

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ARPA'DA KÖK BÜYÜMESİ, ANTİOKSİDATİF ENZİM AKTİVİTESİ VE
LİPİD PEROKSİDASYONU ÜZERİNE ARSENİK'İN ETKİSİ**

SEZGİ PEKŞEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. FİLİZ SANAL

EDİRNE-2014

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Yılmaz ÇAMLITEPE
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Filiz SANAL
Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoloji Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri :

Yrd.Doç.Dr.Filiz SANAL (Danışman)

Doç.Dr.Ayşegül ÇERKEZKAYABEKİR

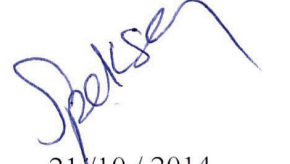
Yrd.Doç.Dr.Elvan BAKAR

İmza

Tarih: 21 /10 / 2014

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

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.



21/10/2014

Sezgi Pekşen

Yüksek Lisans Tezi

Arpa'da Kök Büyümesi, Antioksidatif Enzim Aktivitesi ve Lipid Peroksidasyonu

Üzerine Arsenik'in Etkisi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada Arseniğin (As) Arpa bitkisinin (*Hordeum vulgare*) Sladoran ve Balkan 96 iki çeşidinde 10 µM (düşük ve non toksik doz) ve 50 µM (yüksek ve toksik doz) iki konsantrasyonunun çimlenme oranı, kök uzunluğu kuru ve taze ağırlık gibi fizyolojik parametreler değerlendirilmiş, arseniğin kök dokusunda Superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), Guaiacol peroxidase (GPX) gibi antioksidatif enzimlere ve oksidatif stresin önemli bir belirleyicisi olan lipid peroksidasyona etkileri incelenerek, arpa bitkisinin, arsenik toksisitesine biyokimyasal olarak cevabı araştırılmıştır.

Arsenik, doz artışına paralel olarak arpada, her iki çeşitte kök büyümesini inhibe etmiş, köklerde taze ve kuru ağırlık belirgin şekilde azalmış, köklerde lipid peroksidasyonuna sebep olmuştur.

Bunun yanı sıra, arseniğin oluşturduğu oksidatif stres karşısında arpa bitkisi kök dokusunda; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), guaiacol peroksidaz (GPX) gibi antioksidatif enzimlerin aktivitelerindeki değişikliklerle cevap verilmiştir. APX ve CAT enzimlerinin aktivitelerinde anlamlı bir azalma ($p<0.005$) görülürken, SOD enzim aktivitesinde artma meydana gelmiştir. GPX enzim aktivitesinde ise anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir.

Yıl : 2014

Sayfa Sayısı : 59

Anahtar Kelimeler : Arsenik, Arpa(*Hordeum vulgare*), Lipid peroksidasyonu , Antioksidatif Enzimler

Master Thesis

Root Growth In Barley, Antioxidative Enzyme Activity and Effect of Arsenic on Lipid Peroxidation

Trakya University Institute of Natural Sciences

Biology Department

ABSTRACT

In this study, physiological parameters of Sladoran and Balkan 96 species of barley (*Hordeum vulgare*) Arsenic (As) such as germination rate, root length and dry and wet weight were evaluated in 10 μ M (low and non-toxic dose) and 50 μ M (high and toxic dose) two concentrations, its effect on antioxidative enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), Guaiacol peroxidase (GPX) in root tissue of arsenic and effect on lipid peroxidation which is an important determinant of oxidative stress were evaluated, the effect of barley on arsenic toxicity was analyzed in biochemical sense.

Parallel to dose increase, arsenic inhibits root growth in both species of barley, dry and wet weight decreased distinctly, it caused lipid peroxidation in the roots.

Besides, against oxidative stress caused by arsenic, barley reacted in root tissue with changes in antioxidative enzyme activities such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), Guaiacol peroxidase (GPX). While there was a significant ($p < 0.005$) decrease in activities of APX and CAT enzyme activities, there was increase in SOD enzyme activities. There was no significant change in GPX enzyme activity.

Year : 2014

Number of Pages : 59

Keywords : Arsenic, Barley(*Hordeum vulgare*), Lipid peroxidation , Antioxidative Enzymes

TEŐEKKÖR

Çalıőmamın belirlenmesinden son aőamasına kadar bilgisini ve tecrubesini benden esirgemeyen ve burs almama olanak sağlayan sevgili hocam Yrd.Doç.Dr. Filiz SANAL' a,

Bu çalışmanın istatiksels analizlerinde yardımları için Doç.Dr. Enis ULUÇAM' a ve Doç.Dr. Utku GÖNER'e,

Yüksek lisansım süresince manevi desteklerini eksik etmeyen Doç.Dr. Ayőegöl ÇERKEZKAYABEKİR'e ve Yrd. Doç.Dr. Elvan BAKAR'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi TUBAP-2011/177 nolu proje ile desteklenmiştir.

SEZGİ PEKŞEN

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.....	4
GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Arpa.....	4
2.2 Bitki Gelişimini Etkileyen Stres Koşulları.....	6
2.3 Ağır Metal Kirliliği.....	6
2.4 Arsenik.....	11
2.5 Arseniğin Besin Alınımı ve Membran Üzerindeki Etkisi.....	12
2.6 Oksidatif Stres.....	13
2.9 Süperoksid Dismutaz (EC 1.15.1.1).....	19
2.10 Katalaz (EC 1.11.1.6).....	21
2.11 Askorbat Peroksidaz (EC 1.11.1.11).....	22
BÖLÜM 3.....	24
MATERYAL VE METOD.....	24
3.1 Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Arsenik Uygulanması.....	24
3.2 Çimlenme Oranı, Kök Uzunluğu, Taze ve Kuru Ağırlık.....	24
3.3 Lipit Peroksidasyonunun Ölçülmesi.....	25
3.4 Protein Tayini.....	25
3.5 Enzim Aktiviteleri İçin Köklerin Ekstraksiyonu.....	26
3.6 Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	26
3.7 Hücre Ölümünün Belirlenmesi.....	27
3.8 İstatistiksel Analiz.....	27

BÖLÜM 4	28
SONUÇLAR	28
4.1 Arsenik Uygulamasının Kök Uzunluğu Üzerine Etkisi	28
4.3 Arsenik Uygulamasının Arpa Çeşitlerinde Kök Taze ve Kuru Ağırlığı Üzerine Etkisi	30
4.5 Köklerdeki Total Protein İçeriğinin Belirlenmesi.....	33
4.6 Arseniğin Arpa Çeşitlerinin Köklerindeki Antioksidan Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine Etkisi.....	34
4.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi.....	34
4.6.2. Katalaz (CAT) Aktivitesi Üzerine Etkisi	36
4.6.3. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi Üzerine Etkisi	38
4.6.4 Guaicol Peroksidaz (GPX) aktivitesi üzerine etkisi.....	39
4.7 Hücre Ölümünün Belirlenmesi	41
BÖLÜM 5	42
TARTIŞMA	42
KAYNAKLAR	51
ÖZ GEÇMİŞ	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

As : Arsenik

MDA : Malondialdehit

SOD : Süperoksit Dismutaz

CAT : Katalaz

APX: Askorbat Peroksidaz

GPX: Guaiacol Peroksidaz

ROT: Reaktif Oksijen Türleri

H₂O₂: Hidrojen peroksit

TBA: Thiobarbituric asit

TCA: Trichloroacetic acid

PVP: Polivinilprolidon

NBT: Nitro Blue Tetrazolium

Al: Alüminyum

Pb: Kurşun

Cd: Kadmiyum

Zn: Çinko

Fe: Demir

Mn: Mangan

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. ROT oluşumuna neden olan olaylar [44].....	14
Şekil 2.2. Ağır metal nedeniyle oluşan ROT üretim yolları. (siyah noktalar apoplast ve hücre için de biriken ağır metal (M) dağılımını göstermektedir [52]	16
Şekil 2.3. Antioksidan tarafından serbest radikalın elektrok aktarımıyla nötralize edilmesi [57].....	19
Şekil 2.4. Oksidatif stresin etkilerini hafifletmede SOD, CAT ve APX in birlikte hareketi.....	21
Şekil 2.5. Katalaz Reaksiyonu [19].....	21
Şekil 4.1. Balkan-96 çeşidi arpa bitkisinin kök uzunluklarının arsenik doz miktarına göre değişimi.....	29
Şekil 4.2. Sladoran çeşidi arpa bitkisinin kök uzunluklarının arsenik doz miktarına göre değişimi.....	29
Şekil 4.3. Balkan-96 çeşidinde 10 µM ve 50 µM Arsenik konsantrasyonuna göre MDA içeriğinin kontrol grubuna göre değişimi.....	32
Şekil 4.4. Sladoran çeşidinde 10 µM ve 50 µM Arsenik konsantrasyonuna göre MDA içeriğinin kontrol grubuna göre değişimi.....	32
Şekil 4.5. Balkan-96 çeşidinde 10 µM ve 50 µM Arsenik konsantrasyonuna göre köklerdeki total protein içerikleri.....	33
Şekil 4.6. Sladoran çeşidinde 10 µM ve 50 µM Arsenik konsantrasyonuna göre köklerdeki total protein içerikleri.....	34
Şekil 4.7. Balkan-96 çeşidinde Arsenik konsantrasyonuna göre köklerdeki SOD enzim aktivitesi değişimleri.....	35
Şekil 4.8. Sladoran çeşidinde Arsenik konsantrasyonuna göre köklerdeki SOD enzim aktivitesi değişimleri.....	36
Şekil 4.9. Balkan-96 çeşidinde Arsenik konsantrasyonuna göre köklerdeki CAT enzim aktivitesi değişimleri.....	37
Şekil 4.10. Sladoran çeşidinde Arsenik konsantrasyonuna göre köklerdeki CAT enzim aktivitesi değişimleri.....	37

