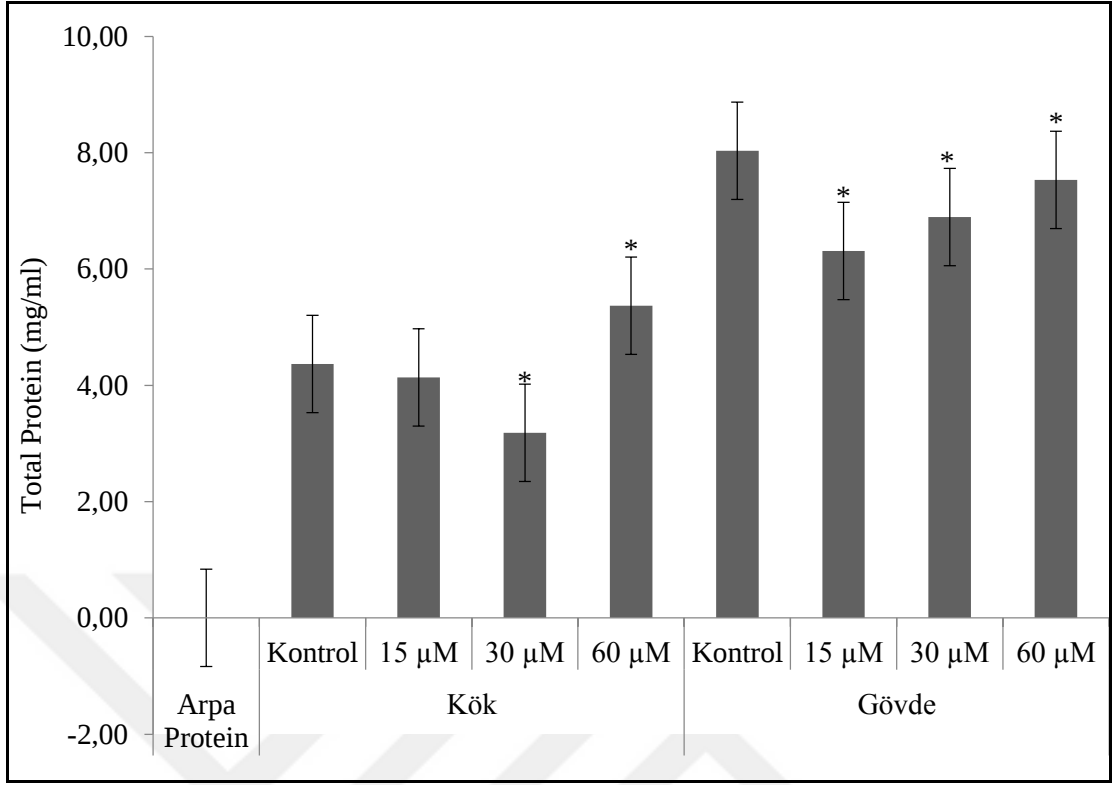


Şekil 4.7: 1.gün sonunda buğday kök ve gövdedeki total protein içerikleri

*: Kontrol grubu ile karşılaştırma, $p < 0.05$

5.GÜN

a) Arpa: 5. gün sonunda arpa kök protein içerikleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 15 µM dozda anlamlı bir değişiklik izlenmezken ($p > 0.05$), 30 µM ağır metal uygulanan köklerin protein içeriğinde azalma tespit edildi ($p < 0.05$). 60 µM doz uygulanan grubun protein içeriği kontrol grubuna göre artma göstermiştir ($p < 0.05$). Arpa gövde örneklerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm metal uygulanan grupların protein içeriği kontrol grubuna göre azaldığı görüldü ($p < 0.05$).

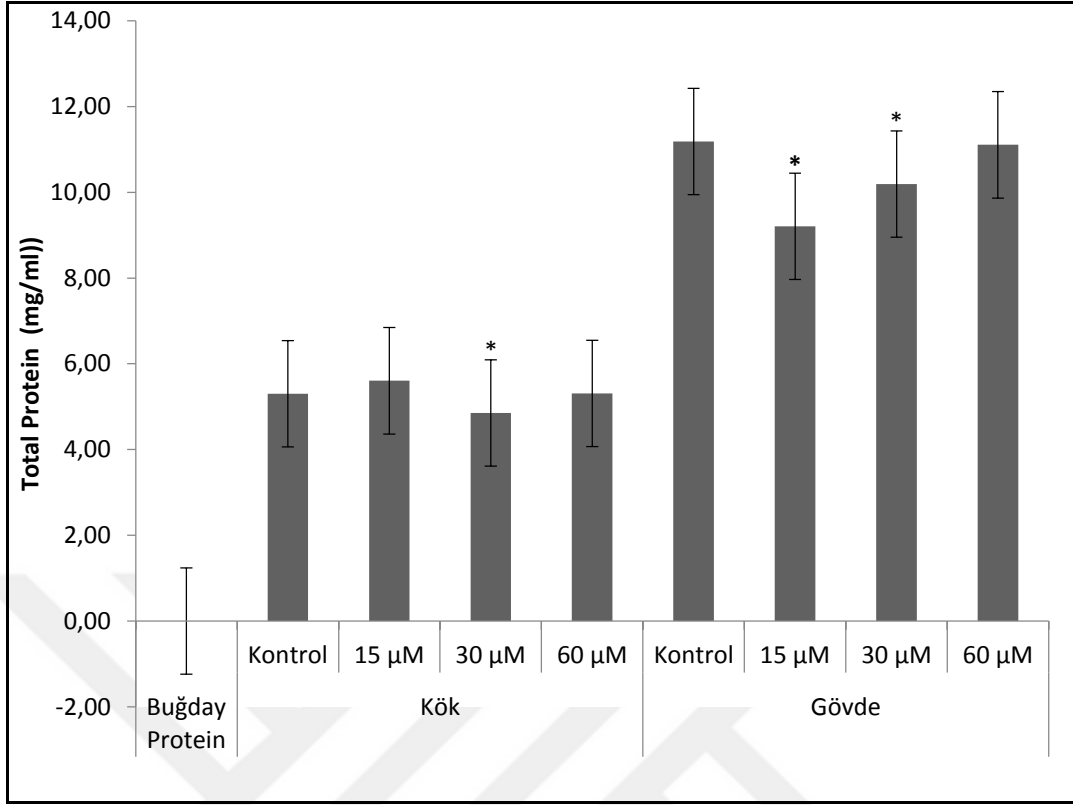


Şekil 4.8: 5.Gün sonunda arpa kök ve gövdedeki total protein içerikleri

*: Kontrol grubu ile karşılaştırma, $p < 0.05$

b) Buğday: 5. gün sonunda buğday köklerinin protein içerikleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 15 µM ve 60 µM doz uygulanan grupta total protein miktarlarında anlamlı bir değişiklik olmazken ($p > 0.05$), 30µM doz uygulamasında azalma tespit edildi ($p < 0.05$).

5. gün sonunda gövde örneklerinde 15 µM ve 30 µM metal uygulanan grupların protein içeriği kontrol grubuna göre azaldığı tespit edildi ($p < 0.05$). 60 µM doz uygulamasında ise protein miktarları tekrar artarak kontrole yaklaşmıştır. Kontrol ile arasında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ($p > 0.05$).



Şekil 4.9 5.gün sonunda buğday kök ve gövdedeki total protein içerikleri

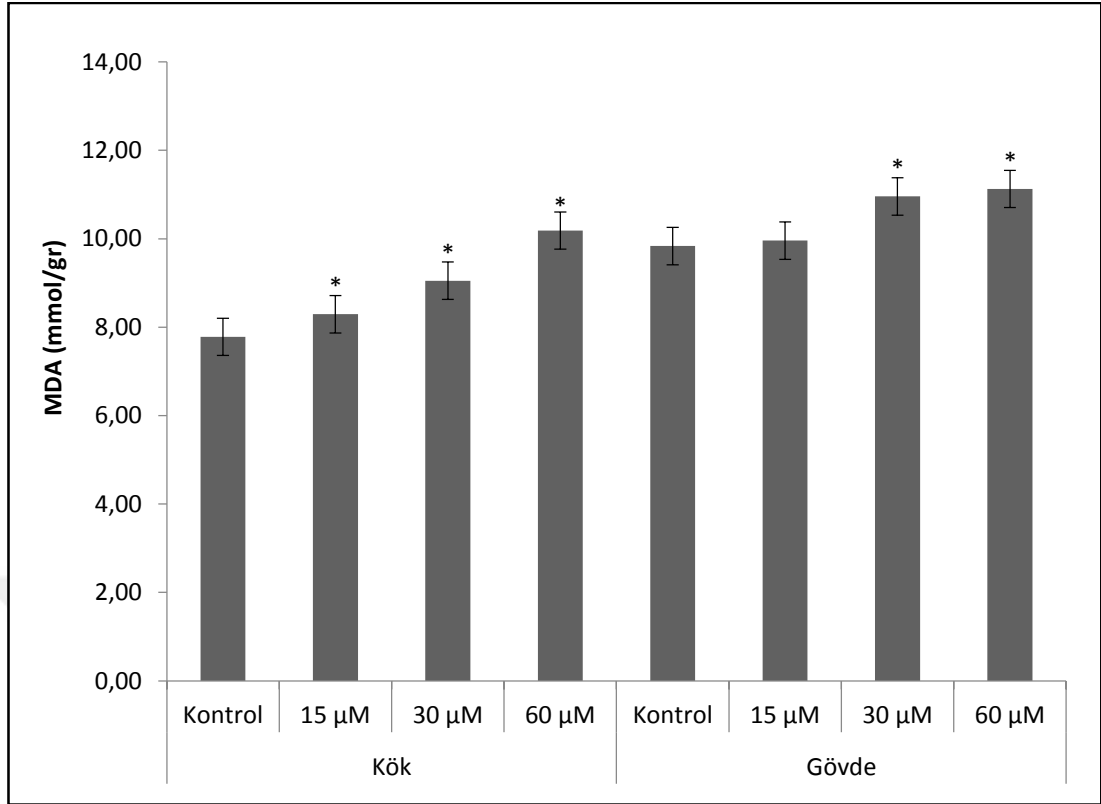
*: Kontrol grubu ile karşılaştırma, $p < 0.05$

4.5. Arsenik, Kurşun ve Kadmiyum ‘un Kök ve Gövdede MDA İçeriği Üzerine Etkisi

Kök ve gövdelerde meydana gelen lipid peroksidasyonun derecesinin belirlenmesi için lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA seviyesi ölçüldü.

1. GÜN

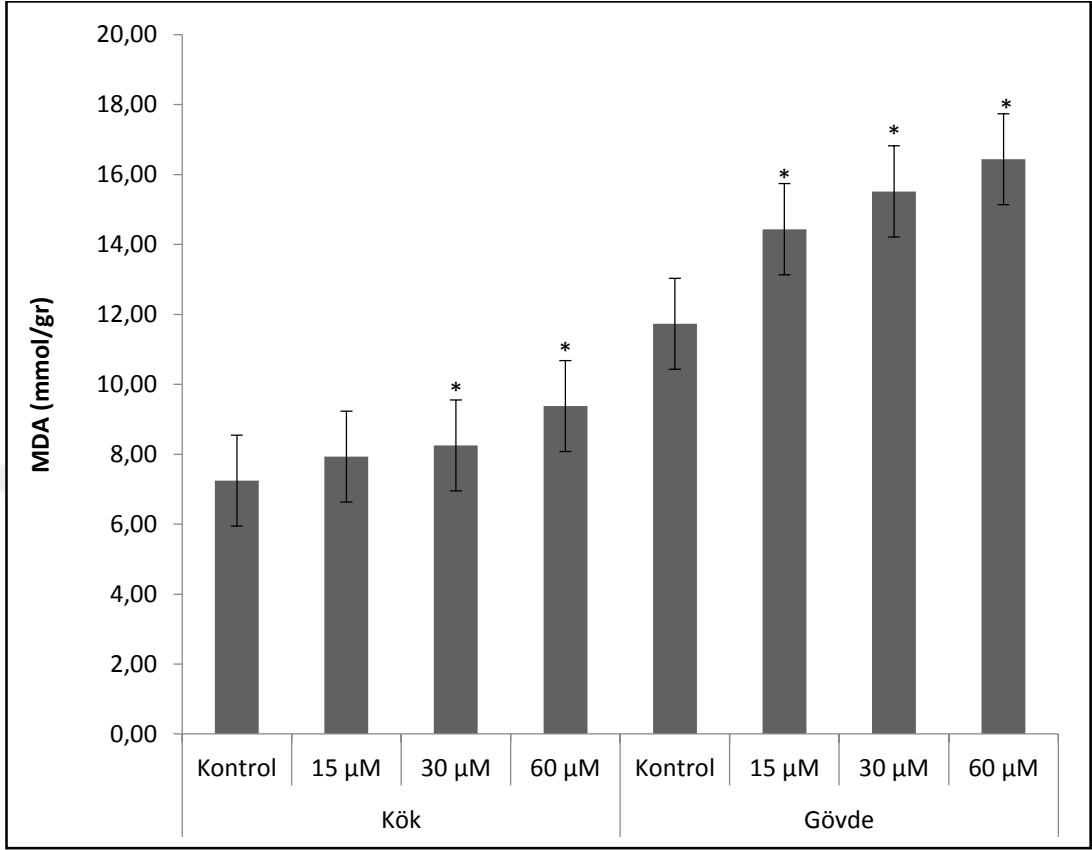
a) Arpa: 1. gün sonunda arpa kök örneklerinde metal iyonu uygulanan örnekler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MDA seviyelerinde anlamlı bir artış tespit edildi ($p < 0.05$). Gövde örneklerinin MDA seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırmada 15 µM dozda anlamlı bir değişiklik olmazken ($p > 0.05$), 30 µM ve 60 µM dozlarda artış gözlemlendi ($p < 0.05$).



Şekil 4.10: 1.gün sonunda arpa kök ve gövdedeki MDA içeriği.

*: Kontrol grubu ile karşılaştırma, $p<0.05$

b) Buğday: 1. gün sonunda buğday kök örneklerinde metal uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 15 µM dozdaki artış anlamlı bulunmadı ($p>0.05$) diğer bütün gruplarda MDA seviyesinde artma gözlemlendi ($p<0.05$). Gövde örneklerinde MDA seviyelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış tespit edildi ($p<0.05$).

