

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ARPA (*HORDEUM VULGARE* L.) BİTKİSİNİN BAZI
ÇEŞİTLERİNDE AĞIR METAL STRESİ ETKİLERİNİN
FİZYOLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Esin GEZER

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Ali DOĞRU

Haziran 2011

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ARPA (*HORDEUM VULGARE* L.) BİTKİSİNİN BAZI
ÇEŞİTLERİNDE AĞIR METAL STRESİ ETKİLERİNİN
FİZYOLOJİK OLARAK ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Esin GEZER

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Bu tez 16 / 06 /2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Arif BARAN

Jüri Başkanı



Yrd. Doç. Dr. Ali DOĞRU

Üye



**Yrd. Doç. Dr. E. Selcen
DARÇIN**

Üye

TEŞEKKÜR

Araştırma konusunun ve uygulama yöntemlerinin belirlenmesinde, deneylerin yürütülmesinde ve sonuçlarının değerlendirilip tartışılmasında, tezin yazılmasında ve anlatım dilinin düzeltilmesinde her türlü yardımlarını gördüğüm tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Ali DOĞRU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tüm çalışmam boyunca her zaman değerli görüşleriyle yol göstericilik yapan Sayın Yrd. Doç. Dr. Kenan TUNÇ (Sakarya Üniversitesi Biyoloji Bölümü)'a, çalışmamda kullandığım tohumların temin edilmesinde yardımlarını gördüğüm Sayın Yrd. Doç. Dr. E. Selcen DARÇIN (Sakarya Üniversitesi Biyoloji Bölümü) ve Sayın Namuk ERGİN (Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü)'e, bitki yetiştirme sürecindeki yardımlarından dolayı arkadaşım Ahmet MUŞLU'ya teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca değerli katkılarından dolayı Sayın Doç. Dr. Sedat AKTAN (Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zooteknik Bölümü) ve Sayın Doç. Dr. Mevlüt TÜRK (Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü)'e ve arkadaşım Nesrin ECEM'e teşekkürlerimi sunarım.

Sakarya'da ilk bulunduğum günden bu yana her zaman desteklerini gördüğüm SAFİTÜRK ailesine ve tüm yaşamım boyunca her an yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 2011 – 50 – 01 – 026 nolu proje ile desteklenmiştir

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
ÖZET.....	xii
SUMMARY.....	xiii
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2	5
GENEL BİLGİLER	5
2.1. Arpa Hakkında Genel Bilgiler.....	5
2.1.1. Arpanın kültüre alınması, kökeni ve sınıflandırılması.....	5
2.1.2. Arpanın iklim ve toprak isteği	7
2.1.3. Dünyada ve Türkiye’de arpa.....	7
2.2. Bitki Gelişimini Etkileyen Stres Koşulları	8
2.3. Ağır Metal Stresi	13
2.3.1. Ağır metallerin bitkiler üzerine etkileri	15
2.3.2. Ağır metale uyum	19

2.3.2.1. Aktif oksijen türlerinin oluşumu ve antioksidant sistem.....	19
BÖLÜM 3	25
MATERYAL VE METOD	25
3. 1. Bitki Materyali.....	25
3.2. Yöntemler	25
3.2.1. Tohum kabuk sterilizasyonu	25
3.2.2. Ekim yöntemi.....	25
3.3. Ölçüm ve Analizler.....	28
3.3.1. Yaprak dokularındaki fotosentetik pigment miktarının belirlenmesi	28
3.3.2. Yaprak dokularındaki toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi	28
3.3.3. Yaprak dokularında malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi	29
3.3.4. Yaprak dokularında hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarının belirlenmesi.....	30
3. 4. Bazı Antioksidant Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	30
3. 4. 1. Toplam askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin belirlenmesi (EC 1. 11. 1. 11)	30
3. 4. 2. Toplam glutatyon redüktaz (GR) aktivitesinin belirlenmesi (1. 6. 4. 2). 31	
3. 4. 3. Toplam guaiakol peroksidaz (GPOD) aktivitesinin belirlenmesi (1. 11. 1. 7)	31
3. 5. İstatiksel Analizler.....	32
BÖLÜM 4	33
BULGULAR	33
4.1. Ağır Metal Stresinin Klorofil a Miktarı Üzerine Etkisi.....	33
4.2. Ağır Metal Stresinin Klorofil b Miktarı Üzerine Etkisi	34
4.3. Ağır Metal Stresinin Toplam Klorofil Miktarı Üzerine Etkisi.....	36

4.4. Ağır Metal Stresinin Toplam Karotenoid Miktarı Üzerine Etkisi.....	38
4.5. Ağır Metal Stresinin Toplam Fenolik Madde Miktarı Üzerine Etkisi	40
4.6. Ağır Metal Stresinin Malondialdehit (MDA) Miktarı Üzerine Etkisi.....	42
4.7. Ağır Metal Stresinin Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarı Üzerine Etkisi.....	44
4.8. Ağır Metal Stresinin Toplam Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	46
4.9. Ağır Metal Stresinin Toplam Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	49
4.10. Ağır Metal Stresinin Toplam Guaiakol Peroksidaz (GPOD) Aktivitesi Üzerine Etkisi	50
BÖLÜM 5	53
TARTIŞMA VE SONUÇ	53
5.1 Ağır Metal Stresinin Fotosentetik Pigment Miktarları Üzerine Etkisi.....	53
5.2 Ağır Metal Stresinin Toplam Fenolik Madde Miktarı Üzerine Etkisi	55
5.3 Ağır Metal Stresinin Malondialdehit Miktarı Üzerine Etkisi.....	57
5.4 Ağır Metal Stresinin Hidrojen Peroksit Miktarı Üzerine Etkisi.....	58
5.5 Ağır Metal Stresinin Antioksidant Enzim Sistemleri Üzerine Etkisi	59
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	74

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

$\mu\text{g ml}^{-1}$: mikro gram / mililitre
μl	: Mikrolitre
$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$: mikromol / metre kare / saniye
$^1\text{O}_2$: Singlet oksijen
Ag – Cd	: Gümüş - kadmiyum
Al^{+3}	: Aliminyum iyonu
ANOVA	: Varyans analizi (Analysis of variance)
AOT	: Aktif Oksijen Türleri
AÖF	: Anlamli önemli fark
APX	: Askorbat peroksidaz
ATP	: Adenozin tri fosfat
ATPaz	: Adenin tri fosfataz
C	: Karbon
$\text{C}_{55}\text{H}_{70}\text{O}_6\text{N}_4\text{Mg}$: Klorofil b
$\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{O}_5\text{N}_4\text{Mg}$: Klorofil a
$\text{C}_6\text{H}_4\text{O}$: Fenoksi radikali
CAT	: Katalaz
Cd	: Kadmiyum
CdNO_3	: Kadmiyum nitrat
cm	: Santimetre
Cu – Zn SOD	: Bakır – Çinko Süperoksit dismutaz
DHAR	: Dehidroaskorbat redüktaz
DNA	: Deoksiribo nükleik asit

FCR	: Folin Ciocalteu's Reagent
FeSOD	: Demir süperoksit dismutaz
FS II	: Fotosistem II
g	: Gram
g ml ⁻¹	: gram / mililitre
GPOD	: Guaiakol Peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
H	: Hidrojen
H ₂ O	: Su
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
Hg – Cd	: Cıva – kadmiyum
HO ₂ ⁻	: Perhidroksit
K – PO ₄	: Potasyum fosfat
KI	: Potasyum iyodür
M	: Molar
MDA	: Malondialdehit
MDHAR	: Monodehidro askorbat redüktaz
Mg	: Magnezyum
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Mili molar
MnSOD	: Mangan süperoksit dismutaz
N	: Azot
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
Na ₂ EDTA	: Sodyum etilen diamin tetra asetik asit
NADPH	: Nikotinamidadenin dinükleotid fosfat
NaOCl	: Sodyum Hipoklorit

Ni – Cd	: Nikel – kadmiyum
nm	: Nanometre
nmol	: Nanomol
O	: Oksijen
O ₂	: Atmosferik oksijen
O ₂ ⁻	: Süperoksit
°C	: Santigrad derece
OH ⁻	: Hidroksil radikali
Pb	: Kurşun
PbNO ₃	: Kurşun nitrat
PVP	: Polivinil polipirrolidon
ROO	: Peroksi
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiyobarbütirik asit
TCA	: Trikloraasetik asit
UV	: Ultraviyole Işık

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1	Türkiye’de 1988 – 2009 yıllarına ait toplam arpa ekilen alan, üretim ve verim miktarları.....	8
Tablo 3.1.	Hoagland besin çözeltisinin içeriği.....	27

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Arpa varyete gruplarının oluşum şeması.....	6
Şekil 2.2.	Çevresel stres faktörleri ve bunların birbirleriyle olan ilişkileri...	10
Şekil 2.3.	Aktif oksijen türlerinin oluşumu.....	20
Şekil 2.4.	Ağır metaller tarafından aktif oksijen türlerinin oluşumu.....	21
Şekil 2.5.	Askorbat – glutatyon döngüsü.....	24
Şekil 4.1.	Farklı iki arpa çeşidinin yapraklarındaki klorofil a miktarı üzerine kadmiyum (A) ve kurşunun (B) etkileri.....	34
Şekil 4.2.	Farklı iki arpa çeşidinin yapraklarındaki klorofil b miktarı üzerine kadmiyum (A) ve kurşunun (B) etkileri.....	36
Şekil 4.3.	Farklı iki arpa çeşidinin yapraklarındaki toplam klorofil miktarı üzerine kadmiyum (A) ve kurşunun (B) etkileri.....	38
Şekil 4.4.	Farklı iki arpa çeşidinin yapraklarındaki toplam karotenoid miktarı üzerine kadmiyum (A) ve kurşunun (B) etkileri.....	40
Şekil 4.5.	Farklı iki arpa çeşidinin yapraklarındaki toplam fenolik madde miktarı üzerine kadmiyum (A) ve kurşunun (B) etkileri.....	42
Şekil 4.6.	Farklı iki arpa çeşidinin yapraklarındaki malondialdehit (MDA) miktarı üzerine kadmiyum (A) ve kurşunun (B) etkileri.....	44
Şekil 4.7.	Farklı iki arpa çeşidinin yapraklarındaki hidrojen peroksit miktarı üzerine kadmiyum (A) ve kurşunun (B) etkileri.....	46
Şekil 4.8.	Farklı iki arpa çeşidinin yapraklarındaki askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi üzerine kadmiyum (A) ve kurşunun (B) etkileri.	48

- Şekil 4.9. Farklı iki arpa çeşidinin yapraklarındaki toplam glutatyon peroksidaz (GR) aktivitesi üzerine kadmiyum (A) ve kurşunun (B) etkileri..... 50
- Şekil 4.10. Farklı iki arpa çeşidinin yapraklarındaki toplam guaiakol peroksidaz (GPOD) aktivitesi üzerine kadmiyum (A) ve kurşunun (B) etkileri..... 52

ÖZET

Anahtar kelimeler: Arpa (*Hordeum vulgare* L.), Kadmiyum, Kurşun, Fotosentetik Pigmentler, Toplam Fenolik Madde, Malondialdehit (MDA), Antioksidant enzimler

Bu çalışmanın amacı, arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkisinin farklı çeşitlerinin (Tarm – 92, Tokak 157/37) kadmiyum (0 – 1 – 1,5 mM) ve kurşun (0 – 10 – 15 mM) stresine verdiği cevapları incelemektir. Kadmiyum uygulamaları Tarm – 92, kurşun uygulamaları ise Tokak 157/37 genotipinin yapraklarındaki klorofil a, toplam klorofil ve toplam karotenoid miktarlarında önemli azalmalara yol açmıştır. Tokak 157/37'nin yaprak dokularındaki toplam fenolik madde miktarı her iki ağır metal uygulaması sonucu artmıştır. Kadmiyum ve kurşun uygulamaları, Tarm – 92 genotipinin yapraklarında daha belirgin şekilde malondialdehit birikimine neden olmuştur. Kadmiyum uygulanan Tarm – 92 genotipinin yapraklarındaki hidrojen peroksit miktarının daha düşük olduğu, kurşun uygulamasının ise bunu artırdığı belirlenmiştir. Kadmiyum ve kurşun uygulamaları her iki genotipin yapraklarındaki askorbat peroksidaz aktivitesini azaltırken, guaiakol peroksidaz aktivitesini artırmıştır. Kadmiyum ve kurşun uygulanmış Tarm – 92 genotipinin yapraklarındaki glutatyon redüktaz aktivitesi azalırken, Tokak 157/37'de ise bu enzimin aktivitesi artmıştır. Bu sonuçlara göre, Tokak 157/37 genotipinin özellikle kadmiyumun yüksek konsantrasyonlarına bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif stresten kendisini daha iyi koruduğu, ancak kurşun toksisitesine daha duyarlı olduğu sonucu çıkarılabilir.

INVESTIGATION OF PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF HEAVY METAL STRESS ON SOME BARLEY (*Hordeum vulgare* L.) CULTIVARS

SUMMARY

Key words: Barley (*Hordeum vulgare* L.), Cadmium, Lead, Photosynthetic Pigments, Phenolics, Malondialdehyde (MDA), Antioxidant Enzymes

The aim of this study is to investigate responses of two barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes (Tarm – 92 and Tokak 157/37) subjected to cadmium (0 – 1 – 1,5 mM) and lead (0 – 10 – 15 mM) stress. Cadmium treatments decreased photosynthetic pigment (chlorophyll a, total chlorophyll and total carotenoid) contents in leaves of Tarm-92 while lead was more effective in Tokak 157/37. Both cadmium and lead increased total phenolic content in leaves of Tokak 157/37. Malondialdehyde accumulation was more significant in Tarm-92 leaves as the result of cadmium and lead application. Hydrogen peroxide content was lower in cadmium-treated Tarm – 92 leaves while it was increased as the result of lead application. Both cadmium and lead treatment decreased ascorbate peroxidase activity in Tarm – 92 and Tokak 157/37 leaves while guaiacol peroxidase activity was increased. Glutathione reductase activity in cadmium and lead - treated leaves of Tarm – 92 was lower while it was increased in Tokak 157/37.

As a result, it may be concluded that Tokak 157/37 can protect itself oxidative stress derived from high cadmium concentration and it is more sensitive to lead toxicity.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Canlılar doğal koşullar altında hayatta kalabilmek için birçok olumsuz çevre koşuluyla mücadele etmek zorundadırlar. Bazıları bu zor koşullar altında kalıtsal yapısındaki değişiklikler sonucu değişen koşullara adapte olabilirken, bazıları koşullara adapte olamayıp ölmektedir. Tüm canlılarda olduğu gibi bitkilerde de olumsuz her koşul stres faktörü olarak karşımıza çıkar. Abiyotik stres faktörleri olarak tanımlanan sıcaklık (düşük ya da yüksek sıcaklık), kuraklık, mineral madde eksikliği, tuzluluk, ultraviyole ışık (UV), ağır metaller gibi faktörler bitkiler için birçok olumsuz durumları ortaya çıkarmıştır. Özellikle son yıllarda sanayileşmeyle artan ağır metal kirliliği birçok ülke için ciddi çevre sorunlarını beraberinde getirmektedir. Yiyecek ve içecek üretimi, tekstil, dericilik, kimya ve petrokimya, döküm, kaplama, madencilik gibi endüstriyel kuruluşlar, kentsel, tarımsal ve ticari atıklar, çevre kirliliğine neden olan kaynaklar olarak gösterilmektedir [Nellesen and Fletcher (1993), Guo and Marschner (1995), Salt et al (1995), Robinson et al (2001)]. Ayrıca hava, toprak ve su kirleticileri de bitkilerin yaşamını olumsuz yönde etkileyen faktörler arasına girmiştir [Kılınç ve Kutbay (2004)].

Ağır metal kirliliğine maruz kalmış bitkilerde fotosentez ile topraktan su ve mineral alım mekanizmaları zarar görür. Ağır metalle yüksek oranda kirlenmiş topraklarda yetiştirilen bitkilerde klorozis gibi çeşitli semptomlar görülür, zamanla kök ve gövde büyümesi inhibe olur ve en sonunda ölüm gerçekleşir [Yadav (2010)].

Kobalt, bakır, demir, mangan, molibden, nikel ve çinko gibi bazı ağır metal özelliği gösteren elementler bitkiler için temel mikro besin elementlerindedir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda bitkiler toksik etkiye sahiptirler [Lambers et al (1998)]. Önemli mikro besin olarak bu elementler hücrede kofaktör, spesifik enzimlerin aktivatörü

veya organik molekülleri stabilize etme gibi rolleri üstlenirler. Kadmiyum, kurşun, krom, uranyum, cıva, gümüş ve altın gibi diğer ağır metaller bitkiler için esansiyel besin elementleri olmadığı gibi çok küçük konsantrasyonları bile toksik etkiler yapar [Lambers et all (1998)]. Mikro besin elementi olsun ya da olmasın ağır metallerin, atmosferde, suda ve topraktaki konsantrasyonunun belli bir seviyenin üzerine çıkması, tüm canlılar için ciddi problemlere neden olmaktadır [Benavides et all (2005)]. Birçok kirlenmede olduğu gibi ağır metal kirlenmesinde de öncelikle etkilenen grup primer üreticiler olan bitkilerdir. Bitkiler toprak çözeltisinde iyon halinde bulunan ağır metalleri genellikle kökleri ile alırlar [Doğan ve Saygıdeğer (2009), Kafadar ve Saygıdeğer (2010)].

Kadmiyum ve kurşun sadece bitkiler üzerinde değil tüm canlılar, hatta ekosistem üzerinde olumsuz etkiler yaratan ağır metallere aittir. Ağır metal toksisitesi, endüstriyel ve tarımsal faaliyetler gibi insan aktiviteleri sonucu son yıllarda çok daha yaygın ve tehlikeli bir hale gelmiştir [Erdik ve Sarıkaya (2007), <http://www.mta.gov.tr>]. Toprakta bulunan kadmiyum ve kurşun yüksek konsantrasyonlarda tarla bitkilerinin büyüme ve gelişmesini etkileyerek, veriminin ve tüketilebilir olma özelliğinin (sağlık açısından) azalmasına neden olmaktadır [Alloway (1990), Kabata-Pendias and Pendias (1991), Zheljazkov et all (2005), Wang et all (2006)]. Bitkiler, gelişimleri için gerekli olmamasına rağmen, aldıkları kadmiyum ve kurşunu organlarında çeşitli konsantrasyonlarda biriktirmektedirler. Dokularda biriken bu ağır metaller, besin zinciri yolu ile -besin zincirinin her basamağında miktarı daha da artarak- diğer canlılara geçmekte ve insan sağlığını tehdit edecek toksik düzeye ulaşmaktadır. Bitki türüne göre değişmekle birlikte, belli bir konsantrasyondan sonra kadmiyum ve kurşun alınımı, bitkilerde çeşitli zararlara yol açmaktadır. Bitki yapraklarında morfojik farklılıklar, yaprak alanında küçülme, yapraklarda sararma ve nekrotik leke oluşumları gözlenebilmektedir [Krupa and Moniak (1998), Lombardi and Sebastiani (2005), Lagriffoul et all (1998), Benavides et all (2005), Köleli et all (2004)]. Bunun yanında zarsı yapıların kompozisyonunda, hücre membran akışkanlığında, membrana bağlı enzimlerin yapı ve aktivitelerinde değişikliklere yol açmaktadır. [Kennedy and Golsalves (1987), Ros et all (1990), De Vos et all (1991), Fodor et all (1995)]. Kurşun ve kadmiyumun, bitkilerde fotosentetik pigment miktarında azalma [Hattab et all (2009), Seth et all (2008), Patel

ve arkadaşları (2005)], enzim aktivitelerinde, membran yapısında ve geçirgenliğinde değişiklikler ve bitki dokularındaki aktif oksijen türlerinin miktarında artışlara [Chaitanya and Naithani (1994), Stohs and Bagchi (1995), Verma and Dubey (2003), Cho and Seo (2004)] neden olduğu rapor edilmiştir.

Biyotik ve abiyotik stres koşulları sonucu hücrelerde aktif oksijen türleri üretilir ve [Scandalios (2002)] bu türler hücre canlılığını etkileyen lipidler, proteinler, pigmentler ve nükleik asitlerle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna, membran hasarına ve enzimlerin inaktivasyonuna neden olurlar [Halliwell (1987)] Stres sonucu oluşan serbest radikallere bağlı doku hasarı oluşumunda en önemli mekanizma hücre zarındaki lipidlerin peroksidasyona uğramasıdır. Oksidantlar, çoklu doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonu başlatırlar. Lipid peroksidasyonun son ürünü olan malondialdehid (MDA) hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar. Böylece iyon geçirgenliği ve enzim aktivitesinde değişimler gibi olumsuz sonuçlara neden olur [Niki (1987)].

Bitkiler hücrelerini ve hücre sel bileşenlerini oksidatif stresten kaynaklanan zararlı etkilere karşı, antioksidant sistemlerinin enzimatik ve enzimatik olmayan elemanları ile korumaya çalışırlar [Halliwell (1987)]. Antioksidant sistemin enzimatik olmayan elemanları glutatyon, askorbik asit (C vitamini), α – tokoferol (E vitamini) ve karotenoidlerden oluşur [Kacar ve arkadaşları (2006)]. Süperoksit radikalının hidrojen perokside dönüşümünü sağlayan süperoksit dismutaz (SOD) ve hidrojen peroksidin suya dönüşümünü sağlayan askorbat peroksidaz (APX) ve katalaz (CAT) gibi enzimler ile askorbat – glutatyon döngüsünde yer alan monodehidro askorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimler antioksidant savunma sisteminin enzimatik bileşenleri arasındadır.

Son yıllarda artan endüstriyel faaliyetler ve taşıt kullanımının neden olduğu kadmiyum ve kurşun kirlenmesi, özellikle tarım için ayrılmış toprakların kirlenmesine neden olmakta, buralarda yetiştirilen bitkilerin bünyelerinde birikmek suretiyle verimi etkilemekte, ürün kayıplarına neden olmaktadır. Arpa gerek dünyada

gerekse ülkemizde buğdaydan sonra en fazla ekilip üretilen serin iklim tahılıdır. Çoğunlukla hayvan beslenmesinde, malt ve bira üretiminde ham madde olarak kullanılmaktadır [Geçit ve arkadaşları (2009)]. 2008 yılında 29 500 000 dekarlık alana ekim yapılmışken bu miktar 2009 yılında 30 100 000 dekara çıkmıştır. 2008 yılında 5 923 000 ton üretim yapılırken yine bu miktar 2009 yılında 7 300 000 tona yükselmiştir. Verim de yine 2008 yılında 201 kg/dekardan 2009 yılında 243 kg/dekara yükselmiştir [www.tuik.gov.tr].

Tez kapsamında, arpa bitkisinin seçilmesinde; hem arpanın önemli bir tahıl olması hem de Türkiye’de yetiştirilen arpa çeşitleri üzerinde ağır metallerin etkisini araştıran çalışmaların az olması etkili olmuştur. Bu çalışmada kadmiyum ve kurşun ağır metallere dayanıklılık ve duyarlılık derecelerinin anlaşılması ve arpa çeşitlerinin ağır metal stresi altında sergiledikleri metabolik değişimleri bazı fizyolojik kriterler vasıtasıyla açıklanması amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü’nden temin edilen Tarm – 92 ve Tokak 157/37 çeşitlerine ait arpa (*Hordeum vulgare* L.) tohumları kullanılmıştır. 32 gün boyunca perlit kültür ortamında ve sera koşullarında yetiştirilen arpa bitkilerine 6 gün boyunca iki gün arayla yüksek konsantrasyonda kadmiyum ve kurşun uygulaması yapılmıştır. Hasattan sonra kadmiyum ve kurşun uygulamalarının arpa çeşitlerinin yaprak dokularındaki fotosentetik pigment, malondialdehit, hidrojen peroksit ve toplam fenolik madde miktarı ile bazı antioksidant enzimlerin aktivitelerinde meydana getirdiği değişimler incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlarla üreticiye yüksek kadmiyum ve kurşun konsantrasyonlarına daha dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi konusunda yol gösterilebileceği gibi, ıslah çalışmalarında kullanılabilecek yeni gen kaynaklarının belirlenmesi de mümkün olabilecektir.