Şekil 4.11. Balkan-96 çeşidinde Arsenik konsantrasyonuna göre köklerdeki APX enzim aktivitesi değişimleri	38
Şekil 4.12. Sladoran çeşidinde Arsenik konsantrasyonuna göre köklerdeki APX enzim aktivitesi değişimleri	39
Şekil 4.13. Balkan-96 çeşidinde Arsenik konsantrasyonuna göre köklerdeki GPX enzim aktivitesi değişimleri	40
Şekil 4.14. Sladoran çeşidinde Arsenik konsantrasyonuna göre köklerdeki GPX enzim aktivitesi değişimleri	40
Şekil 4.15. 10 µM ve 50 µM arsenik doz uygulanmış arpa köklerinde Evans Blue ile hücre ölümünün gösterilmesi.	41

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1. Son verilere göre Türkiye’de arpa üretimi [2]	1
Tablo 2.1. Türkiye’ de son 5 yılda üretimi yapılan tahıl miktarları.	5
Tablo 2.2. 100 gr arpada bulunan besin değerleri [20]	5
Tablo 2.3. Antioksidan enzimlerin görevleri ve lokalizasyonları[46]	23
Tablo 4.1. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan arseniğin arpa tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisi	30
Tablo 4.2. Farklı konsantrasyonlarda arsenik uygulanmış Balkan 96 ve Sladoran çeşidi arpa köklerinde taze ve kuru ağırlık değişimleri	31

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Türkiye iklim özellikleri ve uygun coğrafi yapısı açısından, tarımsal üretimde dünya tarımında önemli bir yere sahiptir. Tahıl üretimi Türkiye de tüm ülke sathına yayılmıştır. Tahıl ürünleri, insan beslenmesindeki önemi yanında milyonlarca üreticinin gelir kaynağını oluşturmakla birlikte, gıda sanayine de ham madde sağlamaktadır [1].

Arpa (*Hordeum vulgare* L.), buğdaygillerden taneleri malt ve yem olarak kullanılan önemli bir tahıl bitkisidir. Tarih öncesi devirlerdeki en önemli kültür bitkilerinden biri olmakla birlikte, ekonomik önemi olan bitkilerin başında gelmektedir.

Arpa, ülkemizde tarla ürünleri arasında ekiliş alanı bakımından buğdaydan sonra gelen üründür. 2012-2013 yılları arasında TÜİK'in verdiği değerlere göre toplam tahıl üretiminde en büyük paya sahip olan buğdayın üretimi %98, yem sanayinin en önemli girdilerini oluşturan arpanın üretimi %91,8 ve mısırın ise %77,5 olduğu belirtilmiştir [2].

Arpanın insan beslenmesinde doğrudan kullanımı çok azdır. Hayvancılık da doğrudan tüketilme özelliğine sahiptir; ayrıca yem ve malt sanayinin de önemli bir hammaddesidir [3]. Tablo 1'de Türkiye'de toplam arpa üretimi ve üretimde maltlık ve yemlik dağılımları gösterilmiştir.

Tablo 1.1. Son verilere göre Türkiye'de arpa üretimi [2]

ARPA (BARLEY)			
ÜRETİM (TON)	TOPLAM	MALTLIK	DİĞER
2008	5 923 000	523 000	5 400 000
2009	7 300 000	650 000	6 650 000
2010	7 250 000	600 000	6 650 000
2011	7 600 000	630 000	6 970 000
2012	7 100 000	590 000	6 510 000
2013	7 900 000	560 000	7 340 000

Doğal ve tarımsal bitkilerin yetiştiği topraklar giderek ağır metallerle (Al, As, Pb, Cd, Zn, Hg, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni) kirlenmiş ve bu kirlilik bitkiler için toksik olabilecek seviyeye ulaşmıştır [4].

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 [5].

Arsenik biyolojik proseslerde hayati önemi olmayan, bitki, hayvan ve insanlar için toksik bir elementtir [6]. Arseniğin yaygın kaynakları yarı iletken üretimi, çöp depolama alanlarındaki sızıntılar, gübreler, insektisitler ve herbisitler, ahşap koruyucular, kokusuz boya üretimi, madencilik maden eritme ve kömür tutuşturucularıdır [7, 8].

Dünya sağlık örgütü yer altı sularında izin verilebilir arsenik limitini $0,05 \text{ mgL}^{-1}$ olarak belirlemiştir [9]. Bu sebepten dolayı toprak ve su kirliliğine neden olduğu için, başta insanlar olmak üzere bitki ve hayvan hayatını olumsuz yönde tehdit etmektedir. Toprakta seviyesi yükselen arsenik bitki gelişimini etkileyen ve çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik bozukluklar ile sonuçlanan toksisiteye neden olur [10].

Kontamine olmuş sulama suları ile sulanan topraklarda yetişen tahıllarda biriken arsenik insanlık için giderek önemi artan bir problemdir [11]. Çünkü tahıllar ana besinkaynaklarından biridir ve tohumda, bitki kök ve gövdelerinde biriken arsenik besin zinciri yolu ile insana kadar ulaşmaktadır [12].

Tüm bu veriler dikkate alındığında ülkemizde de yaygın ve bilinçsiz olarak herbisit ve pestisit kullanımı mevcut olduğundan ve sulama sularına karışan sanayi atıklarında arsenik bileşikleri içerebileceği göz önüne alınarak, bitkiler üzerindeki arsenik toksisitesinin incelenmesi amacıyla bu tez çalışması planlanmıştır. Örnek bitki olarak ülkemizde yaygın olarak tarımı yapılan biri maltlık diğeri ise yemlik olarak üretilen arpa bitkisinin iki çeşidi Sladoran ve Balkan 96 seçilmiştir.

Sladoran çeşidi; Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından 1998 yılında tescil ettirilmiştir. Kışlık bir çeşit olup soğukluğa dayanıklılığının iyi olduğu belirtilmiştir. Sladoran çeşidi özellikle maltlık sanayide kullanılan kalitesi çok yüksek bir çeşittir. Balkan 96 çeşidi ise, Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından 1996 yılında tescil ettirilmiştir. Bu çeşit özellikle yemlik olarak yetiştirilen bir arpa çeşididir.

Bu alışma ile, arseniğin 10 μM (düşük ve non toksik doz) ve 50 μM (yüksek ve toksik doz) iki konsantrasyonunun arpa bitkisinde çimlenme oranı, kök uzunluğu, kuru ve taze ağırlık gibi fizyolojik parametreleri üzerine etkilerinin yanı sıra, Superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), Guaiacol peroksidaz (GPX) gibi kök dokusundaki antioksidatif enzimlere ve lipit peroksidasyonu seviyelerine etkilerini inceleyerek arpa bitkisinin çimlenmenin erken fazında arsenik tarafından köklerde oluşan oksidatif strese cevabı belirlenmeye çalışılmıştır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Arpa

Arpa yeryüzünde ilk kültüre alınan bitkidir. Mezopotamya ve Eski Yunan uygarlıklarında da önemli bir yer tutmaktadır. Yunancada arpaya günlük ekmek anlamına gelen ‘alphita’ denilmiştir [13-15].

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 [15-17].

Yabani yıllık arpa türleri, diğer türlere göre göreceli olarak açık habitatlarda düşük rekabetle yetişirler. Yabani arpa Doğu Akdeniz Bölgesi, Kuzeybatı Asya’da geniş iklim ve topraklarda yayılmıştır. Genellikle yabani arpa uç düşüklükteki sıcaklıklara toleranslı değildir ve 1500 m rakım üzerinde nadiren bulunur. Ancak yabani buğdaya göre kuraklığa daha dayanıklıdır. Nispeten sıcak steplerde ve çöllerde yaygın olarak bulunur [18].

Arpa taneleri, malt ve yem olarak kullanılan önemli bir tahıl bitkisidir [15, 16, 19]. Serin iklim tahıllarından olan arpa en iyi gelişimini sıcaklığı 0°C’nin altına düşmeyen ve 18 – 25 °C’nin üstüne çıkmayan nisbi nem oranı sürekli olarak % 70 ve % 80 arasında değişiklik gösteren yerlerde gösterir. Arpa kuraklığa ve düşük sıcaklıklara da son derece dayanıksızdır. Arpa çeşitlerinin çoğu –10°C civarındaki düşük sıcaklıklardan zarar görür. Bundan dolayı arpanın kışlık ekimi bir çok bölgede sınırlı olmakla birlikte, yazlık ekimler suyu bol ve yüksek verimli topraklarda yapılmaktadır. Arpa için en uygun topraklar milli, havalanması ve nemliliği uygun, nötr topraklardır [15].

Türkiye çapındaki üretimi ve yüzölçümü bakımından TÜİK değerlerine göre arpa, buğdaydan sonra üretilen en önemli ikinci tahıldır (Tablo. 2).

Tablo 2.1. Türkiye’ de son 5 yılda üretimi yapılan tahıl miktarları.

Üretim (TON)	TOPLAM	BUĞDAY	ARPA	MISIR	PİRİNÇ
2009	120 677 087	81 000 000	30 100 000	5 920 000	967 541
2010	121 002 714	81 034 000	30 400 000	5 940 000	990 000
2011	119 034 352	80 960 000	28 688 331	5 890 000	994 000
2012	112 933 013	75 296 394	27 487 664	6 226 094	1 197 247
2013	115 403 221	77 726 000	27 205 100	6 599 980	1 105 924

Rusya dünyanın en iyi arpa üreticilerinin lideridir. Rusya’yı Fransa, Kanada ve Almanya izlemektedir. Bu ülkelerin yanında Türkiye ve Ukrayna’da da önemli ölçüde arpa üretimi vardır [16].

100 g arpada bulunan besin değerleri aşağıdaki tablodaki gibidir [20].