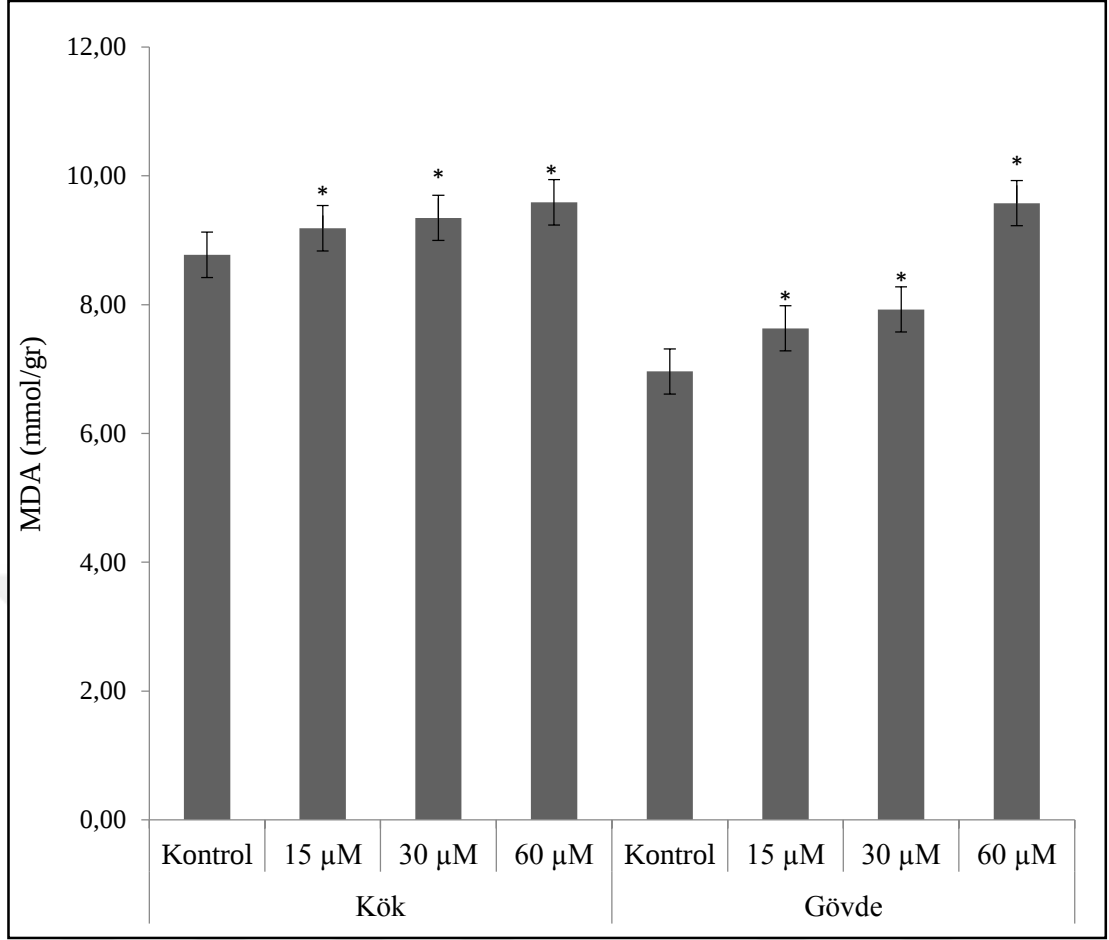


Şekil 4.11: 1.gün sonunda buğday kök ve gövdedeki MDA içeriği.

*: Kontrol grubu ile karşılaştırma $p<0.05$

5. GÜN

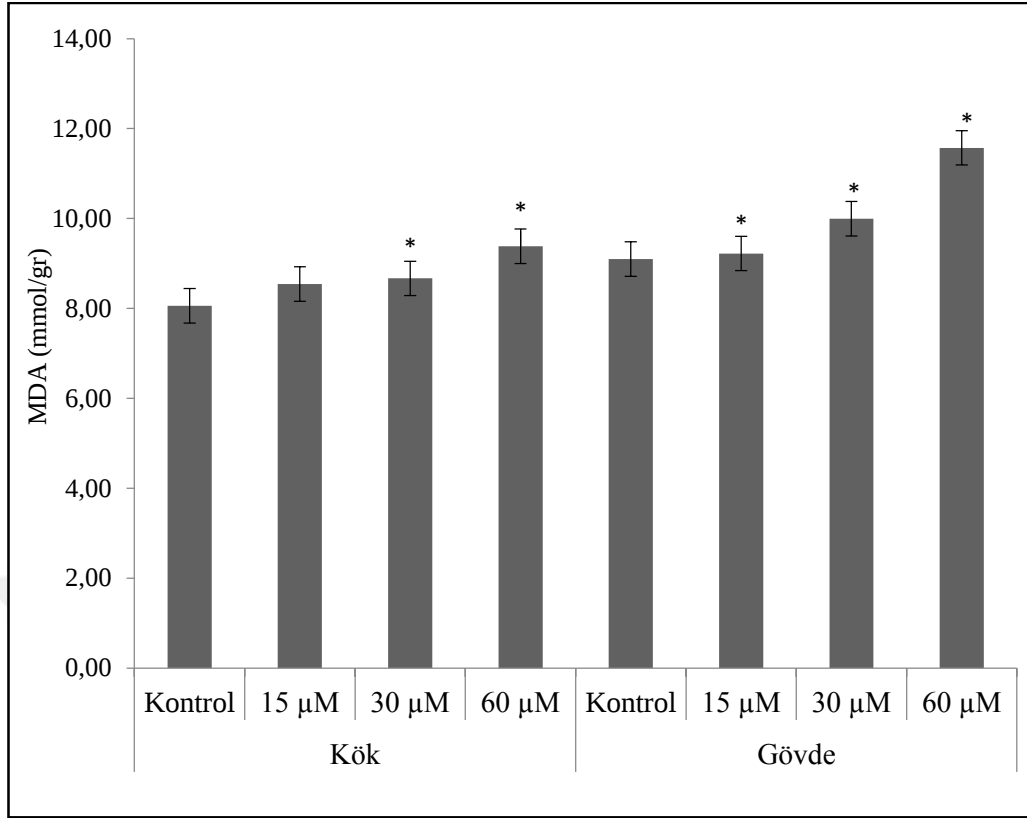
a) Arpa: 5. gün sonunda Arpa kök örneklerinde kontrol grubuna göre metal uygulanan gruplarda MDA seviyesinde artış gözlemlendi ($p<0.05$). Gövde örneklerindede aynı şekilde anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0.05$).



Şekil 4.12: 5.gün sonunda arpa kök ve gövdedeki MDA içeriği.

*: Kontrol grubu ile karşılaştırma $p<0.05$

b) Buğday: 5. gün sonunda buğday kök örneklerinde kontrol grubuna göre 15 µM dozda önemli bir değişiklik olmazken ($p>0.05$), 30 µM ve 60 µM dozlarda artış gözlemlendi ($p<0.05$). Gövde örneklerinde kontrol grubuna göre metal iyonu uygulanan grupların MDA seviyelerinde artış tespit edildi ($p<0.05$).



Şekil 4.13: 5.gün sonunda buğday kök ve gövdedeki MDA içeriği.

*: Kontrol grubu ile karşılaştırma $p<0.05$

4.6. Buğday ve Arpa'da Ağır Metal Birikimi

1. gün ve 5. gün sonunda arpa'da ağır metal uygulanan gruplar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında arsenik, kurşun ve kadmiyum'un dokularda konsantrasyon artışına bağlı olarak artarak biriktiği tespit edilmiştir. En yüksek birikim 60 µM doz uygulamasında gerçekleştiği gözlemlendi.

Tablo 4.3: 1.gün sonunda arpa’da ağır metal birikimi (ppb)

	Kontrol 1.Gün	15µM 1. Gün	30µM 1.Gün	60µM 1.Gün
As	0,104	0,28	0,286	1,381
Cd	0,039	0,177	0,195	1,065
Pb	0,428	0,524	0,61	1,647

Tablo 4.4: 5.gün sonunda arpa’da ağır metal birikimi (ppb)

	Kontrol 5.Gün	15µM 5.Gün	30µM 5.Gün	60µM 5.Gün
As	0,126	0,366	0,983	1,859
Cd	0,098	0,354	1,024	2,38
Pb	0,856	1,162	1,975	3,066

Buğday bitkisinde ağır metal karışımı uygulanan gruplar 1. gün sonunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bitkide biriken ağır metallerde artma tespit edilmiştir. 5.gün sonunda kontrol grubu ile karşılaştırmada ağır metal birikiminin artarak devam ettiği görüldü.

Tablo 4.5: 1.gün sonunda buğday’da ağır metal birikimi (ppb)

	Kontrol 1.Gün	15µM 1. Gün	30µM 1.Gün	60µM 1.Gün
As	0,093	0,333	0,369	1,596
Cd	0,038	0,325	0,368	1,074
Pb	0,484	0,715	0,763	2,289

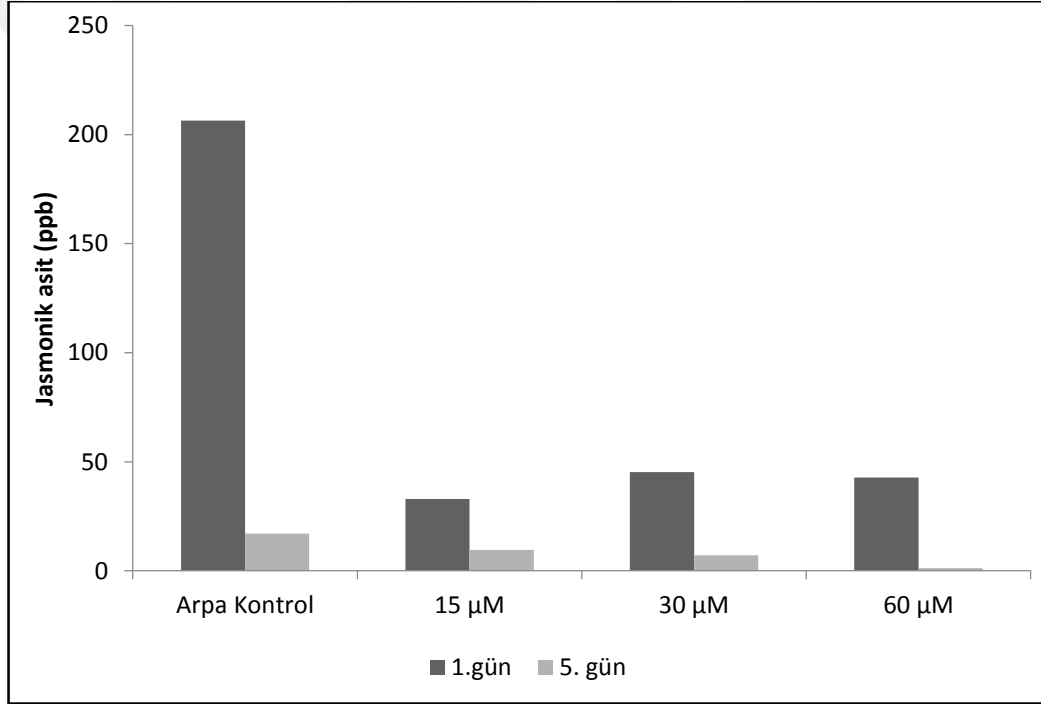
Tablo 4.6: 5.gün sonunda buğday’da ağır metal birikimi(ppb)

	Kontrol 5.Gün	15µM 5. Gün	30µM 5.Gün	60µM 5.Gün
As	0,115	0,462	0,987	1,84
Cd	0,066	1,11	1,846	3,172
Pb	0,79	1,384	2,74	3,133

4.7. Ağır Metal Karışımının Buğday ve Arpa'da Hormonlar Üzerine Etkisi

Bitkilerde stres sırasında bitkinin büyüme ve gelişmesini teşvik eden yada inhibe eden bazı hormonlardaki değişimleri incelendi. Aktive edici hormonlardan IAA (İndol asetik asit), inhibe edici hormonlardan ise ABA (Absisik asit) JA (Jasmonik asit) miktarlarındaki değişiklikler değerlendirildi. Ayrıca Redukte glutatyon miktarlarındaki değişimler incelendi.

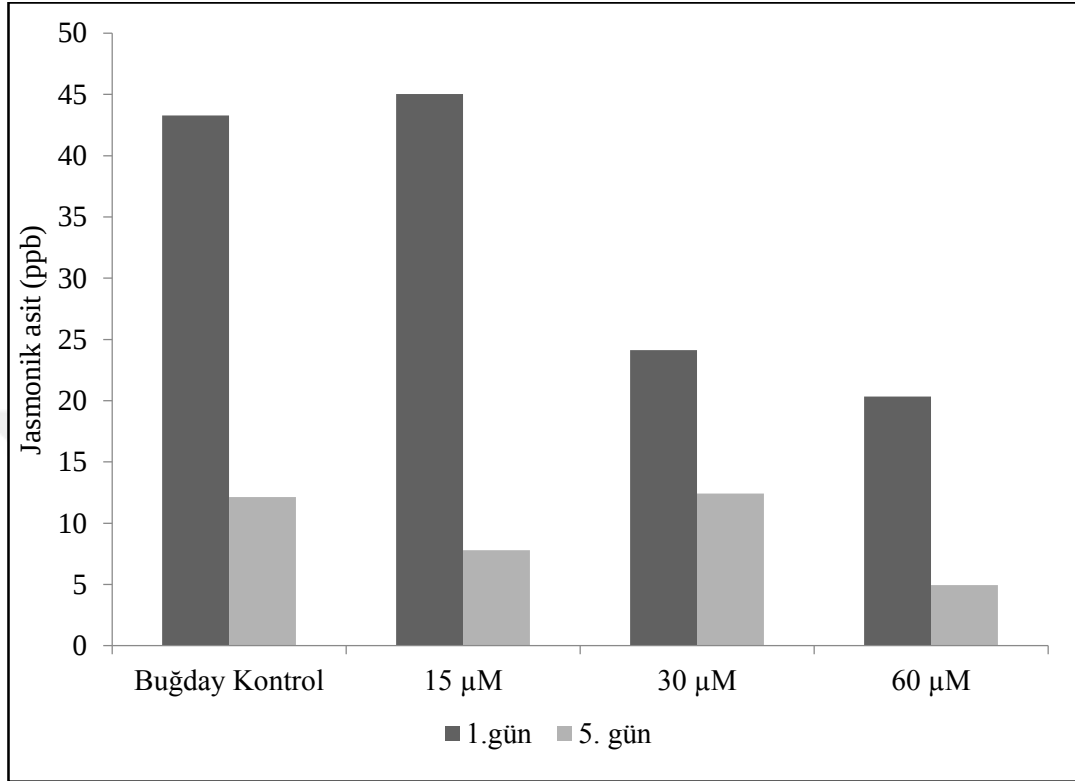
Jasmonik asit (JA): Arpa'da 15 μ M, 30 μ M ve 60 μ M ağır metal uygulanan gruplar 1. gün ve 5. gün 'nün sonunda kontrol grubuna göre jasmonik asit miktarında azalma tespit edildi.



Şekil 4. 14 Ağır metal karışımının 1.gün ve 5.gün sonunda arpa'da jasmonik asit üzerine etkisi.