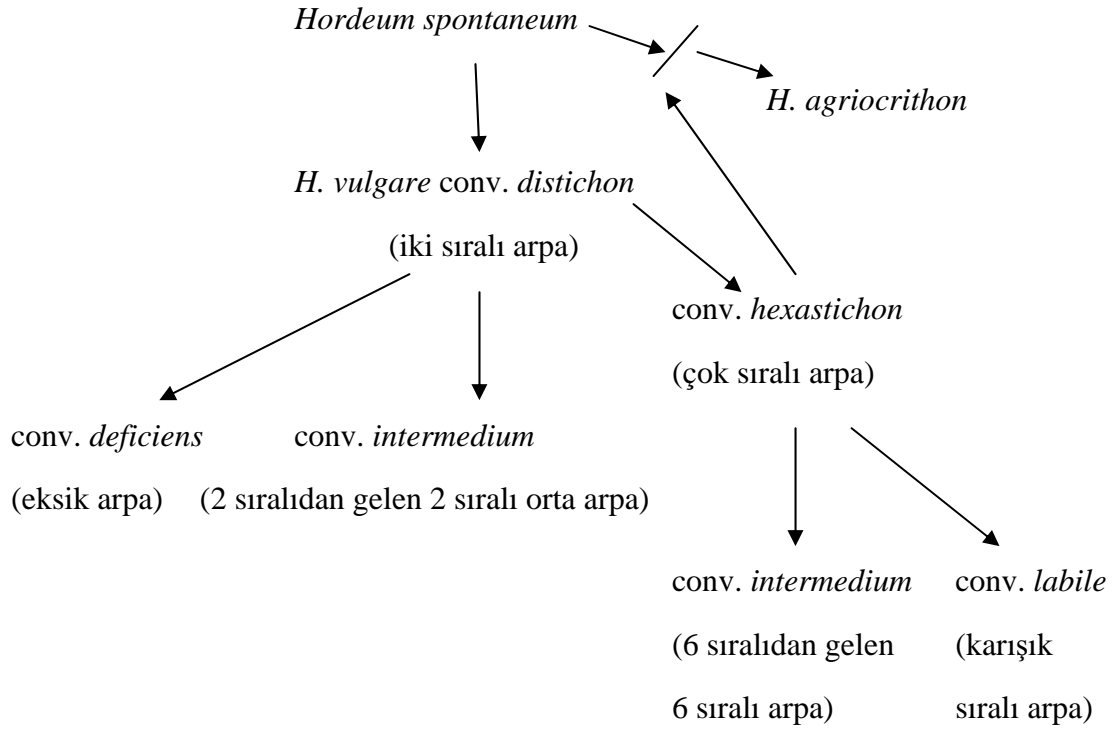
BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1. Arpa Hakkında Genel Bilgiler

2.1.1. Arpanın kültüre alınması, kökeni ve sınıflandırılması

Arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkiler aleminin Spermatophyta (Tohumlu Bitkiler) bölümünün, Angiospermae (Kapalı Tohumlular) alt bölümünün, Monocotyledoneae (Tek Çenekliler) sınıfında bulunan Poaceae (Buğdaygiller) familyasına ait tek yıllık otsu bir bitkidir [Seçmen ve arkadaşları (2000)].

Arpanın diploit, tetraploit ve hekzaploit olan türleri vardır. Bunlardan tetraploit (*H. jubatum* $2n = 28$) ve hekzaploit (*H. nodosum* $2n = 42$) türlerinde bitkiler kısa boyludur. Ayrıca vejetatif ve generatif gelişme hızları düşüktür. Kültür arpaları ise diploittir ($2n = 14$) ve *H. spontaneum* Koch ve *H. agriocrithon* Aberg olarak iki yabancı türle temsil edilir. Kültür bitkilerinin sınıflandırılmasında kromozom sayıları ve genom yapıları aynı olan, birbiri arasında kolayca döllenebilen çeşitler aynı tür içine alınır. Bundan dolayı tüm kültür arpaları tek bir türe, yani *H. vulgare* L. türüne sokulur. Başak ekseninin bir boğumdaki tane bağlayan başakçık sayısına göre farklı varyete gruplarına (convariates) ayrılır [Yürür (1994)] [Şekil 2.1].



Şekil 2.1. Arpa varyete gruplarının oluşum şeması [Yürür (1994)]

Arpa yeryüzünde ilk kültüre alınan bitkidir. Pumpelli'nin Doğu Türkistan'da yaptığı Anav kazılarında M.Ö. 5000 yıllarına ait iki sıralı arpa taneleri bulunduğu belirtilmiştir. Mısır'da İngiliz Kraliyet Arkeoloji Enstitüsü tarafından yapılan kazılarda yine M.Ö. 5000 – 15000 yıllarına ait iki ve altı sıralı arpa taneleri bulunmuştur. İki sıralı arpaların yabani türü olan *H. spontaneum* Koch'un bütün Orta Doğu'da [Yürür (1994)] – Suriye, Irak, İran ve Türkiye'de [Martin et all (2006)] – *H. agriocrithon* Aberg ise Doğu Anadolu'da, Kafkasya ve Afganistan'da bol olarak bulunduğu kaydedilmiştir. Mezopotamya ve Eski Yunan uygarlıklarında da arpa önemli bir yer tutmaktadır. Yunancada arpaya günlük ekmek anlamına gelen 'alphita' denilmiştir [Yürür (1994)]. Altı sıralı arpaların yaklaşık M.Ö. 6000 yılında kültüre alındığına dair bilgiler de vardır [Martin et all (2006)].

2.1.2. Arpanın iklim ve toprak isteği

Serin iklim tahıllarından olan arpa sıcaklığı 0 °C'nin altına düşmeyen ve 18 – 20 °C'nin üstüne çıkmayan nisbi nem oranı sürekli olarak % 70 – 80 arasında bulunan yerlerde en iyi gelişimini gösterir. Sıcak ve kurak bölgelerde çiçeklenme zamanında esen sıcak rüzgarlar dölleme ve tane tutma üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir, verimi de yine olumsuz yönde etkiler. Her ne kadar arpa kurak ve yarı kurak bölgelerde yetiştirilse de buralarda yetiştirilen çeşitlerin verimleri nemli bölgelerde yetiştirilen çeşitlere oranla oldukça düşüktür. Arpa kurağa olduğu kadar düşük sıcaklıklara da son derece dayanıksızdır. Arpa çeşitlerinin çoğu – 10 °C civarındaki düşük sıcaklıklardan zarar görür. Bundan dolayı arpanın kışlık ekimi birçok bölgede sınırlıdır. Yazlık ekimler ise suyu bol ve yüksek verimli topraklarda yapılmaktadır [Yürür (1994)].

Arpa için en uygun topraklar milli, havalanması ve nemliliği uygun, en az % 5 oranında organik madde içeren, nötr topraklardır. Suyu fazla, havalanması kötü topraklarda, nemliliği çok kötü bulunan kumlu topraklarda verimi çok düşer. Verimli topraklarda uygun çeşit ekilmek şartıyla arpa kadar ürün verebilen kültür bitkisi oldukça azdır [Yürür (1994)]. Drenajı iyi, pH'sı 7 – 8 arasında olan derin tınlı toprakları da çok sever. Orta derecede verimli topraklarda hızla gelişirken azotça zengin topraklarda genellikle verim düşmektedir [Geçit ve arkadaşları (2009)].

2.1.3. Dünyada ve Türkiye'de arpa

Arpa gerek dünyada gerekse ülkemizde buğdaydan sonra en fazla ekilip üretilen serin iklim tahılıdır. Çoğunlukla hayvan beslenmesinde, malt ve bira üretiminde ham madde olarak kullanılmaktadır [Geçit ve ark. (2009)]. Ülkemizde arpa tarımıyla ilgili 1988 – 2009 yıllarına ait bazı veriler tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1 Türkiye’de 1988 – 2009 yıllarına ait toplam arpa ekilen alan, üretim ve verim miktarları [<http://www.tuik.gov.tr/>]

YIL	EKİLEN ALAN (Dekar)	ÜRETİM (Ton)	VERİM (kg/dekar)
1988	34 450 000	7 500 000	218
1989	34 400 000	4 500 000	131
1990	33 500 000	7 300 000	218
1991	34 500 000	7 800 000	226
1992	34 400 000	6 900 000	201
1993	34 850 000	7 500 000	215
1994	35 000 000	7 000 000	200
1995	35 250 000	7 500 000	213
1996	36 500 000	8 000 000	219
1997	37 000 000	8 200 000	222
1998	37 500 000	9 000 000	240
1999	36 500 000	7 700 000	211
2000	36 290 000	8 000 000	220
2001	36 400 000	7 500 000	206
2002	36 000 000	8 300 000	231
2003	34 000 000	8 100 000	238
2004	36 000 000	9 000 000	250
2005	36 500 000	9 500 000	260
2006	36 498 000	9 551 000	262
2007	34 280 165	7 306 800	213
2008	29 500 000	5 923 000	201
2009	30 100 000	7 300 000	243

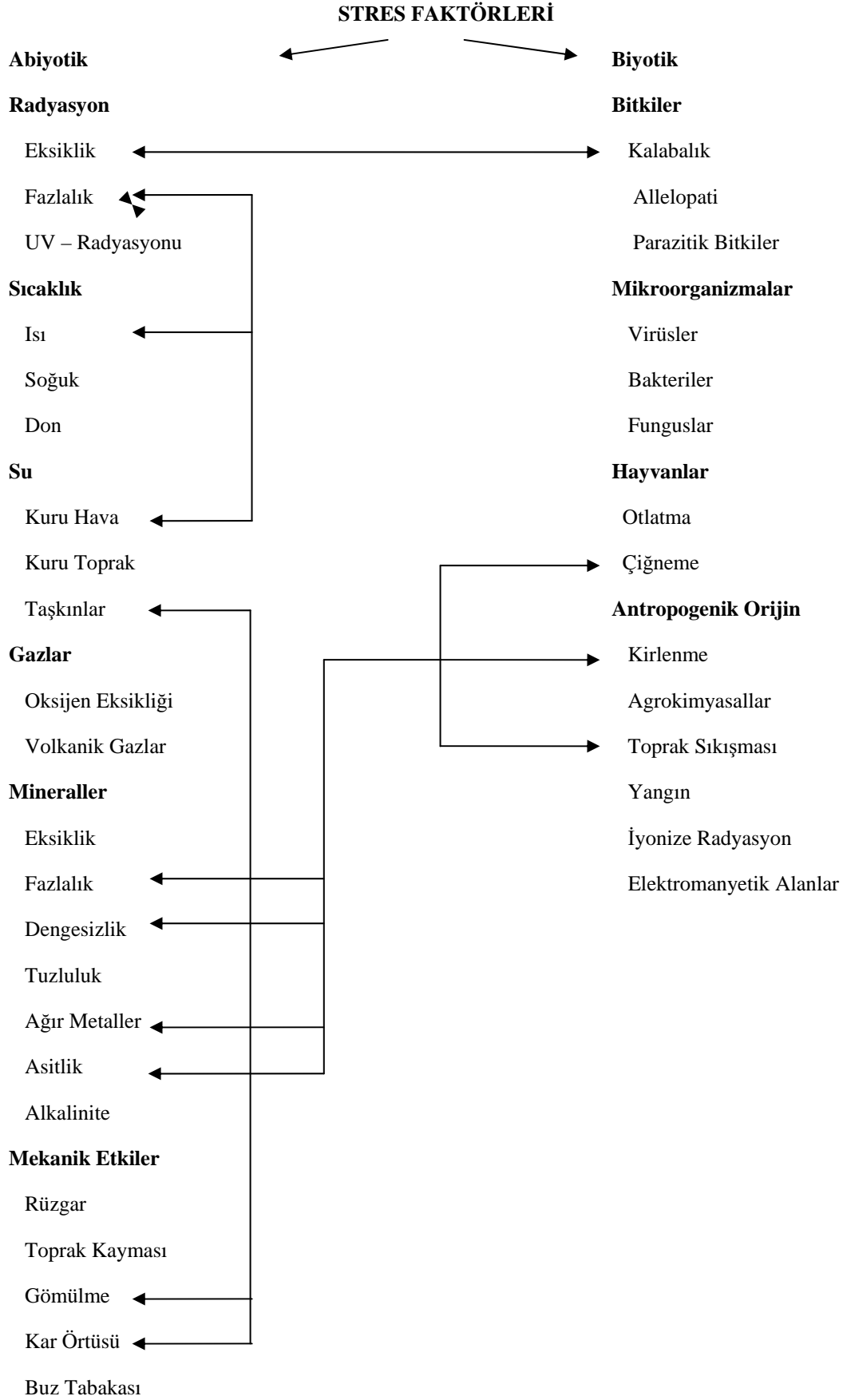
Gerek yemlik gerekse maltlık arpanın kalitesini belirleyen çeşitli kriterler vardır. Yemlik arpanın besleyicilik değerini etkileyen en önemli faktör lisin adlı amino asidin miktarıdır. Lisin miktarı yüksek olan çeşitler ıslah programlarında donör olarak kullanılarak yem kalitesi yüksek yeni çeşitler üretilmeye çalışılmaktadır. Maltlık arpanın kalitesini belirleyen en önemli kriterse nişasta miktarının fazla protein miktarının ise az olmasıdır. Arpa kuru madde üzerinden % 55 – 60 oranında nişasta ihtiva ederken % 9 – 11,5 protein içerir [Geçit ve arkadaşları (2009)].

2.2. Bitki Gelişimini Etkileyen Stres Koşulları

Bitkiler her zaman uygun çevre şartları altında bulunmazlar. Yeryüzünde kurak alanlar, tuzlu topraklara sahip bölgeler, kutup bölgeleri ile yüksek dağlar gibi alanlar bulunmaktadır. Bu alanlardaki ekolojik koşullar bitkilerin yaşamlarını olumsuz yönde etkilemektedir. Ayrıca son yıllarda hava, toprak ve su kirleticileri de bitkilerin yaşamını olumsuz yönde etkileyen faktörler arasına girmiştir [Kılınç ve Kutbay (2004)].

Olumsuz çevre şartları bitkilerde stres yaratır. Bitkinin üzerinde içsel ya da dışsal faktörlere bağlı olarak büyüme ve gelişme üzerinde etkin olan olumsuz etkiler stres olarak tanımlanır [Madlung ve Comai (2004)]. Bir çevrede devamlı olarak ya da arada sırada meydana gelen çok sayıdaki olumsuz, fakat hemen öldürücü olmayan koşullar stres olarak bilinir. Bir diğer ifadeyle bitkide metabolizmayı, büyüme ve gelişmeyi etkileyen veya engelleyen uygun olmayan herhangi bir durum ya da madde stres olarak kabul edilir [Lichtenhaler (1998)]. Levitt (1980) ise stresi canlı organizmalar için uygun olmayan çevre koşulları olarak tanımlamıştır [Gaspar et al (2002)].

Bitkiler ekosistem içinde sıklıkla pek çok stres olayları ve stres faktörleriyle karşılaşılır. Stres faktörleri orjinlerine göre değişik şekillerde sınıflandırılır. Levitt (1980)'e göre stres faktörleri biyotik ve fizikokimyasal faktörler olmak üzere ikiye ayrılır. Biyotik faktörler mantar, bakteri ve virüs gibi enfeksiyon oluşturan mikroorganizmaları, böcekler ve nematodlar gibi zararlı hayvanları ve diğer organizmalarla rekabeti içerir. Fizikokimyasal faktörler ise sıcaklık, su, radyasyon, kimyasal maddeler, manyetik ve elektriksel alanlar gibi çevre faktörlerini içerir. Bir diğer araştırmacı da stres faktörlerini doğal ve antropogenik olarak ikiye ayırmıştır. Doğal stres faktörlerini yüksek sıcaklık, ışık, donma, su eksikliği ve fazlalığı, mineral maddelerin yetersizliği, böcekler ve patojenler oluşturur. Antropogenik stres faktörlerini ise herbisitler, pestisitler, fungusitler, havayı kirletici maddeler, ozon, fotooksidantlar, asit yağmurları, yüksek azot konsantrasyonu, ağır metaller, UV radyasyonu ve karbondioksit düzeyi gibi faktörleri içerir [Kılınç ve Kutbay (2004)]. Şekil 2.2 çeşitli stres faktörleri ve bunların birbirleriyle ilişkilerini göstermektedir.



Şekil 2.2. Çevresel stres faktörleri ve bunların birbirleriyle olan ilişkileri [Kılınç ve Kutbay (2004)]

Stres herhangi bir biçimde tüm organizmalar üzerinde güçlü bir baskı uygular. Herhangi bir organizma hayatta kalmak için sakınma, direnme ya da tolerans mekanizmaları geliştirir. Bitkiler stresli koşullarda stresle baş etmek ve hayatta kalmak için hareketli organizmalara nazaran daha karmaşık metabolik cevaplar geliştirmişlerdir. Tolerans mekanizması organizmanın stres faktöründen zarar görmeden canlılığını sürdürmesine olanak verir. Kaçınma mekanizmasında strese maruz kalma önlenirken, direnç mekanizmasında daha etkin önlemler söz konusudur [Madlung ve Comai (2004)]. Tolerans bitkinin aşırı dış stres koşullarında olduğu kadar içsel stres altında da bir dereceye kadar fonksiyonlarını ya da canlılığını devam ettirme, yani strese dayanma kapasitesidir. Örneğin bakteriler diğer organizmalar için öldürücü olan düşük ya da yüksek sıcaklıklarda canlılıklarını devam ettirebilirler. Yani tolerans, dayanıklı olmayan türler ya da bireyler için letal ya da inhibitör olan koşullar altında organizmaların canlı kalması için özel biyolojik mekanizmaların gelişmesini ifade eder [Kadıoğlu (2007)]. Kaçınmanın mekanizması daha çok stresin etkisini azaltma yönündedir [Kılınç ve Kutbay (2004)]. Bunu dış ortamda stres oluşturabilecek koşullar olmasına rağmen bitki, hücrelerini stres altına sokmayan bir iç ortamı meydana getirmekle sağlar [Kadıoğlu (2007)]. Bitki yaprak laminasının yüzeyi ve kalınlığında, stomaların büyüklüğü ve yerinde, kök ve gövdenin boyutlarında meydana gelen değişimler sakınma mekanizmasına örnek teşkil eder. Örneğin bazı bitkiler su eksikliğinde buharlaşmayı azaltmak için kutikula tabakasını kalınlaştırabildiği gibi su depolayan etli yapraklar oluşturarak da stres koşullarından kaçınmaya çalışır ya da neslini garanti altına almak için kısa sürede tohum veya yumru oluşturur. Direnç gösterme durumunda ise bitkide stresin yarattığı etkilerin onarılması veya ortadan kaldırılması söz konusudur [Kılınç ve Kutbay (2004)].

Bitkilerin olumsuz çevre koşullarına çeşitli mekanizmalarla direnç ya da dayanıklılık gösterdiğinden bahsedilmiştir. Bir bitkinin strese karşı göstereceği direnci bir çok faktör belirler [Hale and Orcutt (1987)]. Stresin şiddeti, süresi, strese maruz kalan doku ya da organ tipi ile bitkinin stres koşulları altında iken bulunduğu gelişim evresi ve aynı türe ait farklı çeşit veya genotipler bu faktörler arasındadır [Bray et all (2000)]. Ayrıca stres faktörleri ile bunların kombinasyonu da direnç mekanizmasını etkileyen faktörlerdendir. Bitki bu durumda adaptasyon veya uyum mekanizmalarını

devreye sokar. Bu iki kavram her ne kadar aynıymış gibi algılansa da aralarında önemli farklar vardır. Huner et all (1998)'e göre adaptasyon uzun süren çevresel değişiklikler sonucu kendini gösteren genotipik farklılığı ifade eder. Adaptasyon sonucunda genomda meydana gelen değişiklikler kararlılığı ifade ederken bu değişiklikler populasyonda birçok generasyon boyunca korunur. Gaspar et all (2002)'ye göre ise stres altındaki bir populasyonda, canlılıklarını devam ettirmelerini sağlayan uygun gen kombinasyonlarına sahip genotipler baskın olarak bulunur. Uyum ise ortam koşullarının değişmesi ile oluşan ve genetik yapıda herhangi bir değişiklik olmaksızın ortaya çıkan sadece fenotipik bir durumu ifade eder [Huner et all (1998)].

Bitkiler stres faktörlerine karşı submoleküler, moleküler ve subselüler düzeyde cevaplar oluştururlar. Submoleküler düzeyde strese cevap olarak hücre içinde serbest radikaller oluşturulur. Hücre düzeyinde serbest radikaller özellikle oksijen içeren moleküller aracılığıyla oluşturulur. Süperoksit (O_2^-), hidroksit (OH^-), perhidroksit (HO_2^-), peroksi (ROO), fenoksi (C_6H_4O) radikalleri ile singlet oksijen (1O_2) bu moleküller arasında yer alır. Bu yapılarda yer alan oksijenler aktif oksijen olarak adlandırılır. Bitkinin moleküler düzeyde strese verdiği cevaplar çeşitli molekülleri sentezlemesi şeklindedir. Düşük molekül ağırlıklı fenoller, terpenoidler, kinonlar, poliaminler, terpenoidler, prolin ve absisik asit gibi sekonder bileşiklerin yanında yüksek molekül ağırlıklı sekonder bileşiklerden lignin, suberin ve kitin sentezleyerek mekanizmayı işletirler. Yine hücre zarı ile hücre duvarı arasında depolanan stres faktörlerine karşı hücre duvarında bir bariyer oluşturan ve önemli polisakkaritlerden olan kalloz da strese cevap olarak sentezlenir. Ayrıca farklı molekül ağırlıklarında olan, normalde hücre proteini olmayan ya da hücrede çok az bulunan stres koşullarında bu koşullara ait genlerin aktifleşmesiyle sentezlenen ve olumsuz koşul ortadan kalktığıında kaybolan proteinler de yine moleküler düzeyde stres cevabı olarak karşımıza çıkar. Subselüler düzeyde stres cevabı olarak hücre çeperindeki lignin sentez hızı ve depolanma hızı artırılır ve ayrıca çepere mekanik destek sağlamak amacıyla kalloz sentezlenir. Bunun yanında stresin algılanmasını sağlayan reseptörler de hücre çeperinde bulunur ve reseptörün oluşturduğu sinyalleri hücreye ileterek savunma mekanizmasını çalıştırır. Bir sonraki aşamada hücre ve organel

zarları devreye girer. Hücre zarındaki doymamış yağ asitlerinden aktif oksijen serbest radikali, fosfolipidlerden de jasmonik asit gibi sinyal molekülleri oluşur. Oluşan bu sinyal molekülleri hücre içinde fitoaleksinin ve stres proteini gibi savunma metabolitlerinin sentezini uyarır [Özen ve Onay (1999)].

Ayrıca bitkilerde stres koşullarında miktarı değişen fenolik bileşikler de savunma sisteminde rolleri vardır. Önemli sekonder metabolitlerden olan fenolik bileşiklerin yapısı, aromatik halkasında işlevsel hidroksil grubu içeren fenol grubundan oluşur [Kadıoğlu (2011), Taiz ve Zeiger (2008)]. Bu sayede aktif oksijen türlerini yok etme yeteneğine sahiptir. Ayrıca bu bileşikler hidroksil grubundaki hidrojen atomlarını aktif oksijen türlerine vermek suretiyle kararlı fenoksil radikallerini oluştururlar ve böylece savunma sistemini devreye sokmuş olurlar [Ecem (2010)].

2.3. Ağır Metal Stresi

Ağır metaller, yoğunluğu sudan en az beş kat daha fazla olan kimyasal elementler olarak tanımlanır ya da diğer bir ifadeyle yoğunluğu 5 g ml^{-1} 'den fazla olan metaller için kullanılan bir kavramdır [Kvesitadze et al (2006), Lambers et al (1998)]. Bunlardan kobalt, bakır, demir, mangan, molibden, nikel ve çinko gibi bazı ağır metal özelliği gösteren elementler bitkiler için temel mikro besin elementlerindedir. Ancak yüksek konsantrasyonda bitki için toksik etki yaparlar [Lambers et al (1998)] ve akut veya kronik zehirlenmelere yol açarlar [Kvesitadze et al (2006)]. Önemli mikro besin olarak bu elementler hücrede kofaktör, spesifik enzimlerin aktivatörü veya organik molekülleri stabilize etme gibi rolleri üstlenirler. Kadmiyum, kurşun, krom, uranyum, cıva, gümüş ve altın gibi diğer ağır metaller bitkiler için esansiyel besin elementleri olmadığı gibi çok küçük konsantrasyonları bile toksik etkiler yapar [Lambers et al (1998)].

Ağır metallerin toksisitesi mikroorganizmalar ve bitkiler üzerinde büyüme ve gelişmede azalma şeklinde kendini gösterirken, insan ve hayvan sağlığı üzerinde ise çeşitli zararlarla karakterize edilir. Özellikle ağır metaller merkezi sinir sisteminin normal fonksiyonunu bozabilirler, kan içeriğinde değişikliklere neden olurlar ve akciğerler, böbrekler, karaciğer ve diğer organların işleyişini olumsuz yönde etkilerler. Ağır metallerin uzun süreli etkisi kanser gelişimine, alerjiye, distrofiye, alzheimer ve parkinson gibi nörolojik hastalıklara neden olabilmesi şeklindedir [Kvesitadze et al (2006)].

Ağır metaller endüstriyel faaliyetler, su arıtma tesisleri, maden işletmeleri, baca emisyonları ve araçlar gibi yaygın kaynaklarla sucul ortamlara girer. Toprak ve sedimentte olduğu kadar canlı dokularında da birikim gösterme özelliğine sahiptirler [Davis and Masten (2009)]. Besin zinciri yoluyla insana kadar ulaşırlar [Pepper et al. (2006)]. İtai – itai kadmiyuma belli aralıklarla maruz kalan insanlarda böbrek yetmezliği ve osteomalazi ile sonuçlanan bir hastalıktır. Kronik sırt ve kemik ağrıları ile karakterize edilir. Japonya’da kadmiyumla kirlenmiş Jinzu Nehri’nden alınan suyla sulanan pirinç tarlalarından, günlük besin ihtiyacını karşılamak için pirinç tüketen insanların, kontamine pirinçlerin zararlı etkilerine maruz kaldıkları rapor edilmiştir [Davis and Masten (2009)].