Tablo 2.2. 100 gr arpada bulunan besin değerleri [20]

Karbonhidrat (g)	64.31
Protein (g)	9.84
Yağ (g)	2.10
Kolesterol (mg)	0.00
Sodyum (mg)	18.00
Potasyum (mg)	444.00
Kalsiyum	38.00
Vitamin A	0.00
Vitamin C	0.00
Demir	2.80

Arpa; yüksek besin içeriği sayesinde hayvan besini olarak tercih edilmektedir. Ayrıca bira ve likör yapımında kullanılan bir hammaddedir [21].

Trakya Bölgesinde, maltlık olarak; Bolayır, Sladoran, yemlik olarak ise; Balkan 96, Martı, ve Harman olmak üzere 5 çeşit arpa tescillendirilmiştir. 2014 yılında Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından melezleme çalışmaları sonucunda ‘Hasat’ arpa çeşidi tescilendirilmiştir.

2.2 Bitki Gelişimini Etkileyen Stres Koşulları

Bir çevrede devamlı ya da aralıklarla gözlenen olumsuz ancak hemen öldürücü olmayan koşullara ‘stres’ adı verilir. Yani bitki metabolizmasının dengesini bozan , büyüme ve gelişmeyi etkileyen, engelleyen, uygun olmayan durum stres olarak adlandırılır.

“Bitkiler, yaşadıkları çevrede çeşitli olumsuz koşullara maruz kalabilirler. Bu koşullar biyotik ve abiyotik olarak incelenebilir. Biyotik faktörlere bitkilerin sayıca çok olduğu bölgelerdeki bitki kalabalığı örnek olarak verilebilir. Ayrıca parazit bitkiler strese neden olabilirler. Abiyotik faktörler ise radyasyon, uygun olmayan sıcaklık koşulları, kuraklık veya su baskınları gibi su stresleri, mekanik etkiler (rüzgar, toprak kayması) gibi biyolojik kaynaklı olmayan olumsuz koşullardır” [21].

Bitkiler her zaman uygun çevre şartları altında bulunmazlar. Kurak alanlar, tuzlu topraklar, dağlık alanlar ve kutup bölgelerinin ekolojik koşulları bitkilerin yaşamlarını olumsuz yönde etkilemektedir. Ayrıca son yıllarda hava, toprak ve su kirleticileri de bitkilerin yaşamını olumsuz yönde etkileyen faktörler arasına girmiştir [10, 15].

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 bir çok olumsuz durumları ortaya çıkarmıştır. Özellikle son yıllarda sanayileşmeyle artan ağır metal kirliliği birçok ülke için ciddi çevre sorunlarını beraberinde getirmektedir [15].

2.3 Ağır Metal Kirliliği

Endüstriyel atık sularla kirlenen tarım alanlarında yetişen bitkilerde, ürün kayıpları görülmektedir. Bitki çeşidine bağlı olarak tarımsal alanlarda ağır metal iyonu (As^{+2} , Cd^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2}) konsantrasyonlarının toksik düzeyde bulunması ile

bitkide bazı olumsuzlukların görülmesine neden olan olay ‘ağır metal stresi’ olarak tanımlanır [22].

Ağır metaller, yer kabuğunda doğal olarak bulunan bileşiklerdir. Bozulmaz ve yok edilemezler. İnsan vücuduna gıdalar, içme suyu ve hava yolu ile girerler. Bazı ağır metaller (örneğin bakır, selenyum, çinko) insan vücudunun metabolizmasını sürdürmek için gereklidir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda toksik olabilirler. Örneğin ağır metal bulaşması olmuş içme suyundan tüketilmesi ile, kirli hava konsantrasyonunun yüksek olması sebebiyle veya gıda zinciri yoluyla ağır metal zehirlenmesi oluşabilmektedir. [23, 24]. “Yıllık olarak doğal çevrimler sonucu 7600 ton kadmiyum, 18800 ton arsenik, 3600 ton cıva, 332000 ton kurşun atmosfere salınmaktadır. İnsan aktiviteleri katkısıyla da bu oranlar daha fazla artmaktadır” [24].

Ağır metaller, büyük ölçüde insan kaynaklı aktiviteler sonucunda toprağa yayılır ve bu durum, bitki verimliliğini kısıtlayan en önemli çevresel kirleticilerden biri olmasına sebep gösterilir [25].

Endüstrileşme ile birlikte insan kaynaklı aktiviteler sonucu oluşan ağır metaller ve pestisitler gibi toksik maddeler doğal çevrenin kirlenmesine neden olmuştur. Günümüzde atıkların oluşturduğu ağır metal kirliliği, yerkürenin farklı bölgelerindeki hava, kara ve su ekosistemlerinde toksik seviyelere ulaşmıştır. Ağır metaller, madencilik, maden eritimi, elektrolizle kaplama, enerji ve yakıt üretimi, güç nakli, yoğun tarımsal faaliyetler, evsel atıklar ve askeri operasyonlar gibi insan kaynaklı faaliyetlerin sonucunda önemli çevre kirliliği yaratmaktadır [4].

Ağır metal daha çok çevresel problemler sonucunda ortaya çıkmakla birlikte düşük konsantrasyonlarda bile toksik veya zehirleyici olan metal şeklinde tarif edilmektedir [26].

Ağır metaller, çevre şartlarına dayanıklı yapıları, biyolojik sistemi tehdit edici etkileri ve kolayca besin zincirine girip canlı organizmalarda birikme eğilimi göstermeleri nedeniyle diğer kimyasal kirleticiler arasında ayrı bir yere sahiptir [25, 27]. Ağır metaller, ekolojik dengeyi bozan, canlı büyüme ve gelişmesini önemli oranda etkileyen, çevreyi kirleten temel kaynaklardan biridir [28].

Topraktaki ağır metal kirliliğinin bitkilerdeki semptomları metalden metale ve etki süresine göre değişebildiği gibi, bitki türleri arasında da farklılık göstermektedir [24, 29].

Bitkilerdeki metal duyarlılığı ve toksitesi yalnızca konsantrasyon ve toksikant tipi değil aynı zamanda biyolojik proseslerle de ilgilidir (çimlenme, fidelerin hayatta kalması, vegetatif büyüme). Tohum çimlenmesi ve erken fidelenme diğer hayat evreleri ile karşılaştırıldığında metal kirliliğine daha duyarlıdır. Çünkü savunma mekanizmalarının bazıları henüz gelişmemiştir ve bu nedenle toksisite değerlendirmelerinde önemlidir [11].

Ağır metal kirliliğine maruz kalmış bitkilerde fotosentez ile topraktan su, mineral alımın transpirasyon, stoma hareketleri, fotosentez, enzim aktivitesi, çimlenme, protein sentezi, membran stabilitesi, hormonal denge, nükleik asit yapısı, hücre bölünmesi, kök tüyü yoğunluğunun azalması gibi birçok fizyolojik olayın bozulmasına neden olmaktadır [24, 30].

Topraklara bulaşan ve birikim yapan ağır metaller, toprak verimliliğine, biyolojik çeşitliliğe ve ürünlerdeki verim kaybına, hatta besin zinciri yoluyla zehirlenmelere kadar bir çok çevre, bitki ve insan sağlığı sorunlarının ortaya çıkmasına neden olabilmektedir.

Endüstriyel atık sularla toprak ekosistemine ulaşan ağır metaller, toprakta birikmektedir. Toprakta biriken bu ağır metallerin çözünürlüğü toprağın pH değerinden önemli ölçüde etkilenmektedir. Ağır metallerin topraktaki aktivitesi genellikle toprağın pH değeriyle ters orantılı olarak değişmektedir [22].

Ağır metallerin, atmosferde, suda ve topraktaki konsantrasyonunun belli bir seviyenin üzerine çıkması, tüm canlılar için ciddi problemlere neden olmaktadır [31]. Ağır metaller, doğrudan doğruya toprağa gelip, oradan bitkilere, hatta bazı koşullarda taban sularına ulaşır. Kısmen de yüzeysel akışla uzak çevreye yayılırlar [26].

Bitkilerde ağır metal stresi, serbest radikal (single oksijen, süperoksit radikali, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi sorbent radikal) oluşumunu teşvik ederek bitki dokularına zarar vermekte ve oksidatif zararlara yol açmaktadır.

Bitkiler, ağır metallerin neden olduğu bu zararların üstesinden gelebilmek için çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu savunma mekanizmaları; düşük molekül ağırlıklı ve metal bağlayan bir polipeptid sınıfı olan bitki şelatları ile antioksidant savunma sistemlerini içermektedir. Bitkiler, oksidatif zararlara karşı kendilerini koruyan çeşitli antioksidant molekül (askorbat, glutatyon, α -tokoferol) ve

enzimlere (süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz, peroksidaz, askorbat peroksidaz, katalaz vb.) sahiptirler. Çeşitli bitkilerde ağır metallerin toksik düzeylerine karşı geliştirilen savunma mekanizmasında antioksidant enzimlerin önemli rol oynadığı bildirilmiştir [22].

Mn, Cu, Zn, Mo ve Ni gibi ağır metaller yüksek yapılı bitkiler için gerekli ve faydalı mikro besinlerdir. Zn^{+2} ve Cu^{+2} bitkilerin büyüme ve gelişmesinde önemli rol oynayan protein ve enzimlerin yapısı için gerekli kofaktör olarak görev yaparlar [32, 33].

Bu metaller bitkiler için yararlı ve gerekli mikro besinlerken yüksek konsantrasyonlarda bulduklarında diğer ağır metaller gibi toksik etki gösterirler ve çevre için tehlike oluştururlar. Önemli mikro besin olarak bu elementler hücrede kofaktör, spesifik enzimlerin aktivatörü veya organik molekülleri stabilize etme gibi rolleri üstlenirler [15].