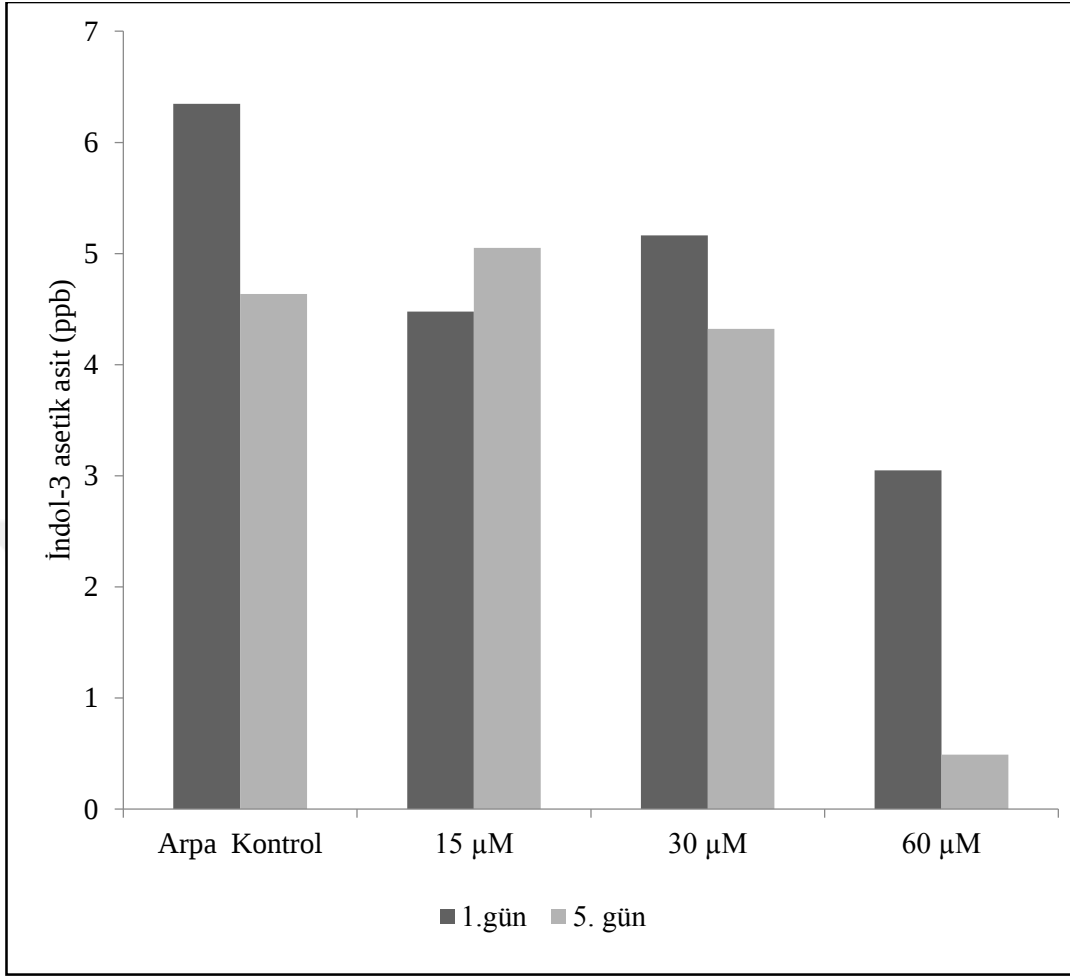
Buğdayda 1. gün sonunda ağır metal uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 15 μ M doz uygulanan grupta jasmonik asit miktarında artma gözlenirken diğer iki grupta azalma tespit edilmiştir. 5. günün sonunda 15 μ M ve 60 μ M

doz uygulanan gruplarda jasmonik asit miktarında azalma görülürken 30 μM doz uygulanan grupta artma tespit edildi.



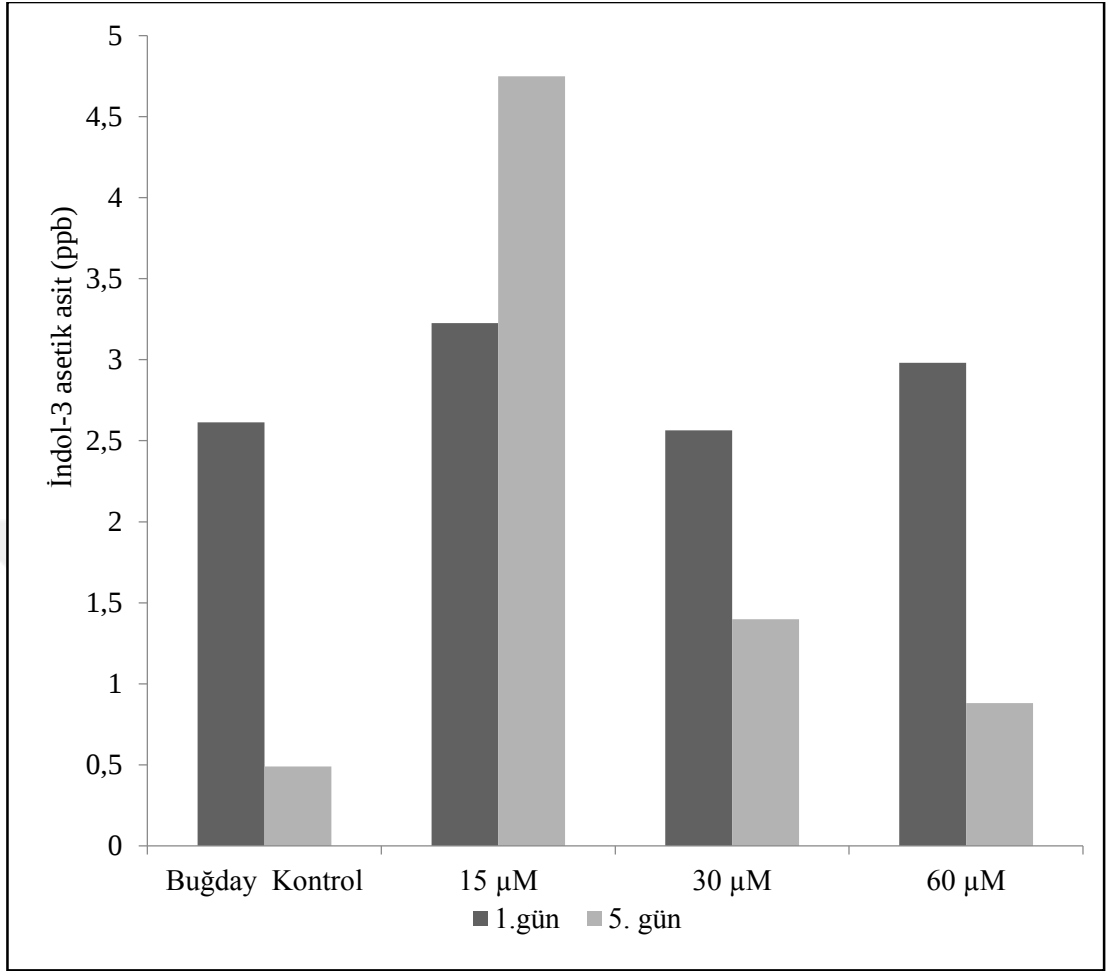
Şekil 4.15 Ağır metal karışımının 1.gün ve 5.gün sonunda buğday'da jasmonik asit üzerine etkisi.

Indol-3-asetik asit: Arpa'da 1. gün sonunda metal uygulanan gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Indol-3-asetik asit miktarında azalma görülmüştür. 5.gün sonunda ise Indol-3-asetik asit miktarında 15 μM doz uygulamasında artma, artan dozlarda ise azalmalar tespit edilmiştir.



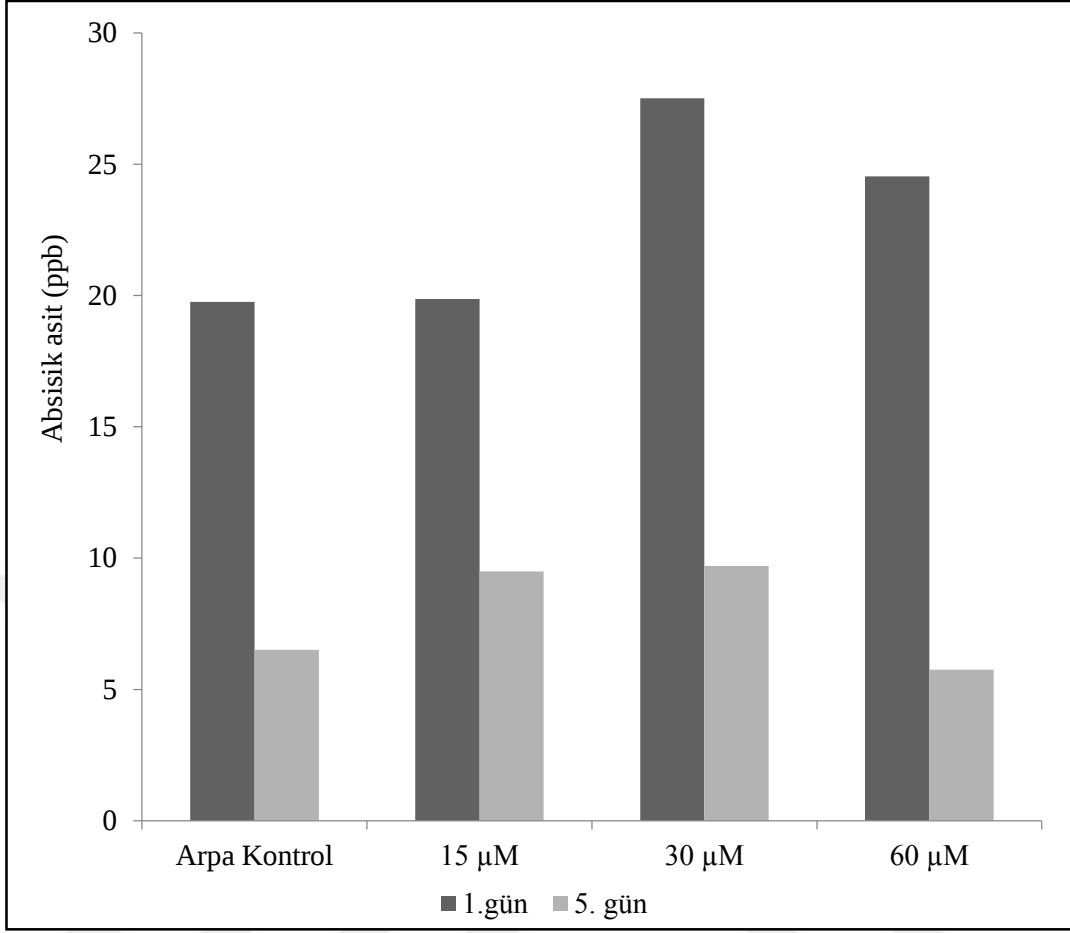
Şekil 4.16: Ağır metal karışımının 1.gün ve 5.gün sonunda arpa’da Indol-3-asetik asit üzerine etkisi.

1. gün sonunda buğdayda kontrol grubuna göre yapılan karşılaştırmada 15 µM ve 60 µM doz uygulanan gruplarda Indol-3-asetik asit miktarları kontrol grubuna göre yüksek olarak tespit edilmiş. 30 µM doz uygulanan grupta Indol-3-asetik asit miktarı kontrol grubuna yakın olduğu gözlenmiştir. 5. gün sonunda buğday’da ağır metal uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre üç doz uygulamasında da Indol-3-asetik asit miktarında artma tespit edilmiştir. En yüksek artış 15 µM doz uygulamasında gözlenmiştir.



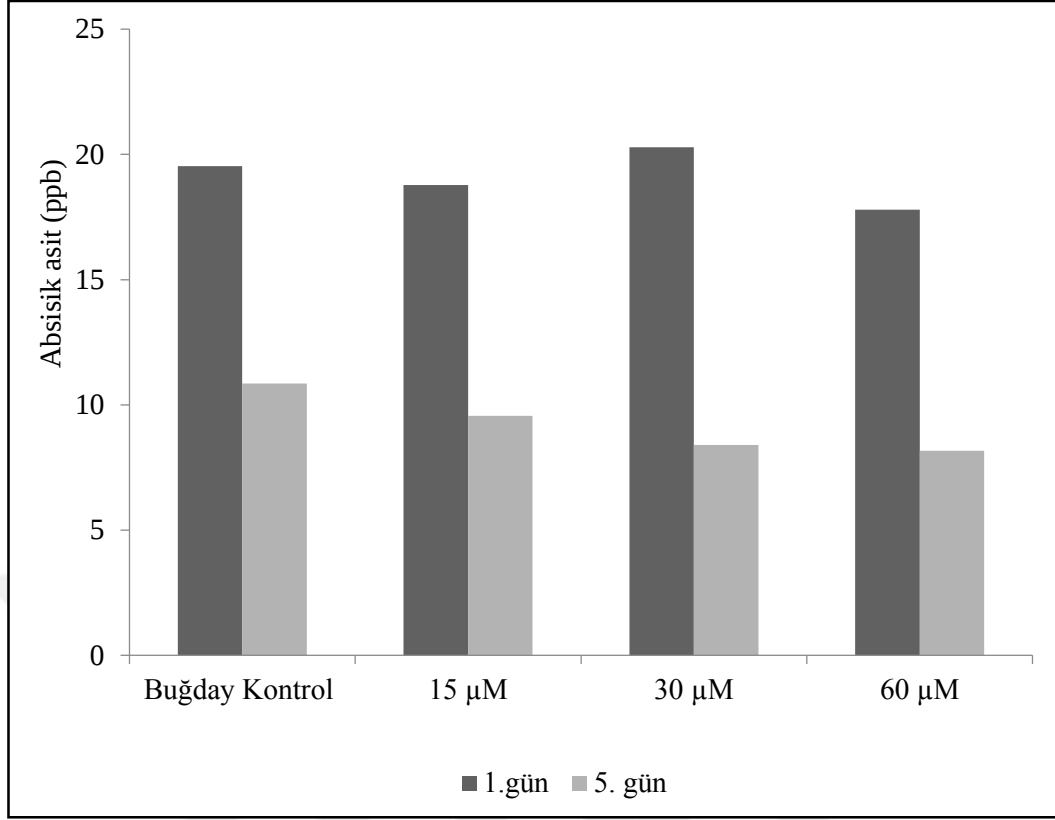
Şekil 4.17: Ağır metal karışımının 1.gün ve 5.gün sonunda buğday’da Indol-3-asetik asit üzerine etkisi

Absisik asit: Arpa’da 1. gün sonunda absisik asit miktarında artış tespit edilmiştir. 5. gün uygulamanın sonunda ise kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmada 15 µM ve 30 µM metal iyonu uygulanan gruplarda artış olduğu 60 µM uygulamada bir miktar azalma olmasına rağmen kontrol grubuna göre hala yüksek olarak tespit edilmiştir.



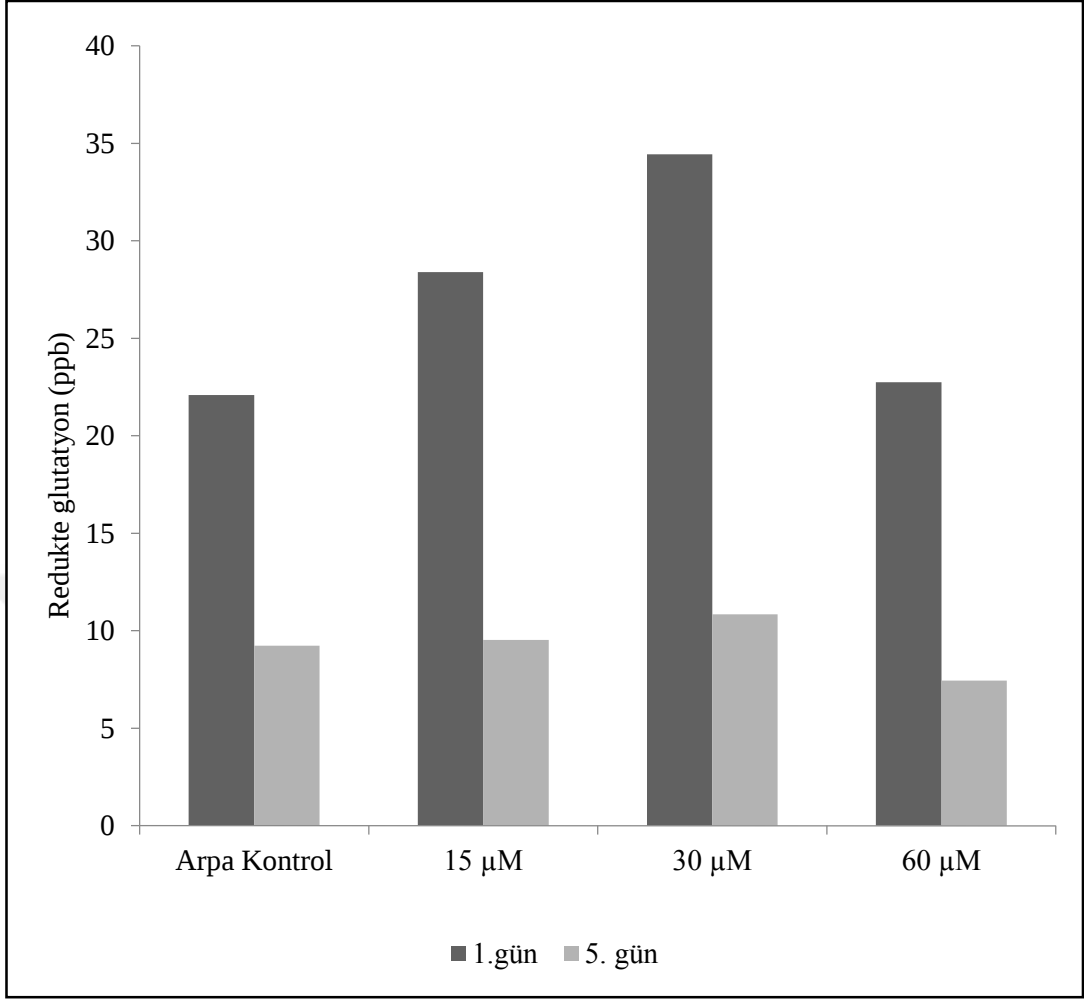
Şekil 4.18: Ağır metal karışımının 1.gün ve 5.gün sonunda arpa’da absisik asit miktarları üzerine etkisi.