Kadmiyum kimyasal simgesi Cd, atom numarası 48 olan, periyodik cetvelde II B grubunda yer alan ve yoğunluğu $8,6 \text{ g ml}^{-1}$ olan bir ağır metaldir. Mavimsi beyaz renkli bir metal olan kadmiyum, çinkonun ayrışsal damıtılması sırasında elde edilir. Çinkoya göre daha yumuşak olduğu için daha kolay çekilebilir ve dövülebilir. Özellikle deniz ve alkali ortama dayanıklılığı nedeniyle demir, çelik, pirinç ve alüminyum kaplamasında kullanılır. Kadmiyum kaplamaları elektrik, elektronik, otomotiv ve uzay sanayinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. En önemli kullanım alanını nikel – kadmiyum (Ni – Cd), gümüş – kadmiyum (Ag – Cd) ve cıva – kadmiyum (Hg – Cd) pilleri oluşturur. Diğer bir yaygın kullanım alanı da boya endüstrisidir. Ayrıca stabilizatör olarak plastik ve sentetik elyaf sanayi, televizyon tüpleri ve floresan lamba imalatı, nükleer reaktör kontrol sistemlerinde ve

alaşımında kullanılmaktadır. Zirai ve endüstriyel etmenlerden dolayı çevredeki konsantrasyonu sürekli artan kadmiyum tüm canlılar için toksik olmaktadır [Erdik ve Sarıkaya (2007), Doğan ve Saygıdeğer (2009), <http://www.mta.gov.tr>].

Kurşun ise kimyasal simgesi Pb ve atom numarası 82 olan, periyodik cetvelde IV A grubu içinde yer alan ve yoğunluğu $11,34 \text{ g ml}^{-1}$ olan bir ağır metaldir. Mavi – gümüş karışımı bir renge sahip olan kurşun, yer altından kazma, patlatma, kırma ve öğütme aşamalarından geçirilerek çıkarılır ve bir dizi işlem sonucu kullanılabilir bir hale getirilir. En önemli kullanım alanını akü imalatı oluşturur. Yer altı haberleşme kablolarının izolasyonunda, sülfirik asitten etkilenmediği için kimya endüstrisinde, radyasyonu en aza geçiren metal olması dolayısıyla bu ışıklardan korunmada, renkli televizyon tüplerinin yapımında ve mühimmat imalatında yaygın olarak kullanılır. Ayrıca kurşunun kararlı bileşiklerinden kurşun tetra etil ve tetra metil, benzin içinde oktan ayarlayıcı olarak kullanılmaktadır. Kurşunun toprağa ve tarım alanlarına bulaşması küçük miktarlarda gübre ve bazı pestisitlerle olmaktadır. Bunun ötesinde giderek artan miktarlarda diğer metallerle birlikte şehir, sanayii atık suları ve hava kaynaklı olarak da baca, egzoz gazlarından çevreye katılmaktadır. Çevreyi kirleten en önemli kurşun kaynağı, hava ile taşınan kurşundur. Hava kaynaklı kurşunun büyük kısmı otomobil egzoz gazlarından ileri gelmektedir. [Erdik ve Sarıkaya (2007), Kafadar ve Saygıdeğer (2010), <http://www.mta.gov.tr>].

Topraktan bitki kökleri ile alınan kadmiyum ve kurşun, ksilem aracılığıyla gövde ve yapraklara taşınmakta ve kök ucundan bitkinin üst kısımlarına kadar bütün dokularında birikebilmektedir. Sonuç olarak, özellikle şehirlerde yaşayan insanlar kontamine bitkilerle beslenirken besin zincirine katılan kadmiyum ve kurşunla zehirlenmektedirler [Doğan ve Saygıdeğer (2009), Kafadar ve Saygıdeğer (2010)].

2.3.1. Ağır metallerin bitkiler üzerine etkileri

Ağır metallerin en birincil etkileri köklerde kendini gösterir. [Brune et all (1994), Tester and Leigh (2001), Verma and Dubey (2003)]. Yüksek ağır metal konsantrasyonuna maruz kalmış bitkilerin köklerinde bazı morfolojik farklılıklar

göze çarpmaktadır; kök boyları normal bitki kök boylarına göre kısa olabildiği gibi, saçak kök sayısında azalmalar, yan köklerde artma ya da azalma da gözlemlenebilmektedir. Ayrıca köklerde lignifikasyonla epidermis ve hipodermiste bazı yapısal değişiklikler de kaydedilmiştir. Bitki ağır metal almaya devam ettikçe bir süre sonra gövde de bu durumdan etkilenmekte, gövde uzaması azalmakta, hem kökün hem de gövdenin taze ve kuru ağırlığında azalma meydana gelmesi dolayısıyla bitki büyümesi yavaşlamaktadır [Chaoui and Ferjani (2005), Hagemeyer and Breckle (1996), Peralta et all (2001), Munzuroğlu and Geckil (2002), Punz and Sieghardt (1993), Stolt et all (2003), Köleli ve arkadaşları (2004), Sharma et all (2004), Lombardi and Sebastiani (2005), Barcelo and Poschecrieder (1990)]. Örneğin aliminyum kültür bitkilerinin kök sistemlerinde birikmek suretiyle kökün normal işlevlerini yerine getirmesini engeller [Turan ve arkadaşları (1989)]. Al^{3+} hücre duvarındaki pektinlerle ve karboksil gruplarıyla tepkimeye girerek hücre bölünmesini azaltır. Ayrıca hücrel membranlar geçirgenliğini ve elastikiyetini de yitirirler. Kök uçlarında ve yan köklerde uzunlamasına büyüme durur, kök kısa, kalın bir hal alır ve kök uçları kıvrık bir görünüm arzeder [Klotz and Horst (1988)]. Bitki yapraklarında maruz kalınan ağır metal çeşidi ve konsantrasyonuna bağlı olarak morfojik farklılıklar, yaprak alanında küçülme, yapraklarda sararma ve nekrotik leke oluşumları gözlenebilmektedir [Krupa and Moniak (1998), Lombardi and Sebastiani (2005), Lagriffoul et all (1998), Benavides et all (2005), Köleli et all (2004)].

Metal toksisitesinin biyokimyasal temeli her zaman açık değildir. Kadmiyum, bakır ve civa, proteinlerdeki sülfidril gruplarını etkiler ve dolayısıyla bunları etkisiz hale getirir. Bakır gibi redoks aktif bir metal, fazlalığı durumunda lipid peroksidasyonuna ve membran sızıntısına yol açabilir, toksik serbest radikallerin oluşumuna sebebiyet veren kontrolsüz redoks reaksiyonlarına neden olabilir [De Vos et all (1989)]. Zarsı yapıların kompozisyonunda oluşan değişiklikler sadece hücre membran akışkanlığını değiştirmez, membrana bağlı enzimlerin yapısını ve aktivitelerini de değiştirir. Bazı ağır metaller enzimlerin çalışmasında önemli rolleri olan kofaktörleri oluştururlar. Fakat zaman zaman yüksek konsantrasyonlardaki başka metaller kofaktör metallerin yerine geçerek enzim aktivitelerinde azalmaya neden olabilirler. Bakır, nikel, kurşun ve kadmiyumun belirli konsantrasyonlarının bitkilerde hücre membranlarında

bulunan adenin tri fosfataz (ATPaz) enziminin aktivitesini azalttığı belirtilmiştir [Kennedy and Golsalves (1987), Ros et all (1990), De Vos et all (1991), Fodor et all (1995)]. Çinko Rubisco (Rubiloz-1, 5-bisfosfat karboksilaz/oksigenaz) içinde magnezyumla yer değiştirebilir, bu enzimin aktivitesini dolayısıyla fotosentetik kapasiteyi değiştirebilir [Van Assche and Clijsters (1984)]. Yine benzer bir durum süperoksit dismutaz (SOD) enziminde demir yerine magnezyum geçmesi şeklinde de görülmektedir [Vance and Miller (1998)]. Ernst and Josse – Van Damme (1983) bakır, kadmiyum, çinko, nikel, kobalt ve mangan konsantrasyonuna bağlı olarak nitrat redüktaz enzim aktivitesinin azaldığı belirtmişlerdir [Kacar ve arkadaşları (2006)]. Buna karşın bazen ağır metaller enzimlerin aktivitesini artırabilmektedir. Kadmiyum ve kurşunun yüksek konsantrasyonlarının fosfataz, ribonükleaz, proteaz ve amilaz gibi bazı enzimlerin aktivitesini artırdığı belirtilmiştir [Lee et all (1976), Jana and Choudhari (1982)].

Ağır metal iyonları solunum ve fotosentezin elektron taşınım reaksiyonlarında devreye girerek olumsuz etkiler yapar. Kadmiyum çoğu bitkide klorofil ve karotenoidlerin sentezini de olumsuz yönde etkilemektedir. 1 – 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ konsantrasyonlarındaki kadmiyumun yonca bitkisinde fotosentezi önemli ölçüde yavaşlattığı bildirilmiştir. Yine artan kadmiyum konsantrasyonunun buğdayda klorofil a / klorofil b oranını azalttığı rapor edilmiştir [Kacar ve arkadaşları (2006)]. Çinko, kadmiyum gibi metaller fotosentezi etkiler. Yapılan klorofil floresansı ölçümleri, ağır metallerin Calvin yapısal bütünlüğü üzerinde olumsuz etkileri olduğunu göstermektedir [Krupa et all (1993)]. Mangan toksisitesi klorozise ve fotosentez hızında azalmaya yol açar [Macfie and Taylor (1992)]. Bitkilerde gereğinden fazla bulunan nikel klorofil sentezi ve yağ metabolizması üzerinde olumsuz etki yapar [Kacar ve arkadaşları (2006)]. Kamprath ve Foy (1971)'a göre Al^{3+} ATPaz enzim aktivitesini ve hücrelerde metabolik enerji metabolizmasını olumsuz şekilde etkilerken, solunumun azalmasına neden olur [Kacar ve arkadaşları (2006)].

Stres fizyolojisi açısından bakıldığında kadmiyum ve kurşuna maruz kalmış bitkilerin, fotosentezin önemli elemanlarından olan klorofil (a, b) ve karotenoid pigmentlerinin düzeyindeki değişimlerin bilinmesi önemlidir. Fotosentez ökaryotlarda kloroplast adlı organelde gerçekleşir. Kloroplastın en belirgin özelliği tilakoit denen bir iç zar sisteminin bulunmasıdır. Klorofilin tümü fotosentezin ışık reaksiyonlarının gerçekleştiği bu zar sisteminin içinde bulunur. Klorofiller fotosentezde ışık absorpsiyonu yapan en önemli pigmentlerdendir. Yeşil renkli olan klorofiller sadece ışığı absorbe etmekle kalmaz, aynı zamanda elde ettiği enerjiyi bir molekülden diğerine transfer ederek fotosentetik reaksiyonlarda katalizör olarak görev alır. Genel olarak karbon (C), hidrojen (H), oksijen (O), azot (N) ve magnezyum (Mg) elementlerinden oluşan klorofil pigmentinin, yüksek bitkiler ve ototrofik organizmalarda (fotosentetik bakteriler hariç) en yaygın bulunan çeşitleri klorofil a ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$) ve klorofil b ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$) dir. Mavi – mor bölgede klorofil a 429 nm, klorofil b 453 nm’de en yüksek absorpsiyonu gösterirken, kırmızı bölgede klorofil a 660 nm, klorofil b 642 nm dalga boyunda en yüksek absorpsiyonu gösterir. Klorofil molekülü merkezindeki magnezyum atomunun çevresinde yer alan 4 pirok halkasından oluşmaktadır. Tüm klorofiller kimyasal olarak bir halka yapısına sahiptir. Ayrıca bu halkaya tutunmuş uzun bir hidrokarbon kuyruk bulunur. Bu kuyruk klorofilin içinde bulunduğu ortamın hidrofobik kısmına tutunmasını sağlar. Halka yapısı zayıf bağlı bazı elektronlar içerir. Bu kısım molekülün elektron geçişleri ve redoks reaksiyonlarında yer alan bölümüdür [Boncuk (2000), Özen ve Onay (2007), Taiz ve Zeiger (2008), Kadioğlu (2011)].

Yüksek bitkilerin yapraklarında ve bazı alglerde bulunan karotenoidler tıpkı klorofil pigmenti gibi kloroplastlarda, özellikle tilakoidlerin üst üste gelmesiyle oluşan granada yerleşmiştir. Fakat çiçek petali gibi organlarda, kromoplastlarda da bulunurlar. Turuncu, kırmızı, sarı ve kahverengi gibi çok değişik renk ve tipleri vardır. Fotosentez açısından önemine bakıldığında daha çok fotosentetik sistem içerisinde belli dalga boylarındaki ışık enerjisini absorbe edip daha sonra bunu klorofil molekülüne transfer etmek şeklinde olduğu bilinmektedir [Boncuk (2000), Özen ve Onay (2007), Taiz ve Zaiger (2008)].

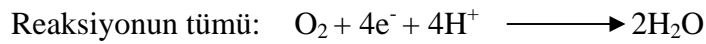
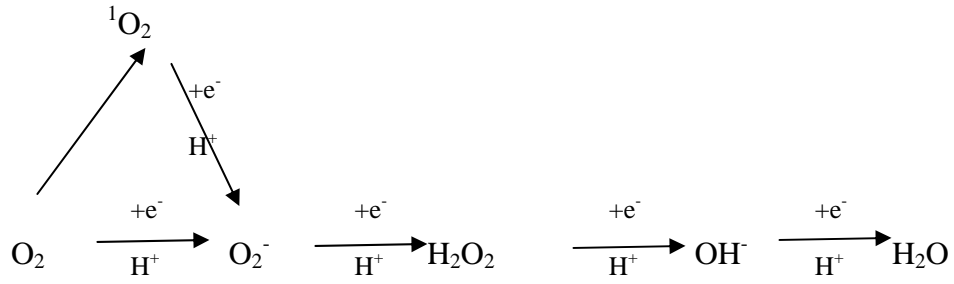
Fotosentetik pigmentler (klorofiller ve karotenoidler gibi) tilakoid zar üzerinde fotosistem I ve II halinde yerleşim gösterirler. Burada bulunan klorofil molekülleri absorbe ettikleri ışık enerjisini kısa dalga boyu absorbe eden pigmentten uzun dalga boyu absorbe eden pigmente doğru iletirler [Kadioğlu (2011)].

2.3.2. Ağır metale uyum

2.3.2.1. Aktif oksijen türlerinin oluşumu ve antioksidant sistem

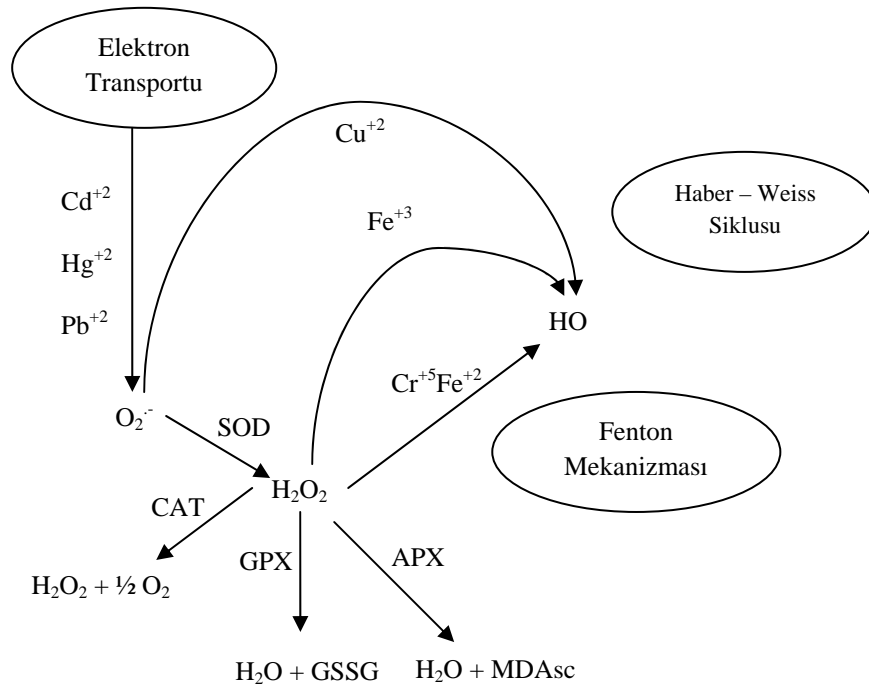
Bitkiler hava kirliliği, kuraklık, sıcaklık, ışık, ağır metaller, tuzluluk, donma, UV radyasyonu ve besin sınırlaması gibi çeşitli stres faktörlerine maruz kalırlar. Kirletici metaller ile zehirlenme oksidatif strese neden olur. Çünkü aktif oksijen türlerini (AOT) üreten mekanizmalar devreye girer [Stohs and Bagchi, (1995)]. Ağır metaller, serbest radikalleri ve toksik aktif oksijen türlerini üreterek oksidatif strese neden olur [di Toppi and Gabbrielli (1999), Hegedüs et all (2001), Arvind and Prasad (2003)]. Bitkilerde tıpkı diğer aerobik organizmalar gibi enerji üretebilmek için oksijene ihtiyaç duyarlar. Fakat sürekli olarak oksijenin hücre içerisindeki varlığı hücre yapısı ve reaksiyonlar için oksidatif bir tehlikeyi de beraberinde getirmektedir [Alscher et all (1997)]. Aktif oksijen türlerinin normal şartlar altında hücrelerde üretimi sıkı bir şekilde kontrol edilir ve aktif oksijen türleri atmosferik oksijenin (O_2) miktarını azaltır [Dat et all (2000)].

O_2 'nin iki molekül suya indirgenmesi dört elektronun transferiyle olur. Singlet oksijen (1O_2), süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^-), O_2 'nin spin inversiyonu ve O_2 'ye sırasıyla bir, iki ve üç elektronun transferi sonucu üretilir [Scandalios (2002)] [Şekil 2.3].



Şekil 2.3. Aktif oksijen türlerinin oluşumu [Scandalios (2002)]

Hidrojen peroksit demir, bakır ve mangan gibi geçiş metallerinin katalizörlüğünde ‘Haber – Weiss’ ya da ‘Fenton’ reaksiyonu yoluyla hidroksil radikalini oluşturabilir. Canlı sistemlerde hidroksil radikalini etkisiz hale getirebilen herhangi bir enzimatik mekanizma olmaması yüzünden dokulardaki aşırı birikimi hücre ölümüne neden olur [Doğru (2006)]. Kadmiyum, kurşun ve cıva gibi metaller, antioksidant bir molekül olan glutatyonun (GSH) hücrelerdeki miktarını azaltarak, makromoleküllerin oksidasyonuna neden olan toksik bileşiklerin miktarının artmasına yol açabilirler [Pinto et all (2003)] [Şekil 2.4].



Şekil 2.4. Ağır metaller tarafından aktif oksijen türlerinin oluşumu (Cd^{+2} , kadmiyum iyonu; Hg^{+2} , cıva iyonu; Pb^{+2} , kurşun iyonu; Cu^{+2} , bakır iyonu; Fe^{+2} ve Fe^{+3} , demir iyonu; Cr^{+5} , krom iyonu; $\text{O}_2^{\cdot-}$, süperoksit radikali; HO, hidroksil radikali; SOD, süperoksit dismutaz; CAT, katalaz; H_2O_2 , hidrojen peroksit; APX, askorbat peroksidaz; MDAsc, monodehidroaskorbik asit; GSSG, okside glutatyon; H_2O , su; O_2 , moleküler oksijen;) [Benavides et al (2005)]

Hüresel aktif oksijen türlerinin üretimi, biyotik ve abiyotik stres koşullarının ortaya çıkardığı metabolik dengesizliklere cevap olarak uyarılır ve benzer mekanizmalar aracılığıyla ilerler [Scandalios (2002)]. Ağır metal zehirlenmesi 30 kata kadar aktif oksijen türlerinin üretimini artırır [Mittler (2002)]. Bu türler hücre canlılığını etkileyen lipidler, proteinler, pigmentler ve nükleik asitlerle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna, membran hasarına ve enzimlerin inaktivasyonuna neden olurlar [Halliwell (1987)]. Süperoksit radikalleri daha çok hidrojen peroksit ve hidroksil radikali oluşturmak suretiyle etkili olurlar [Halliwell ve Gutteridge (1989)]. Calvin döngüsünün birçok enzimi hidrojen peroksit dolayısıyla inaktivasyona uğrar [Kaiser (1979), Charles ve Halliwell (1980)].

Işık enerjisinin klorofil tarafından absorbe edilmesi ile meydana gelen aktif triplet klorofil, absorbe ettiği enerjiyi moleküler oksijene aktararak singlet oksijeni oluşturur. Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer eder ya da kovalent tepkimelere girer. Doymamış yağ asitleri ile de doğrudan tepkimeye girerek peroksi radikalini oluşturur ve hidroksil kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir [Halliwell ve Gutteridge (1985)].

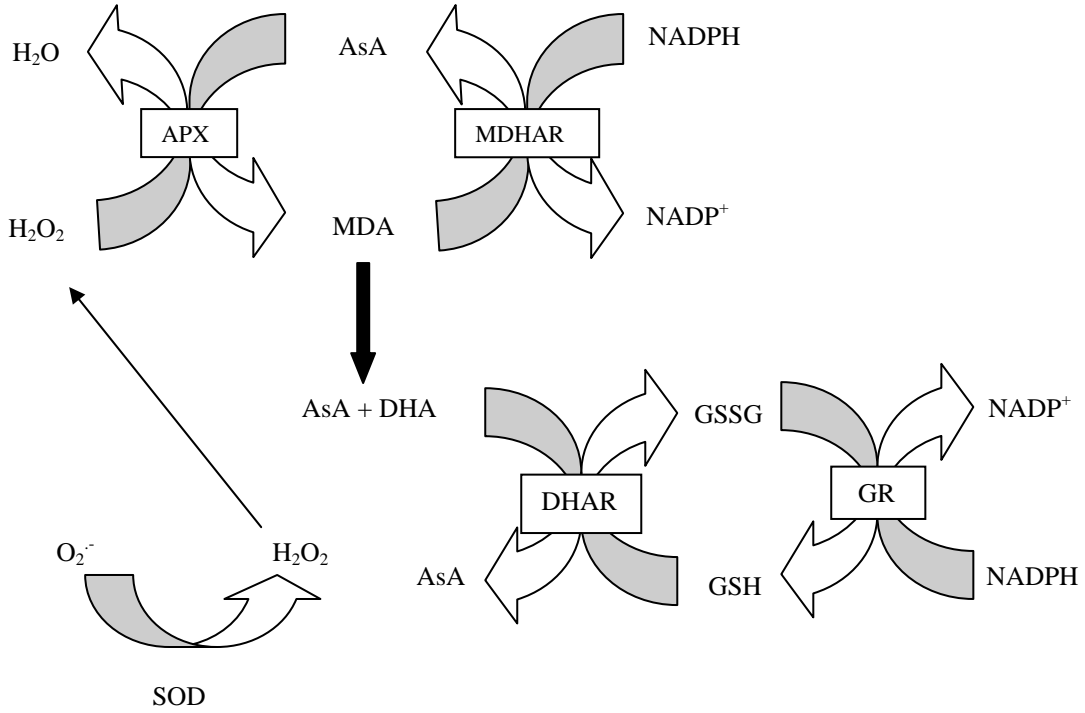
Serbest radikaller, membran lipid ve proteinlerinin geri dönüşümsüz şekilde hasara uğramasına neden olur. Reaktif oksijen türleri, kolayca membran lipidlerini etkileyerek doymamış aldehitlerin oluşmasına neden olmaktadır. Stres sonucu oluşan serbest radikallere bağlı doku hasarı oluşumunda en önemli mekanizma hücre zarındaki lipidlerin peroksidasyona uğramasıdır. Oksidantlar, çoklu doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu başlatırlar. Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehid (MDA) hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar. Böylece iyon geçirgenliği ve enzim aktivitesinde değişimler gibi olumsuz sonuçlara neden olur [Niki (1987)].

Lipid peroksidasyonu; membran bütünlüğünün yok olmasına neden olduğu gibi hücrenin elektrolitlere permeabilitesinin artmasını da sağlar. Hücre içine özellikle kalsiyum ve sodyum iyonlarının girişi, hücrenin adenzin tri fosfataz (ATP) tüketen hale gelmesine neden olarak hücrenin enerji oluşturan mekanizmasını etkileyebilir. Kalsiyum iyonlarının hücre içindeki artışı, protein ve lipidlerde daha fazla hasara neden olabilecek proteaz ve fosfolipazı aktive eder. Aynı zamanda DNA'da yapısal hasar ile hücre ölümüne neden olabilecek enzim inaktivasyonuna neden olabilir [Halliwell ve Gutteridge (1985), Cummins et al (1994)].

Bitkiler hücrelerini ve hücrenel bileşenlerini oksidatif stresten kaynaklanan zararlı etkilere karşı, antioksidant sistemin enzimatik ve enzimatik olmayan elemanları ile korumaya çalışırlar [Halliwell (1987)]. Antioksidant sistemin enzimatik olmayan elemanları glutatyon, askorbik asit (C vitamini), α – tokoferol (E vitamini) ve karotenoidlerden oluşur [Kacar ve arkadaşları (2006)]. Süperoksit radikalinin

hidrojen perokside dönüşümünü sağlayan süperoksit dismutaz (SOD) ve hidrojen peroksidin suya dönüşümünü sağlayan askorbat peroksidaz (APX) ve katalaz (CAT) gibi enzimler ile askorbat – glutatyon döngüsünde yer alan monodehidro askorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimler antioksidant savunma sisteminin enzimatik bileşenleri arasındadır. Süperoksit dismutaz ve askorbat peroksidazın izoformları bitki hücrelerinde kloroplast, mitokondri, peroksizomlar, sitoplazma ve apoplast gibi çok farklı organel ve bölgelerde bulunmasına rağmen, katalaz çok büyük oranda sadece peroksizomlarda yer almaktadır [Mittler (2002)].