Arsenik (As), civa (Hg), Cd ve Pb gibi bazı ağır metaller ise bitki ve hayvan gelişimi için gerekli olmayan elementlerdir [34]. Çok küçük konsantrasyonları bile toksik etkiler yapar. Ağır metallerin, atmosferde, suda ve topraktaki konsantrasyonunun belli bir seviyenin üzerine çıkması, tüm canlılar için ciddi problemlere neden olmaktadır. Bir çok 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 [35].

Toprak ve suyun arsenikle kirlenmesi, endüstriyel atıkların atılması ve işlenmesi, gübreler, pestisitler, madencilik eritme işlemleri ve yakma prosesleri gibi çok sayıda endüstriyel aktivite sonucu meydana gelir. Madencilikte özellikle bakır, kurşun, çinko, altın ve gümüş üretiminde arsenik çevreye yayılır [36].

Ağır metal kirliliğine maruz kalan bitkilerde özellikle, kök hücre duvarları ve plazma membranı tehlike altındadır. Çünkü kök metalle ilk karşılaşan organdır ve çoğu metalin %70-90'ı köklerde birikir [30,37].

Ağır metaller topraklarda, kolloidlere tutunmuş halde, organik maddelere bağlı halde ve toprak çözeltisi içinde iyon halinde bulunurlar. Bitkiler ancak toprak çözeltisinde iyon halinde bulunan ağır metalleri kökleri aracılığıyla alabilirler. Koşulların değişmesi (pH, sıcaklık, organik madde miktarı, diğer metallerin varlığı, mikroorganizmalar vb.) toprak çözeltisi içindeki ağır metal konsantrasyonunu

değiştireceğinden ağır metal alınımını da etkileyecektir. Örneğin pH'ın düşmesi ortamdaki H^+ iyonlarının artmasına neden olmaktadır, artan H^+ katyonları, ağır metal katyonları ile rekabete girmekte, kolloidlere tutunmasını engellemekte ve böylece ağır metallerin toprak çözeltisindeki konsantrasyonunun artmasına neden olmaktadır.

Aşırı ağır metale maruz kalma, bitkilerde birçok değişikliklere neden olmaktadır. Bu değişikliklerin yol açtığı zararların bir kısmı gözle görülebilir ve ölçülebilir (morfolojik değişiklikler) düzeyde iken, birçoğunun saptanabilmesi ise karmaşık biyokimyasal analizleri gerektirmektedir.

Yüksek ağır metal konsantrasyonuna maruz kalmış bitkilerin köklerinde bazı morfolojik farklılıklar göze çarpmaktadır; kök boylarında kısalma 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 [14].

Genel olarak insanların arseniğe maruz kalma yollarından birisi de toprak bitki transferidir. İnorganik arsenik (arsenat ve arsenit) bitkiler için yüksek derecede toksiktir. Çünkü fosforilasyonu çözer ve fosfat alınımını inhibe eder. Yüksek konsantrasyonları bitki büyümesini inhibe edebilir. Hatta bitkiyi ölüme götürebilir [13].

Yapılan incelemeler tohum çimlenme aşamasının bazı savunma mekanizmaları henüz gelişmediğinden metal kirliliğine daha duyarlı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle toksisite değerlendirmeleri yapılırken bu aşamanın incelenmesi önemlidir [21].

Bazı metaller enzimlerin çalışmasında önemli rolleri olan kofaktörleri oluştururlar. Fakat bazı zamanlarda yüksek konsantrasyondaki başka ağır metaller kofaktör görevi yapan metallerin yerine geçerek enzim aktivitelerinde azalmaya neden olabilirler. Örneğin; “Bakır, nikel, kurşun ve kadmiyumun belirli konsantrasyonlarının bitkilerde hücre membranlarında bulunan ADENİN TRİFOSFATAZ (ATPaz) enziminin aktivitesini azalttığı belirtilmiştir.” Bu durum fotosentetik kapasiteye etki etmektedir. Yine benzer bir durum ise süperoksit dismutaz (SOD) enziminde demir yerine magnezyum geçmesi şeklinde de görülmektedir [15].

2.4 Arsenik

Arsenik, kimyada 'As' sembolü ile gösterilir. Periyodik cetvelde azot ailesinde bulunur ve metalloid özellik gösterir. Bazı biçimleri metale benzer, fakat element olarak genellikle, ametal sınıfında yer alır. Bileşikleri gri ve sarı kristaller olarak iki ayrı biçimde bulunan arsenik, M.Ö. 4. yüzyıl'dan beri bilinmesine rağmen, element olarak ancak 17. yüzyıl'da tanımlanmıştır. Bazı belgelere göre arsenik, ilk kez Alman eczacı Johann Schroeder tarafından serbest element halinde tanımlanmış ve arseniğin oksidi ise, 1649'da arseniğin taş kömürü ile ısıtılması sonucu elde edilmiştir. Bakır, kurşun gibi metallerin eritilmesiyle de yan ürün olarak arsenik oluşabilmektedir.

Arseniğin gaz formu en toksik formudur. Doğada en çok bulunan formu ise; inorganik formu olan arsenik trioksittir (As_2O_3). Oranları topraktaki organik maddelere de bağlı olan arsenik, organik maddelerin okside olmasıyla birlikte suya, oradan da sudaki canlılara ve bitkilere geçmektedir. İçeriğinde arsenik olan pestisitlerin toprakta birkaç yıl kullanılması sonucu arsenik, bu miktarın birkaç yüz katı kadar artış göstermektedir [9].

Arsenik, metalik gri renğinde, böcek ve tarım ilaçları, fare zehiri, bazı kanser ilaçları, boya, dişçilikte, duvar kağıdı, seramik gibi çeşitli ürünlerin imalatında kullanılan toksik bir ağır metaldir. Ayrıca pestisit, herbisit ve akarisit formülasyonlarında, yağlı boya sanayinde, seramikçilik ve ağaç koruyucusu olarak, sülfirik asit üretiminde, kanatlı ve domuz yemlerinde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Tüm bu alanlar arseniğin besinlere bulaşmasının kaynağını oluşturmaktadır [10].

Arsenik; sanayi, madencilik ve tarımsal faaliyetler aracılığıyla ortama dağılan toksik bir metaldir. Doğal ortamda toprağı kirletir ve suyu kontamine eder. Bu durum bitkiler, hayvanlar ve insanlar için ciddi bir tehlike yaratmaktadır [6, 26, 38].

Dünyanın birçok bölgesinde arsenikle kontamine olmuş yer altı suları rapor edilmiştir [21].

Yer altı sularının As kirlenmesi sonucu Bangladeş ve Hindistan 'ın Batı Bengal bölgesi'nde milyonlarca insan arsenikle kontamine olan su içtiklerinden dolayı, arsenik zehirlenmesi riski yaşamışlardır [32, 39]. Arsenik zehirlenmesi salgına neden olarak,

birçok kişide gelişmiş deri hastalıklarına ve kanserlerine sebep olmaktadır [38]. Arsenik embriyolarda da kronik etkilere, DNA hasarlarına veya kanserlere sebep olabilir [10].

Arseniğin bir sistemden diğer bir sisteme geçişi genellikle su ile olur. Bitkiler, gelişimleri için gerekli olmamasına rağmen, aldıkları Arseniği organlarında biriktirmektedirler. Yüksek arsenik seviyeleri bitkilerin gelişiminde depresyona neden olabilir. Fakat bu etkiyi oluşturan miktar bitkinin türüne ve arsenik dozuna bağlıdır. 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 [40].

İnorganik arsenik oldukça fitotoksiktir. [39] Çünkü fosforilasyonu çözer ve fosfat alımını inhibe eder. Yüksek konsantrasyonları bitki büyümesini inhibe edebilir. Hatta bitkiyi ölüme götürebilir [13].

Bitki türüne göre değişmekle birlikte, belli bir konsantrasyondan sonra As alınımı, bitkilerde çeşitli zararlara yol açmaktadır. Bitkilerin aşırı ağır metale maruz kaldıklarında, bu metalleri dokularında biriktirdikleri göz önüne alınırsa, ürün kaybı yanında tarım bitkilerinin tüketilebilir sağlıklı besin olma özellikleri de azalacaktır [4, 12]. Metal alınımı ve taşınımı bitki türü ve metal çeşidine göre farklılık göstermektedir. Bitkiler havada gaz halinde bulunan metalleri stomaları aracılığıyla ve kolloidlere tutunmuş şekilde, organik maddelere bağlı ve toprak çözeltisi içinde iyon halinde bulunan ağır metalleri ise kökleri aracılığıyla almaktadır [40].

2.5 Arseniğin Besin Alınımı ve Membran Üzerindeki Etkisi

Yüksek konsantrasyonda arsenik, bitki metabolizmasına zarar verir. Besin alınımını etkiler ve ayrıca besin transportunda makro ve mikro besinlerin rekabet yoluyla alınımını etkiler [30, 37].

Buna örnek olarak bitkilerde fosfor (P) alımı verilebilir. Yüksek arsenik dozu hücre metabolizmasında öncelikle P alınımını inhibe eder [30].

Yüksek arsenik dozu hücre membran kompozisyonunda değişiklikler neden olmakla birlikte, hücreyi arseniğin toksik etkilerinden korumak için membran

transportunda azalmalar meydana gelir [41]. Bunun sonucunda diğere önemli besin alımlarını da kesintiye uğratabilir [42].

As toksitesi, bitkilerde sık sık zayıf tohum çimlenmesi ve kök büyümesinde çok belirgin azalmalara neden olarak ortaya çıkar. Bu etkiyle birlikte As, P kullanılabilirliğini de etkilemektedir. Bu etki plazma membranının yapısının hızlı bozulmasıyla ilgili olabilir [43].