1. gün sonunda buğday örnekleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 30 µM doz uygulamasında hafif bir artış olmasına rağmen, diğer iki grupta azalma tespit edilmiştir. 5. gün sonunda ise tüm deney gruplarında absisik asit seviyesinde azalma gözlemlendi.



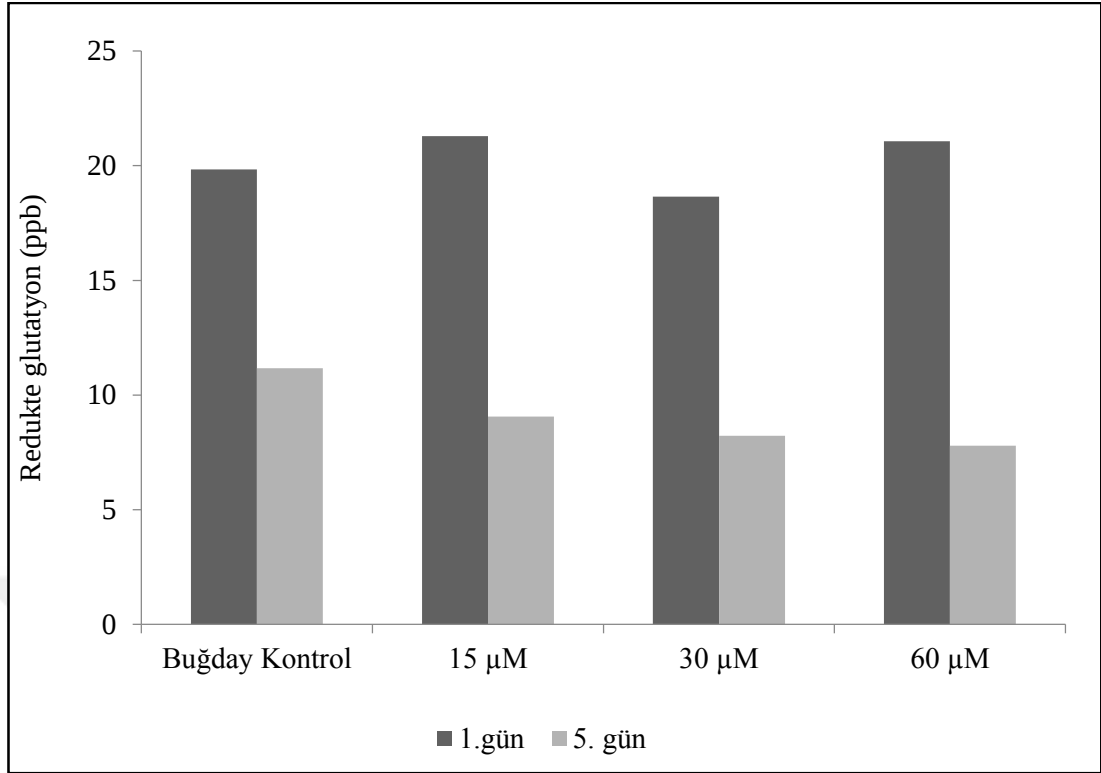
Şekil 4.19: Ağır metal karışımının 1.gün ve 5.gün sonunda buğday’da absisik asit miktarları üzerine etkisi.

Redukte glutasyon: Hücre içi ortamın önemli antioksidan moleküllerinden birisi olan redukte glutasyon seviyeleri karşılaştırıldığında, 1. gün ve 5. günün sonunda arpa’da ağır metal gruplarında kontrole göre artma tespit edildi. Yalnızca 60 µM uygulamada 1. günde kontrol grubundan yüksek olmakla birlikte redukte glutasyon seviyeleri düşmüş, 5. gün de kontrole göre daha düşük seviyede izlenmiştir.



Şekil 4.20: Ağır metal karışımı uygulanan arpa'da 1.gün ve 5.gün sonunda redükte glutatyon seviyeleri

Buğday bitkisi üzerinden değerlendirildiğinde redükte glutatyon seviyeleri arpada gözlenen seviyelerle benzer bulunmuştur. Ancak buğdayda, 1. gün sonunda kontrol grubuna göre 15 µM ve 60 µM metal iyonu uygulamasında artma gözlenirken, 30 µM uygulamada azalma görülmüştür. 5. gün sonunda ise kontrol grubuna göre metal iyonu uygulanan gruplarda redükte glutatyon seviyesinde anlamlı bir şekilde azalma tespit edilmiştir.



Şekil 4.21: Ağır metal karışımı uygulanan buğday’da 1.gün ve 5.gün sonunda redükte glutatyon seviyeleri

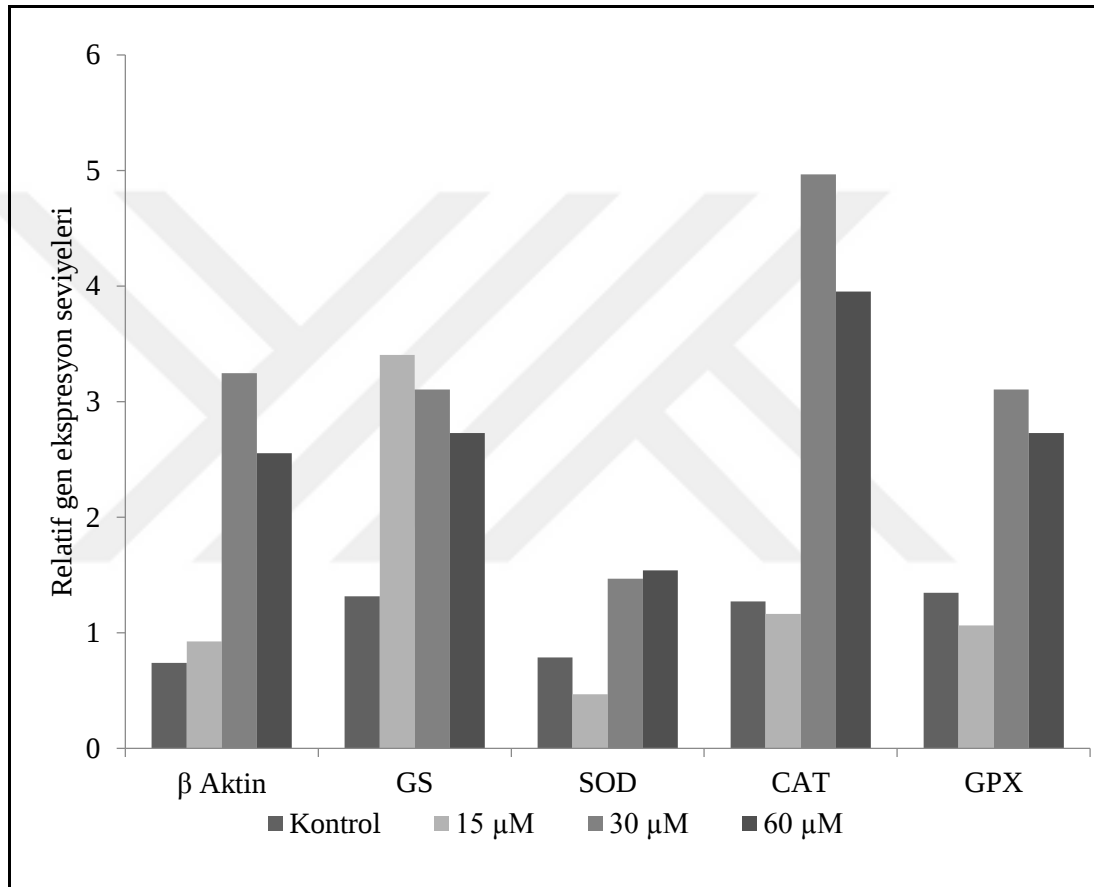
4.8.Ağır Metal Karışımı Uygulamasının Antioksidan Enzimlerin Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisi

Arpa ve buğday bitkileri üzerindeki As, Cd, Pb’a bağlı metal stresi karşısında bitkilerin primer cevaplarından olan antioksidan enzim seviyelerindeki değişimler bu enzimlerin ekspresyon seviyeleri referans gen olarak seçilen β aktin geni seviyeleri temel alınarak incelendi.

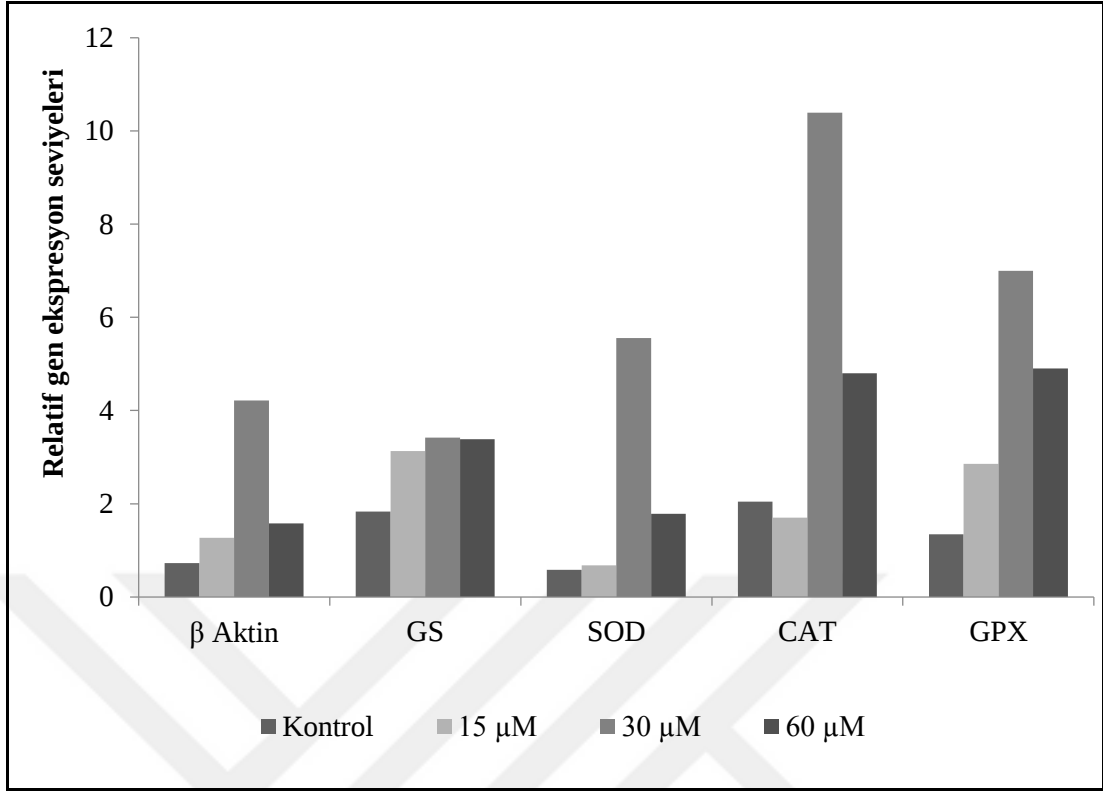
Buğdayda 1. gün’un sonunda referans gen olarak seçilen β Aktin ve GS, SOD, CAT, GPX antioksidan enzimlerinin gen ekspresyon seviyeleri kontrol gruplarının 15 μ M 30 μ M ve 60 μ M metal iyonu uygulanan gruplar ile karşılaştırılmasında β Aktinin gen ekspresyonu metal iyonu uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre artmıştır. GS enziminin gen ekspresyonu kontrol grubuna göre artış göstermiştir. SOD enziminin gen ifadesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 15 μ M doz uygulamasında azalırken diğer iki

dozda artma tespit edilmiştir. CAT ve GPX enzimlerinin gen ekspresyonu 15 μ M dozda azalmış, diğer iki dozda artma göstermiştir.

5. gün sonunda buğdayda referans geni β Aktin GS ve SOD enzimlerinin kontrol grubuna göre gen ifadeleri artış gösterirken CAT enziminin gen ifadesinde, 15 μ M dozda azalma, diğer iki metal iyonu uygulamasında artma izlenmiştir. GPX enziminin gen ekspresyonu tüm dozlarda kontrol grubuna göre artma göstermiştir.