Bitki hücrelerindeki antioksidant savunma sistemi karmaşık bir yapıya sahiptir. Süperoksit dismutaz süperoksit radikalinin H_2O_2 ' ye dismutasyonunu katalizleyen ve metaloenzim ailesine ait bir enzimdir. Demir SOD (FeSOD), Mangan SOD (MnSOD) ve Bakır – Çinko SOD (Cu – Zn SOD) olmak üzere üç farklı izoenzime sahip olan süperoksit dismutazdan; FeSOD kloroplastlarda, MnSOD mitokondri ve peroksizomlarda ve Cu – Zn SOD kloroplast ve sitoplazmada yer almaktadır [Alscher et all (2002)]. Bitki hücrelerinde H_2O_2 düzeyinin hassas bir şekilde ayarlanması askorbat – glutatyon döngüsünün enzimleri ve metabolitleri ile sağlanmaktadır [Shigeoka et all (2002)]. H_2O_2 'nin hücrede birikimi katalaz veya askorbat – glutatyon döngüsü ile önlenir [Dixit et all 2001]. Askorbat peroksidaz, askorbat – glutatyon döngüsünde hidrojen peroksidi suya indirgemekte görevlidir. Monodehidro askorbat redüktaz indirgeyici molekül olarak NADPH'yi ve dehidroaskorbat redüktaz ise glutatyonu kullanmak suretiyle askorbatın rejenerasyonunu sağlar. Aktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olan Haber – Weiss veya Fenton reaksiyonlarında rol oynayan metal iyonlarının, bitki hücrelerindeki miktarının kontrol altında tutulması, aktif oksijen türlerinin oluşumunun regüle edilmesini sağlayan önemli bir faktördür [Mittler (2002)] [Şekil 2.5].



Şekil 2.5. Askorbat – glutasyon döngüsü ($O_2^{\cdot-}$, süperoksit radikali; SOD, süperoksit dismutaz; H_2O_2 , hidrojen peroksit; APX, askorbat peroksidaz; AsA, askorbik asit; MDA, monodehidroaskorbik asit; MDHAR, monodehidro askorbat redüktaz; DHA, dehidroaskorbik asit; DHAR, dehidroaskorbat redüktaz; GSSG, okside glutasyon; GSH, indirgenmiş glutasyon; GR, glutasyon redüktaz) [Doğru (2006)]

Antioksidant enzim aktivitelerindeki değişimler farklı bitki türlerinin çeşitli stres faktörlerine duyarlılık ve dayanıklılık derecelerinin belirlenmesinde fikir vermektedir [Foyer et all (1994)]. Bundan dolayı stres altındaki bitkilerin antioksidant enzim aktivitelerinin incelenmesi önemlidir.

Bu çalışmanın amacı, arpa bitkisinin farklı çeşitlerinin ağır metal stresine (Cd ve Pb) karşı duyarlılık ve dayanıklılık derecesinin araştırılması ve ağır metal stresi altında sergiledikleri metabolik değişimleri bazı fizyolojik kriterlerle vasıtasıyla incelemektir. Elde edilen sonuçlarla üreticiye ağır metal stresine daha dayanıklı çeşitlerin yetiştirilmesi konusunda yol gösterilebileceği gibi, ıslah çalışmalarında kullanılacak yeni gen kaynaklarının belirlenmesi de mümkün olabilecektir.

BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOD

3. 1. Bitki Materyali

Araştırmada kullanılan arpa (*Hordeum vulgare* L.) tohumları Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Çalışmada Tarm – 92 ve Tokak 157/37 çeşitlerine ait tohumlar kullanılmıştır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Tohum kabuk sterilizasyonu

Eşit büyüklükte ve sağlam olan tohumlar seçilerek kabuk sterilizasyonunu sağlamak amacıyla % 5'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltisinde 30 dakika bekletilmiş ve üç kez distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra tohumlar, imbibisyon işlemi için 16 saat distile suda bekletilmiştir.

3.2.2. Ekim yöntemi

İmbibisyon işleminden sonra tohumlar, eşit miktarda (80 gr) perlit içeren 17 x 14 cm (üst çap x yükseklik) ebatlarındaki plastik saksılara ekilmiştir. Çalışmada yetiştirme ortamı olarak tarımsal perlit kullanılmıştır. Saksıların dibine perlit konulmadan önce yetiştirme ortamının akması amacıyla filtre kağıdı yerleştirilmiştir. Bitkiler sera

ortamında 32 gün boyunca büyütülmüştür. Bu süre boyunca bitkiler ½ oranında sulandırılmış Hoagland besin çözeltisi ile sulanmıştır (Hoagland besin çözeltisinin içeriği tablo 3. 1 'de verilmiştir). 32 günlük olan bitkiler kontrol ve stres grupları olarak ayrılmıştır. Kontrol grubunda bulunan bitkiler denemenin sonuna kadar tarla kapasitesine uygun olarak ½ oranında sulandırılmış Hoagland besin çözeltisi ile sulanırken, stres grubundaki bitkiler 1 ve 1,5 mM CdNO₃ ile 10 ve 15 mM PbNO₃ ile 3 kez sulanmıştır. 6. günün sonunda hasat yapılmıştır. Denemenin devam ettirildiği 38 gün boyunca sera ortamının sıcaklığı günlük ortalama 23 °C iken, oransal nem miktarı ise % 50-55 arasında değişmiştir. Her iki grupta bulunan bitkilerin yaprak dokularında bazı fizyolojik ve biyokimyasal analizler yapılarak, ağır metal stresinin bazı metabolik olaylarda neden olduğu değişimler incelenmiştir.

Tablo 3.1. Hoagland besin çözeltilisi [Hoagland (1920)]

	Stok Çözeltiler	½ Hoagland Besin Çözeltilisi
Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	118.1 g/ 1000 ml	50 ml / 20 lt
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	26.6 g/1000ml	
K ₂ HPO ₄ . 3 H ₂ O	16.4 g/1000 ml	
KNO ₃	50.4 g/1000ml	
Al ₂ (SO ₄) ₃ . 18 H ₂ O	0,105 g/ 25 ml	37,5 µl/ 20 lt
KI	0,0139 g/ 25 ml	
KBr	0,0139 g/ 25 ml	
SnCl ₂ . 2 H ₂ O	0,0139 g/ 25 ml	
LiCl	0,0139 g/ 25 ml	
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	0,1944 g/ 25 ml	
H ₃ BO ₃	0,3055 g/ 25 ml	
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0,0494 g/ 25 ml	
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,6277 g/ 25 ml	
NiSO ₄ . 7 H ₂ O	0,0297 g/ 25 ml	
Co(NO ₃) ₂ . H ₂ O	0,0277 g/ 25 ml	
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,0834g/ 100 ml	10 ml/20lt
C ₄ H ₆ O ₆	0,0450 g/ 100 ml	

3.3. Ölçüm ve Analizler

3.3.1. Yaprak dokularındaki fotosentetik pigment miktarının belirlenmesi

Yaprak dokularındaki klorofil a ve b, toplam klorofil (klo a+b) ve karotenoid (ksantofil + β -karoten) miktarları Lichtenthaler (1987)'e göre belirlenmiştir. Buna göre taze yaprak dokularından alınan örnekler cam deney tüpüne alınarak üzerine 3 ml saf aseton ilave edilmiştir. Pigmentler yaprak dokusundan çözeltiye geçinceye kadar buzdolabında (+4 °C) beklemeye bırakılmıştır. 4100 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen özütlerin absorbans değerleri 661.1, 644.8 ve 470 nm'de spektrofotometrik (SHIMADZU, UV mini 1240 UV-VIS Spectrophotometer) olarak belirlenmiştir. Pigment miktarları aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır (Lichtenthaler (1987):

$$\text{Klorofil a (Klo a)} = (11.24 \times A_{661.6}) - (2.04 \times A_{644.8})$$

$$\text{Klorofil b (Klo b)} = (20.13 \times A_{644.8}) - (4.19 \times A_{661.6})$$

$$\text{Toplam Klorofil (Klo a+b)} = (7.05 \times A_{661.6}) + (18.09 \times A_{644.8})$$

$$\text{Karotenoid (x+c)} = [(1000 \times A_{470}) - (1.9 \times \text{Klo a}) - (63.14 \times \text{Klo b})] / 214$$

3.3.2. Yaprak dokularındaki toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi

Yaprak dokularındaki toplam fenolik madde miktarı Chandler and Dodds (1983) tarafından geliştirilen metoda göre belirlenmiştir. Buna göre taze yaprak örneklerinden alınan 0,1 gr'lık dokular % 80'lik 5 ml metil alkol ile öğütülmüştür. 48 saat buzdolabında (+4 °C) bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda homojenatlar 4000 rpm' de 20 dk santrifüj edilmiştir. 1000 μ l süpernatant üzerine sırasıyla 5 ml distile su, 400 μ L % 50'lik Folin Ciocalteu's Reagent (FCR) ve 1000 μ l % 5'lik sodyum

karbonat (Na_2CO_3) eklenerek hazırlanan reaksiyon karışımı, oda sıcaklığında bir saat bekletildikten sonra vortekslenerek, karışımların absorbans değerleri, 725 nm dalga boyunda spektrofotometrik (SHIMADZU UV mini 1240 UV-VIS Spectrophotometer) olarak belirlenmiştir. Yaprak dokularındaki toplam fenolik madde miktarları, gallik asitle hazırlanan standart grafik yardımıyla hesaplanmıştır.

3.3.3. Yaprak dokularında malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi

Yaprak dokularındaki lipid peroksidasyonunu belirlemek için malondialdehit (MDA) miktarı Ohkawa ve arkadaşları (1979)'nin metodu kullanılarak saptanmıştır. Kontrol ve ağır metal stresine maruz bırakılmış bitki yapraklarından alınan yaklaşık 0,3 g taze yaprak örneği küçük parçalara ayrıldıktan sonra 6 mL %5 trikloroasetik asit (TCA) ile havanda dövülerek homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sırasında ve sonrasında numunelerin soğuk tutulmasına dikkat edilmiştir. Bu karışım $+4^\circ\text{C}$ 'de 4100 rpm'de 20 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatanttan 0,5 ml alınarak yeni tüplere, içinde % 0.5 tiobarbütirik asit (TBA) bulunan %20'lik TCA çözeltisinden 1 ml ve 0,1 M 0,5 ml Tris tamponu (pH 7,6) eklenmiş, daha sonra 95°C 'de 60 dakika su banyosunda tutulmuştur. Su banyosundan çıkarılan tüplerdeki reaksiyonları durdurmak için tüpler buz banyosuna konulmuştur. Spektrofotometrede (SHIMADZU UV mini 1240 UV-VIS Spectrophotometer) 532 ve 600 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. Kör olarak içinde % 0.5 TBA bulunan %20'lik TCA çözeltisi kullanılmıştır. Yaprak dokularındaki MDA miktarı aşağıdaki formüle göre nmol.g TA^{-1} olarak hesaplanmıştır:

$$\text{MDA içeriği} = [(A_{532} - A_{600}) \times \text{ekstraksiyon hacmi}] / [155 \times \text{örnek miktarı}]$$

3.3.4. Yaprak dokularında hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi

Yaprak dokularındaki hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarı Ohkawa ve arkadaşları (1979)'nin metodu kullanılarak saptanmıştır. Kontrol ve ağır metal stresine maruz bırakılmış bitki yapraklarından alınan yaklaşık 0,3 g taze yaprak örneği küçük parçalara ayrıldıktan sonra 6 mL %5 trikloroasetik asit (TCA) ile havanlarda dövülerek homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sırasında ve sonrasında numunelerin soğuk tutulmasına dikkat edilmiştir. Bu karışım +4°C'de 4100 rpm'de 20 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatanttan 0,5 ml alınarak yeni tüplere, içinde 0,1 M 0,5 ml Tris tamponu (pH 7,6) ve 1 M 1ml potasyum iyodür (KI) eklenmiştir. Spektrofotometrede (SHIMADZU UV mini 1240 UV-VIS Spectrophotometer) 390 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. Kör olarak % 0.1'lik TCA çözeltisi kullanılmıştır. Yaprak dokularındaki hidrojen peroksit miktarı standart grafik yardımıyla nmol.g TA⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

3. 4. Bazı Antioksidant Enzim Aktivitelerinin Belirlemesi

3. 4. 1. Toplam askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin belirlenmesi (EC 1. 11. 1. 11)

Toplam APX aktivitesi Wang et all (1991)'a göre belirlenmiştir. Yaklaşık 0.2 g taze yaprak dokusu, sıvı azotla öğütülmüş ve 1.5 ml, 50 mM Tris-HCl (pH 7.2), % 2'lik PVP, 1 mM Na₂EDTA ve 2 mM askorbat içeren ekstraksiyon çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Homojenat, 12.000 rpm ve +4 °C'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Son hacim 1000 µl olacak şekilde 50 mM K-PO₄ tamponu (pH 6.6), 2.5 mM askorbat, 10 mM H₂O₂ ve 100 µg protein içeren enzim karışımından oluşan reaksiyon çözeltisi hazırlanmıştır. Reaksiyon, H₂O₂'nin eklenmesiyle başlatılmıştır. Askorbat konsantrasyonundaki azalma, spektrofotometrede (SHIMADZU, UV mini 1240 UV-VIS Spectrophotometer) 290 nm'de yapılan okumalarla enzim özütü

içermeyen reaksiyon çözeltisine karşılık kaydedilmiştir. Enzim aktivitesi, askorbatın ekstinksiyon katsayısı (2.8 mM/cm.290 nm) kullanılarak reaksiyonun başlangıç hızından hesaplanmıştır (nmol askorbat/dakika/mg protein).

3. 4. 2. Toplam glutatyon redüktaz (GR) aktivitesinin belirlenmesi (1. 6. 4. 2)

Toplam GR aktivitesi Sgherri et al. (1994)'ye göre belirlenmiştir. Yaklaşık 0.2 g taze yaprak dokusu, sıvı azotla öğütülmüş ve 1.5 ml, 100 mM K-PO₄ (pH 7.0), % 2'lik PVP ve 1 mM Na₂EDTA içeren ekstraksiyon çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Homojenat, 14.000 rpm ve +4 °C'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Son hacim 1000 µl olacak şekilde 100 mM K-PO₄ tamponu (pH 7.8), 2 mM Na₂EDTA, 0.5 mM okside glutatyon (GSSG), 0.2 mM NADPH ve 100 µg protein içeren enzim karışımından oluşan reaksiyon çözeltisi hazırlanmıştır. Reaksiyon, NADPH'nin eklenmesiyle başlatılmıştır. Enzim aktivitesi spektrofotometrik (SHIMADZU, UV mini 1240 UV-VIS Spectrophotometer) olarak 340 nm'de yapılan okumalarla ölçülmüştür. Düzeltme, NADPH yokluğunda GSSG oksidasyonu ile yapılmıştır. Enzim aktivitesi, NADPH'nin ekstinksiyon katsayısı (6.2 mM/cm. 340 nm) kullanılarak reaksiyonun başlangıç hızından hesaplanmıştır (nmol NADPH/dakika/mg protein).

3. 4. 3. Toplam guaiakol peroksidaz (GPOD) aktivitesinin belirlenmesi (1. 11. 1. 7)

Toplam GPOD aktivitesi Sanchez-Romero (1993)'e göre belirlenmiştir. Yaklaşık 0.2 g taze yaprak dokusu, sıvı azotla öğütülmüş ve 1.5 ml, 100 mM K-PO₄ (pH 7.0), % 2'lik PVP ve 1 mM Na₂EDTA içeren ekstraksiyon çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Homojenat, 14.000 rpm ve +4 °C'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Son hacim 3180 µl olacak şekilde 100 mM K-PO₄ tamponu (pH 7.0), 0.316 mM guaiakol, 0.116 mM H₂O₂ ve 100 µl enzim karışımından oluşan reaksiyon çözeltisi

hazırlanmıştır. Reaksiyon, H₂O₂'nin eklenmesiyle başlatılmıştır. Enzim aktivitesi spektrofotometrik (SHIMADZU, UV mini 1240 UV-VIS Spectrophotometer) olarak 470 nm'de yapılan okumalarla ölçülmüş ve guaiakol'ün ekstinksiyon katsayısı (26.6 mM/cm. 470 nm) kullanılarak reaksiyonun başlangıç hızından hesaplanmıştır (nmol H₂O₂/dakika/mg protein).

3. 5. İstatiksel Analizler

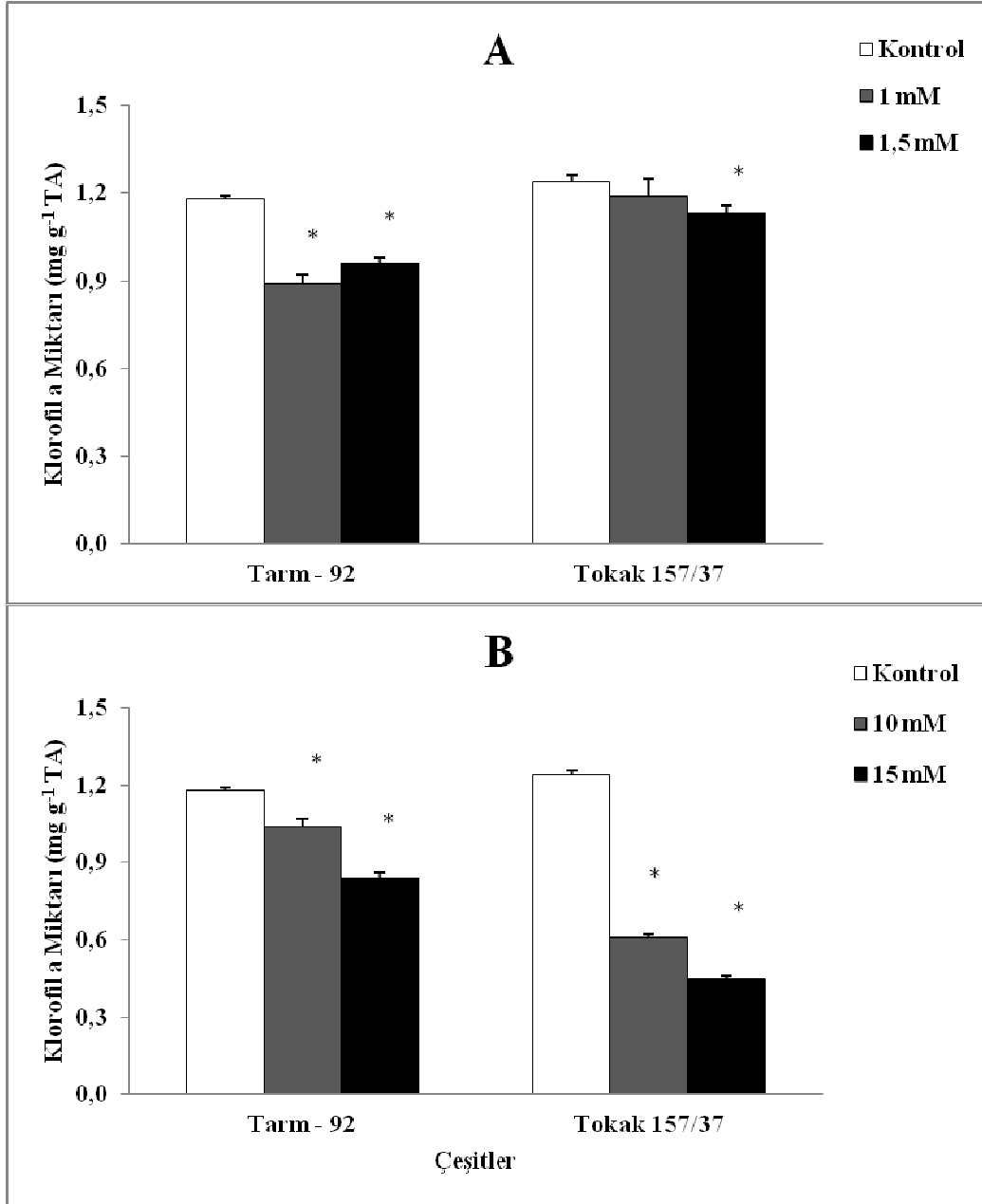
Denemelerden elde edilen verilere, SPSS paket programı kullanılarak, istatistiki varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Her bir bağımsız değişken için uygulama ve çeşitler arasındaki farkın önem kontrolü Anlamlı Önemli Fark (AÖF) % 5 düzeyinde hesaplanmıştır.

BÖLÜM 4. BULGULAR

4.1. Ağır Metal Stresinin Klorofil a Miktarı Üzerine Etkisi

Kadmiyum ve kurşun uygulamalarının farklı iki arpa çeşidinin yapraklarındaki klorofil a miktarı üzerine etkisi şekil 4. 1'de görülmektedir. Kadmiyum uygulaması her iki çeşidin yapraklarındaki klorofil a miktarının azalmasına neden olmuştur (Şekil 4. 1A). Ancak Tarm – 92'de 1 mM ve 1,5 mM, Tokak 157/37'de 1,5 mM'lık kadmiyum uygulamasının, yapraklardaki klorofil a miktarını kontrole göre önemli derecede azalttığı bulunmuştur ($p < 0.05$). Tokak 157/37'de 1 mM'lık kadmiyum uygulamasının yapraklardaki klorofil a miktarını önemli derecede etkilemediği belirlenmiştir ($p > 0.05$).

Kurşun uygulamasının iki farklı arpa çeşidinin yapraklarındaki klorofil a miktarındaki değişimler üzerine etkisi şekil 4. 1B'de görülmektedir. Her iki çeşit için de artan dozda uygulanan kurşun yapraklardaki klorofil a miktarını azaltmıştır. Bu azalmalar önemli bulunmuştur ($p < 0.05$).



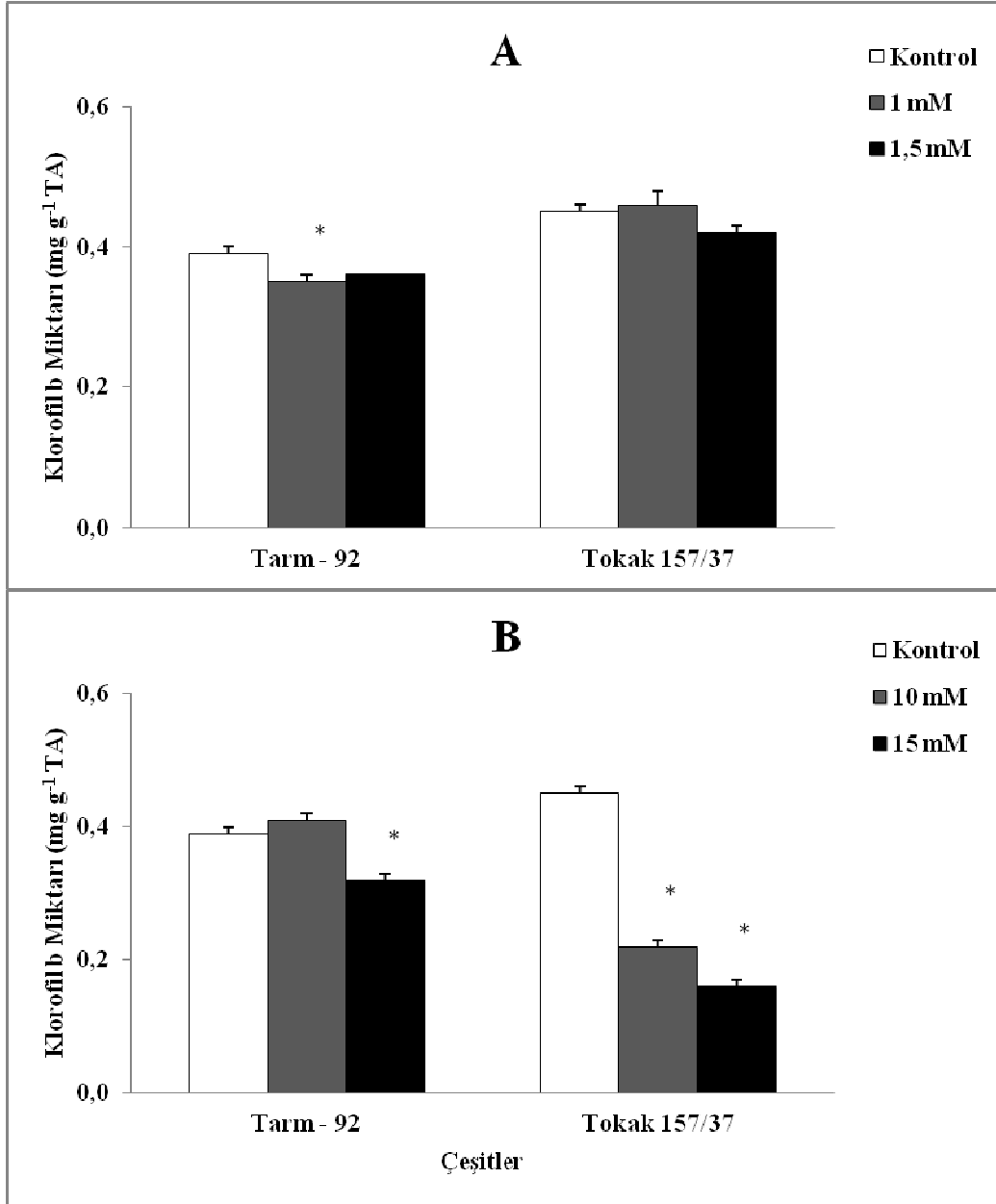
Şekil 4.1. Farklı iki arpa çeşidinin yapraklarındaki klorofil a miktarı üzerine kadmiyum (A) ve kurşunun (B) etkileri (* : Ağır metal uygulamaları ile kontrol değerleri arasındaki farkın $P < 0.05$ seviyesinde önemli olduğunu ifade etmektedir. Değerler 3 tekrarın ortalaması olup, barlar \pm standart hata değerlerini göstermektedir)

4.2. Ağır Metal Stresinin Klorofil b Miktarı Üzerine Etkisi

Tarm – 92 ve Tokak 157/37 çeşitlerinde kadmiyum uygulamaları sonucu yapraklarındaki klorofil b miktarlarında meydana gelen değişimler şekil 4. 2A'da görülmektedir. Tarm – 92 için 1 mM'lık uygulama yapraklarındaki klorofil b

miktarını azaltmış ve bu azalma önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Ancak 1,5 mM'lık kadmiyum uygulaması yapraklarındaki klorofil b miktarını artırırken bu fark önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). Tokak 157/37 genotipinde 1 mM'lık kadmiyum uygulaması sonucu yapraklardaki klorofil b miktarı artarken, 1,5 mM'lık kadmiyum konsantrasyonu klorofil b miktarını kontrole göre azaltmıştır. Tokak 157/37 genotipinde ise klorofil b miktarında meydana gelen değişimler kontrole göre önemli bulunmamıştır ($p>0.05$) (Şekil 4. 2A).