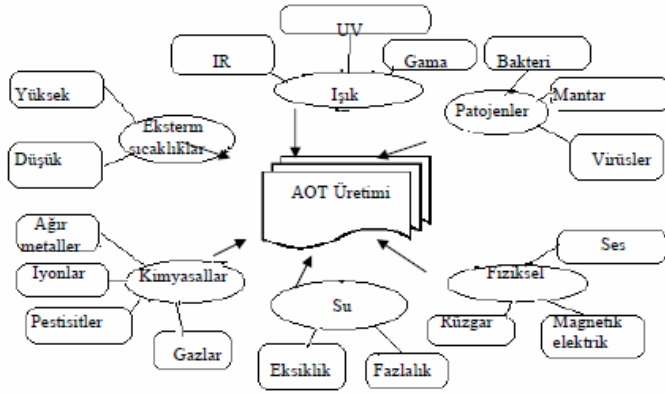
Membran hasarı, bitki hücrelerinde dengesiz besin ve su alınımına neden olur ve stoma iletkenliğini azaltır [30]. Bir çok çalışma arseniğin kök büyümesini inhibe ettiğini, kök uçlarında mitotik aktivitede anormalliklere neden olduğunu, mikrotübül hasarı oluşturduğunu ve hücre membranında istikrarsızlıklara yol açtığını göstermiştir [44].

2.6 Oksidatif Stres

Oksijen yaşam için önemli bir moleküldür. O₂ molekülü şeklindeyken az aktif bir maddedir ama normal metabolizma sırasında, çeşitli çevre şartlarında ve kirleticilerin bulunduğu ortamlarda (radyasyon, kuraklık, hava kirliliği sigara dumanı, sıcaklık stresi herbisitler v.s.) yüksek derecede toksik ara moleküller oluşturur.

Hücrede normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda, enzimlerin aktif bölgesinde ara ürünler olarak devamlı şekilde serbest radikaller oluşturur. Bazen, bu serbest radikal ara ürünler, enzimlerin aktif bölgelerinden sızmakta, moleküler oksijenle etkileşerek serbest oksijen radikalleri oluşturmaktadırlar [45].

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 stres koşullarında aktif oksijen türlerini üreten mekanizmalar devreye girer [15]. Hücrede ROT, "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinen mekanizmalarla ortadan kaldırılır. Ancak bazen hücresel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırılardan daha fazla ROT oluşabilir [30] (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. ROT oluşumuna neden olan olaylar [30]

Organizmada hücrel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırılardan daha fazla ROT meydana gelmesi oksidatif stres olarak tanımlanır [21, 46].

ROT'lar bitkilerde endojen olarak kloroplastlardaki fotosentez reaksiyonlarında, plastit ve peroksizomlarda, mitokondrilerdeki sitrik asit döngüsünde NADPH oksidaz, hücre duvarı peroksidazları ve amino oksidazlar gibi enzimlerin etkisiyle oluşan en yoğun serbest radikallerdir [47].

Ağır metaller, bitki büyüme, gelişme ve ürün verimi üzerine zararlı etkileri olan ciddi çevre kirleticileridir. "Proteinlerin sülfidril gruplarının metaller tarafından tutulması, önemli hücrel aktivitelerin inhibisyonu, hücrel yapıların parçalanması ya da esansiyel elementlerin hücrel yapıdan uzaklaştırılması sonucu meydana gelen değişiklikler, ağır metallerin oluşturduğu toksisiteye bağlı sonuçlardır. Ayrıca ağır metal alımında artış, oksidatif stresin sonucu olarak reaktif oksijen türleri (ROT) ve serbest radikallerin oluşumunu uyarabilir" [48].

Superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve askorbat peroksidaz (APX) gibi kompleks antioksidant sistemler; hücre zarı ve organelleri ROT'nin zararlı etkilerinden korumakta çok önemlidir [49-51]. Ağır metallerin yüksek konsantrasyonlarına uzun süre maruz kalan bitkilerin primer cevabı reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumudur [5].

ROT lar serbest radikallerin en yaygın formu olan 'serbest oksijen radikalleri'dir. Moleküler oksijen, aşırı enerjiyle eşleşmemiş elektronlardan birisinin

ters dönmesiyle aktive olabilmekte ve tekli oksijen oluşturmaktadır. Hücredeki oksidatif stresin seviyesi reaktif oksijen türlerinin miktarı ile belirlenmektedir.

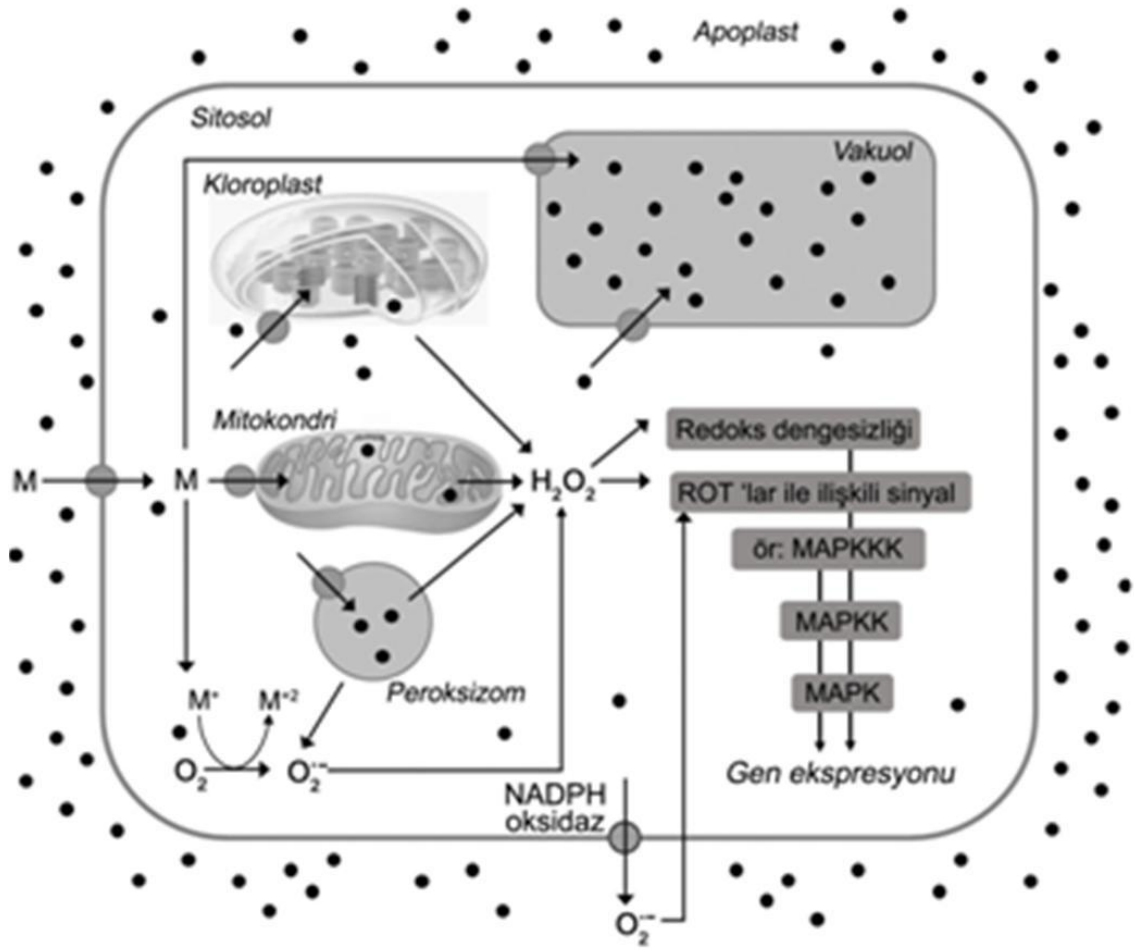
Stres koşullarında ROT'ların artan üretimi hücreler için bir tehdit olabilmekte; fakat ROT'ların stres cevabı ve savunma yollarının aktivasyonunda bir sinyal molekülü olarak fonksiyon gördüğü düşünülmektedir. Bu nedenle, ROT'ların hücrel stres indikatörleri ve stres cevap sinyal iletim yollarında sekonder mesajcı olduğu belirtilmiştir [4].

Bitkilerde tıpkı diğer aerobik organizmalar gibi enerji üretebilmek için oksijene ihtiyaç duyarlar. Fakat sürekli olarak oksijenin hücre içerisindeki varlığı hücrel yapılar ve reaksiyonlar için oksidatif bir tehlikeyi de beraberinde getirmektedir. Aktif oksijen türlerinin normal şartlar altında hücrelerde üretimi sıkı bir şekilde kontrol edilir ve aktif oksijen türleri atmosferik oksijenin miktarını azaltır [15, 31, 36].

O₂'nin iki molekül suya indirgenmesi dört elektronun transferiyle olur. Singlet oksijen (O₂), süperoksit radikali (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikali (OH[•]), O₂'nin spin inversiyonu ve O₂'ye sırasıyla bir, iki ve üç elektronun transferi sonucu üretilir [36, 52].

Ağır metaller, lipitlere bağlanarak ve/veya ROT oluşumunu artırıp lipit peroksidasyonuna neden olarak membranların (hücre, kloroplast, mitokondri, tilakoid membranları vb.) yapılarının ve işlevlerinin değişmesine sebep olurlar [4, 19].

Ağır metaller taşıyıcılar tarafından hücre içine alınmakta ve metabolizmayı etkileyerek organellerde ROT oluşumuna neden olmaktadır. Plazma membranına lokalize olan NADPH, Oksidaz enzimin ağır metal bağımlı aktivasyonu sonucu, ROT üretiminde artış olur. Aşırı ROT üretimi ise hücre membran hasarına ve sinyal yollarında işlev bozukluğuna neden olur [53] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Ağır metal nedeniyle oluşan ROT üretim yolları. (siyah noktalar apoplast ve hücre için de biriken ağır metal (M) dağılımını göstermektedir [53])

2.7 Ağır Metallerin Membran Hasarı ve Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkisi

Bitkilerin ağır metallere maruz kalmasıyla oluşan en zararlı etkilerinden biri de lipid peroksidasyonudur. Bu durum doğrudan membran hasarına neden olur [5].