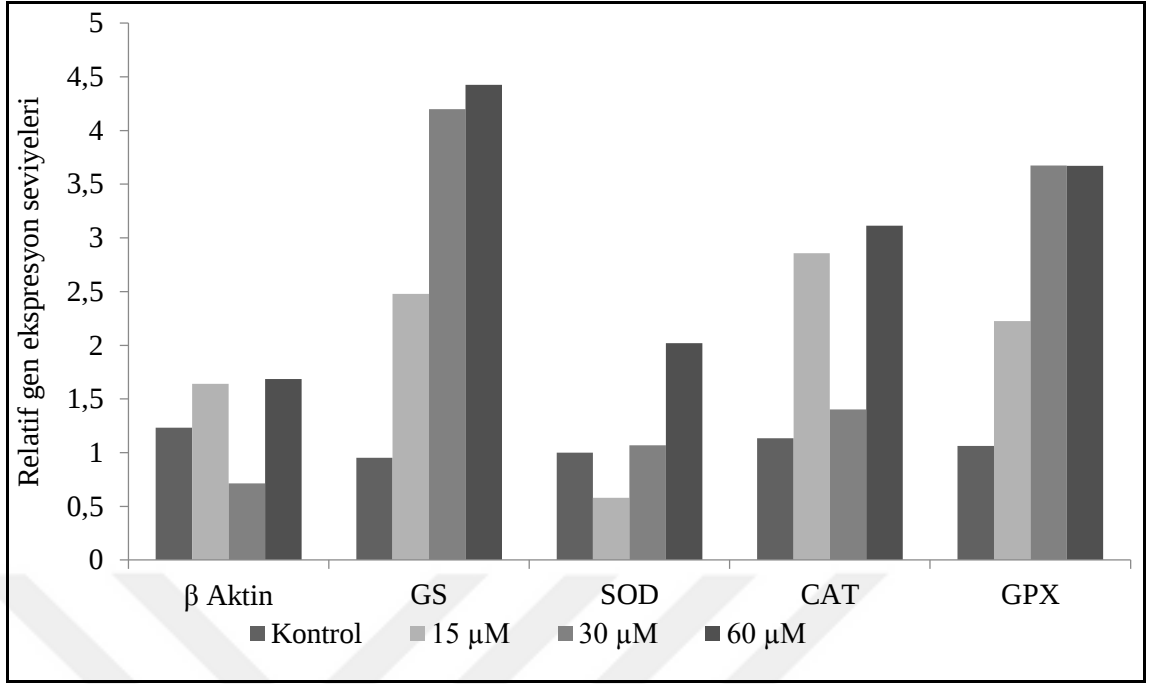
Şekil 4.22: Ağır metal karışımı uygulanan buğday’da 1.gün sonunda antioksidan enzimlerin gen ekspresyon seviyeleri



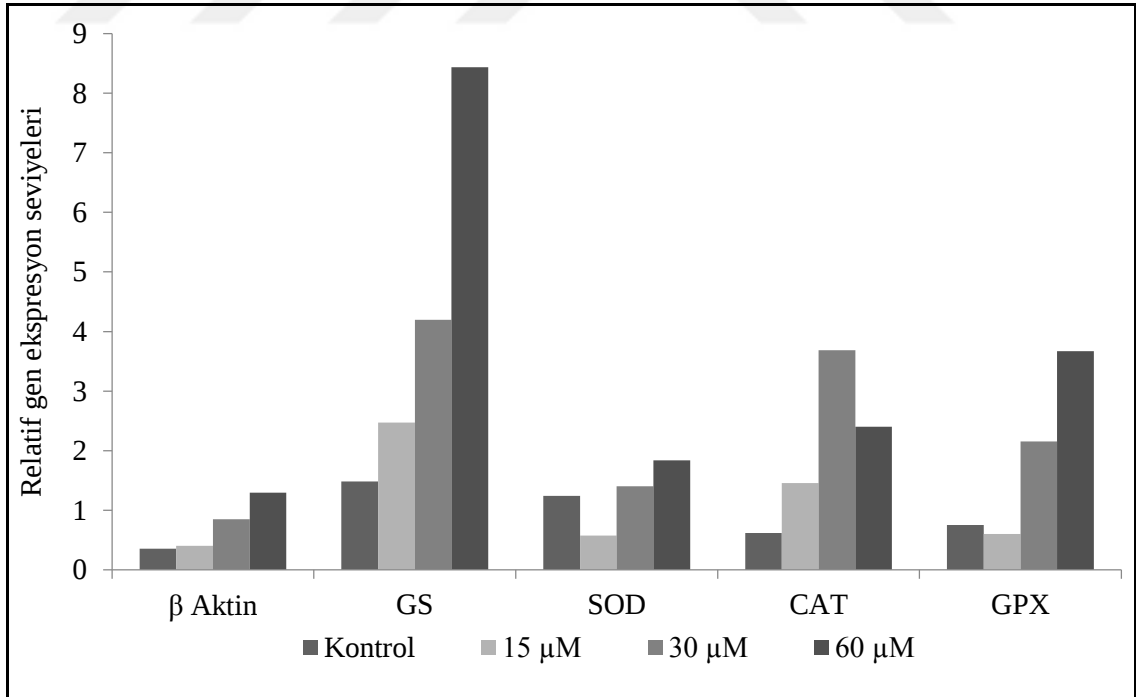
Şekil 4.23: Ağır metal karışımı uygulanan buğday'da 5.gün sonunda antioksidan enzimlerin gen ekspresyon seviyeleri

Arpa bitkisinde 1. gün sonunda referans geni β Aktinin gen ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre 30 μ M doz uygulamasında azalma gösterirken, diğer iki dozda artmıştır. GS enziminin gen ifadesi tüm deney gruplarındaki kontrol grubuna göre artma gösterirken, SOD enziminin gen ifadesi 15 μ M dozda azalma, diğer iki dozda artma göstermiştir. CAT ve GPX enzimlerinin gen ekspresyonları kontrol grubuna göre artmıştır.

5. gün de referans geni β Aktin ve GS enziminin gen ifadesi kontrol grubuna göre artış gösterirken SOD enziminde 15 μ M dozda azalma diğer iki dozda artma tespit edildi. CAT enziminin gen ekspresyonu tüm deney gruplarında artarken GPX enziminin gen ekspresyon seviyeleri 15 μ M dozda azalmış, 30 ve 60 μ M lık dozlarda artma göstermiştir.



Şekil 4.24: Ağır metal karışımı uygulanan arpa'da 1.gün sonunda antioksidan enzimlerin gen ekspresyon seviyeleri



Şekil 4.25: Ağır metal karışımı uygulanan arpa'da 5.gün sonunda antioksidan enzimlerin gen ekspresyon seviyeleri

BÖLÜM 5

TARTIŞMA SONUÇ

Doğa kirlenmesinin önemli sorumlularından biri olan ağır metaller bitkileri makroskobik, mikroskobik ve fizyolojik olarak etkilemektedir. Ayrıca ağır metallerden bitkilerin vejetatif organlarının yanısıra generatif organlarında etkilemektedir. Bitkiler insanoğlunun temel gıdalarından birisi olduğundan ağır metallerin gıdalara bulaşma riski mevcuttur. Gıdalarda su ve benzeri içecek türlerinde besin desteklerinde toksik maddelerin ve ağır metallerin bulunması istenmemektedir. Yapılan araştırmalar bunun mümkün olmadığını göstermiştir. Ağır metaller birçok kaynaktan gıdalarımıza dahil olabilmekte ve bu durum insan sağlığını olumsuz yönde etmektedir. Ağır metallerin insanların besin maddelerine bulaşabilir olması bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir.

Tarımda verimi arttırmak üzere gübre ve arıtma çamurları kullanılmaktadır. Ancak bu sebeple aşırı fosfatlı gübre kullanımı ve arıtma çamurlarının ağır metal içerikleri sebebi ile tüm dünya da tarım toprakları az ya da orta düzeyde Cd kirliliğine maruz kalmaktadır. Cd diğer ağır metallere kıyasla daha mobil olduğundan topraktan bitkiye geçiş daha fazladır ve bu yolla besin zincirine dahil olmaktadır. İnsan ve hayvanların sağlığı ve çevre içinde önemli bir tehdittir. İnsan vücuduna alınan Cd 'un % 42'si tahıllarla olmaktadır (Ysart ve Möler, 2000). Türkiye'de gıda tüketimi çoğunlukla tahıla dayalıdır. Ancak tahıl üretiminde gıda güvenliği açısından bir takım önlemlerin alınması gerekmektedir. Türkiye'de bilhassa Cd ile ilgili yapılan bilimsel çalışmalar az olmasına rağmen bu çalışmalarda Cd ile kirlenmiş toprakların yönetilebilmesi için birçok strateji önerilmektedir. Bunlardan birisi düşük düzeyde Cd içeren tarım alanlarında Cd akümülayonu düşük olan bitkiler yetiştirmektir. Tarım alanlarında Cd'u akümüle eden bitki çeşitlerini belirlemek için ise bilimsel çalışmalara ihtiyaç vardır.

Ülkemizde son yıllarda kurşunlu benzin üretiminin durdurulması sevindirici olmasına rağmen, endüstriyel atıkların kontrol altına alınması yönündeki çalışmalar yeterli görülmemektedir. En kısa zamanda toprak ve sularımızın ağır metal tehdidi altından kurtarılması için gerekli yasa ve kanunların bir an önce çıkarılması büyük önem taşımaktadır.

Dünyada hızla artan nüfusun su ihtiyacını karşılamak için olan talepler, yüzey ve yeraltı suyu kaynakları üzerinde ciddi şekilde baskı oluşturmaktadır. Ülkemizde ve diğer birçok ülkede insanlar arsenikle kirlenmiş yeraltı sularını kullanmaktadır. Bu nedenle, içme ve yeraltı sularında arsenik bulunması tüm dünyada önemli bir sorun olarak hem çevre hemde insan sağlığını ciddi bir şekilde tehdit etmeye devam etmektedir.

Ülkemizde insan beslenmesinde doğrudan veya dolaylı olarak kullanılan buğday ve özellikle hayvan yemi ve maltlık olarak yetiştirilen arpa bitkileri ağır metallere maruz kalmaktadır. Bu durum iki bitkinin ürün verim ve kalitesini etkilemektedir. Tohum çimlenme aşaması bazı savunma mekanizmaları henüz gelişmediğinden metal kirliliğine daha duyarlıdır. Bu nedenle toksisite değerlendirmeleri yapılırken bu aşamanın incelenmesi önemlidir (Liu, vd., 2005).

Tüm bu veriler dikkate alındığında ülkemizde de yaygın ve bilinçsiz olarak herbisit ve pestisit kullanımı mevcut olduğundan ve sulama sularına karışan sanayi atıklarında As, Cd, Pb bileşikleri içerebileceği göz önüne alınarak, bitkiler üzerindeki As, Pb ve Cd toksisitesi karşısında bitkilerin primer cevaplarından olan antioksidan enzim seviyelerindeki değişimler olabileceği dikkate alınarak bu enzimlerin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Örnek bitki olarak Trakya bölgesinde Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından 2014 yılında tescillenen bir ekmeklik buğday çeşidi olan Saban, ve bir arpa çeşidi olan Hasat çeşitleri seçilmiştir. Tez kapsamında ayrıca bitki büyümesini etkileyen bazı hormonların seviyelerindeki değişimler araştırılmıştır.

Çalışmamızda buğday ve arpa tohumlarına uygulanan 15 μ M 30 μ M ve 60 μ M (As, Pb, Cd) metal karışımı konsantrasyon artışına bağlı olarak tohumlarda çimlenme oranında azalmaya neden olmuştur. Benzer şekilde Shri, vd., (2009) 0, 1, 2, 4, 8 mg As/L arsenik dozu uygulayarak buğday tohumlarında yaptığı çalışmada arsenik konsantrasyonunun artmasıyla kontrol grupları ile karşılaştırıldığında çalışma kapsamında değerlendirilen türlerde çimlenme yüzdesinin anlamlı derece azaldığını gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada ağır metallerden kurşunun (PbCl₂) mercimek (*Lens*

culinaris) tohumlarının çimlenmelerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışmada düşük kurşun konsantrasyonlarının çimlenmede etkili olmadığı fakat yüksek konsantrasyonların çimlenmeyi engellediği tespit edilmiştir (Azmat, vd., 2006). Bulunan sonuçlar çalışmamız ile benzerlik göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada kök ve gövde uzunlukları açısından değerlendirilen örnekler kontrol grubuna ile karşılaştırıldığında yalnızca uygulanan 60 μ M doz da arpa kök ve gövde uzunluklarının kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gösterdiği tespit edildi ($p<0.05$). 5. günde arpa bitkisinde uygulanan 15 μ M ve 30 μ M dozda arpa kök ve gövde uzunluklarının kontrol grubuna göre arttığı 60 μ M dozda kök gövde uzunluklarının azalma gösterdiği fakat bu azalmanın ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı sadece gövde uzunluğunun 15 μ M dozda anlamlı bir artma gösterdiği tespit edildi ($p<0.05$).

Buğday kök gövde uzunlukları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1.günde yalnızca 60 μ M metal uygulamasında anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0.05$). Gövde uzunluğunda, arpa bitkisinde olduğu gibi 15 μ M dozda anlamlı bir artma tespit edilmiştir ($p<0.05$). 5.Günde buğday kök ve gövde uzunluklarında 30 μ M ve 60 μ M dozda anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0.05$).

Gonzales ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan çalışmada ağır metal karışımlarının buğday ve arpa bitkilerinde kök gövde uzunluklarını ve biyomasi önemli ölçüde düşürdüğü bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada *Pinus pinea* ve *P. pinaster* fidelerinde kadmiyumun kök uzunluğunu engellediği bildirilmiştir (Arduini, vd., 1994). Kurşun bitkideki toksik etkisi, kök büyüme ve gelişmesinin kısıtlanması, cüceleşme ve klorozdur (Burton, vd., 1984). Çalışmamızda yaptığımız gözlemlere göre, konsantrasyon artışına bağlı olarak bitkilerin yapraklarında ve köklerinde lokal kahverengileşmeler ve kloroz olduğu görüldü. Lombardi ve Sebastiani (2005) tarafından yapılan diğer bir çalışmada belirli derişimlerdeki Cu metalinin yapraklarda senesense ve nekrotik lekelenmeler meydana getirdiği saptanmıştır.

Çalışmamızda, buğday ve arpa tohumlarına uygulanan 15 μ M 30 μ M ve 60 μ M (As,Pb, Cd) metal karışımları konsantrasyon artışına bağlı olarak, tohumlarda çimlenme oranında azalmaya sebep olmuş, ayrıca çalışmamızda ağır metallerin toksititesi ile ilgili en belirgin morfolojik etki köklerde gözlenmiştir.Doz artışına bağlı olarak buğday ve arpa bitkilerinin köklerinin normal bitki köklerine kıyasla daha kısa olduğu yan köklerde azalmalar ile kendini gösterdiği izlenmiştir Metal alımı devam ettikçe 5.günün sonunda

kök ve gövde gelişiminde önemli gerilemeler gözlenmiştir. Kök ve gövde uzamasında meydana gelen yavaşlama sonucunda taze ve kuru kök ve gövde ağırlıklarda da azalmalar görülmüştür Maden kazı alanlarındaki önemli toksikantlarından biri olan Çinko ve arsenat karışımlarının arpa bitkisinde kök uzamasını inhibe ettiği bildirilmiştir (Guzman-Rangel, vd., 2017).

Yaptığımız çalışmada 1.gün buğday kök taze ve kuru ağırlıkları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında taze ağırlığında yalnızca 15 μ M dozda arttığı diğer iki dozda azaldığı görüldü, kuru ağırlıklarında ise bütün dozlarda azalma tespit edildi. 5.gün buğday kök taze ve kuru ağırlıklarında aynı şekilde bütün metal uygulamalarında azalma tespit edildi.

Buğday 1.gün gövde taze ve kuru ağırlıklarında 15 μ M ve 60 μ M dozda azalma 30 μ M dozda artma, kuru ağırlıklarında ise bütün gruplarda azalma 5. gün gövde taze ve kuru ağırlıklarında da aynı şekilde azalma tespit edildi.

1.gün arpa kök taze ve kuru ağırlıklarında 15 μ M metal uygulamasında azalma diğer 30 μ M ve 60 μ M metal uygulamalarında artma gözlenmiştir. 5.günde ise kök taze ağırlığında 15 μ M ve 30 μ M dozda artma, 60 μ M dozda azalma görülmüş kuru ağırlığında da aynı şekilde 15 μ M ve 30 μ M dozda artma tespit edildi fakat 60 μ M dozda bir değişiklik gözlenmemiştir.

1.gün arpa gövde taze ve kuru ağırlıklarında 15 μ M metal grubunda azalma, 30 μ M ve 60 μ M metal gruplarında artma görüldü, 5. günde ise gövde taze ağırlığında 15 μ M ve 30 μ M dozda artma, 60 μ M dozda azalma, kuru ağırlıklarında ise 15 μ M dozda bir değişiklik olmazken 30 μ M dozda artma, 60 μ M dozda ise azalma tespit edildi.

Yapılan bir çalışmada Fargašová (2001), Pb stresine maruz kalmış bitkilerde kök taze ağırlıklarında azalma olduğu. Jiang ve Liu (2000) sarımsak bitkisinde kurşunun kökte biriktiği ve kökün kuru ağırlık miktarlarında ise azalmalara neden olduğu bildirilmiştir. Yapılan bir çok çalışmada Cd ve Pb'nin yüksek seviyeleri bitkilerde, tohum çimlenmesinde, kök ve gövde uzunlullarında ayrıca kök gövde ağırlıklarında azalma (Lagriffoul vd.,1998, Mishra ve Choudhari, 1998, Obroucheva vd., 1998, Çatak vd.,2000, Munzuroğlu ve Geçkil, 2002, Verma ve Dubey, 2003, Dunbar vd., 2003, Kıran ve Munzuroğlu, 2004, Kıran ve Şahin, 2005, Peng vd., 2005) gibi olumsuzluklara neden olduğu bildirilmiştir. Kök kuru ağırlığında ortaya çıkan azalmaya örnek olarak, Uysal, (2007) tarafından da buğday da alüminyum toksitesi ile ilgili çalışmada gösterilebilir.