10 mM'lık kurşun uygulamasının, Tarm – 92'de klorofil b miktarını, istatistiksel anlamda etkilemediği ($p>0.05$) görülmektedir (Şekil 4. 2B). Ancak Tarm – 92'de 15 mM'lık, Tokak 157/37'de ise 10 ve 15 mM'lık kurşun uygulamaları sonucu yapraklardaki klorofil b miktarının kontrole göre önemli ($p<0.05$) bir azalış sergilediği görülmektedir.



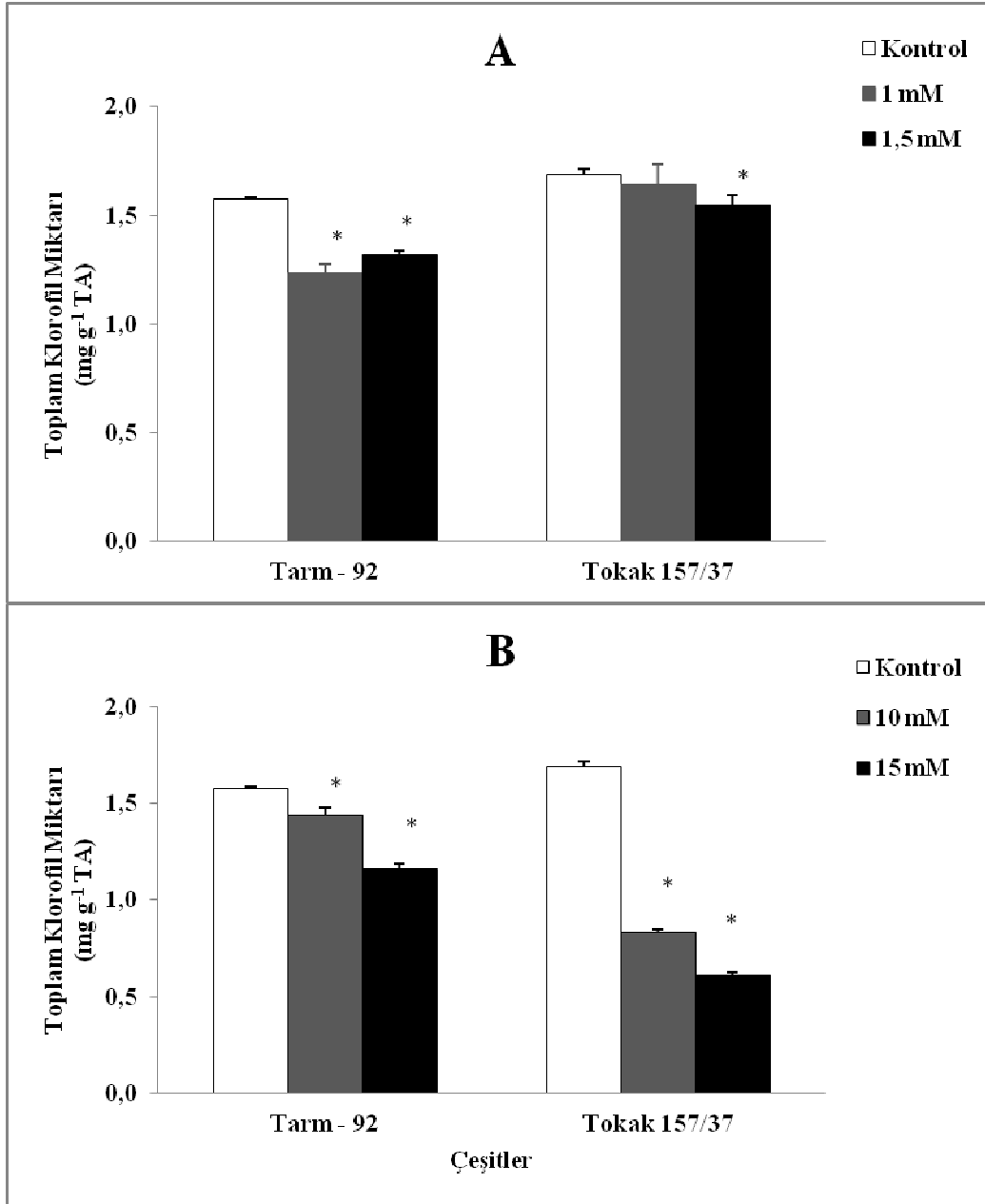
Şekil 4.2. Farklı iki arpa çeşidinin yapraklarındaki klorofil b miktarı üzerine kadmiyum (A) ve kurşunun (B) etkileri (* : Ağır metal uygulamaları ile kontrol değerleri arasındaki farkın $P < 0.05$ seviyesinde önemli olduğunu ifade etmektedir. Değerler 3 tekrarın ortalaması olup, barlar \pm standart hata değerlerini göstermektedir)

4.3. Ağır Metal Stresinin Toplam Klorofil Miktarı Üzerine Etkisi

Kadmiyum uygulamasının toplam klorofil miktarı üzerine etkisine bakıldığında çeşitler arasında farklılıklar göze çarpmaktadır (Şekil 4. 3A). Uygulanan her iki kadmiyum konsantrasyonunu da, Tarm – 92 genotipinin yapraklarındaki toplam

klorofil miktarında kontrole göre önemli azalmaya neden olurken ($p<0.05$), Tokak 157/37 genotipinde sadece 1.5 mM'lık kadmiyum uygulaması yapraklardaki toplam klorofil miktarını önemli oranda azaltmıştır ($p<0.05$).

Kurşun uygulamasının toplam klorofil miktarı üzerindeki etkisine genel olarak bakıldığında ise (Şekil 4. 3B), iki genotipte de artan kurşun konsantrasyonuna paralel olarak toplam klorofil miktarının kontrole göre önemli derecede azaldığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Ayrıca kontrole göre gerçekleşen bu azalma oranının, Tokak 157/37 genotipinde daha belirgin olduğu da görülmektedir.



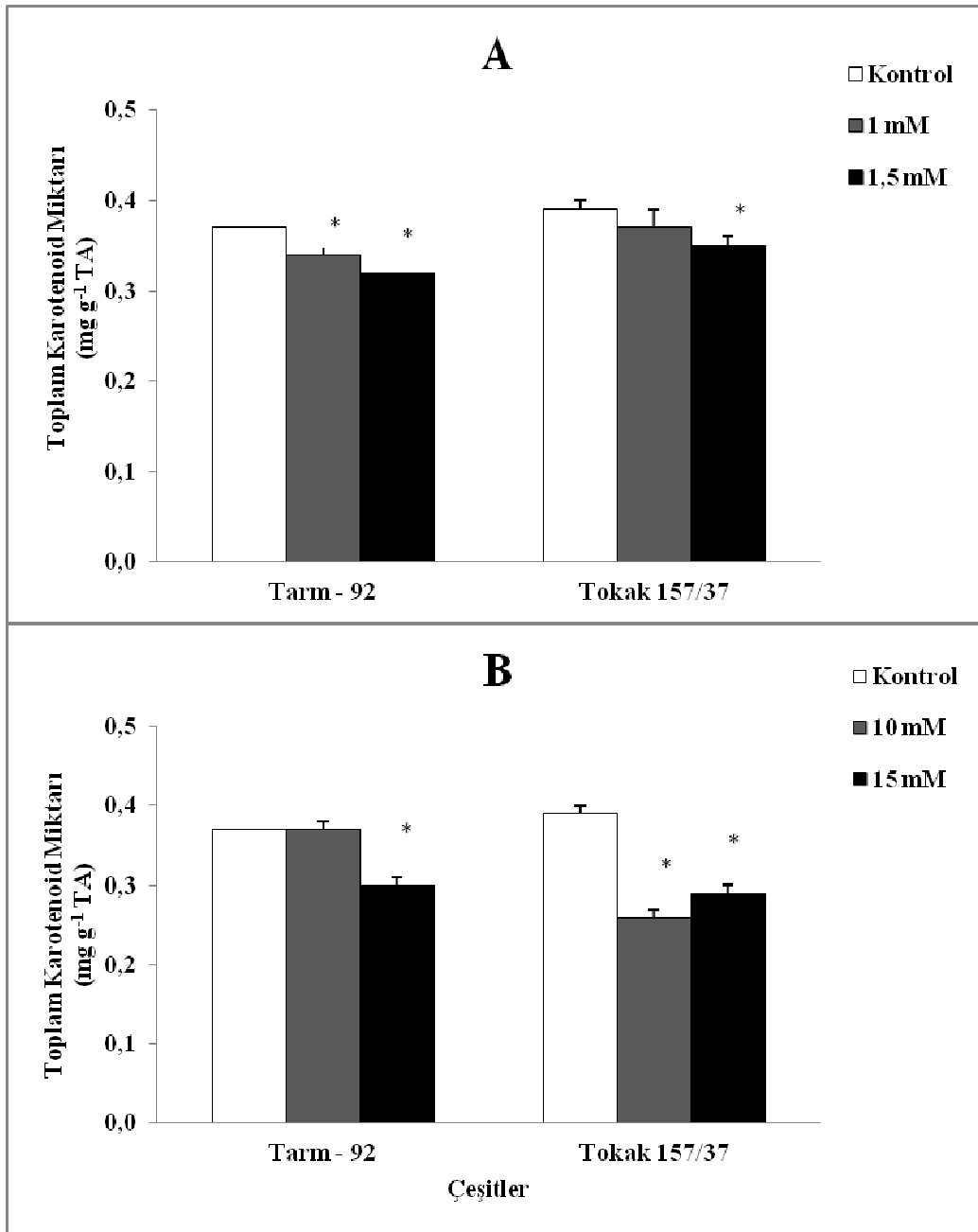
Şekil 4.3. Farklı iki arpa çeşidinin yapraklarındaki toplam klorofil miktarı üzerine kadmiyum (A) ve kurşunun (B) etkileri (* : Ağır metal uygulamaları ile kontrol değerleri arasındaki farkın $P < 0.05$ seviyesinde önemli olduğunu ifade etmektedir. Değerler 3 tekrarın ortalaması olup, barlar \pm standart hata değerlerini göstermektedir)

4.4. Ağır Metal Stresinin Toplam Karotenoid Miktarı Üzerine Etkisi

Kadmiyum uygulamasına maruz kalmış iki farklı arpa çeşidinin yapraklarındaki toplam karotenoid miktarındaki değişimler şekil 4. 4A'da görülmektedir. Her iki çeşit için de kadmiyum uygulaması yapraklardaki toplam karotenoid miktarında bir

azalmaya neden olmuştur. Tokak 157/37 genotipi için 1 mM'lık kadmiyum uygulaması hariç, diğer değişimlerin tümü istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Kurşuna maruz kalmış Tarm – 92 ve Tokak 157/37 arpa çeşitlerinin yapraklarındaki toplam karotenoid miktarı şekil 4. 4B'deki gibi değişim göstermektedir. Buna göre, Tarm-92'de sadece 15 mM'lık, Tokak 157/37'de ise her iki kurşun konsantrasyonu yapraklardaki toplam karotenoid miktarında kontrole göre önemli azalmalara neden olmuştur ($p<0.05$).



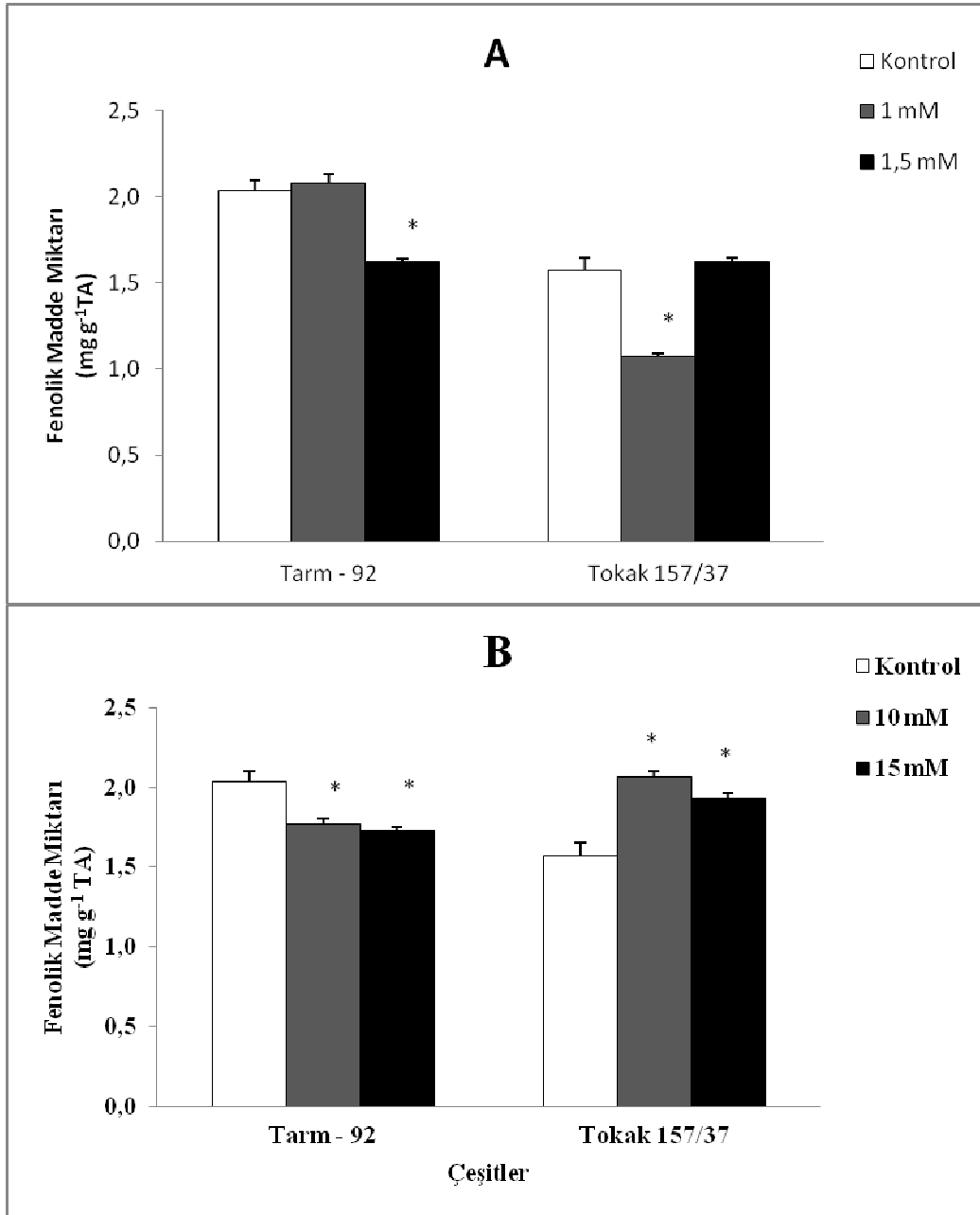
Şekil 4.4. Farklı iki arpa çeşidinin yapraklarındaki toplam karotenoid miktarı üzerine kadmiyum (A) ve kurşunun (B) etkileri (* : Ağır metal uygulamaları ile kontrol değerleri arasındaki farkın $P < 0.05$ seviyesinde önemli olduğunu ifade etmektedir. Değerler 3 tekrarın ortalaması olup, barlar \pm standart hata değerlerini göstermektedir)

4.5. Ağır Metal Stresinin Toplam Fenolik Madde Miktarı Üzerine Etkisi

Kadmiyum ve kurşun uygulanmış iki farklı arpa çeşidinin yapraklarındaki toplam fenolik madde miktarındaki değişimler şekil 4. 5'de görülmektedir. 1 mM'lık

kadmiyum uygulaması Tarm – 92 genotipinde yapraklardaki toplam fenolik madde miktarını etkilemezken, 1.5 mM'lık kadmiyum uygulaması kontrole göre önemli derecede azaltmıştır ($p<0.05$). Tokak 157/37'de ise 1 mM'lık kadmiyum uygulaması sonucu toplam fenolik madde miktarı kontrole göre önemli derecede azalma göstermiş, ancak 1.5 mM'lık kadmiyum uygulaması toplam fenolik madde miktarının kontrol bitkilerindeki seviyeye çıkmasına yol açmıştır (Şekil 4. 5A).

Genel olarak kurşun uygulanmış arpa çeşitlerinin yapraklarındaki toplam fenolik madde miktarına bakıldığında, Tarm – 92 genotipinde artan kurşun konsantrasyonu ile birlikte düzenli bir azalma göze çarpmaktadır. Bu azalma her iki kurşun konsantrasyonu için istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Tokak 157/37 genotipinde ise kurşun uygulamaları yapraklarındaki toplam fenolik madde miktarını kontrole göre önemli derecede artırmıştır ($p<0.05$) (Şekil 4. 5B).



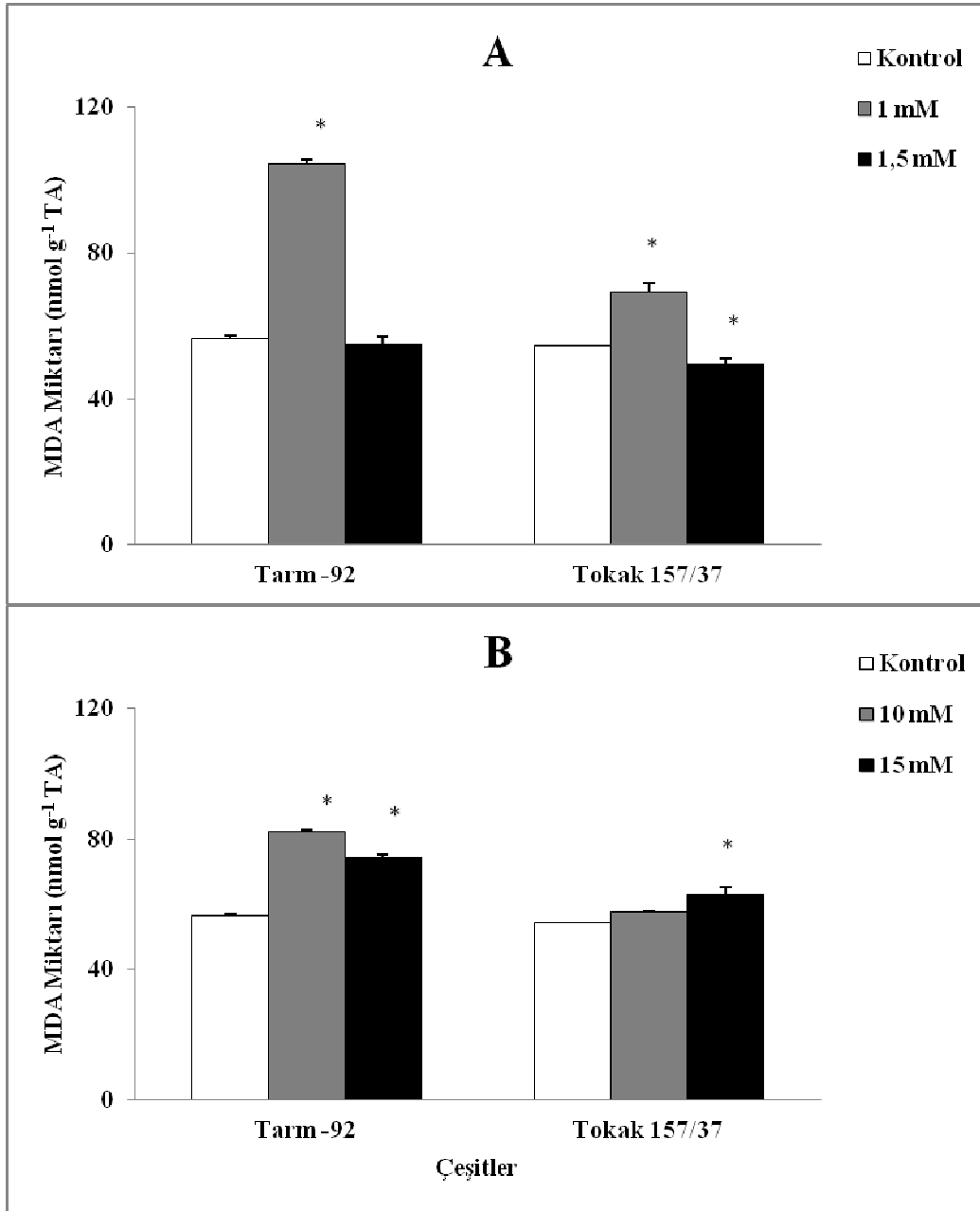
Şekil 4.5. Farklı iki arpa çeşidinin yapraklarındaki toplam fenolik madde miktarı üzerine kadmiyum (A) ve kurşunun (B) etkileri (* : Ağır metal uygulamaları ile kontrol değerleri arasındaki farkın $P < 0.05$ seviyesinde önemli olduğunu ifade etmektedir. Değerler 3 tekrarın ortalaması olup, barlar \pm standart hata değerlerini göstermektedir)

4.6. Ağır Metal Stresinin Malondialdehit (MDA) Miktarı Üzerine Etkisi

Ağır metal stresinin farklı iki arpa çeşidinin hücrel membranlarında neden olduğu hasarın derecesi, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit miktarında

meydana gelen değişimler vasıtasıyla araştırılmıştır. Sonuçlar şekil 4. 6'da görölmektedir. Her iki genotipte de 1 mM'lık kadmiyum uygulaması yapraklardaki malondialdehit miktarını kontrole göre önemli şekilde artırmıştır ($p<0.05$). yine her iki genotipte 1,5 mM'lık kadmiyum uygulaması sonucu yapraklardaki malondialdehit miktarı, hem kontrole hem de 1 mM'lık kadmiyum uygulamasına göre bir azalma göstermiş ve sadece Tokak 157/37'deki azalma istatistiksel anlamda kontrole göre önemli bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 4. 6A).

Kurşun uygulamaları ise iki arpa genotipinde de yapraklardaki malondialdehit miktarı kontrole göre artırmıştır (Şekil 4. 6B). Tarm-92'de 10 ve 15 mM'lık, Tokak 157/37'de ise sadece 15 mM'lık kurşun uygulamasının yapraklardaki MDA miktarını ntrale göre önemli derecede artırdığı belirlenmiştir ($p<0.05$).



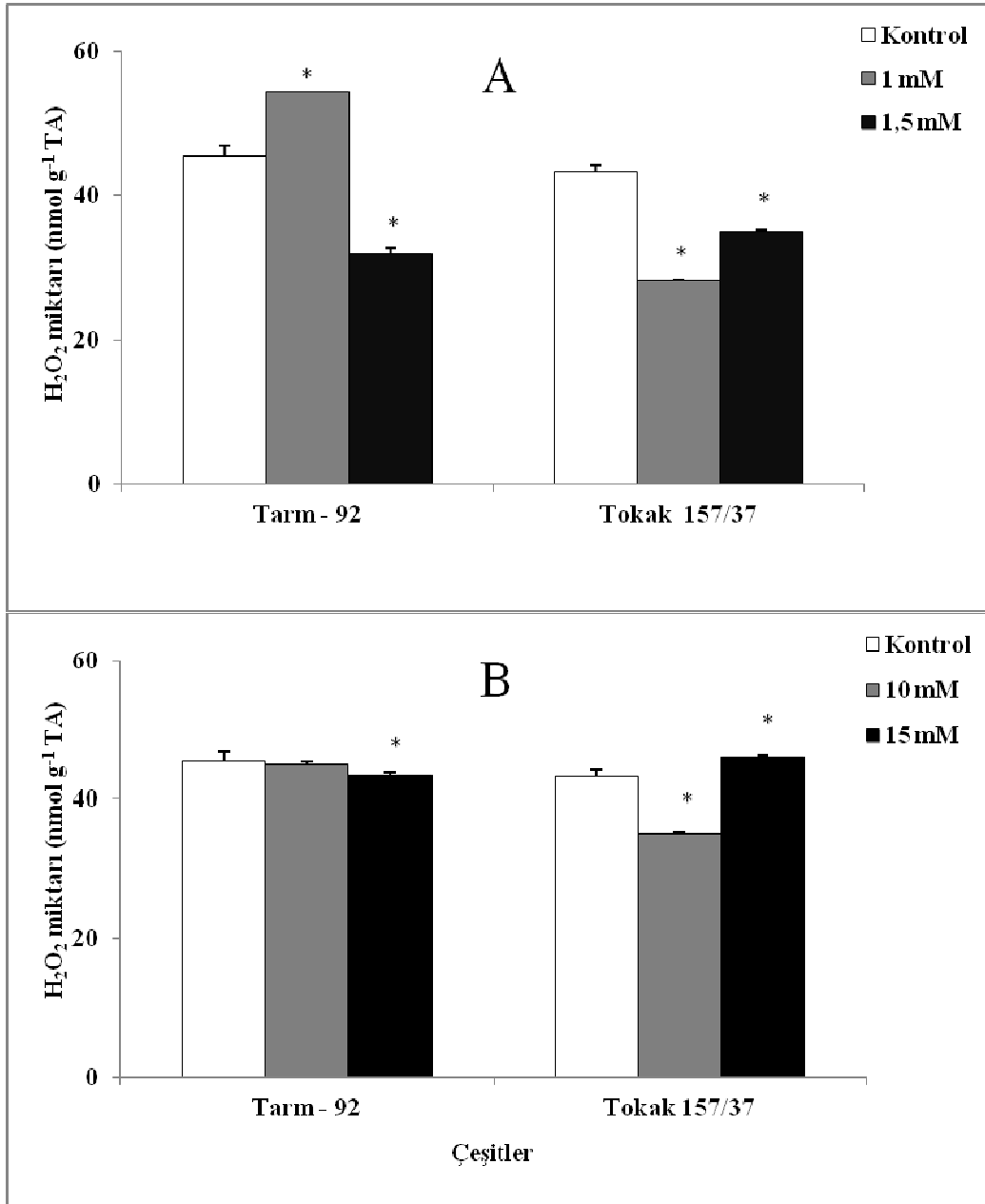
Şekil 4.6. Farklı iki arpa çeşidinin yapraklarındaki malondialdehit (MDA) miktarı üzerine kadmiyum (A) ve kurşunun (B) etkileri (* : Ağır metal uygulamaları ile kontrol değerleri arasındaki farkın $P < 0.05$ seviyesinde önemli olduğunu ifade etmektedir. Değerler 3 tekrarın ortalaması olup, barlar \pm standart hata değerlerini göstermektedir)

4.7. Ağır Metal Stresinin Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Miktarı Üzerine Etkisi

Farklı iki arpa genotipinin yapraklarında, kadmiyum ve kurşun uygulamalarının hidrojen peroksit miktarında neden olduğu değişimler şekil 4. 7'de görülmektedir. Tarm – 92'nin yapraklarındaki hidrojen peroksit miktarı 1 mM'lık kadmiyum

uygulamasý sonucu kontrole göre artmýþ, 1.5 mM'lık uygulama sonucunda ise kontrole göre azalmýþtır. Bu deęiþimlerin tamamý istatistiksel olarak önemli bulunmuþtur ($p<0.05$). Tokak 157/37 genotipinde uygulanan iki farklý kadmiyum konsantrasyonunun yapraklardaki hidrojen peroksit miktarýnÝ kontrole göre önemli derecede azalttýđý gzlenmiþtir($p<0.05$) (Őekil 4. 7A).