Serbest radikaller, hücrenin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Hücre membranı çoklu doymamış yağ asitlerince zengindir ve kolayca bu etkiye maruz kalır. Bu tepkime çok zararlıdır. Çünkü zincirleme olarak ilerler. Membrandaki doymamış yağ asitleri serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar [4].

Membran lipidlerinin temel bileşenlerinden olan çoklu doymamış yağ asitleri peroksidasyona karşı duyarlıdır. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür [53].

Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Bunun sonucu olarak yağ asidi zinciri bir lipid radikali özelliği kazanır. Oluşan lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Molekül içi çift bağların pozisyonunun değişmesiyle dien konjugatları ve daha sonra lipid radikalinin moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksil radikali meydana gelir. Lipid peroksil radikalleri, membran yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlere dönüşürler. Böylece olay kendi kendine katalizlenerek devam eder [46].

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 [53].

Lipid peroksidasyonun son ürünü olan malondialdehid (MDA), hücre membranlarından iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar. Böylece MDA iyon geçirgenliği ve enzim aktivitesinde değişimler gibi olumsuz sonuçlara neden olur [18].

Serbest radikallerde hücrenin membranına saldırdıklarında hücre membranının stabilizasyonunu ortadan kaldırarak, hızlı biçimde hücre ve doku bozulmalarına neden olurlar [21].

Biyotik ve abiyotik stres koşulları sonucu hücrelerde aktif oksijen türleri üretilir ve bu türler hücre canlılığını etkileyen lipidler, proteinler, pigmentler ve nükleik asitlerle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonuna, membran hasarına ve enzimlerin inaktivasyonuna neden olurlar [18].

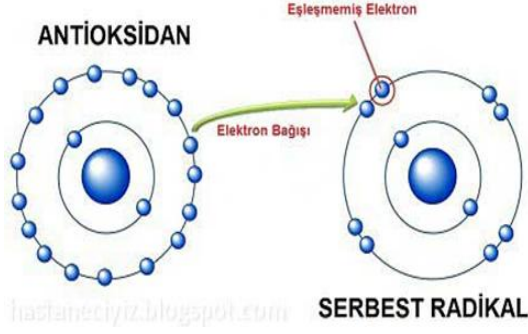
Yağ asitlerinin peroksidasyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkan MDA gibi sitotoksik aldehitler DNA ve proteinler üzerinde önemli zararlara neden olmaktadır. MDA içeriği, lipid peroksidasyonunun bir indeksi olarak kabul edilmekte ve yüksek

seviyede MDA birikimi lipid peroksidasyonunu göstermektedir [53]. Lipid peroksidasyonu; membran bütünlüğünün yok olmasına, hücrenin elektrolitlere permeabilitesinin artmasına neden olur. İçeri özellikle kalsiyum (Ca) ve sodyum (Na) iyonlarının geçişi hücrenin ATP tüketen hale gelmesine neden olarak hücrenin enerji oluşturan mekanizmasını etkileyebilir. Intracelluler Ca iyonlarındaki artış; protein ve lipidlerde daha fazla hasara neden olabilecek proteaz ve fosfolipazı aktive eder. Bu serbest radikal aracılı yöntem aynı zamanda DNA'da yapısal hasar ile hücre ölümüne neden olabilecek enzim inaktivasyonuna neden olabilir [54, 55].

2.8. Antioksidatif Enzimler

Bitkiler serbest radikallerin zararlarından korunmak için kompleks bir antioksidan savunma sistemine sahiptir. Antioksidan terimi, aktif oksijen türlerini, kendisi bir yıkıcı radikale dönüşmeden, baskılayan bir molekül olarak tanımlanabilir. Antioksidan savunma sistemi, enzimleri ve bazı indirgen molekülleri içeren bir sistemdir [34].

Bitkiler oksidatif stres altında yaşamlarını devam ettirebilmek ve stresle başa çıkabilmek için ROT'un kontrolü ve detoksifikasyonunu sağlayan çeşitli antioksidanlara sahiptirler. Antioksidanlar düşük konsantrasyonlar da oksidasyon yapabilen ve diğer bir substratın oksidasyonunu elektron aktarımıyla azaltan veya engelleyen yani oksidasyona karşı mücadele eden maddelerdir [56] (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Antioksidan tarafından serbest radikalın elektrot aktarımıyla nötralize edilmesi [56]

Ağır metal alımında artış, oksidatif stresin sonucu olarak ROT ve serbest radikallerin oluşumunu uyarabilir.

Antioksidatif savunma iki temel kategoride toplanır. Birincisi lipitte çözünür membranla ilişkili antioksidanlardan oluşan düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar; askorbik asit (AA), tokoferoller (vitamin E), karotenoidler, glutatyon ve fenolik bileşikler. İkinci kategoride enzimatik antioksidanlar (SOD, CAT, GPX, APX) ‘dir [10, 56, 57].

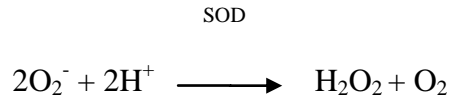
SOD, CAT, APX ve GPX gibi kompleks antioksidant sistemler; hücre zarı ve organelleri ROT ’un zararlı etkilerinden korumakta çok önemlidir. Bu enzimler normal şartlar altında ROT’ ni indirgemedi yeterli olur. Fakat üretimin daha fazla artmasıyla, indirgenme tamamlanamaz ve sonuçta biyomoleküllerin (örneğin; lipitler, proteinler, nükleik asitler, klorofil gibi) oksidasyonu ya da reaktif oksijen türlerinin gereğinden fazla yığılmasıyla hücre ölümleri gerçekleşebilir [4].

2.9 Süperoksid Dismutaz (EC 1.15.1.1)

Süperoksid dismutaz, süperoksid serbest radikalının hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. Hücre içinde mitokondride doğal olarak bulunan bir enzimdir. Süperoksid radikallerini daha az reaktif olan hidrojen peroksit formuna çevirirler. Süperoksid dismutaz (SOD) sistemi, süperoksid anyonunu dismutasyona uğratarak organizmayı korumaktadır ve süperoksid konsantrasyonunun düşük ve sabit konsantrasyonlarda kalmasını sağlamaktadır.

Süper oksit anyonu serbest radikallerin yer aldığı zincir tepkimelerinin kuvvetli bir tetikleyicisi olduğundan SOD, oksidatif strese karşı primer savunma mekanizmasını oluşturmaktadır [21].

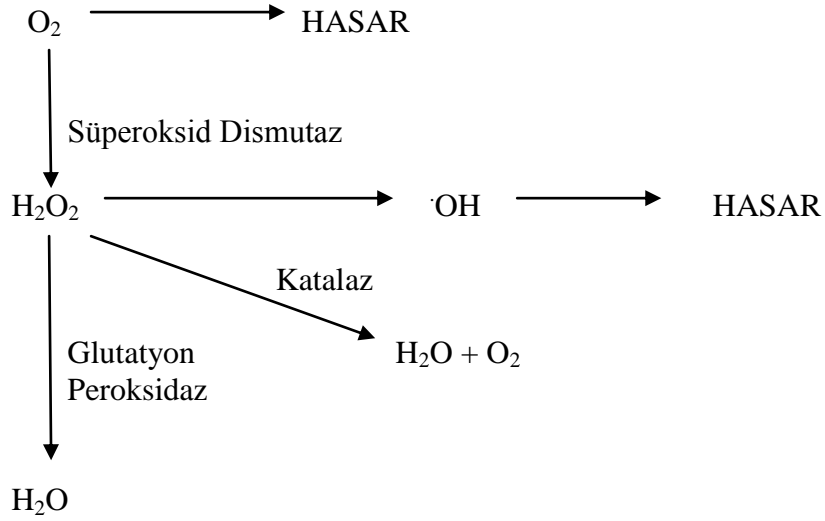
SOD enziminin yüksek katalitik etkisi nedeniyle hücrelerde O_2^- birikimine izin verilmez. Ancak, çeşitli patolojik durumlarda süperoksit yapımının artmasıyla süperoksitde özgü tepkimeler görülmeye başlar. Hidrojen peroksit, aerobik canlılarda süperoksitlerin katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan SOD tarafından katalizlenmesi ile oluşur. SOD enziminin katalizi ile hidrojen peroksit oluşumu aşağıdaki şekilde gerçekleşir [47].



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, Cu – Zn SOD kloroplast ve sitoplazmada yer almaktadır [15, 58].

SOD'ların bu üç farklı tipinden elde edilen amino asit dizilerinin karşılaştırılması ile Mn ve FeSOD'ların eski tipler oldukları ve Cu-ZnSOD'lar Mn-SOD ve FeSOD'lara benzer dizilere sahip olmadığına dayanarak bunların olasılıkla evrimsel süreçte erken dönemde ortaya çıkmış olan enzimlerden köken aldıkları belirtilmiştir. [59].

Süperoksit dismutaz (SOD); katalaz (CAT) ve askorbat peroksidaz (APX) enzimlerinin teşviki ve aktivasyonu bitkilerdeki önemli metal detoksifikasyon mekanizmalarındandır. SOD, CAT ve APX enzimlerinin kombine etkisi oksidatif stresin etkilerini hafifletmede önemlidir [19, 53] (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Oksidatif stresin etkilerini hafifletmede SOD, CAT ve APX in birlikte hareketi

2.10 Katalaz (EC 1.11.1.6)

Katalaz (CAT), sitokrom sistem içeren memeli ve memeli olmayan organizmalarda bulunurken, genelde anaeroblarda bu enzime rastlanmamaktadır. Hemen hemen tüm aerobik mikroorganizmalarda, bitki ve hayvan hücrelerinde katalitik aktivitesi yüksek konsantrasyonda mevcuttur [60].