Kök ve gövdedeki protein miktarları değerlendirildiğinde 1.gün arpa kök ve gövdedeki protein miktarı 15 µM metal iyonu uygulanan grupta azalma gösterirken ($p<0,05$) 60 µM dozda anlamlı bir artış gösterdi($p<0,05$). 30 µM dozdaki değişikliğin istatistik olarak anlamlı olmadığı görüldü. Gövdede ise 30 µM ve 60 µM metal gruplarında anlamlı artma gözlenirken ($p<0,05$); 15 µM dozda anlamlı bir değişiklik olmamıştır. 5.gün arpa köklerinde protein içeriği 15 µM dozda değişmezken 30 µM dozda azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$); 60 µM doz uygulanan grubun protein içeriği kontrol grubuna göre artma gösterdi ($p<0,05$). Gövdede ise tüm metal uygulanan grupların protein içeriği azalmıştır ($p<0,05$).

Buğday bitkisinin protein miktarı değerlendirildiğinde 1.gün buğday köklerinde her üç dozda da artış gözlendi fakat bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Gövdede 15 µM ve 30 µM dozlarda anlamlı bir değişiklik gözlenmezken 60 µM dozda artma tespit edildi ($p<0,05$). 5.günde buğday kökünde 15 µM ve 60 µM metal uygulamalarında protein miktarında anlamlı bir değişiklik olmazken 30 µM dozda azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$). Gövdede 15 µM ve 30 µM dozlarda kontrol grubuna göre azalma tespit edilirken ($p<0,05$); 60 µM uygulamada anlamlı bir değişiklik gözlenmedi.

Arpa kültürleri üzerine boron toksisitesinin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 5 gün 5 ve 10 µM boron uygulamasının kök ve gövdede protein içeriklerinde anlamlı bir değişikliğe sebep olmadığı bildirilmiştir (Karabal, 2003). Bir diğer çalışmada Sanal vd., (2014) arpa tohumuyla yaptığı çalışmada arsenik doz uygulamasında 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 mM sodyum arsenat ve sodyum arsenit uygulamalarında köklerde total protein miktarının düştüğü gözlemlenmiştir. Çalışmamızda da görüldüğü gibi, metal iyonları karışımı total protein içeriklerinde değişikliklere sebep olarak biyokimyasal olarak bitkiyi etkilemektedir.

Çalışmamızda As, Pb ve Cd'un buğday ve arpada kök ve gövdede MDA içeriği üzerine etkisine baktığımızda; 1.gün sonunda arpa köklerinde metal iyonu uygulanan bütün gruplarda MDA seviyelerinde anlamlı bir artış gözlendi ($p<0,05$). Gövdede 15 µM dozda anlamlı bir değişiklik olmazken 30 µM ve 60 µM dozlarda artma tespit edildi ($p<0,05$). 5.gün arpa kök ve gövde örneklerinde her ikisinde de MDA seviyeleri her dozda artış göstermiştir ($p<0,05$).

1.gün buğday kök ve gövdelerinde de aynı şekilde bütün gruplarda kontrol grubuna göre MDA seviyelerinde artış tespit edildi ($p<0,05$). 5.gün buğday kökünde 15

μM dozda önemli bir değişiklik olmazken 30 μM ve 60 μM dozlarda ve gövdede bütün gruplarda artış tespit edildi ($p<0,05$).

MDA miktarının ölçülmesi lipid peroksidasyon seviyelerinin saptanmasında kullanılan bir stres indikatörüdür (Taulavuori, vd., 2001). Chaoui vd., (1997) Zn stresi, Dey vd., (2007), Cd ve Cu stresi altında MDA seviyesinin artabileceğini bildirmişlerdir. Benzer bir çalışma Çakır (2007) selenyum toksitesi altında farklı iki arpa türünde yaptığı çalışmada selenyum dozunun artmasıyla MDA miktarının arttığını belirtmiştir. Panda, vd, (2003) buğdayda farklı Cr konsantrasyonlarının (1, 10 ve 100 mM) lipid peroksidasyonunu başlattığı ve malondialdehit miktarının konsantrasyon ve sürenin artmasına bağlı olarak arttığını bildirmiştir. As, Pb ve Cd karışımı bitkilerde oksidatif stres meydana getirmiştir. Bunun en önemli kanıtıda lipid peroksidasyonunun meydana gelmiş olmasıdır. Çalışmamızda da görüldüğü gibi konsantrasyon artışına bağlı olarak MDA miktarının arttığı tespit edilmiştir.

Yaptığımız çalışmada buğday ve arpa bitkisinde ağır metal birikimine baktığımızda 1. ve 5. gün arpada metal iyonu uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre ağır metallerin konsantrasyon artışına bağlı olarak dokularda artarak biriktiği tespit edilmiştir. Buğday bitkisinde de aynı durum gözlenmiştir.

Hint nilüferi *Nelumbo nucifera* 'da krom birikiminin araştırıldığı çalışmada, farklı krom konsantrasyonlarında (50-200 μM) büyütülen bitkinin dokularında benzer sonuçlar gözlenmiştir. En yüksek birikimin ise köklerde olduğu bildirilmiştir (Vajpayee, 1999). Topcuoğlu ve arkadaşları, yaptıkları bir serada; iki yıl süreyle toprağa uygulanan farklı kentsel arıtma çamurlarının, domates bitkisinde bitki besin elementleri ve içeriklerindeki ağır metal seviyesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Artan miktarlarda uygulanan arıtma çamuru ile paralel olarak domates bitkisinin ağır metal (N, P, K, Ca, Mg, Zn, Mn, Cu, Pb, Ni ve Cd) içeriklerinde önemli bir artmanın olduğunu saptamışlardır (Topcuoğlu, vd.,2003).

Süs bitkisi olan su kamışının (*Typha latifolia*), su içinden topladığı ağır metallerin incelendiği çalışmada *T. latifolia* 'nın bütün kök, gövde ve yapraklarında yüksek miktarda Cu, Ni ve Zn biriktirdiği tespit edilmistir (Manios, vd, 2003). Khan, vd., (2009) hardal bitkisi ile yaptıkları bir çalışmada 5 ve 25 μM arsenik uygulamasının doza bağlı olarak 96 saat süre sonunda kök ve gövdede arsenik içeriğini arttırdığını bildirmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada buğday ve arpa bitkisinde konsantrasyon artışına bağlı olarak metal birikiminin arttığı tespit edilmiştir.

Buğday ve arpada hormonlar üzerinde yaptığımız çalışmada aktive edici hormonlardan IAA (indol asetik asit), inhibe edici hormonlardan ise ABA (absisik asit) JA (jasmonik asit) miktarlarındaki değişiklikler değerlendirildi. Ayrıca redukte glutatyon miktarlarındaki değişimler değerlendirildi.

1. ve 5. gün arpada bütün gruplarda JA miktarında azalma tespit edilmiştir. 1 gün buğdayda 15 µM dozda artma diğer iki grupta azalma gözlemlendi. 5.günde ise 15 µM ve 60 µM metal iyonu uygulanan gruplarda azalma 30 µM metal iyonu uygulanan grupta JA miktarında artma tespit edilmiştir.

IAA miktarına baktığımızda 1.gün sonunda arpa bitkisinde azalma gözlenirken 5. günde kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmada 15 µM dozda artma diğer iki dozda azalma tespit edildi. GPX miktarındaki artışla birlikte IAA oksidasyonu artar ve bu nedenle miktarı azalır. 60.µM dozda 1. ve 5. günlerde IAA miktarlarındaki düşüşte bunu desteklemektedir. Buğdayda 1.günün sonunda 15 µM ve 60 µM dozda artma gözlenirken 30 µM dozda kontrol grubuna yakın olduğu gözlenmiştir. 5.günde ise bütün gruplarda artma görüldü.

ABA miktarına baktığımızda 1.gün sonunda arpada ABA miktarlarında artış gözlenirken, 5.günün sonunda 15 µM ve 30 µM dozlarda artış 60 µM dozda bir miktar azalma olmasına rağmen kontrol grubuna göre yüksek olduğu tespit edildi. Buğdayda 1.gün grubunda 30 µM dozda ABA miktarında artış diğer iki dozda düşüş görüldü. 5.gün grubunda ise tüm dozlarda absisik asit seviyesinde azalma tespit edildi. Yapılan bir çalışmada boron etkisi altında havuç (*Daucus carota* L.)'un kök dokularında ABA içeriği artmıştır (Demiray, vd., 2006)

1. gün ve 5. günün sonunda arpa'da redukte glutatyon miktarlarında metal uygulanan gruplarda artma tespit edildi. 60 µM uygulamada 1. günde kontrol grubundan yüksek olmakla birlikte redukte glutatyon seviyeleri düşmüş, 5. gün de kontrole göre daha düşük seviyede olduğu gözlemlendi

Buğday bitkisinde redukte glutatyon seviyeleri 1. gün sonunda kontrol grubuna göre 15 µM ve 60 µM dozlarda artma gözlenirken, 30 µM uygulamada azalma görüldü. 5. gün sonunda ise kontrol grubuna göre bütün gruplarda anlamlı bir şekilde azalma tespit edildi..

Ağır metal uygulamasının antioksidan enzimlerin gen ekspresyon seviyeleri üzerine etkisine baktığımızda arpa da 1 günün sonunda GS enziminin gen ekspresyonu tüm gruplarda kontrol grubuna göre artma gösterirken SOD enziminde 15 µM dozda azalma diğer iki dozda artma gözlemlendi. CAT ve GPX enzimlerinin gen ifadeleri metal iyonu uygulanan tüm gruplarda artmıştır. Arpada 5.günün sonunda GS ve CAT enzimlerinin gen ekspresyonları kontrol grubuna göre artma gösterirken SOD ve GPX enzimlerinde 15 µM dozda azalma, diğer iki dozda artma gözlemlendi.

Buğdayda 1. günün sonunda GS enziminin gen ekspresyonu tüm gruplarda artış gösterirken SOD enziminin gen ifadesi 15 µM dozda azalırken diğer iki grupta artmıştır. CAT ve GPX enzimlerinde ise gen ekspresyonu 15 µM dozda azalma 30 µM ve 60 µM dozlarda artma gösterdi. 5.günün sonunda buğdayda GS, SOD, GPX enzimlerinin gen ekspresyonları kontrol grubuna göre artış gösterirken CAT enziminin gen ekspresyonu 15 µM dozda azalma diğer iki dozda artma gösterdi. Çalışmamızda SOD, GS, GPX ve CAT enzimlerinin gen ekspresyon seviyeleri 15 µM'lık dozda düşüş göstermekle birlikte, zamana ve doza bağlı olarak savunma sisteminin aktive olduğunu gösterir şekilde artmıştır. Benzer şekilde *Morus alba* L. (dut), *Cicer arietinum* L. (nohut) ve *L. esculentum* (domates) gibi bitkilerde stres koşulları altında yapılan çalışmalarda SOD aktivitesinde artma meydana geldiği gözlemlenmiştir.(Harinasut, 2003; Attia, 2009)

SOD enzimi kodlayan genlerin PCR tekniği ile ifade seviyelerinin araştırıldığı çalışmalarda çeşitli stres koşulları altında ve bitki türlerine bağlı olarak gen ifadesinde değişiklik meydana geldiği bu değişikliklerin ise stres savunmasında rolü olduğu gösterilmiştir (Aydın vd.,2012; Arvind, 2003). Benzer şekilde *L. esculentum* (domates), *Hordeum vulgare* (arpa), *Corylus maxima* Mill. (findık), *Pinus nigra* J.F.Arnold (çam) gibi birçok bitkide katalaz enzimini kodlayan genlerin strese bağlı olarak ifade düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Arvind, 2003; Matsumura, 2002; Millar, 2003).

Sonuç olarak ağır metal uygulamasının arpa ve buğday bitkilerinde bitkinin en savunmasız olduğu çimlenme döneminde bitki gelişimini olumsuz etkilediği belirlenmiştir.

Günümüzde hızla endüstrileşen toplumlarda, endüstriyel ve kentsel atıklar, bilinçsiz tarım ilaçları ve gübre kullanımı toksik etkiye sahip olabilen ağır metallerin toprak ve sulardaki seviyelerini sınır değerlerin üzerine çıkarmaktadır. Literatürde birçok

Çalışmada ağır metale maruz kalan pek çok bitkide oksidan stresin primer cevabı olan antioksidan enzimlerin aktiviterinde değişiklikler bildirilmiştir.

Yaptığımız çalışmada antioksidan savunmada ne çıkan bazı enzimlerin gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler literatürdeki aktivite değişimleri ile ilgili verilerle de uyumlu olduğundan bu enzimlerin ifade seviyelerinin tespiti bitkilerin çimlenme periyodunda ağır metale maruz kaldığındaki savunma mekanizmalarının seyri konusunda araştırıcılara önemli bilgiler sunmuştur.



KAYNAKLAR

- Akgül, H., (2008). Büyüme ve Gelişim Düzenleyiciler Eğirdir Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Yayını, Yayın No:12
- Akkuş, İ., (1995) Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: Mimoza Yayınları.
- Akyüz, E., (2007). *Polygonum bistorta* ssp. Carneum Bitki Ekstraktlarının Kromotografik Yöntemlerle Kimyasal Bileşiminin Belirlenmesi ve Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktiviteleri, Yüksek Lisans Tezi, TRABZON.
- Alscher, R. G., Erturk, N., Heath, L. S., 2002, Role of superoxide dismutases in controlling oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany, (53), 1331-1341.
- Altınışik, M., (2000). Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar, <http://www.mustafaaltinisik.org.uk/21-adsem-01s.pdf>
- Anderson, M.E., (1998). Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. Chemico-Biological Interactions; 111-112: 1-14.
- Anonim, (2003). Ülkesel Serin İklim Tahılları Araştırma Projesi. 2003 Yılı Araştırma Projeleri Raporu, Edirne
- Antunes, F., Han, D., Cadenas, E., (2002). Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. Free Radic Biol Med.;33,1260-7.
- Aravind, P., Prasad, M.N.V., (2005).: "Cadmium-Zinc Interactions in A Hydroponic System
- Arduini, I. Godbold, D.L. Onnis, A. P (1994), Physiol. Plant 92, 675-680.
- Armstrong, DA. (1998).Methods in molecular biology. New Jersey: Toronto Humana Pres;.
- Armutlu, F.C., (2013).Karaman'da yetiştirilen buğdaylarda bazı metal derişimlerinin voltametrik metotlarla tayini. Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. 82 s.
- Arvind, P., Prasad, M.N.V. (2003) Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L: A free-floating freshwater macrophyte. Plant Physiol Biochem, 41: 391-7.