Tarm – 92 genotipinde kurþun uygulamaları yapraklardaki hidrojen peroksit miktarýnda düzenli bir azalıþa neden olmuþ ancak sadece. 15 mM'lık kurþun uygulamasý sonucu görülen azalma kontrole göre önemli bulunmuþtur ($p<0.05$). Tokak 157/37 genotipinde ise 10 mM'lık kurþun uygulamasý yapraklardaki hidrojen peroksit miktarýnÝ kontrole göre azaltırken, 15 mM'lık kurþun uygulamasýnda bu miktar artýrmýþtır. Deęiþimlerin tümü önemli bulunmuþtur ($p<0.05$) (Őekil 4. 7B).



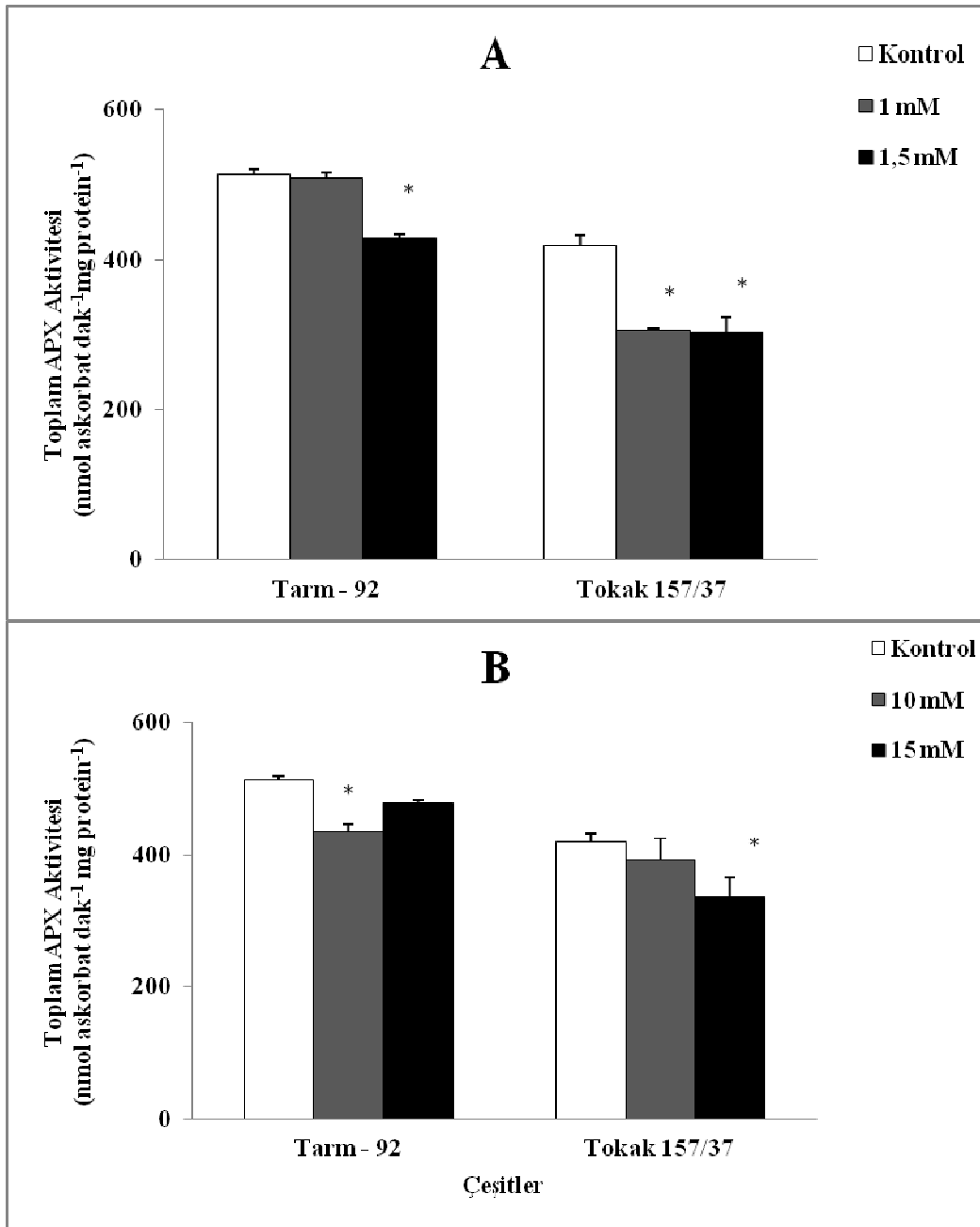
Şekil 4.7. Farklı iki arpa çeşidinin yapraklarındaki hidrojen peroksit miktarı üzerine kadmiyum (A) ve kurşunun (B) etkileri (* : Ağır metal uygulamaları ile kontrol değerleri arasındaki farkın $P < 0.05$ seviyesinde önemli olduğunu ifade etmektedir. Değerler 3 tekrarın ortalaması olup, barlar \pm standart hata değerlerini göstermektedir)

4.8. Ağır Metal Stresinin Toplam Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi Üzerine Etkisi

Kadmiyum ve kurşunun farklı iki arpa genotipinin yapraklarındaki toplam askorbat peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir (Şekil 4. 8). Buna göre, Tarm-92

genotipinin yapraklarındaki toplam askorbat peroksidaz aktivitesinin, sadece 1,5 mM'lık kadmiyum uygulaması sonucu kontrole göre önemli oranda azaldığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Tokak 157/37'de ise her iki kadmiyum konsantrasyonu da toplam askorbat peroksidaz aktivitesini kontrole göre önemli derecede azaltmıştır ($p<0.05$) (Şekil 4. 8A).

Kurşun uygulanmış arpa genotiplerinin yapraklarındaki toplam askorbat peroksidaz aktivitesi genel olarak azalma göstermiştir (Şekil 4. 8B). Tarm – 92 genotipinde iki kurşun konsantrasyonu da yapraklardaki toplam askorbat peroksidaz aktivitesinin kontrole göre azalmasına neden olmuştur. Ancak bunlardan sadece 10 mM'lık konsantrasyonun neden olduğu azalma önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Tokak 157/37'de, kurşun konsantrasyonunun artmasıyla birlikte gözlenen düzenli azalışlardan sadece 15 mM'lık kurşun uygulamasının yapraklardaki toplam askorbat peroksidaz aktivitesini kontrole göre önemli derecede inhibe ettiği bulunmuştur ($p<0.05$).

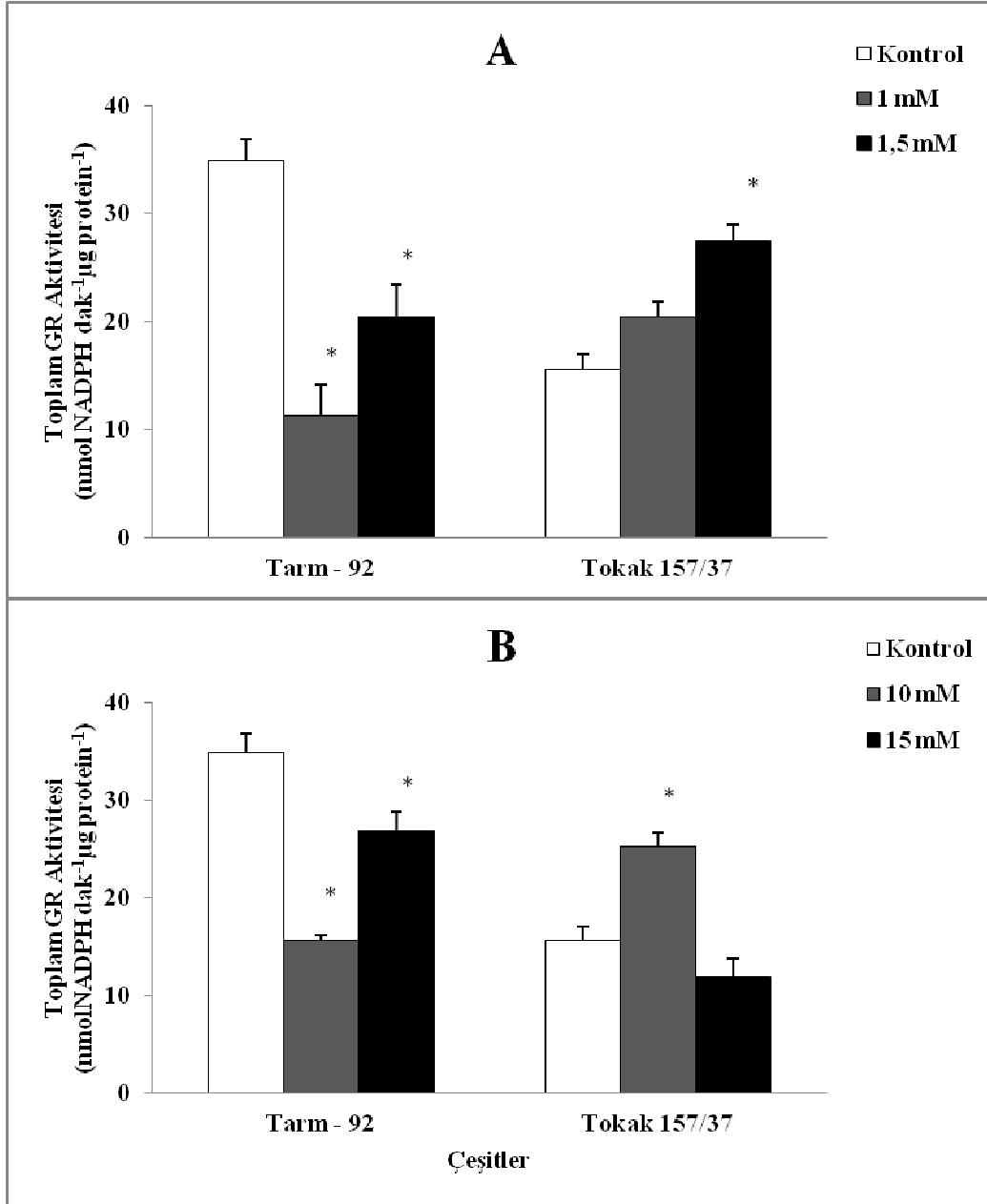


Şekil 4.8. Farklı iki arpa çeşidinin yapraklarındaki askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi üzerine kadmiyum (A) ve kurşunun (B) etkileri (* : Ağır metal uygulamaları ile kontrol değerleri arasındaki farkın $P < 0.05$ seviyesinde önemli olduğunu ifade etmektedir. Değerler 3 tekrarın ortalaması olup, barlar \pm standart hata değerlerini göstermektedir)

4.9. Ağır Metal Stresinin Toplam Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesi Üzerine Etkisi

İki farklı arpa çeşidinin yapraklarındaki toplam glutasyon redüktaz aktivitesinde, kadmiyum ve kurşun uygulamaları sonucu meydana gelen değişimler şekil 4. 9'da görülmektedir. Buna göre, Tarm – 92 genotipinde 1 mM ve 1.5 mM'lık kadmiyum uygulamaları yapraklardaki toplam glutasyon redüktaz aktivitesini, kontrole göre önemli derecede azaltmıştır ($p<0.05$). Tokak 157/37 genotipinde ise uygulanan kadmiyum konsantrasyonuna bağlı olarak artan toplam glutasyon redüktaz aktivitesi, sadece 1.5 mM'lık konsantrasyonda kontrole göre önemli oranda artmıştır ($p<0.05$) (Şekil 4. 9A).

Kurşunun iki farklı arpa çeşidinin yapraklarındaki toplam glutasyon redüktaz aktivitesi üzerine etkisi (şekil 4. 9B) incelendiğinde, Tarm – 92 genotipinde her iki kurşun konsantrasyonunun toplam glutasyon redüktaz aktivitesini kontrole göre önemli derecede azalttığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Tokak 157/37 genotipinde ise 10 mM'lık kurşun uygulaması yapraklardaki toplam glutasyon redüktaz aktivitesinin kontrole göre önemli derecede artırdığı bulunmuştur ($p<0.05$). 15 mM'lık kurşun uygulaması ise yapraklardaki toplam glutasyon redüktaz aktivitesini kontrole göre azaltmış ancak bu azalma istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$).



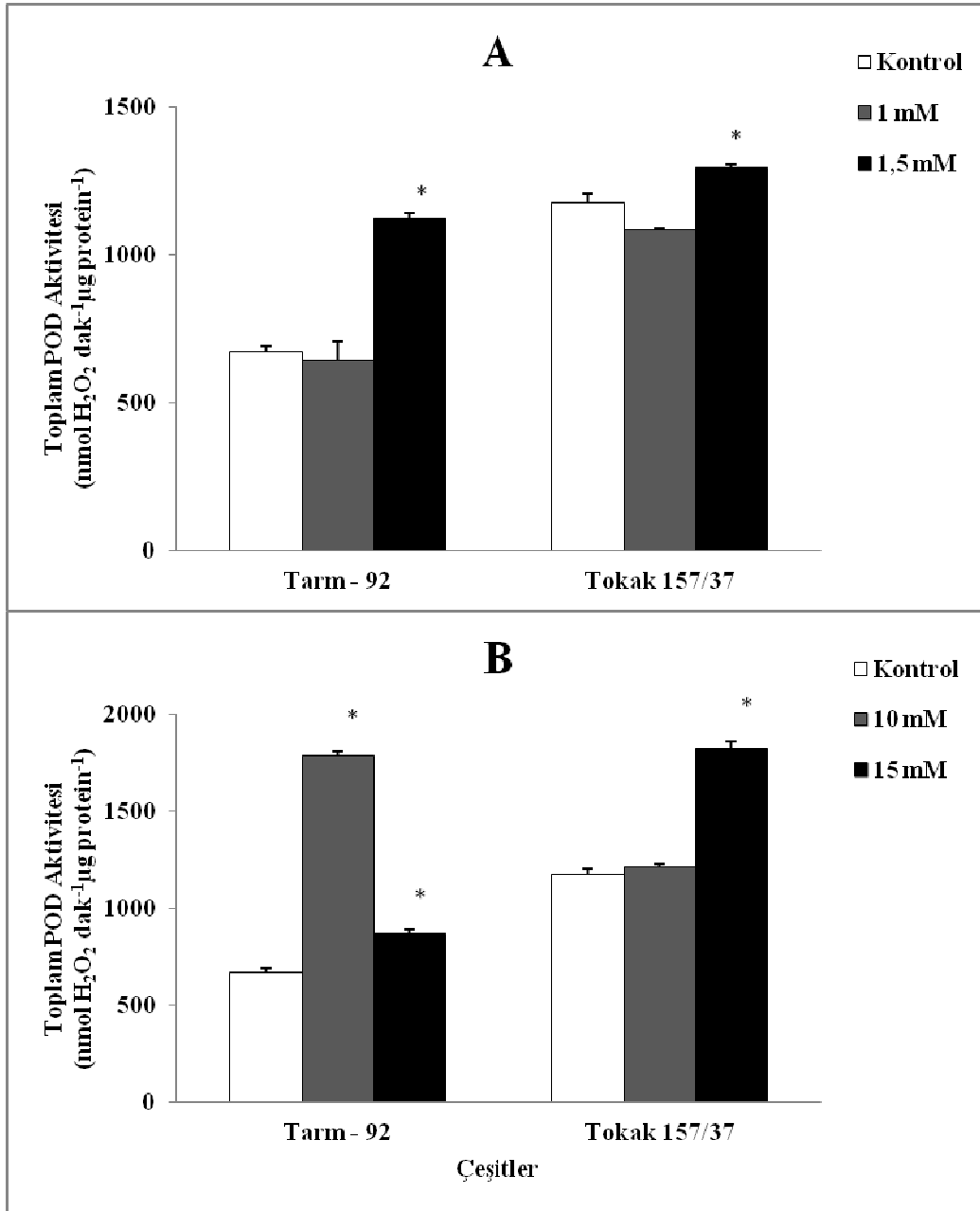
Şekil 4.9. Farklı iki arpa çeşidinin yapraklarındaki toplam glutasyon peroksidaz (GR) aktivitesi üzerine kadmiyum (A) ve kurşunun (B) etkileri (* : Ağır metal uygulamaları ile kontrol değerleri arasındaki farkın $P < 0.05$ seviyesinde önemli olduğunu ifade etmektedir. Değerler 3 tekrarın ortalaması olup, barlar \pm standart hata değerlerini göstermektedir)

4.10. Ağır Metal Stresinin Toplam Guaiakol Peroksidaz (GPOD) Aktivitesi Üzerine Etkisi

Kadmiyum ve kurşun uygulanmış iki farklı arpa genotipinin yapraklarındaki toplam guaiakol peroksidaz aktivitesinde gözlenen değişimler şekil 4. 10'da görülmektedir.

Buna göre ger iki genotipte de sadece 1.5 mM'lık kadmiyum uygulamasının yapraklardaki guaiakol peroksidaz aktivitesini kontrole göre önemli oranda artırdığı belirlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4. 10A).

Tarm – 92 genotipinde 10 ve 15 mM'lık kurşun uygulamalarının yapraklardaki toplam guaiakol peroksidaz aktivitesini kontrole göre belirgin şekilde artırdığı, ancak 10 mM konsantrasyonundaki kurşunun daha etkili olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4. 10B). Tokak 157/37 genotipinde ise sadece 15 mM'lık kurşun uygulaması sonucu meydana gelen aktivite artışı kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 4.10. Farklı iki arpa çeşidinin yapraklarındaki toplam guaiakol peroksidaz (GPOD) aktivitesi üzerine kadmiyum (A) ve kurşunun (B) etkileri (* : Ağır metal uygulamaları ile kontrol değerleri arasındaki farkın $P < 0.05$ seviyesinde önemli olduğunu ifade etmektedir. Değerler 3 tekrarın ortalaması olup, barlar \pm standart hata değerlerini göstermektedir)

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda artan endüstriyel etkinlikler, şehirleşme, taşımacılık, enerji ve yakıt üretimindeki gaz salınımı, gübre ve pestisit kullanımı gibi gelişmeler, beraberinde ciddi çevre sorunlarını da getirmiştir. Bu tip etkinlikler sonucu doğaya bırakılan artıklar, özellikle su ve toprak kirliliğine neden olmaktadır. Bu kirliliğin önemli bir kısmını da ağır metal kirliliği oluşturmaktadır. Bunun için ülkemizde özellikle hayvan yemi ve maltlık olarak yetiştirilen arpada ağır metal (Cd, Pb) kirlenmesine maruz kalmaktadır. Bu durum ürün verimini çok yakından etkilemesi nedeniyle önem arz etmektedir. Bu çerçevede bu çalışmanın amacı arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkisinin farklı çeşitlerinin ağır metal stresine dayanıklılık ve duyarlılık derecelerini araştırmak ve ağır metal stresi altında sergiledikleri metabolik değişimleri bazı fizyolojik kriterler vasıtasıyla incelemektir. Bunun için 6 gün süresince 3 kez kadmiyum ve kurşun uygulanan arpa yapraklarındaki fotosentetik pigment (klorofil a, b ve karotenoid), toplam fenolik madde, malondialdehit ve hidrojen peroksit miktarlarındaki değişimler ile bazı antioksidant enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler incelenmiştir.

5.1 Ağır Metal Stresinin Fotosentetik Pigment Miktarları Üzerine Etkisi

Yüksek bitkilerde ve alglerde fotosentez kloroplastlarda gerçekleşir. Tilakoid membran sistemlerinden oluşan kloroplastlarda görünür ışığı yakalayan klorofil pigmentleri yer alır [Gill ve Tuteja (2010)]. Diğer stres faktörleri gibi kadmiyum ve kurşun ağır metalleri de bitkilerdeki önemli metabolik reaksiyonlardan biri olan fotosentez üzerinde olumsuz etkiler yaratmaktadır. Bu ağır metaller bitkilerde potasyum, kalsiyum, magnezyum, demir, mangan, çinko, bakır gibi besin elementlerinin alınımı ve taşınımını da etkilemektedir [Wang ve arkadaşları (2009)].

Bu elementlerden magnezyum ve demir klorofil sentezi için gereklidir ve eksikliği klorofil miktarının azalmasına neden olur [Burzynski (1987)]. Ayrıca bu ağır metallerin; pigment sentezini engellemesi, elektron taşınmasını aksatması, Calvin döngüsündeki enzimlerin aktivitelerini inhibe etmesi, kalsiyum, demir, mangan gibi gerekli metallere rekabet gibi olumsuz etkileri nedeniyle, fotosentez hızını azalttığını gösteren birçok araştırma sonucu bulunmaktadır [Weigel (1985), Burzynski (1987), Sengar and Pandey (1996), Padmaja et al (1990), Drazkiewicz (1994), Stobard et al (1985), Faller et al (2005), Rashid et al (1994), Kastori et al (1998), Sigfridsson et al (2004)]. Çalışmamızda kadmiyum ve kurşun uygulanmış Tarm - 92 ve Tokak 157/37'in yapraklarındaki fotosentetik pigment miktarlarına bakıldığında (Şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4), genel olarak kontrol grubuna göre bir azalma izlenmektedir. Yapılan bir çalışmada, *Halophila ovalis*'e 0 – 10 mg l⁻¹ kadmiyum ve kurşun uygulanmış, 1 ppm'lik kadmiyumun yapraklardaki klorofil a ve klorofil b miktarını azalttığı, 5 ppm'lik kadmiyumun ise artırdığı belirlenmiştir. Dolayısıyla toplam klorofil miktarı da kontrole göre önce azalmış daha sonra artmıştır [Ralph ve Burchett (1998)]. *Pisum sativum*'da 0 – 7 mg kg⁻¹ kadmiyum uygulaması sonucu yapraklardaki klorofil a ve toplam klorofil miktarının azaldığı rapor edilmiştir [Hattab ve arkadaşları (2009)]. 0 – 160 µM arasında kadmiyum uygulanmış *Brassica juncea* bitkisinin yapraklarındaki klorofil b miktarı; 10, 20 ve 40 µM'lık uygulamalar boyunca yükselirken 80 ve 160 µM'lık uygulamalar sonucu azalmıştır [Seth et al (2008)]. Patel ve arkadaşları (2005) *Colocassia esculentum* bitkisinde yaptıkları bir çalışmada, kadmiyum uygulamaları sonucu, bitkinin yapraklarındaki toplam klorofil miktarında azalma gözlemlenmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada da, *Pisum sativum*'da 0.35 mg kg⁻¹'lık kadmiyum uygulamasının yapraklardaki toplam karotenoid miktarını azalttığı, 0.7 mg kg⁻¹'lık uygulamanın ise artırdığı belirlenmiştir [Hattab ve arkadaşları (2009)]. Bu sonuçlar kadmiyum ve kurşun ağır metallerinin uygulanan konsantrasyona ve bitki türüne bağlı olarak fotosentetik pigment metabolizmasını farklı şekillerde etkileyebileceğini göstermektedir. Çalışmamızda, kadmiyum uygulamaları sonucu, Tokak 157/37 genotipinin yapraklarındaki klorofil a ve toplam klorofil miktarlarının, Tarm – 92 ile karşılaştırıldığında, kontrole daha yakın değerler sergilediği belirlenmiştir. Diğer metabolitlerde olduğu gibi, yapraklardaki fotosentetik pigment miktarlarındaki değişimlerin, bu metabolitlerin sentez ve parçalanma hızları arasındaki dengeye bağlı olduğu bilinen bir gerçektir.