Katalaz yapısında dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Katalaz esas olarak peroksizomlarda, daha az olarak, sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. Katalaz hidrojen peroksidi (H_2O_2) suya ve oksijene parçalar [21]. (Şekil 2.5)

Tepkime aşağıdaki şekilde gerçekleşir;



Şekil 2.5. Katalaz Reaksiyonu [21]

Her aerobik hücrede CAT, % 80 peroksizomlarda ve % 20 sitozolde bulunmaktadır. CAT enzimi dört alt üiteden oluşmuştur ve her bir alt ünitesinde bir heme [Fe(III)] grubu bulunduran 240 000 dalton molekül ağırlığında bir proteindir [60].

Hidroksil radikallerinin oluşumunu önlemek için hidrojen peroksiti suya ayırıştırır. SOD tarafından dismutasyon tepkimelerinde oluşan hidrojen peroksit molekülünün çok zararlı olan hidroksil radikallerine dönüştürülmesi CAT veya glutation peroksidaz (GPX) tarafından önlenmektedir. Hidrojen peroksidin üretiminin yüksek olduğu peroksizomlarda ve mitokondride, bu üretimi kısıtlamakla sorumlu olan GPX ve CAT bulunur [21].

2.11 Askorbat Peroksidaz (EC 1.11.1.11)

Askorbat peroksidaz (APX) hidrojen peroksidin suya katalizlenmesinde gerçekleşen reaksiyon zincirinin ilk enzimidir. Bu reaksiyon mitokondride, kloroplastta, sitosolde, peroksizomlarda gerçekleşebilir. APX'in kloroplast, sitozol, mitokondri, peroksizomlar ve glioksizomlarda bulunan farklı izoenzimleri vardır [34, 61]. Organellerde bulunan APX, organellerdeki O₂' yi ortadan kaldırırken, sitozolik APX, sitozolde ve apoplastta üretilen ya da organellerden türevlenen O₂' yi bertaraf etmektedir [62-64]. Fotosentez sırasında oluşan H₂O₂'nin uzaklaştırılmasında katalaza yardımcı olurlar [65].

APX yüksek bitkiler, algler, kamçılılar gibi birçok organizmada ROT'a karşı gerçekleştirilen savunmada önemli role sahip olduğu düşünülen enzimatik antioksidanlardandır.

Yapılmış olan çalışmalarda *Ceratophyllum demersum* L. (tilki kuyruğu), *Brassica juncea* L. Czern. (hardal), *Triticum aestivum* L. (buğday), *Vigna mungo* L. (siyah mercimek) ve *Phaseolus vulgaris* L. (fasulye) gibi birçok organizmada stres koşulları altında APX enzim aktivitesinde ve gen ekspresyonunda artışlar olduğu gözlenmiş ve bu artışların stres savunmasıyla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür [56].

2.12 Guaiacol peroksidaz (EC 1.11.1.7)

Guaiacol peroksidaz (GPX) kloroplastik olmayan, başlıca hücre duvarlarında ve sitoplazmada lokalize olan bir enzimidir [66]. GPX'ler, glutasyonu H₂O₂, organik ve lipit

hidroperoksitlerin miktarını azaltmada kullanan, çeşitli izozimleri olan geniş bir ailedir ve oksidatif strese karşı bitkileri korumada görevlidirler.

Capsicum annuum L. (biber), *Pisum sativum* (bezelye) ve *L. esculentum* (domates) başta olmak üzere pek çok bitkide stres koşulları altında GPX'in koruyucu bir rolü olduğu bulunmuştur [56].

CAT'a benzer olarak peroksidazlar (APX ve POD), H_2O_2 'in uzaklaştırılmasında fonksiyon görmektedir; Bu enzimler H_2O_2 'nin ortamdan uzaklaştırılmasını çeşitli organik ve inorganik indirgenmiş; askorbik asit, glutatyon gibi kosubstratların oksidasyonu ile gerçekleştirirler [53].

Tablo 2.3.Antioksidan enzimlerin görevleri ve lokalizasyonları [46]

Antioksidan Enzimler	Rolü	Hücrel Lokasyonu
Süperoksit Dismutaz (SOD)	O_2^- 'i H_2O_2 'ye dönüştürür	Kloroplast, sitozol, mitokondri, peroksizom
Askorbat Peroksidaz (APX)	H_2O_2 'yi H_2O 'ya çevirir.	Kloroplast, sitozol, mitokondri, peroksizom
Katalaz (CAT)	H_2O_2 'yi H_2O 'ya çevirir.	Peroksizom
Glutatyon Peroksidaz (GPX)	H_2O_2 'yi ve lipid peroksitlerini etkisizleştirir.	Kloroplast, sitozol, mitokondri, endoplazmik retikulum

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

Bu araştırmada Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından adaptasyon çalışmaları sonucu geliştirilen Sladoran ve Balkan 96 eşidi arpa tohumları kullanılmış ve bir ağır metal olan arsenik'in etkileri incelenmiştir. Salodran eşidi malt kalitesi oldukça yüksek olan biralık olarak malt sanayine önerilen bir çeşittir. Balkan-96 ise yemlik olarak yetiştirilen bir arpa çeşididir.

3.1 Bitkilerin Yetiştirilmesi ve Arsenik Uygulanması

Çalışmada kullanılan tüm tohumlara imlendirmeye bırakılmadan önce % 1.5'luk sodyum hipoklorit çözeltisinde 20 dakika süre ile yüzey sterilizasyonu uygulandı. Sterilizasyon sonrası 3 kez distile su ile yıkandı. Çimlenme işlemi sırasında sulama suyu olarak, 10 μM ve 50 μM Sodyum arsenat, kontrole ise distile su kullanıldı. Tohumlar, içinde filtre kağıdı bulunan petri kaplarında, her petriye 50 adet tohum gelecek şekilde ve 7 mL çözelti ile ıslatılarak çimlenmeye bırakıldı.

Arpa tohumları 20 $^{\circ}\text{C}$ de 16 saat fotoperiyot uygulanarak bitki büyütme kabininde 96 saat süre ile karanlıkta çimlenmeye bırakıldı.

3.2 Çimlenme Oranı, Kök Uzunluğu, Taze ve Kuru Ağırlık

Çimlenme yüzdesini belirlemek üzere, tohumlar petrilere distile su ile ıslatılmış filtre kağıtları arasında çimlenmeye bırakıldı. Tohumlar imlenmeye bırakılmadan önce yüzey sterilizasyonuna tabi tutuldu. Arpa tohumları sodyum arsenatın taze hazırlanmış solusyonları ile sulandı. Kontrol grubu için distile su kullanıldı. 1-5 mm radikula

uzaması olan tohumlar çimlenmiş olarak değerlendirildi. Çimlenme yüzdesi kontrol plaklarında çimlenen tohumlar baz alınarak hesaplandı.

Sodyum arsenat'ın farklı dozlarının kök uzunluğu üzerine etkisini araştırmak için çimlenmeye bırakılan arpa tohumlarının dördüncü günün sonunda, yetiştirilen her fideciğin saçak köklerinden en uzununu ölçülerek kök uzunlukları kaydedildi. Gelişen kökler hipokotilden kök saçağı dikkatlice kesildikten ve kurutma kağıdı ile suyu alındıktan sonra hızlıca tartıldı, taze ağırlıkları not edildi. Kuru ağırlık için kökler 60°C'de 72 saat kurumaya bırakıldı. Kurutma işleminin sonunda kökler tartılıp kuru ağırlıkları belirlendi.

3.3 Lipit Peroksidasyonunun Ölçülmesi

Kökteki lipid peroksidasyonunu ölçmek için Thiobarbutirik asit (TBA) yöntemi kullanıldı [39]. Sodyum arsenat ($\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)'ın 10 ve 50 μM konsantrasyonlarda taze hazırlanmış çözeltileri ile sulanmış arpa tohumları petri plaklarında 20 °C de karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Kontrol grubu için distile su kullanıldı. Çimlenmenin 4. gününde tohumlardan taze 0,2 gr kök örnekleri ayrıldı Köklerden arseniği uzaklaştırmak için saf su ile birkaç kez yıkandı ve kurutma kağıdı ile suları alındıktan sonra -80 °C' de saklandı. Dondurulmuş kökler %10'luk Trikloroasetik asitte (TCA) hazırlanmış % 0,25'lik TBA 'da cam teflon homojenizatör de homojenize edildi. Ekstrakt 95°Cde 30 dk. kaynatıldı. Hızla soğutuldu ve 10.000 x g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant'ın 532 nm ve 600 nm deki absorbansları ölçüldü. Lipid peroksidasyonu seviyesini işaret etmek üzere Lipid peroksidasyon ürünü MDA (malondialdehit) miktarı 1,55 mM cm^{-1} ekstinksiyon katsayısı kullanılarak mmol g^{-1} taze ağırlık olarak ifade edildi.

3.4 Protein Tayini

Sodyum arsenat'ın arpa köklerindeki total protein miktarı üzerine etkisinin araştırılması amacıyla; kökler pH: 5.2 50 mM Malat tamponuda, homojenize edildikten

sonra 5000 rpm'de santrifüj edildi ve protein miktarları Lowry yöntemine göre Folin reaktifi kullanılarak spektrofotometrik olarak 700 nm'de ölçüldü [67].