- Atafar, Z., Mesdaghinia, A., Nouri, J., Homaei, M., Yunesian, M., Ahmadimoghaddam M., (2010). Effect of fertilizer application on soil heavy metal concentration. *Environmental Monitoring and Assessment*. 60(1-4):83-89.
- Attia, H., Karray, N., Lachaa, M. (2009) Light interacts with salt stress in regulating superoxide dismutase gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Sci*, 177: 161–7.
- Aydın, S., et al., (2012) Characterization of stress induced by copper and zinc on cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by means of molecular and population parameters. *Mutat Res*, 746(1): p. 49-55,
- Azmat, R. Haider, S., Askari, S. (2006). Effect of Pb on germination, growth, morphology and histomorphology of *Phaseolus mungo* and *Lens culinaris*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 9: 979-984.
- Balasundram, N., Sundram, K., Saman, S., (2006). Phenolic compounds in plants agri industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191- 203.
- Başer, H.C., (2002). Fonksiyonel gıdalar ve nutrasetikler. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir.
- Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M.L. (2005). Cadmium toxicity in plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17 (1): 21-34.
- Bertin, G., Averbeck, D. (2006). Cadmium; cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*, 88: 1549-1559.
- Blaylock, M.J. ve Huang, J.W., (2000). Phytoextraction of Metals. In: Raskin, I. and Ensley, B.D. (eds.), *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean-up the Environment*. Wiley, New York, pp. 53-70.
- Bočová, B. Huttová, J., Liptáková, L., Mistrík, I. Ollé M. ve Tamás L. (2012). Impact of short-term cadmium treatment on catalase and ascorbate peroxidase activities in barley root tips *Biologia Plantarum* 56 (4): 724-728,
- Bremner, I., (1974). Heavy metal toxicities quart. *Journal Biophysical*, 7: 74-124.
- Breusegem, F.V., Vranova, E., Dat, J.F. ve Inze, D., (2001). The role of active oxygen
- Burton, K.W., Morgan, E., Roig, A. (1984) The influence of heavy metals on the growth of sitka-spruce in South Wales forests. II green house experiments. *Plant Soil* 78, 271-282.

- Büyük, İ., Soydam, A.S., Aras, S., (2012). Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar Derleme/Review Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergi Turk Hij Den Biyol Derg: 69(2): 97 – 110
- Büyükgüzel, E., (2013). Biochemical and molecular mechanisms of protein oxidation (in Turkish with English abstract). Karaelmas Science and Engineering Journal, 3(1): 40-51.
- Castillo-Michel, H., Parsons, J.G, Peralta-Videa, J.R., Martinez- Martinez A., Dokken K.M., Gardea-Torresdey J.L. (2007). Use of X-Ray absorbsiyon spectroscopy and biochemical tecniques to characterize arsenic uptake and reduction in pea (*Pisum sativum*) plants. Plant physiology and Biochemistry.1-7,
- Chai, Y.C., Ashraf, S.S., Rokutan, K., Johnston, Jr. R.B., Thomas, J.A., (1994). S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. Archives Biyochemistry Biophysics, 310: 273– 281.
- Chakraborti, D., Rahman, M.M., Das, B., Murrill, M., Dey, S., Chandra Mukherjee, S., et al., (2010). Status of groundwater arsenic contamination in Bangladesh: a 14-year study report, Water research, 44(19):5789-802.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H., El Ferjani, E. (1997). Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Science, 127(2):139–147.
- Chen, J.G, Ullah, H., Young, J.C., Sussmann, M.R., Jones, A.M. (2001) ABP1 is required for organized cell elongation and division in Arabidopsis embryogenesis. Genes & Development 15, 902–911
- Cheville, N.F. (1983). Celi pathology. The Iowa State University, Ames, Iowa, USA.
- Christian, M., Hannah, W.B, Luthen ,H., Jones, A.M., (2008) Identification of auxins by a chemical genomics approach, Journal of Experimental Botany, 59 (10), 2757–2767
- Christian, M., Steffens, B., Schenck, D., Burmester, S., Bottger, M., Luthen, H. (2006). How does auxin enhance cell elongation? Role of auxin-binding proteins and potassium channels in growth control. Plant Biology 8, 346–352

- Chun-Nu G., Yong-G.Z., Yi-Ping T., Sally E. S., Smith, F.A. (2006). Arsenate (As) uptake by and distribution in two cultivars of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) Chemosphere 62 :608-615..
- Cnubben N.H.P, Rietjens I.M.C.M, Wortelboer H, Zanden J., Bladeren P.J. (2001). The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. Environmental Toxicology and Pharmacology.; 10:141-152.
- Conor, R., (2006). Pollutants in Food? Metals and Metalloids-Mineral Components in Foods, In Chemical & Functional Properties of Food Components, pp. 363-88, CRC Press
- Çakır. (2007) S. Selenyum Toksisitesinin İki Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Çeşitinde (TARM 92, BÜLBÜL 89) Antioksidan Enzim Aktivitesine Etkisi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Çatak, E., Çolak, G., Tokur, S., (2000). Bazı Domates ve Tütün Genotiplerinde Kadmiyum Etkilerinin ıceleyen istatistiksel Bir Çalışma, BAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 2(1), 13-41.
- Çavdar, C., A. Sifil, A.T., (1997). Çamsarı, Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi, 3-4, 92.
- Çepel, N., (1997). Toprak Kirliliği Erozyon ve Çevreye Verdiği Zararlar. TEMA Türkiye Erozyonla Mücadele, Ağaçlandırma ve Doğal Varlıkları Koruma Vakfı Yayınları No:14 İstanbul.
- Çimen, İ., (1988). Meyvecilikte Büyümeyi Düzenleyicilerin Kullanımı, Derim, 5(3), 134-142, Antalya.
- Dalcorso, G., Farinati, S., ve Furini, A., (2010). Regulatory networks of cadmium stress in plants Plant Signal Behav 5(6): 663–667.
- Davies, P.J., (2004) Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action. Kluwer Academic.
- Demiral, T., (2003). Genç Prinç Fidelerine Dışarıdan Glisinbetain Uygulamasıyla, Tuza toleransının Arttırılmasında Antioksidant Enzim Aktivitelerinin Rolünün Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir,73s.

- Demiray H, Dereboyulu A.E (2006) The effects of excess boron with niacin on *Daucus corata* L. (carrot) root callus. *Acta Biologica Hungarica* 57(1): 105-114. doi:10.1556/ABiol.57.2006.1.10
- Demirci, M., (2007). Beslenme. Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Tekirdağ
- Dey, S.K. Dey, J. Patra, S. ve Pothal, D. (2007). Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 19(1):53-60.
- Dhar, R.K., Biswas, B. Kr., Samanta, G., Mandal, B. Kr., Chakraborti, D., Roy, S., Jafar, A., Islam, A., (1997). Groundwater arsenic calamity in Bangladesh”, *Current. Sci.*, 73:48–58 ,
- Dixit, V., et al., (2002). Chromium Ions Inactivate Electron Transport and Enhance Superoxide Generation in vivo in Pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) Root Mitochondria, *Plant Cell Environ.*, 25, 687-690,.
- Dousova, B., Machovic, V., Kolousek, D., Kovanda, F., Dornicak, V. (2003). Sorption of As(V) Species from aqueous systems. water, air, and Soil Poll. 149
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.C., Babut, M., Vaseural, P., (1997). Antioxidant Enzymes, Glutathione and Lipid Peroxidation as Relevant Biomarkers of Experimental or Field Exposure in The Gills and The Digestive Gland of The Freshwater Bivalve *Unio Tumidus*. *Aquatic Toxicology*, 39: 93-110.
- Duker, A.A., Carranza, E.J.M., Hale, M. (2005). Arsenic geochemistry and health. *Environmental international*, 31, 631-641.
- Dunbar, K.R. McLaughlin, M.J. ve Reid, R.J. (2003). The uptake and partitioning of cadmium in two cultivars of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Experimental Botany*, 54, 349-354.
- Dündar, Y., Aslan, R. (1999). Oksidan-Antioksidan Denge ve Korunmasında Vitaminlerin Rolü, *Hayvancılık Araştırma Dergisi.*; 9(1-2): 32-39
- Dündar, Y., Aslan, R. (2000). Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar. Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınları. Afyonkarahisar.
- Dürüst, N., Dürüst, Y., Tuğrul, D and Zengin, M., (2004). Heavy Metal Contents of *Pinus radiata* Trees of İzmit (Turkey). *Asian Journal of Chemistry*, Vol. 16, No. 2, 1129-1134.

- Erdin, E., Alten, A., Hagemann, W., Emiralioğlu, A., (2004) Endokrin maddeler ve çevresel etkileri. I. Ulusal Çevre Kongresi.13-15 Ekim. Sivas.
- Escarpa, A. ve Gonzalez, M. C., (2001). An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods, critical reviews in analytical chemistry, 31, (2), 57-139.
- Evans, M.L., (1984), Functions of hormones at the cellular level of organization. In: Pirson A, Zimmermann MH, eds. Encyclopedia of plant physiology, Vol. 10. Berlin: Springer Verlag, 23–79.
- FAO. 2005, Food and Agriculture Organization, Statistical Databases. www.fao.org
- Fargašová, A. (2001). Phytotoxic effects of Cd, Zn, Pb, Cu and Fe on *Sinapis alba* L. seedlings and their accumulation in roots and shoots. *Biologia Plantarum*, 44(3):471-473
- Ferreira, RR., Fornazier, RF., Vitoria, AP., Lea, PJ., Azevedo, RA., 2002, Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. *Journal of Plant Nutrition*, (25), 327-342.
- Forman, H.J., Zhang, H., Rinna, A. (2009). Glutathione: Overview of its protective roles, measurement and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30: 1-12.
- Formicki, G., Stawarz, R., Gren, A., Muchacka, R. (2012).Cadmium, Copper, Lead and Zinc Concentrations in Low Quality Wines and Alcohol Containing Drinks from Italy, Bulgaria and Poland. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*.1 (February Special issue):753-757.
- Fridovich, I. (1986) Biological effect of superoxide radical. *Arch Biochem Biophys*,; 247: 1-11.
- Gadd, G.M. ve Griffiths, A., (1978),. Microorganisms and heavy metal toxicity, *Microbial Ecology*. 4: 303-317 p.
- Gardea-Torresdey, J.L. (2007). Use of X-Ray absorbsiyon spectroscopy and biochemical techniques to characterize arsenic uptake and reduction in pea (*Pisum sativum*) plants. *Plant physiology and Biochemistry*.1-7,
- Garg, N.S., P., (2011). Arsenic toxicity in crop plants: physiological effects and tolerance mechanisms. *Environmental Chemistty Letters*, 9: p. 303-321,
- Geng, C.N., ve ark., (2006). Arsenate (As) uptake by and distribution in two cultivars of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere*, 62(4): p. 608-15,

- Gill, S.S., Khan, N.A., Anjum, N.A., Tuteja, N., (2011) Amelioration of cadmium stress in crop plants by nutrients management: morphological, physiological and biochemical aspects. *Plant Stress* 5 (Special Issue 1): 1-23.
- González, A., Gil-Díaz, M. M., Pinilla, P., & Lobo, M. C. (2017). Impact of Cr and Zn on Growth, Biochemical and Physiological Parameters, and Metal Accumulation by Wheat and Barley Plants. *Water, Air, & Soil Pollution*, 228(11), 419.)
- Goyer, R. A., (1991). Toxic effects of metals. In: Caserett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons (Eds. Amdur M. O., Doull, J., Klaassen, C. D.) Pergamon Press, New York, 1032
- Grunewald, W., Noorden, G.V., Isterdael, G.V., Beeckman, T., Gheysen, G., Mathesius, U., (2009). Manipulation of auxin transport in plant roots during *Rhizobium* symbiosis and nematode parasitism. *The Plant Cell*, Vol. 21: 2553–2562.
- Gustafson, N. (1985). Wheat Foods in The American Diet. *Cereal Foods World*. 30 (12): 831-835.
- Guzmán-Rangel, G., Versieren, L., Qiu, H., & Smolders, E. (2017). Additive toxicity of zinc and arsenate on barley (*Hordeum vulgare*) root elongation. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(6), 1556-1562.)
- Güleç, T.E., Sönmezoğlu, Ö.A., Yıldırım A. 2010. Makarnalık buğdaylarda kalite ve kaliteyi etkileyen faktörler, *GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 27/1, 113-120.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd edn. Oxford: Oxford Science Publications. New York, 936s.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1998) *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 188-96.
- Harinasut P, Poonsopa D, Roengmongkol K, Charoensataporn R. (2003) Salinity effects on antioxidant enzymes in mulberry cultivar. *Sci Asia*, 29: 109-13.
http://www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136_4753.pdf.
<http://yadelfin.blogcu.com/bugdayin-anatomisi/13437311> 23.09.2016.
- Huang, Y., Chang, Y., Hsu, J., Chuang, H. (2008) Transcriptome analysis of auxin-regulated genes of *Arabidopsis thaliana*, *Gene*, 420; 118–124 Inc., United States of America, 221-253.
- Järup, L., (2003). Hazards of heavy metal contamination, *British medical bulletin*, 68(1):167-82.

- Jiang, W. ve Liu, D. (2000). Effects of Pb^{+2} on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays* L. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 65(6):786-793.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., (2009). Metallerin Çevresel Etkileri-I, Metalurji, 136.Sayı,
- Karabal, E., Yücel, M., & Öktem, H. A. (2003). Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity. *Plant Science*, 164(6), 925-933.)
- Kaya, S., Pirinççi, İ., Bilgili, A., (1998). Metaller ve diğer inorganik ve radyoetkin maddeler. I. Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. Baskı. Ankara: Medisan Yayınevi134-8.
- Khan, A.A. ve Downing, R.D. (1968). Cytokinin reversal of abscisic acid inhibition of growth and α -amylase synthesis in barley seed, *Physiol. Plant.*, 21, 1301-1307.
- Khan. I., Ahmad, A., Iqbal, M. (2009) “Modulation of antioxidant defence system for arsenic detoxification in Indian mustard “,*Ecotoxicology and Environmental Safety* 72,626-634.
- Kılıç, Y., (2007), Fitohormonların Saplı Mese (*Quercus robur* L.) 1+0 Yaşlı Fidan Morfolojik Karakterleri Üzerine Etkisi Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Y.Lisans Tezi, 74s.
- Kıran, Y. ve Munzuroğlu, Ö. (2004). Mercimek (*Lens culinaris* Medik.) Tohumlarının Çimlenmesi ve Fide Büyümesi Üzerine Kurşunun Etkileri. F.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi 16, 1-9,
- Kıran, Y. ve Şahin, A. (2005). The effects of the lead on the seed germination, root growth, and root tip cell mitotic divisions of *Lens culinaris* Medik. G.U. Journal of Science 18, 17-25.
- Kidd, P.M. (1997). Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alternative Medicine Reviews*; 2: 155-176.
- Komarnicki, G. J. K. (2005). Lead and cadmium in indoor air and the urban environment. *Environ Pollut.*, 136: 47-61.
- Kono, Y., Fridovich, I., (1983). Functional Significance of Manganese Catalase in *Lactobacillus plantarum*, *Journal Bacteriology.*, 155, 742-746,.
- Köksel, H., Demiralp, M., (1994). Glutensiz Ekmek. *Unlu Mamülleri Dünyası*. 3 (5): 20-27.