Nitekim, ağır metal stresine bağı olarak bitkilerin yapraklarındaki klorofil miktarlarındaki değişimlerin, klorofil biyosentezinden sorumlu olan enzimlerin ağır metaller tarafından inhibe edilmesinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir [Zengin ve Munzuroğlu (2005)]. Buna göre iki genotip karşılaştırıldığında, Tokak 157/37 genotipinin kadmiyum stresi altında fotosentetik pigment metabolizmasını, sentez reaksiyonları lehine, daha başarılı bir şekilde devam ettirdiği söylenebilir. Ayrıca kadmiyum uygulamalarının Tokak 157/37 genotipinde klorofil b miktarını etkilememesi, kadmiyum toksisitesinin bu genotipte özellikle klorofil a sentezi üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra, Tarm – 92 genotipinde, toplam klorofil miktarında meydana gelen azalmaların, klorofil a ve klorofil b moleküllerinin eş zamanlı olarak azalmasından kaynaklandığı; Tokak 157/37 genotipinde ise bundan sorumlu olan etkenin sadece klorofil a miktarındaki azalma olduğu söylenebilir. Kurşun uygulamaları sonucu iki genotipin fotosentetik pigment miktarlarındaki değişimler yukarıda bahsedilen sonuçların tam tersidir. Kurşun toksisitesi durumunda, Tarm – 92 adlı genotipin yapraklarındaki fotosentetik pigment miktarlarının, Tokak 157/37 genotipine göre daha kararlı olduğu görülmektedir. Bu durumda, fotosentetik pigment metabolizmasının, Tarm – 92 genotipinde kurşun, Tokak 157/37 genotipinde ise kadmiyumun toksik konsantrasyonlarına daha dayanıklı olduğu söylenebilir. Çalışmamızda kullandığımız iki arpa genotipinin yapraklarındaki karotenoid miktarlarında ağır metal uygulamaları sonucu gözlenen değişimler de, bu düşünceyi destekler niteliktedir. Karotenoidlerin bitkilerde çeşitli stres faktörlerine karşı endojen savunma mekanizmalarının bir parçası olduğu bilinmektedir.

5.2 Ağır Metal Stresinin Toplam Fenolik Madde Miktarı Üzerine Etkisi

Fenolik bileşikler bitkiler tarafından normal gelişim süresince ve stres koşullarında strese cevap olarak sentezlenen sekonder metabolitlerdendir [Naczka and Shahidi (2006)]. Bitkilerin ağır metal stresi gibi abiyotik stres faktörlerinin etkisiyle dokularında fenoller, tokoferoller ve askorbik asit gibi antioksidantları biriktirmesi, bitkilerin strese karşı geliştirdiği bir adaptasyon mekanizması olarak

düşünülmektedir [Hernandez (2004), Keleş ve Öncel (2002), Munne-Bosch (2005)]. Yapmış olduğumuz çalışmada Tarm – 92 genotipinde 1.5 mM'lık, Tokak 157/37 genotipinde ise 1 mM'lık kadmiyum konsantrasyonlarının yapraklardaki fenolik madde miktarını önemli derecede azalttığı belirlenmiştir (Şekil 4.5). Bu sonuçlar bahsedilen kadmiyum konsantrasyonlarının fenolik madde sentezini belirli oranda inhibe ettiğini göstermektedir. Ancak Tokak 157/37'de 1.5 mM'lık kadmiyum uygulaması sonucu, yapraklardaki fenolik madde miktarı kontrol seviyesine çıkmıştır. Bu sonuçlar Tokak 157/37 genotipinde 1.5 mM'lık kadmiyum uygulamasının fenolik madde sentezini uyardığını ve içsel savunma mekanizmalarını tetiklediğini gösteriyor olabilir. Nitekim, Rivero ve arkadaşları (2001) domates ve kavuna düşük ve yüksek sıcaklık stresi uygulamışlar ve bitki yapraklarındaki toplam fenolik madde miktarının arttığı rapor etmişlerdir. Bu artışı da fenolik madde miktarı ile fenolik maddelerin sentezlendiği fenilpropanoid metabolizmasının kilit enzimlerinden olan fenil alanin amonyak liyaz (PAL; EC 4.3.1.5) enziminin aktivitesi arasında pozitif bir korelasyon bulunduğu sonucuyla ilişkilendirmişlerdir. Ayrıca Dixon ve arkadaşları (1992) farklı bitkilerdeki değişik stres faktörlerine karşı tolerans gelişiminin fenolik maddelerle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir [Ecem (2010)]. Bunun yanı sıra çalışmamızda 10 ve 15 mM'lık kurşun uygulamalarının Tarm – 92 genotipinin yapraklarındaki fenolik madde miktarını önemli derecede azalttığı, Tokak 157/37'de ise artırdığı belirlenmiştir. Bu değişimler de Tokak 157/37 genotipinde, kurşun toksisitesine karşı fenolik madde sentezleme yeteneğinin daha fazla olduğunu gösterebilir. Tarm – 92 genotipinde ise yüksek kurşun konsantrasyonunun neden olduğu inhibisyon mekanizmaları söz konusudur. Nitekim, su kültür ortamında yetiştirilmiş buğdaya uygulanan artan konsantrasyonlardaki (0, 10, 100 mg l⁻¹) kurşun sonucu, bitkinin kök ve otsu gövdelerindeki fenolik madde miktarının azaldığı rapor edilmiştir. Lavid ve arkadaşları (2001) bu azalışın nedenini fenoliklerin sentezinin engellenmesi ya da reaktif oksijen türlerinin indüklediği polimerizasyon olabileceğini bildirmişlerdir [Doğan ve Çolak (2009)].

5.3 Ağır Metal Stresinin Malondialdehit Miktarı Üzerine Etkisi

Ağır metal stresi bitkilerde serbest radikallerin oluşmasına neden olmaktadır. Stres sonucu oluşan serbest radikallere bağlı olarak hücre zarındaki lipidler peroksidasyona uğramakta ve bunun son ürünü olarak malondialdehid ortaya çıkmaktadır. Ortaya çıkan bu radikaller lipid ve proteinlerin geri dönüşümsüz olarak hasara uğramasına neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonu, hücre zarlarında membran bütünlüğünün yok olmasına sebep olmakta ve sonuçta hücre bütünlüğünün bozulması ve hücre ölümü gerçekleşmektedir [Halliwell and Gutteridge (1985), Niki (1987), Cummins et al (1994), Dolatabadian et al (2008)]. Tamas ve arkadaşları (2008)'nın arpa üzerinde yaptığı bir çalışmada 1 mM'lık kadmiyum uygulaması sonucu köklerdeki malondialdehit miktarının yükseldiği rapor edilmiştir. Mısırdaki yapılmış başka bir çalışmada 0 – 0.9 mM'lık kadmiyum ve 0 – 8 mM'lık kurşun uygulaması sonucu yapraklardaki malondialdehit miktarı kontrole göre artış göstermiştir [Ayhan (2006)]. *Brassica napus* ve *Brassica oleracea* bitkilerinde, artan dozda uygulanan (0, 10, 25, 50 µM) kadmiyum sonucu yapraklardaki malondialdehit miktarının arttığı bildirilmiştir [Nouairi et al (2009)]. Yine ağır metal uygulaması sonucu lipid peroksidasyonun son ürünü olan malondialdehit miktarında artışların gözlemlendiği başka çalışmalar da mevcuttur [Khan ve arkadaşları (2009), Janas ve arkadaşları (2010)]. Oluşan malondialdehit, hücre membranlarında iyon alış-verişine etki eder ve membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açarak iyon geçirgenliğini ve membran enzim aktivitelerini olumsuz etkiler [Porter (1984), Placer et al (1990), Mercan (2004)]. Çalışmamızda kadmiyumun 1 mM'lık konsantrasyonda uygulanması sonucu, yaprak dokularındaki malondialdehit miktarının, Tarm – 92 genotipinde daha belirgin bir şekilde arttığı görülmüştür. Bu durum, Tarm – 92'de kadmiyum toksisitesi sonucu daha fazla membran hasarının ortaya çıktığını göstermektedir. Ayrıca 1.5 mM'lık kadmiyum uygulaması sonucu Tokak 157/37 genotipinde malondialdehit miktarının azalması, bu genotipte içsel savunma mekanizmalarının daha etkili olduğunu gösteriyor olabilir (Şekil 4.6 A). Çalışmamızda kurşun uygulamaları sonunda, Tokak 157/37 genotipinin yaprak dokularındaki MDA birikiminin, Tarm – 92 genotipine göre daha düşük seviyede olması (Şekil 4.6 B), Tokak 157/37'deki endojen savunma mekanizmalarının daha

etkili olduğunu ve aktif oksijen türlerinin birikimini engelleyen mekanizmaların varlığını gösterebilir.

5.4 Ağır Metal Stresinin Hidrojen Peroksit Miktarı Üzerine Etkisi

Hidrojen peroksit oksidatif stres mekanizmasının önemli elemanlarından biridir. Peroksizomal ve kloroplastik oksidatif reaksiyonları sonunda bitkisel dokulardaki miktarı artış gösterebilir. Yani aktif oksijen türlerinden birini oluşturur. Süperoksit radikaliyle reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturabilir [Lin ve Kao (1998)]. Kloroplastlardaki askorbat – glutatyon döngüsüne girerek suya kadar parçalanır. Askorbat peroksidaz ve glutatyon redüktaz bu reaksiyonun gerçekleşmesinde rol alan önemli enzimlerdendir [Khan ve arkadaşları (2009)]. Hidrojen peroksit düzeyindeki değişimlerin bilinmesi oksidatif hasarın ölçülmesi açısından önem arzeder. Çalışmamızda, kadmiyum uygulamaları sonucunda, Tokak – 157/37 genotipinin yaprak dokularındaki hidrojen peroksit miktarı önemli derecede azalırken, Tarm – 92 genotipinde ancak 1.5 mM’lık kadmiyum uygulaması sonucunda yaprak dokularındaki hidrojen peroksit miktarının azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.7 A). Bu durumda Tokak – 157/37 genotipinde, hidrojen peroksidin oluşmasını engelleyen veya oluşan hidrojen peroksidin parçalanmasını sağlayan mekanizmaların daha etkin olduğu düşünülebilir. Kurşun uygulamaları sonucunda ise, Tarm – 92 genotipinin yaprak dokularında hidrojen peroksit miktarının kontrole göre sürekli azalması, bu genotipin benzer bir avantaja sahip olduğunu göstermektedir. Tokak – 157/37 genotipinde ise, 10 mM’lık kurşun uygulaması sonucu, yaprak dokularındaki hidrojen peroksit miktarında gözlenen azalma, enzimatik savunma mekanizmalarının etkinliği ile ilişkili olabilir. Ancak aynı genotipte, 15 mM’lık kurşun uygulaması sonucu hidrojen peroksit miktarı artış göstermiştir. Yapılan çalışmalar, her ne kadar dayanıklı olsa da, bitki türlerinin ve genotiplerinin maruz kaldıkları stresin şiddeti belli bir seviyenin üzerine çıktığı takdirde, bitkinin dayanım mekanizmalarının etkisini kaybedebileceğini göstermiştir. Bu durumda diğer parametrelere göre diğer genotipe göre daha dayanıklı gibi görünse de, 15 mM’lık kurşun konsantrasyonunun Tokak – 157/37 genotipindeki savunma mekanizmalarını etkisiz hale getirdiği söylenebilir (Şekil 4.7 B).

5.5 Ağır Metal Stresinin Antioksidant Enzim Sistemleri Üzerine Etkisi

Bitkiler aktif oksijen türlerinin yıkıcı etkilerini önleyebilecek kompleks bir antioksidant savunma sistemine sahiptirler. Bu mekanizma; glutasyon, askorbat, α - tokoferol, karotenoid ve benzeri indirgeyici molekülleri içeren enzimatik olmayan antioksidant savunma sistemi ile guaiakol peroksidaz, glutasyon redüktaz, askorbat peroksidaz, gibi enzimleri içeren enzimatik antioksidant savunma sistemi olmak üzere iki gruba ayrılır [Verma and Dubey (2003)]. Oksidatif stres altında, bu moleküllerin ve enzimlerin konsantrasyon ve aktivitelerindeki değişimler bitkilerin gösterdiği direncin simgesidir.

Askorbat peroksidaz antioksidant enzim sisteminde önemli rol oynayan bir enzimdir [Massacci (1995)]. Askorbat peroksidaz, süperoksit dismutazın katalizlediği reaksiyon sonucu oluşan H_2O_2 'yi suya kadar parçalayan, askorbat-glutasyon döngüsünün ilk enzimidir [Asada (1999)]. Arpanın Weisuobuzhi ve Dong 17 adlı iki çeşidine 5 μM 'lık kadmiyum uygulaması sonucu, Weisuobuzhi'nin 5, 10 ve 15. günlerde, Dong 17'nin ise 10 ve 15. günlerde yapraklarındaki toplam askorbat peroksidaz aktivitesinde azalışlar olduğu bildirilmiştir [Chan et all (2010)]. Çalışmamızda Tarm – 92 genotipinde 1.5 mM'lık, Tokak – 157/37 genotipinde ise 1 ve 1.5 mM'lık kadmiyum uygulamaları, yaprak dokularındaki askorbat peroksidaz aktivitesini önemli ölçüde azaltmıştır. Benzer durum kurşun uygulamaları sonucunda da görülmüştür (Şekil 4.8). Bu sonuçlar her iki genotipte kadmiyum ve kurşun uygulamaları sonunda, hidrojen peroksidi parçalama etkinliğinin azaldığını göstermektedir. Görülen bu durum enzim yapısında yer alan disülfit bağlarının kopması ve enzimin inaktive olması ile açıklanabilir [Creissen et all (1992)]. Ancak bitkisel dokularda hidrojen peroksidin parçalanmasından sorumlu olan başka bileşenlerin olduğu da bilinmektedir.

Glutasyon redüktaz, askorbat – glutasyon döngüsünün son enzimi olarak, okside glutasyonu NADPH yardımıyla indirgenmiş glutatyona dönüştüren, kloroplastlardaki ve mitokondrideki hidrojen peroksidi temizleyen önemli bir enzimdir [Asada (1999)]. Yapılmış farklı çalışmalarda stres koşulları altındaki bitki dokularında,

glutasyon redüktaz aktivitesinde artış [Chan et all (2010), Tiryakioğlu ve arkadaşları (2006), Ayhan (2006)] ya da azalış [Tiryakioğlu ve arkadaşları (2006), Ayhan (2006)] gözlemlenmiştir. Çalışmamızda Tarm – 92 genotipinde kadmiyum uygulamaları sonucu glutasyon redüktaz aktivitesi kontrole göre önemli derecede azalmış, Tokak – 157/37 genotipinde ise artmıştır (Şekil 4.9 A). Bu sonuçlar, Tokak – 157/37 genotipinde glutasyonun okside formdan indirgenmiş forma dönüşümünün kadmiyum toksisitesi altında diğer genotipe göre daha kolay bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir. Kurşun uygulamalarında da genotipler arasında benzer bir durum görülmektedir. Ancak Tokak – 157/37 genotipinde 15 mM'lık kurşun uygulamasının glutasyon redüktaz aktivitesini daha şiddetli bir şekilde inhibe ettiği söylenebilir (Şekil 4.9 B).

Bitki peroksidazlarının büyüme ve gelişme [Riquelme and Cardemil (1993)], çeperlerdeki lignin biyosentezi [Bruce and West (1989)] ve çevresel streslere verilen cevaplarda rol oynadığı bilinmektedir [Markkola et all (1990), Cippolini (1998)]. Çalışmamızda 1.5 mM'lık kadmiyum uygulaması sonucu her iki arpa genotipinde de yapraklardaki toplam guaiakol peroksidaz aktivitesi kontrole göre önemli derecede artmıştır (Şekil 4.10 A). Kurşun uygulaması sonucunda ise genel olarak yapraklardaki toplam guaiakol peroksidaz aktivitesi her iki çeşit için de artış göstermektedir (Şekil 4.10 B). Genel olarak guaiakol peroksidaz aktivitesindeki artış stres altındaki bitki yapraklarında hücre membran bütünlüğünün korunmaya çalışıldığı ve hücre çeperinin mekaniksel özelliklerinin düzenlendiğini göstermektedir [Ekmekçi and Terzioğlu (2005)]. Bu sonuçlar her iki genotipte kadmiyum ve kurşun toksisitesine karşı özellikle hücre çeperinin mekanik dayanıklılığın artırılmaya çalışıldığını göstermektedir.

Elde ettiğimiz sonuçlar, kadmiyum toksisitesine karşı Tokak – 157/37 genotipinin, Tarm – 92'ye göre savunma mekanizmalarının daha etkin olduğunu göstermektedir. Tokak 157/37 genotipinin yapraklarında fotosentetik pigment miktarlarında, kadmiyumun yüksek konsantrasyonlarına maruz kalmasına rağmen gözlenen indirgenmenin daha düşük seviyede olması, bu genotipte ışık absorpsiyonu ve

fotosentetik elektron taşınım reaksiyonlarının daha ideal bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Tarm – 92 ile karşılaştırıldığında, yapraklarında bulunan daha yüksek karotenoid miktarı, özellikle aktif oksijen türlerine karşı savunma mekanizmasının daha aktif olduğunu düşündürmektedir. Tokak – 157/37 genotipinin yapraklarında, 1.5 mM'lık kadmiyum uygulaması sonucu toplam fenolik madde miktarının artış göstermesi, Tarm – 92 genotipine göre bir avantaj olarak değerlendirilebilir. Tokak 157/37 genotipinin yapraklarında kadmiyum uygulamaları sonucu daha düşük miktarda gerçekleşen malondialdehit ve hidrojen peroksit birikimi, bu genotipin hücrel membranların bütünlüğünü muhafaza etme ve hidrojen peroksitten kaynaklanan oksidatif strese karşı kendini koruma bakımından daha etkin olduğunu göstermektedir. Tokak 157/37 genotipinin kadmiyum toksisitesi durumunda özellikle glutasyon redüktaz ve toplam guaiakol peroksidaz aktivitelerinde gözlenen belirgin artışlar, oksidatif stresten korunma konusunda antioksidant enzim sistemini daha etkili bir şekilde kullandığını göstermektedir. Kurşun uygulamaları sonucunda da hemen hemen benzer şeyleri söylemek mümkündür. Kurşun toksisitesi Tokak 157/37 genotipinde, Tarm – 92' ye göre fotosentetik pigment miktarlarında daha büyük bir indirgenmeye yol açmıştır. Ancak yapılan bazı çalışmalarda, stres koşulları altında bitkilerin fotosentetik pigment içeriklerini azaltarak, fazla ışığın zararlı etkilerinden kendilerini korumaya çalıştıklarına dair sonuçlar da elde edilmiştir. Sonuç olarak, iki genotip arasında kadmiyum ve kurşun toksisitesine dayanıklılık konusunun tam olarak aydınlatılabilmesi için daha farklı mekanizmaların varlığının ve bunların etkinlik derecelerinin test edilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

ALLOWAY, B.J., Heavy Metals in Soils. Alloway, B.J. (ed.), Blackie, Glasgow, 321, 1990.

ALSCHER, GR., ERTURK, N., HEATH, L.S., Role of Superoxide Dismutases (SODs) in Controlling Oxidative Stres in Plants, Journal of Experimental Botany, 53(372),1331-1341, 2002.

ALSCHER, R. G., DONAHUE, J. L. , CRAMER, C. L., Reactive oxygen Species , Antioxidants: Relationships in Green cells, Physiologia Plantarum, 100, 224 - 233, 1997.

ARVIND, P., PRASAD, M.N.V., Zinc Alleviates Cadmium – Induced Oxidative Stress in *Ceratophyllum demersum* L., a free Floating Freshwater Macrophyte, Plant Physiol. Biochem. 41, 391–397, 2003.

ASADA, K., The Water - Water Cycle in Chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens , Dissipation of Excess Photons, Annual Review of Plant Physiology , Plant Molecular Biology, 50, 601-639, 1999.

AYHAN, B., Mısır (*Zea mays* L.)’ın Bazı Çeşitlerinde Ağır Metal (Cd, Pb) Stresinin Etkilerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, 2006.

BARCELÓ, J., POSCHENRIEDER, C., Plant Water Relations as Affected by Heavy Metal Stress: A review, J. Plant Nutr., 13, 1-37, 1990.

BENAVIDES, M.P., GALLEGO, S.M., TOMARO, M.L., Cadmium Toxicity in Plants, Braz. J. Plant Physiol., 17(1), 21 - 34, 2005.

BOZCUK, S., Bitki Fizyolojisi, Hatiboğlu, 112 – 176, Ankara, 2000.

BRAY, E. A., BAILEY – SERRES, J., WERETILNYK, E., Responses to Abiotic Stress , in Biochemistry , Molecular Biology of Plants, Buchanan, B. B., Gruissem, W. , Jones, R. L. (eds), American Society of Plant Physiologists, 1158 – 1202, Rocville, Maryl., 2000.

BRUCE, R. J., WEST, C. A., Elicitation of Lignin Biosynthesis , Isoperoxidase Activity by Pectic Fragments in Suspension Culture of Castor Bean, Plant Physiol., 91, 889-897, 1989.

BRUNE, A., URBACH, W., DIETZ, K.J., Compartmentation , Transport of Zinc in Barley Primary Leaves as Basic Mechanisms Involved in Zinc Tolerance, *Plant Cell Environ.*, 17:153 – 162, 1994.

BURZYNSKI, M., The Influence of Lead , Cadmium on the Absorption , Distribution of Potassium, Calcium, Magnesium an Iron in Cucumber Seedlings, *Acta Physiol. Plant*, 9, 229-238, 1987.

CHAITANYA, K.S.K., NAITHANI, S.C., Role of Superoxide, Lipid Peroxidation , Superoxide Dismutase in Membrane Perturbaition During Loss in Viability of Seeds of *Shorea robusta* Gaertn, *New Phytol.*, 126, 623-627, 1994.

CHAN, F., WANG, F., WU, F., MAO, W., ZHANG, G. , ZHOU, M., Modulation of Exogenous Glutathione in Antioxidant Defence System Against Cd Stress in the Two Barley Genotypes Differing in Cd Tolerance, *Plant Physiology , Biochemistry* 48: 663 – 672, 2010.

CHILER, S.F., DODDS, J.H., The Effect of Phosphate Nitrogen , Sucrose on the Production of Phenolics , Socosidine in Callus Cultures of *Solanum laciniatum*, *Plant Cell Rep*, 2, 105-108, 1983.

CHAOUI, A., FERJANI, E., Effects of Cadmium , Copper on Antioxidant Capacities,Lignification , Auxin Degradation in Leaves of Pea (*Pisum sativum L.*) Seedlings, *CR. Biol.*, 328, 23-31, 2005.

CHARLES, S.A., HALLIWELL, B., Effect of Hydrogen Peroxide on Spinach (*Spinacia oleraceae*) Chloroplast Fructose Biphosphatase. *Biochem. J.*, 189: 373 – 376, 1980.

CHO, U., , SEO, N., Oxidative Stress in *Arabidopsis thaliana* Exposed to Cadmium is Due to Hydrogen Peroxide Accumulation, *Plant Sci.*, 168, 113- 120, 2004.

CIPPOLINI, D. F. J.R., The Induction of Soluble Peroxidase Activity in Bean Leaves by Wind - Induced Mechanical Perturbation, *American Journal of Botany*, 85, 1586-1591, 1998.

CREISSEN, G., EDWARDS, E.A., , ENARD C., Molecular Characterization of Glutathione- Reductase cDNAs from Pea (*Pisum sativum L.*), *Plant J.*, 2, 129-131, 1992.

CUMMINS J.M, JEQUIER A.M, KAN R., Molecular Biology of Human Male Infertility: Links with Aging, Mitochondrial Genetics , Oxidative Stress? *Mol Reprod Dev.*, 37: 345 – 362, 1994.

DAT, J., V, ANABEELE, S., VRANOVA, E., VAN MONTAGU, M., INZE, D., VAN BREUSEGEM, F., Dual Action of the Active Oxygen Species During Plant Stress Responses, *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 779–795, 2000.

DAVIS, M. , L., MASTEN, S., J., Principles of Environmental Engineering , Science, Second Edition, Mc Graw – Hill Companies, Inc., 344 -345, New York, 2009.

DE VOS, C.H.R., SCHAT, H., DE WALL M.A.M., VOOIJS, R., , ERNST W.H.O., Increased Resistance to Copper – Induced Damage of the Root Cell Plasmalemma in Copper Tolerant *Silene cucubalus*, *Physiol. Plantarum*, 82, 523 – 528, 1991.

DE VOS, C.H.R., VOOIJS, R., SCHAT, H. , ERNST, W.H.O., Copper – Included Damage to the Permeability Barrier in Roots of *Silene cucubalus*, *J. Plant Physiol.* 135:165 – 169, 1989.

DIXIT, V., PEY, V., SHYAM, R., Differential Antioxidative Responses to Cadmium in Roots , Leaves of Pea (*Pisum sativum* L.cv.Azad), *Journal of Experimental Botany*, 52 (358): 1101 – 1109, 2001.

DIXON, R.A., CHOUDHARY A.D., DALKIN D., ET AL., Molecular Biology of Stress-Induced Phenylpropanoid , Isoflavonoid Biosynthesisin Alfalfa. In: Stafford HA, Ibrahim R.K., (eds), *Phenolic Metabolism in Plant*, Plenum Press, New York, 91–138, 1992.

di TOPPI, L.S., GABBRIELLI, R., Response to Cadmium in Higher Plants, *Environ. Exp. Bot.* 41, 105–130, 1999.