- Köse, E., (2007). Enne Barajı'nda Yaşayan Balıklarda Ağır Metal Birikiminin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, 70s.,
- Kumaresan, M., Riyazuddin, P. (2001). Overview of speciation chemistry of arsenic. *Current Science*. 80(7), 837-846.
- Lagriffoul, A. Mocquot, B. Mench, M. ve Vangronsveld, J. (1998). Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). *Plant Soil* 200, 241-250.
- Lamb, C., Dixon, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 251-275.
- Lamhamdi, M., Bakrim, A., Aarab, A., Lafont, R., Sayah, F. (2011). Lead phytotoxicity on wheat (*Triticum aestivum* L.) seed germination and seedlings growth. *Comptes Rendus Biologies*. 334. 118–126.
- Lauwerys, R.P., Bernad, A.M., Buchnet, J.R. ve Raels, H.H., (1993). Assessment of the health
- Liu, X., Zhang, S., Shan, X., Zhu, Yg. (2005). Toxicity of arsenate and arsenite ogermination, seedling growth and amylolytic activity of wheat. *Chemosphere* 61(2):293-301.
- Lin, K.F., Xu, X.Q., Paul A., Xiang, Y.L., Jin X., (2001). Relationship between As contents of farmer' hair and of environment in As polluted area. China. *Environ. Sci.* 21 , 440-444.
- Liszkay, A., et al., (2004).Production of Reactive Oxygen Intermediates (O₂ , H₂O₂, and OH) by Maize Roots and Their Role in Wall Loosening and Elongation Growth, *Plant Physiol.*, 136, 3114-3123,
- Liu, X., Zhao, J., Zheng, R. (2003). DNA damage of tumor-associated lymphocytes and total antioxidant capacity in cancerous patients. *Mutat Res*; 539: 1–8.
- Lombardi, L. ve Sebastiani L. (2005). Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. *Plant Sciences.*, 168, 797-802.
- Lowry, O.H., vd., (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*, 193(1): p. 265-75,

- Luthria, D. L., (2008). Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor, *Food Chemistry*, 107, 745–752.
- Lyons-Alcantara, M., Tarazona J.V. and Mothersill C., (1996). The differential effect of cadmium exposure on the growth and survival of primary and established cells from fish and mammals. *Cell Biol. and Toxicol.*, 12: 29-38.
- Manios, T. Stentiford, E.I. Millner, P.A. (2003). The effect of heavy metals accumulation on the chlorophyll concentration of *Typha latifolia* L. plants, growing in a substrate containing sewage sludge compost and watered with metaliferus water. *Ecological Engineering*, 20(1), pp: 65-74.
- Manta, DS., Angelona, M., Bellanca, A., Neri, R., Sprovieri, M. (2002). Heavy metal in urban soils: a case study from the city of Palermo (Sicily), Italy. *Sci. Total Environ.*, 300: 229- 243.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(10): 577-586.
- Masip, L., Veeravalli, K., Georgiou, G. (2006) The Many Faces of Glutathione in Bacteria. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8 (5-6), 753– 762)
- Matsumura, T. Tabayashi, N. Kamagata, Y. Souma, C. Saruyama, H. (2002) Wheat catalase expressed in transgenic rice can improve tolerance against low temperature stress. *Physiology Plant*, 116(3): 317-37.
- Mercan, U. (2004) Toksikolojide serbest radikallerin önemi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Vet Fak
- Meyer, A., Miersch, O., Buttner, C., Dathe, W., Sembdner, G., (1984). Occurence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants, *Journal Plant Growth Regulator*, 3, 1-8.
- Millar, A.H., Mittova, V., Kiddle, G., Heazlewood, J.L., Bartoli, C.G. (2003) Theodoulou FL, et al. Control of ascorbate synthesis by respiration and its implication for stress responses. *Plant Physiology*, 133: 443-7.
- Miller, FS., Kilminster, K.L., Degens, B., Firms, G.W. 2010. Relationship between metal sleached and soil type from potential acid sulphate soil sunderacidic and neutral conditions in Western Australia. *Water. Air. Soil Poll.*, 205: 133-147.

- Mishra, A. ve Choudhari, M.A. (1998). Amelioration of lead and mercury effects on germination and rice seedling growth by antioxidants. *Biology Plant*. 41, 469-473.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Kumar, R., Seth, C.S., Gupta, D.K., (2006) Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere* 65, 1027-1039.
- Moldovan, L., Moldovan, N.I. (2004) "Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochemistry and Cell Biology*, 122; 395-412.
- Munzuroğlu, O. ve Geckil, H. (2002). Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. *Archives Environmental Contamination and Toxicology*. 43, 203-213.
- Niess, D.H., (1999). Microbial Heavy-Metal Resistance, *App.Microbiol. Biotechnol.*, 51, 730-750,
- Nriagu, J.O., Pacyna, J.M. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*; 333(6169):134-9.
- Nyska, A., Kohen, R. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stres phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.*, 30: 620-650.
- Obroucheva, N.V. Bystrova, E.I. Ivanov, V.B. Anupova, O.V. ve Seregin, I.V. (1998). Root growth responses to lead in young maize seedlings. *Plant Soil* 200, 55-61.
- Omaye, S.T. (2004). Food and nutritional toxicology. New York: CRC Press,.
- Onat, T., Emerk, K.S. Özmen, E. Y., (2002). İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, İstanbul, 674 .
- Özbek, H., Kaya, Z., Gök, M ve Kaptan, H., (1995). Toprak Bilimi. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fak. Genel Yayın No: 73 Ders Kitapları Yayın No:16, Adana.
- Öztürk, L., (2002). Normal şartlarda büyütülen ıspanak (*S. Oleracea* cv. *Gladiator*) bitkisinde etafon ve poliamin uygulamalarının oksidatif enzimler üzerine in vivo ve in vitro etkilerinin incelenmesi. (Doktora Tezi), Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Panda, S.K., Choudhury, S., (2005). Chromium Stress in Plants, *Braz. Journal Plant Physiology.*, 17, 95-102.

- Panda, S.K., Chaudhury, I., Khan, M.H., (2003). Heavy Metals Induce Lipid Peroxidation and Affect Antioxidants in Wheat Leaves, *Biol. Plant.*, 46, 289-294,
- Pastorea, A., Federicia, G., Bertinib, E., Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta.*, 333: 19–39.
- Pena-Ilopis, S., Ferrando, M.D., Pena, J.B., (2003). Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. *Aquatic Toxicology*, 65: 337-360.
- Peng, H. Tian, S. ve Yang, X. (2005). Changes of root morphology and Pb uptake by two species of *Elsholtzia* under Pb toxicity. *Journal of Zhejiang University Science* 6B(6), 546-552.
- Polat, S., 2007. *Triticum* L.'un bazı cesitleri ve *Aegilops* L. Türünde düşük sıcaklıkta bazı antioksidan enzim aktivitelerinin ve fizyolojik parametrelerin araştırılması. (Yuksek Lisans Tezi), Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Potters, G., Pasternak, T. P., Guisez, Y., Jansen, M.A.K. (2009). Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant Cell Environmental* 32: 158–169
- Rajasekaran, R. ve Blake, T.J. (1999). New plant growth regulators protect photosynthesis and enhance growth under drought of jack pine seedlings, *Journal of Plant Growth Regulation*, 18: 175-181.
- Ranjbar, A. Solhi, H. Mashayekhi, F.J. Susanabdi, A. Rezaie, and. Abdollahi, M. (2005). Oxidative stress in acute human poisoning with organophosphorus insecticides; a case control study, *Environmental Toxicology Pharmacology*, (20) ; 88–91.
- Reed, D.J. (2000). Mechanisms of chemically induced cell injury and cellular protection, (E. Hodgson; R.C. Smart, Editörler). *Introduction to biochemical toxicology*. United States of America: Wiley and Sons Inc; s. 221-253.
- Sağlam, N., Cihangir, N., 1995 Ağır Metallerin Biyolojik Süreçlerle Biyosorbsiyonu Çalışmaları, *Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 11, 157-161
- Sanal, F., Seren, G. ve Guner. U. (2014) Effects of arsenate and arsenite on germination and some physiological attributes of barley *Hordeum vulgare* L. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 92(4): p. 483-9.

- Sembdner, G., Parthier, B., (1993). The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates, *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 44, 569-589.
- Serafini, M., Del Rio, D. (2004). Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool. *Redox Report*, 9(3): 145-152.
- Sgherry, C.L.M., Pinzino, C., Navari-Izzo, F. (1996) Sunflower seedlings subjected to increasing water stress by water deficit: changes in O₂-production related to the composition of thylakoid membranes. *Physiology Plant*, 96: 446-52
- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S., (2005). Chromium toxicity in plants, *Environment International*, 31, 739-753,
- Shao, H.B., CHU, L.Y., Jaleel, C.A., Zhao, C.X. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies*, 331(3): 215-225
- Sharma, P. ve Dubey, R.S., (2005). Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal Plant Physiology*, 17(1):35-52.
- Sharma, S.S., Dietz, K.J., (2008). The Relationship Between Metal Toxicity and Cellular Redox Imbalance, *Trends Plant Sci.*, 14, 43-50,
- Sharp, R.E. (2002). Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root growth responses to water stress, *Plant, Cell and Environment* 25: 211-222.
- Sheoran, I.S., Aggarwal, N., Singh, R. (1990). Effects of cadmium and nickel on in vivo carbon dioxide exchange rate of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). *Plant and Soil*. 129. 243-249.
- Shri, M. Vd., (2009) Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotoxicol Environ Saf*, 72(4): p. 1102-10.
- Singh, B.K., Sharma, S.R., Singh, B. (2009). Combining ability for superoxide dismutase, peroxidase and catalase enzymes in cabbage head (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.). *Scientia Horticulturae* 122: 195–199.
- Smirnoff, N. (1993). The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125: 27-58.
- Stadtman, E.R., 2002, Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, 597-604.

- Stahl, W., Sies, H. (2002). Introduction: Reactive oxygen species. Research Monographs, 1-2.
- Sun, L. Z., Guo B., Chu G., Wei C. ve Liang, Y, (2008). Arsenic mitigates cadmium toxicity in rice seedlings. Environmental and Experimental Botany, 64: p. 264-270,
- Swanson, S. ve Gilroy, S. (2010). ROS in Plant Development, Physiologia Plantarum, 138, 384-392.
- Taulavuori, E. Hellström, E.K., Taulavuori, K. ve Laine, K. (2001). Comparison of two methods used to analyse lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillus* L. during snow removal, reclamation and cold acclimation. Journal of Experimental Botany, 52(365):2375-2380.
- Tayfur, M., (2009), Zehirli Ağır Metaller, In Gıda Kaynaklı Enfeksiyonlar ve Zehirlenmeler, s.243-77, 1. Baskı, Kuban Matbaacılık, Ankara.
- Temple, M.D., Perrone, G.G., Dawes, I.W. (2005). Complex cellular responses to reactive oxygen species. Trends Cell Biol., 15: 319-26.
- Ting, Y.P., Lawson, F. ve Prince, L.G. (1991). Uptake of cadmium and zinc by the alga *Chlorella vulgaris*: II Multi-ion stiation, Biotechnol. Bioeng. 37: 445 -455
- Topcuoğlu, B., Önal, M.K., ve Arı, N. (2003) Toprağa Uygulanan Kentsel Arıtma Çamurunun Domates Bitkisine Etkisi I. Bitki Besinleri Ve Ağır Metal İçerikleri, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, Antalya.
- Tsai, F.Y., Lin, C.C. ve Kao, C.H. (1997). A comparative study of the effects of abscisic acid and methyl jasmonate on seedling growth of rice, Plant Growth Regul., 21, 37-42.
- Tsao, R. ve Yang, R., (2003). Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography, Journal of Chromatography A, 1018, 29–40.
- Türkan, İ., (2008). Bitki Fizyolojisi. Palme yayıncılık, Ankara.
- TÜİK, <http://www.tuik.org.tr>, erişim tarihi 02.08.2017
- URL2-<http://www.mustafaaltinisik.org.uk> (2000). 20.05.2017
- Uysal, D.İ. (2007) Buğdayda, Kök Büyümesi ve Antioksidatif Enzim Aktivitesi Üzerinde Alüminyum Stresinin Etkisi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Vajpayee, P. Sharma, S. C. Rai, U. N. Tripathi, R. D. Yunus, M. (1999). Bioaccumulation of chromium and toxicity to photosynthetic pigments nitrate reductase activity and protein content of *Nelumbo nucifera* Gaertn. Chemosphere, 39, 2159-2169.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. International Journal Biochemistry Cell Biology, 39: 44-84.
- Verma, S. ve Dubey, R.S. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Science, 164, 645-655.
- Wang, G., Su, M.Y., Chen, Y.H., Lin, F.F., Luo, D. Ve Gao, S.F. (2006). Transfer characteristics of cadmium and lead from soil to the edible parts of six vegetable species in southeastern. China Environmental Pollution, 144(1), 127-35.
- Wang, Z.G., He, H.Y., Yan, Y.L., Wu, C.Y., Yang, Y., Gao, X.Y., (1999). Arsenic exposure of residents in areas near Shimen arsenic mine. Journal Environmental Health, 16, 4-6.
- Westwood, M.N., (1993). Hormones and Growth Regulators, Temperate Zone Pomology: Physiology and Culture, Timber Press Inc, Portland, Oregon, USA.
- Wong, P.K. ve Kwok, S.C. (1992): Accumulation of nickel ion (Ni^{+2}) by immobilized cells of Enterobacter species, Biotechnology Letters, 14: 629-634 p.
- Wu, D., Cederbaum, A.I. (2003). Alcohol, oxidative stress and free radical damage. Alcohol Research & Health; 27: 277-284.
- Wu, G., Kang, H.B., Zhang, X.Y., Shao, H.B., Chu, L.Y. ve Ruan, C.J. (2010). A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: Issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities. Journal of Hazardous Materials, 174, 1-8.
- Yadav, S.K., (2010). Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. South African Journal of Botany, 76: p. 167–179,
- Yagmur, F., Hanci, Y.H. (2002). Arsenik. Sted; 11(7): 250-251.

- Yeum, K.J., Russell, M.R., Krinsky, I.N., Adlini, G. (2004). Biomarkers of antioxidant capacity in hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. Archives of Biochemistry and Biophysics, 430: 97-103.
- Yıldız, N., Aksu, E., 2005. Erzurum-Daphan Ovası Topraklarının Ağır Metal (Ni, Cd, Cr, Co ve Pb) Durumunun Değerlendirilmesi. GAP IV Tarım Kongresi, Bildiriler. Sanlıurfa.
- Ysart, G. ve Möler, P. (2000). Total Diet Study-Dietary Exposures to Aluminium, Arsenic, Cadmium, Chromium, Copper, Lead, Mercury, Nickel, Selenium, Tin and Zinc. Food Additives and Contaminants. 17 (9), 775-786
- Zengin, F., Munzuroğlu, Ö. (2005). Fasulye fidelerinin (*Phaseolus vulgaris* L.Strike) klorofil ve karotenoid miktarı üzerine bazı ağır metallerin (Ni^{+2} , Co^{+2} , Cr^{+3} , Zn^{+2}) etkileri. F. Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi. 17/1. 164- 172.
- Zengin, F.K., Munzuroğlu, Ö., (2003). Fasulye Fidelerinin (*Phaseolus vulgaris* L.) Kök, Gövde ve Yaprak Büyümesi Üzerine Kadmiyum (Cd^{++}) ve Civa (Hg^{++})'nın Etkileri C.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi Cilt 24 Sayı 1
- Zheljaskov, V.D., Craker, L.E. ve Xing B. (2006). Effects of Cd, Pb, and Cu on growth and essential oil contents in dill, peppermint, and basil. Environmental Experimental Botany, 58, 9-16.
- Zhou, D.X., Liu, Y.F., ve Liu, X.B. (2009). Effects of waterlogging stress on physiological and biochemical index in *Alternant philoxeroides* Hubei. Agricultural Sciences, 48(3):585-587.

ÖZGEÇMİŞ

03 Aralık 1973 yılında Kahramanmaraş'ta doğdum. İlkokul ve Ortaokul Kahramanmaraş'ta Lise öğrenimimi Ankara Kalecik'te tamamladım. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tatvan Meslek Yüksekokulu Genel Laboratuvar bölümünde ön lisans yaptım. 1998 yılında Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne girdim ve 2003 yılında mezun oldum. 2005 yılından bu yana Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde Biyolog olarak çalışmaktayım.