DOĞAN, M., ÇOLAK, U., *Triticum aestivum* L. cv. Tosunbey'e Uygulanan Kurşunun Bazı Fizyolojik Özelliklere Etkisi, *Ekoloji* 19, 73, 98-104, 2009.

DOĞAN, M., SAYGIDEĞER, D.S., Kadmiyumun *Ceratophyllum demersum* L. Üzerindeki Bazı Fizyolojik ve Morfolojik Etkileri, *Ekoloji* 18, 71, 57 – 64, 2009.

DOĞRU, A., Kolza (*Brassica napus* ssp. *oleifera*)'nın Bazı Kışlık Çeşitlerinde Düşük Sıcaklık Toleransı İle İlgili Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametrelerin Araştırılması, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalı, 2006.

DOLATABADIAN, A., SANAVY, S.A.M.M. , CHASHMI, N.A., The Effects of Application of Ascorbic Acid (Vitamin C) on Antioxidant Enzymes Activites, Lipid Peroxidant , Proline Accumulation of Canola (*Brassica napus* L.) under Conditions of Salt Stress. *J.Agronomy , Crop Science*, 931-2250, 2008.

DRAZKIEWICZ M., Chlorophyllase: Accurrence, Functions, Mechanisim of Action, Effects of External , Internal Factors, *Photosynthetica*, 30, 321 - 331, 1994.

ECEM, N., Farklı Mısır (*Zea mays* L.) Çeşit ve Hatlarında Kuraklık Stresi Etkilerinin Fizyolojik Olarak İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı, 2010.

- EKMEKCI, Y., TERZIOGLU, S., Effects of Oxidative Stress Induced by Paraquat on Wild , Cultivated Wheats, Pesticide Biochemistry , Physiology, 83, 69-81, 2005.
- ERDİK, E., SARIKAYA, Y., Temel Üniversite Kimyası, Gazi Kitabevi, 805 – 859, Ankara, 2007.
- ERNST, W.H.O., JOSSE VAN DAMME, E.N.G., Umweltbelastung durch Mineralstoffe – biologische Effekte, Fischer, Stuttgart, 1983.
- FALLER, P., KIENZLER, K., ANJA KRIEGER-LISZKAY, A., Mechanism of Cd²⁺ Toxicity: Cd²⁺ inhibits Photoactivation of Photosystem II by Competitive Binding to the Essential Ca²⁺ Site, Biochimica et Biophysica Acta, 1706, 158-164, 2005.
- FODOR, A., SZABÓ-NAGY, A., ERDEI, L., The Effects o Cadimum on the Fluidity , H⁺-ATPase Activity of Plasma Membrane from Sunflower , Wheat Roots, J. Plant Physiol., 14, 787 - 792, 1995.
- FOYER, C. H., LELAIS, M., KUNERT, K. J., Photooxidative Stress in Plants, Physiologia Plantarum, 92: 696-717, 1994.
- GASPAR, T., FRANCK, T., BISBIS, B., KEVERS, C., JOUNE, L., HAUSMAN, J. F. , DOMMES, J., Concepts in Plant Stress Physiology. Application to Plant Tissue Cultures, Plant Growth Regulation, 37, 263 – 285, 2002.
- GEÇİT, H.H., ÇİFTÇİ, C.Y., EMEKLİER, H.Y., İKİNCİKARAKAYA, S., ADAK, S., KOLSARICI, Ö., EKİZ, H., ALTINOK, S., SANCAK, C., SEVİMAY, C.S., KENDİR, H., Tarla Bitkileri, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, 173 – 182, Ankara, 2009.
- GUO, Y., MARSCHNER, H., Uptake, Distribution, Binding of Cadmium, Nickel in Different Plant Species, J. Plant Nutr., 18, 2691-2706, 1995.
- HAGEMEYER, J., , BRECKLE, S.W., Growth Under Trace Element Stress. Plant Roots; the Hidden Half. 2nd edition. Waisel, Y., Eshel, A., , Kafkafi, U., (eds.), Dekker, New York., 415 - 433, 1996.
- HALE, M. G., ORCUTT, D. M., The Physiology of Plants Under Stress, John Willey & Sons Inc., 1 – 4, New York, 1987.
- HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C., Free Radicals in Biology , Medicine, Oxford: Clarendon Press, 1989.
- HALLIWELL, B. VE GUTTERIDGE, J.M.C., Free Radicals in Bialogy , Medicine. Clar,um Press, Oxford, 1985.
- HALLIWELL, B., Oxidative damage, Lipid Peroxidation , Antioxidant Protection in Chloroplasts, Chem. Phys. Lipids 44, 327–340, 1987.

HATTAB, S., DRIDI, B., CHOUBA, L., KHEDER, M. B. , BOUSETTA, H., Photosynthesis , Growth Responses of Pea *Pisum sativum* L. under Heavy Metals Stress, Journal of Environmental Sciences 21, 1552 – 1556, 2009.

HEGEDUS, A., ERDEI, S., HORVATH, G., Comparative Studies of H₂O₂ Detoxifying Enzymes in Green , Greening Barley Seedlings Under Cadmium Stress, Plant Sci. 160, 1085 – 1093, 2001.

HERNEZ, I., ALEGRE, L., MUNNE- BOSCH, S., Drought- Induced Changes in Flavonoids , Other Low Molecular Weight Antioxidant in *Cistus clusii* Grown Under Mediterranean Field Conditions. Tree Physiol, 24, 1301-1311, 2004.

HOAGL., DR., Optimum nutrient solutions for plants, Science, 52(1354), 562-564, 1920.

http://www.mta.gov.tr/v1.0/daire_baskanliklari/metut/index.php?id=maden_kul_alan&m=2, 20 Nisan 2011.

http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb_id=45&ust_id=13, 25 Mart 2011.

HUNER, N. P. A., OQUIST, G. , SARHAN, F., Energy Balance , Acclimation to Light , Cold, Trends in Plant Science, 3 (6): 224 – 230, 1998.

JANA, S., , CHOUDHARI, M.A., Senescence in Submerged Aquatic Angiosperms: Effects of Heavy Metals, New Phytol., 90, 477 - 484, 1982.

JANAS, K.M., ZIELINSKA – TOMASZEWSKA, J., RYBACZEK, D., MASZEWSKI, J., POSMYK, M.M., AMAROWICZ, R. , KOSINSKA, A., The Impact of Copper ions on Growth, Lipid Peroxidation, , Phenolic Compound Accumulation , Localization in Lentil (*Lens culinaris* Medic.) Seedlings, Journal of Plant Physiology 167, 270–276, 2010.

KABATA-PENDIAS, A., , PENDIAS, H., Trace Elements in Soils , Plants, 2nd ed., CRC Press, 365p, 1991.

KACAR, B., KATKAT, A.V., ÖZTÜRK Ş., Bitki Fizyolojisi, Nobel, 493 – 544, Ankara, 2006.

KADIOĞLU, A., Bitki Fizyolojisi, Esen Ofset Matbaacılık, 406 – 426, Trabzon, 2007.

KADIOĞLU, A., Bitki Fizyolojisi, Gündüz Ofset Matbaacılık, 104 – 188, Trabzon, 2011.

KAFADAR, F.N. ve SAYGIDEĞER, S., Gaziantep İlinde Organize Sanayi Bölgesi Atık Suları ile Sulanan Bazı Tarım Bitkilerinde Kurşun (Pb) Miktarının Belirlenmesi, Ekoloji 19, 75, 41 – 48, 2010.

KAISER, W.M., Reversible Inhibition of The Calvin Cycle , Activation of The Oxidative Pentose Phosphate Cycle in Isolated Intact Chloroplasts by Hydrogen Peroxide. *Planta*, 145: 377 – 382, 1979.

KAMPRATH, E.J., , FOY, C.D., Lime – Fertilizer – Plants Interactions in Acid Soils. *Fertilizer Technology , Use*, 2nd Ed. Soil Sci. Soc., 105 – 151, Amer. Madison. Wisc. USA, 1971.

KASTORI, R., PLESNICAR, M., SAKAC, D., PANKOVIC, D., , ARSENIHJEVIC-MAKSIMOVIC, I., Effect of Excess Lead on Sunflower Growth , Photosynthesis, *J. Plant Nut.*, 21(1), 75-85, 1998.

KELEŞ, Y., ÖNCEL, I. Response of Antioxidative Defense System to Temperature , Water Stres Combinations in Wheat Seedlings, *Plant. Sci.*, 163, 783-790, 2002.

KENNEDY, C.D., , GONSALVES, E.A.N., The Action of Zn, Cadmium, Mercury, Copper , Lead on Transroot Potential , H⁺ Efflux of Excised Roots., *J. Exp. Bot.*, 38, 800 - 817, 1987.

KHAN, I., AHMAD, A. , IQBAL, M., Modulation of Antioxidant Defence System for Arsenic Detoxification in Indian Mustard, *Ecotoxicology , Environmental Safety* 72, 626 – 634, 2009.

KILINÇ, M., KUTBAY, G., *Bitki Ekolojisi*, Palme, 333 – 348, Ankara, 2004.

KLOTZ, F., HORST, W.J., Genotypic Differences in Aliminium Tolerance of Soybean (*Glycine max* L.) as Affected by Ammonium , Nitrate – Nitrogen Nutrition, *J. Plant Physiol.*, 132:702 – 707, 1988.

KÖLELİ, N., EKER, S., , ÇAKMAK, I., Effect of Zinc Fertilization on Cadmium Toxicity in Durum , Bread Wheat Grown in Zinc-Deficient Soil, *Environ. Pollut.*, 131, 453-459, 2004.

KRUPA, Z., , MONIAK, M., The Stage of Leaf Maturity Implicates the Response of the Photosynthetic Apparatus to Cadmium Toxicity, *Plant Sci.*, 138, 149 - 156, 1998.

KRUPA, Z., OQUIST, G. , HUNER, N.P.A., The Effect of Cadmium on Photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* – a fluorescence analysis, *Physiol. Plant*, 88:626 – 630, 1993.

KVESITADZE, G., KHATISASHVILI, G., SADUNISHVILI, T., RAMSDEN, J., J., Biochemical Mechanisms of Detoxification in Higher Plants, *Basis of Phytoremediation*, Springer – Verlag, 20 -21, Berlin Heidelberg, 2006.

- LAGRIFFOUL, A., MOCQUOT, B. MENCH, M., , VANGRONSVELD, J., Cadmium Toxicity Effects on Growth, Mineral , Chlorophyll Contents, , Activities of Stress Related Enzymes in Young Maize Plants (*Zea mays* L.), *Plant Soil*, 200, 241 - 250, 1998.
- LAMBERS, H., CHAPIN III, F., S., PONS, T., L., *Plant Physiological Ecology*, Springer – Verlag, 272 – 277, New York, Inc., 1998.
- LAVID, N., SCHWARTZ A, TEL YARDEN O, OR E, The Involvement of Polyphenols, Peroxidase Activities in Heavy – Metal Accumulation by Epidermal Gl,s of the Waterlily (*Nymphaeaceae*). *Planta* 212, 323-331, 2001.
- LEE, K.C., CUNNINGHAM, B.A., POULSEN, G.M., LIANG, J.M., , MOORE, R.B., Effects of Cadmium on Respiration Rate , Activities of several Enzymes in Soybean Seedlings, *Physiol. Plant*, 36, 4 - 6, 1976.
- LEVITT, J., *Responses of Plants to Environmental Stress. Water, Radiation, Salt , Other Stress*, Vol. II 2nd Edition, Academic Pres, Inc, 607, 1980.
- LICHTENTHALER, H. K., *Chlorophylls , Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes*, *Methods in Enzymology*, 148, 350-382, 1987.
- LICHTENTHALER, H., K., *The Stress Concept in Plants: An Introduction*, *Ann. NY Acad. Sci*, 851, 187 – 198, 1998.
- LIN J.N. , KAO C.H., Effect of Oxidative Stress Caused by Hydrogen Peroxide on Senescence of Rice Leaves, *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 39: 161 – 165, 1998.
- LOMBARDI, L. , SEBASTIANI L., *Copper Toxicity in *Prunus cerasifera*: Growth , Antioxidant Enzymes Responses of *in vitro* Grown Plants*, *Plant Sci.*, 168, 797 - 802, 2005.
- MACFIE, S.M. , TAYLOR, G.J., The Effect of Excess Manganese on Phtosynthetic Rate , Concentration of Chlorophyll in *Triticum aestivum* Grown in Solution Culture, *Physiol. Plant.*, 85:467 – 475, 1992.
- MADLUNG, A. , COMAI, L., The Effect of Stress on Genom Regulation , Structure, *Annals of Botany*, 94, 481 – 495, 2004.
- MARKKOLA, A. M., OHTONEN, R. , TARVAINEN, O., Peroxidase Activity as an Indicator of Pollution Stress in the Fine Roots of *Pinus sylvestris*, *Water Air , Soil Pollution*, 52, 149-156, 1990.
- MARTIN, J.H., WALDREN, R.P. , STAMP, D.L., *Principles of Field Crop Production*, Fourth Edition, Pearson Prentice Hall, 440 – 454, Ohio, 2006.

- MASSACCI, A., LANNELLI, M. A., PIETRINI, F. LORETO, F., The Effect of Growth at Low Temperature on Photosynthetic Characteristics , Mechanisms of Photoprotection of Maize Leaves, *Journal of Experimental Botany*, 46, 119 - 127, 1995.
- MERCAN, U., Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi, *Y.Y.U. Vet. Fak. Derg.*, 5 (1-2), 91-96, 2004.
- MITTLER, R., Oxidative stress, Antioxidants , Stress Tolerance, *Trends Plant Sci.* 7, 405 – 410, 2002.
- MUNNE- BOSCH, S., The Role of a (ALFA) Tokopherol in Plant Stres Tolerance, *J. Plant Physiol.*, 162, 743-748, 2005.
- MUNZUROGLU, O., , GECKİL, H., Effects of Metals on Seed Germination, Root Elongation , Coleoptile , Hypocotyl Growth in *Triticum aestivum* , *Cucumis sativus*, *Arch. Environ. Con. Tox.*, 43, 203 - 213, 2002.
- NACZK, M. , SHAHIDI D., Phenolics in Cereals, Fruits , Vegetables: Occurrence, Extraction , Analysis, *Journal of Pharmaceutical , Biomedical Analysis* 41, 1523 – 1542, 2006.
- NELLESEN, J.E., FLETHCHER J.S., Assessment of Published Literature on the Uptake, Accumulation , Translocation of Heavy Metals by Vascular Plants, *Chemosphere*, 9, 1669-1680, 1993.
- NIKI, E., Antioxidants in Relation to Lipid Peroxidation. *Chem. Phys. Lipids.*, 44: 227 – 253, 1987.
- NOUAIRI, I., AMMAR, W. B., YOUSSEF, N. B., MILED, D. D. B., GHORBAL, M. H. , ZARROUK, M., Antioxidant Defense System in Leaves of Indian Mustard (*Brassica juncea*) , Rape (*Brassica napus*) Under Cadmium Stress, *Acta Physiol Plant* 31:237–247, 2009.
- OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, Y., Assay of Lipid Peroxides in Animal Tissue by Thiobarbituric Acid Reaction, *Anal. Biochem.*, 95, 351-358, 1979.
- ÖZEN, H. Ç., ONAY, A., Bitki Büyüme ve Gelişme Fizyolojisi, Dicle Üniversitesi Basımevi, Diyarbakır, 1999.
- ÖZEN, H.Ç., ONAY, A., Bitki Fizyolojisi, Nobel, 73 – 106, Ankara, 2007.
- PADMAJA, K., PARSAD D.D.K., , PARSAD A.R.K., Inhibition of Chlorophyll Synthesis in *Phaseolus vulgaris* L. Seedlingis by Cadmium Acetate, *Photosynthetica*, 24, 399-404, 1990.

- PATEL, M.J., PATEL, J.N. , SUBRAMANIA, R.B., Effect of Cadmium on Growth , the Activity of H₂O₂ Scavenging Enzymes in *Colocassia esculentum*, Plant , Soil, 273: 183 – 188, 2005.
- PEPPER I., L., GERBA, C., P., BRUSSEAU, M., L., Environmental , Pollution Science, Second Edition, Elsevier, Inc., 202 – 206, Amsterdam Boston, 2006.
- PERALTA, J.R., GARDEA-TORRESDEY, J.L., TIEMANN, K.L., GOMEZ, E., ARTEAGA, S., RASCON, E., , PARSONS, J.G., Uptake , Effects of Five Heavy Metals on Seed Germination , Plant Growth in Alfalfa (*Medicago sativa* L.), Bulletin of Environmental Contamination , Toxicology, 66(6), 727 - 734, 2001.
- PINTO, E., SIGAUD – KUTNER, TCS., LEITÃO, M.A.S., OKAMOTO, O.K., MORSE, D., COLEPICOLO, P., Heavy Metal – Induced Oxidative Stress in Algae, J. Phycol. 39: 1008 – 1018, 2003.
- PLACER, C.A., CUSHMAN, L.L., , JOHNSON, B.C., Estimation of Product of Lipid Peroxidation (Malondy Dialdehyde) in Biochemical Systems, Anal. Biochem., 16, 259-264, 1990.
- PORTER, N.A., Chemistry of Lipid Peroxidation. Methods Enzymol., 105, 273 - 283, 1984.
- PUNZ, W.F., , SIEGHARDT, H., The Response of Roots of Herbaceous Plant Species to Heavy Metals, Environ. Exp. Bot., 33, 85 - 93, 1993.
- RALPH, P.J. , BURCHETT, M.D., Photosynthetic Response of *Halophila ovalis* to Heavy Metal Stress, Environmental Pollution 103, 91 – 101, 1998.
- RASHID, A., CAMM, E.L., , EKRAMODDOULLAH, K.M., Molecular Mechanism of Action of Pb , Zn²⁺ on Water Oxidizing Complex of Photosystem II, FEBS Lett., 350, 296-298, 1994.
- RIQUELME, A. , CARDEMIL, L., Peroxidases in the Cell Walls of Seed , Seedlings of *Araucaria araucana*, Phytochemistry, 32, 15-20, 1993.
- RIVERO, RM., RUIZ, JM., GARCÍA, PC., LO´ PEZ-LEFEBRE, LR., SA´NCHEZ, E., ROMERO, L., Resistance to Cold , Heat Stress: Accumulation of Phenolic Compounds in Tomato , Watermelon Plants, Plant Sci., 160, 315–321, 2001.
- ROBINSON, B., RUSSELL, C., HEDLEY, M., , CLOTHIER, B., Cadmium Adsorption by Rhizobacteria: Implications for New Zeal, Pasturel., Agr. Ecosyst. Environ., 87(3), 315-321, 2001.

- ROS, R., COOKE D.T., BURDEN, R.S., JAMES C.S., Effect of Herbicide MCPA, the Heavy Metals, Cadmium, Nickel, on the Lipid Composition, Mg-ATPase Activity, Fluidity of Plasma Membranes from Rice, *Oryza sativa* cv. Bahia shoots, *J. Exp. Bot.*, 41, 457 - 467, 1990.
- SALT, D.E., BLAYLOCK, M., KUMAR, N.P.B.A., DUSENKOV, V., ENSLEY, B.D., CHET, I., Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants, *Bio/Technology*, 13, 468-474, 1995.
- SANCHEZ-ROMERO, C., GARCIA-GOMES, M. L., PLIEGO-ALFARO, F., HEREDIS, A., Peroxidase Activities, Isoenzyme Profiles Associated with Development of Avocado (*Persea americana* M.) Leaves at Different Ontogenetic Stages, *Journal of Plant Growth Regulation*, 12, 95-100, 1993.
- SCALIOS, J.G., The Rise of ROS, *Trends in Biochemical Sciences*, 27:9, 483 – 486, 2002.
- SEÇMEN, Ö., GEMİCİ, Y., GÖRK, G., BEKAT, L., LEBLEBİCİ E., Tohumlu Bitkiler Sistematigi, Ege Üniversitesi, 317 – 319, İzmir, 2000.
- SENGAR, R.S., PEY, M., Inhibition of Chlorophyll Biosynthesis by Lead in Greening *Pisum sativum* Leaf Segments, *Biol. Plant*, 38, 459-462, 1996.
- SETH, C.S., CHATURVEDI, P.K., MISRA, V., The role of phytochelatins, antioxidants in tolerance to Cd accumulation in *Brassica juncea* L., *Ecotoxicology, Environmental Safety* 71, 76–85, 2008.
- SHARMA, S.S., KAUL, S., METWALLY, A., GOYAL, K.C., FINKEMEIER, I., DIETZ, K.J., Cadmium Toxicity to Barley (*Hordeum vulgare*) as Affected by Varying Fe Nutritional Status, *Plant Sci.*, 166, 1287 - 1295, 2004.
- SHIGEOKA, S., ISHIKAWA, T., TAMOI, M., MIYAGAWA, Y., TAKEDA, T., YABUTA, Y., YOSHIMURA, K., Regulation, Function of Ascorbate Peroxidase Isoenzymes. *J. Exp. Bot.* 53, 1305–1319, 2002.
- SIGFRIDSSON, K.G.V., BERNÁT, G., MAMEDOV, F., STYRING, S., Molecular Interference of Cd²⁺ with Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1659, 19-31, 2004.
- STOBART, A.K., GRIFFITS, W., BUKHARI, I.A., SHERWOOD, R.P., The Effect of Cd²⁺ on the Biosynthesis of Chlorophyll in Leaves of Barley, *Physiol. Plant.*, 63, 293-298, 1985.
- STOHS, S.J., BAGCHI, D., Oxidative Mechanisms in the Toxicity of Metal Ions, *Free Rad. Biol. Med.* 18: 321 – 336, 1995.

STOLT, J.P., SNELLER, F.E.C., BRYNGELSSON, T., LUNDBORG, T., , SCHAT, H., Phytochelatin, Cadmium Accumulation in Wheat, *Environ. Exp. Bot.*, 49, 21 - 28, 2003.

TAIZ, L., ZEIGER, E., Bitki Fizyolojisi, Türkan İ (eds), Palme, 111 – 192, Ankara, 2008.

TAMAS, L., DUDIKOVA, J., DURCIKOVA, K., HALUSKOVA, L., HUTTOVA, J., MISTRİK, I. , OLLE, M., Alterations of the Gene Expression, Lipid Peroxidation, Proline , Thiol Content along the Barley Root Exposed to Cadmium, *Journal of Plant Physiology* 165, 1193 – 1203, 2008.

TESTER, M., LEIGH, R.A., Partitioning of Nutrient Transport Processes in Roots, *J. Exp. Bot.*, 52, 445 - 457, 2001.

TIRYAKIOGLU, M., EKER, S., OZKUTLU, F., HUSTED, S. , ÇAKMAK, I., Antioxidant Defence System , Cadmium uptake in Barley Genotypes Differing in Cadmium Tolerance, *Journal of Trace Elements in Medicine , Biology* 20:181 – 189, 2006.

TURAN, C., TABAN, S., KORKMAZ, A., Artan Miktardaki Kirecin Asit Topraklarda Yetiştirilen Mısır Bitkisinin ve Kökünün Gelişmesi ile Al, P, Cu ve Mn Kapsamları Üzerine Etkisi, *DOĞA, Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi*, 13 (2) : 427 – 436, 1989.

VAN ASSCHE, F., CLIJSTERS, H., Substitution in vivo of Mg^{2+} by Zn^{2+} in Rubisco – CO_2 – Me^{2+} Complexes as a Result of Toxic Zinc Nutrition to *Phaseolus vulgaris* L., *Arch. Internat., Physiol. Biochim.*, 92:V18 – V19, 1984.

VANCE, C.K., MILLER, A.F., Spectroscopic Comparison of the pH Dependencies of Fe-Substituted (Mn) Superoxide Dismutase , Fe-superoxide Dismutase, *Biochemistry*, 37, 5518 - 5527, 1998.

VERMA S., DUBEY R.S., Lead Toxicity Induces Lipid Peroxidation , Alters the Activities of Antioxidant Enzymes in Growing Rice Plants, *Plant Sci.*, 164, 645 - 655, 2003.

WANG, G., SU, M.Y., CHEN, Y.H., LIN, F.F., LUO, D., , GAO, S.F., Transfer Characteristics of Cadmium , Lead from Soil to the Edible Parts of Six Vegetable Species in Southeastern China, *Environ. Pollut.*, in press., 2006.

WANG, S. Y., JIAO, H. , FAUST, M., Changes in Ascorbate, Glutathione , Related Enzyme Activity During Thidiazuron - Induced Bud Break of Apple, *Plant Physiology*, 82, 231-236, 1991.

WEIGEL, H.J., Inhibition of Photosynthetic Reactions of Isolated Intact Chloroplast by Cadmium, *J. Plant Physiol*, 119, 179-189, 1985.

YADAV, S.K., Heavy Metals Toxicity in Plants: An Overview on the Role of Glutathione, Phytochelatins in Heavy Metal Stress Tolerance of Plants, South African Journal of Botany 76, 167–179, 2010.

YÜRÜR, N., Serin İklim Tahılları (Tahıllar – I), Uludağ Üniversitesi, 169 – 195, Bursa, 1994.

ZENGİN, K.F., MUNZUROĞLU, Ö., 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, 2005.

ZHELJAZKOV, V.D., CRAKER, L.E. , XING B., Effects of Cd, Pb, Cu on Growth, Essential Oil Contents in Dill, Pepermint, Basil, Environ. Exp. Bot., in press., 2005.

ÖZGEÇMİŞ

Esin GEZER, 20.02.1985 yılında Isparta'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Isparta'da tamamladı. 2004 yılında Erciyes Üniversitesi Fen – Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 2008 yılında lisanstan mezun olduktan sonra Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.