3.5 Enzim Aktiviteleri İçin Köklerin Ekstraksiyonu

0,2 gr kök, +4 °C de, cam-cam homojenizatör kullanılarak % 0,1 polivinilprolidon (PVP) ve 1 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren 2 mL 50 mM pH 7,0, K-fosfat tamponunda homojenize edildi. Ekstrakt iki kat tülbent kullanılarak süzüldü ve +4 °C de 15 000 rpm'de 30 dk santrifüj edildi. Bu ekstraktlar, SOD, CAT, GPX, APX enzimlerinin aktivite ölçümlerinde kullanıldı. Ekstraktlar enzim çalışmalarından hemen önce taze olarak hazırlandı.

3.6 Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Katalaz (EC 1.11.1.6) aktivitesinin belirlenmesi için Singh ve ark. uyguladığı yöntem modifiye edilerek kullanıldı [10]. %30 H₂O₂ içeren 1.2 ml 50 mM (pH 7,0) K-fosfat tamponun'dan oluşan bir reaksiyon karışımı kullanıldı. Reaksiyona 850 µL tampona 150 µL ham ekstrakt eklenerek başlandı ve aktivite ekstrakt içermeyen kör tüpüne karşı 4 dakika süre ile 240 nm'de izlendi ($\epsilon=39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Katalaz aktivitesi H₂O₂'nin kaybolma oranına göre ölçüldü.

Guaikol Peroksidaz (EC 1.11.1.7) aktivitesinin belirlenmesi için Singh ve ark. nın uyguladığı yöntem modifiye edilerek kullanıldı [10]. Reaksiyon karışımı (2.25 ml) 50 mM K-fosfat tamponu (pH 7,0), % 1 Guaicol , % 1 H₂O₂ ve 100 µL enzim ekstrakt içermektedir. Aktivite 470'nm de guaicolun oksidasyonu sebebi ile oluşan absorbans artışının ölçülmesi ile belirlendi($\epsilon=26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Askorbat Peroksidaz (EC 1.11.1.11) aktivitesinin ölçülmesinde Singh ve ark.'nın yöntemi modifiye edilerek kullanıldı [10]. Aktivite ölçümünde reaksiyon karışımı (2.0 ml) 50 mM K-fosfat tamponu (pH 7,0), 0.1 mM EDTA, 0.25 mM askorbik asid, % 30 luk H₂O₂ ve 200 µL enzim ekstraktı içerecek şekilde hazırlandı.

APX aktivitesi askorbik asidin dehidroaskorbata oksidasyonu sebebi ile 290 nm de absorbanstaki azalmanın ölçülmesi ile ($\epsilon=2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) belirlendi.

Supeksid Dismutaz (EC 1.15.1.1) aktivitesinin belirlenmesinde Çakmak ve Marschner (1992) tarafından önerilen nitro blue tetrazolium (NBT)'nin fotokimyasal redüksiyonunu inhibe etme özelliği temel alan yöntem kullanıldı [68].

Reaksiyon karışımı (2,5 ml) ; 0.1 mM Na-EDTA içeren 50 mM K-fosfat tamponu (pH 7,0) 100 µL enzim ekstraktı , 50 mM Na₂CO₃, 12 mM L-methionine , 75 µM NBT ve 10 µM riboflavine içermektedir.

Reaksiyon tüpleri spektrofotometrede okuma yapılmadan önce 15 dk florasan ışığın altında, sonrasında da 15 dk karanlıkta inkübasyona bırakılarak 560 nm de okuma yapıldı. Bir ünite enzim aktivitesi 560 nm de NBT'nin %50 inhibisyonunu gerçekleştiren enzim miktarı olarak tanımlandı.

Elde edilen sonuçlar 3 tekrarlı deneylerin ortalamasıdır.

3.7 Hücre Ölümünün Belirlenmesi

Arpa köklerine arsenik dozlarının uygulanmasında sonra kökler yaklaşık 3-4 cm kesilip 3 kez distile su ile yıkandıktan sonra %1 lik Evans Blue ile 30 dk süre ile boyanmıştır. Kökler boyadan çıkarılıp 3 kez distile su ile yıkandıktan sonra binoküler altında incelenmiş ve görüntülenmiştir [69].

3.8 İstatiksel Analiz

İstatistiksel analizler için SPSS 19 programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler aritmetik ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. Verilerin normal dağılıma uygunlukları tek örnek Kolmogorov Smirnov testi ile belirlendi. Değişkenlerin normal dağılıma uyduğu gözlemlendiğinden gruplar arası çoklu karşılaştırmalar için tek yönlü ANOVA testi, post hoc testlerden "Tukey post hoc" testi yapıldı. $p<0.005$ anlamlı kabul edildi.

BÖLÜM 4

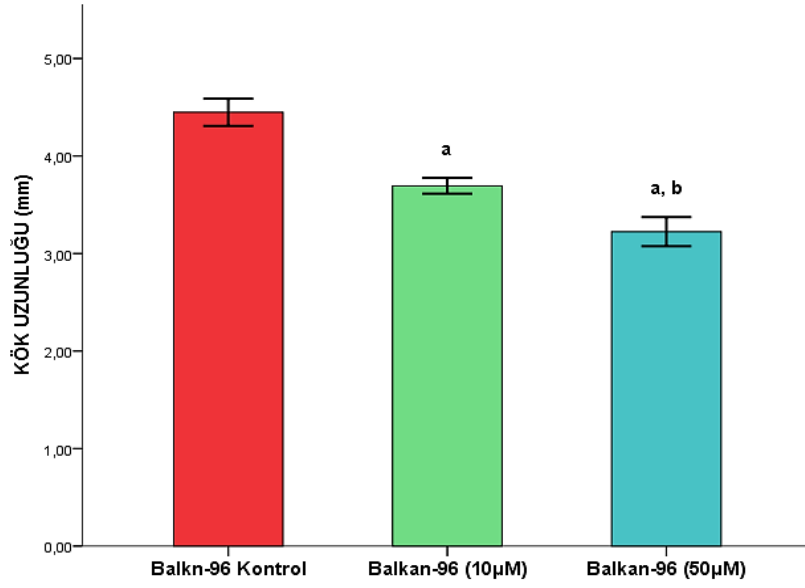
SONUÇLAR

Bu araştırmada iki farklı konsantrasyonda (10 µM ve 50 µM sodyum arsenat) As çözeltisinin arpada çimlenme oranı, kök taze ve kuru ağırlığı; kök uzunluğu ve kökte antioksidatif enzim aktiviteleri üzerine etkileri belirlenmiştir.

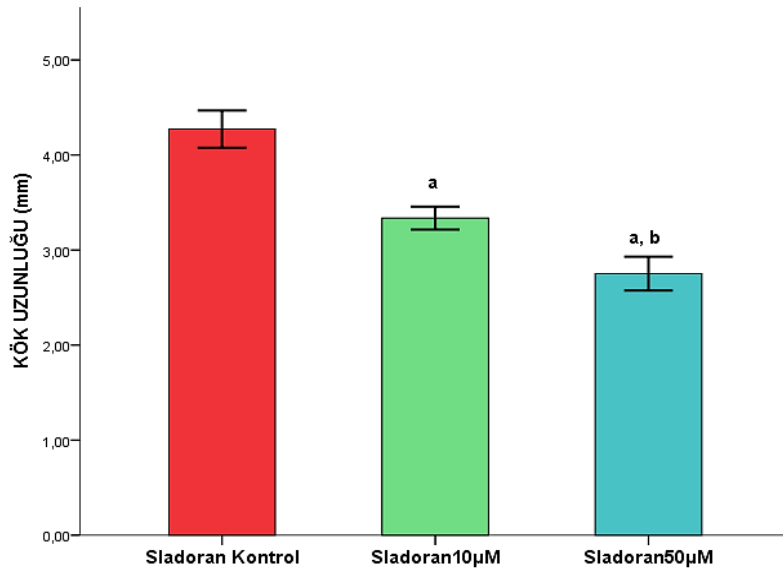
4.1 Arsenik Uygulamasının Kök Uzunluğu Üzerine Etkisi

Uygun fidelenme süresinin sonunda kökuzunlukları ölçülerek kontrol ve deney grupları karşılaştırıldı ve relatif kök uzunluğu olarak ifade edildi.

Bu çalışma da farklı konsantrasyonlarda As uygulaması, kontrol ile karşılaştırıldığında kök uzamasının konsantrasyon artışına bağı olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Balkan-96 çeşidinde 10 µM ve 50 µM Arsenik konsantrasyonuna göre kök uzunluğunun kontrol grubuna göre değişimi
a: kontrol grubu ile karşılaştırma, $p < 0.005$
b: Balkan-96 10 µM arsenik uygulaması ile Balkan- 96 50 µM arsenik uygulaması karşılaştırma, $p < 0.005$



Şekil 4.2. Sladoran çeşidinde 10 µM ve 50 µM Arsenik konsantrasyonuna göre kök uzunluğunun kontrol grubuna göre değişimi
a: kontrol grubu ile karşılaştırma, $p < 0.005$
b: Sladoran10 µM arsenik uygulaması ile Sladoran 50 µM arsenik uygulaması karşılaştırma, $p < 0.005$

4.2 Arsenik Uygulamasının Çimlenme Oranı Üzerine Etkisi

Çimlenmenin 4. gününde radikula ve plumula uzunlukları 1.5 mm'den uzun olanlar çimlenmiş kabul edilerek çimlenen tohum sayısı belirlendi. Kontrol plaklarında çimlenen tohum sayısı baz alınarak çimlenme yüzdeleri hesaplandı.

Arsenik uygulanan deney grubunda konsantrasyon artışına bağlı olarak çimlenme oranında azalma olduğu görüldü (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan arseniğin arpa tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisi

BALKAN-96	Çimlenme yüzdesi	SLADORAN	Çimlenme yüzdesi
Kontrol	100	Kontrol	100
10µM sodyum arsenat	92	10 µM sodyum arsenat	89.3
50µM sodyum arsenat	82	50 µM sodyum arsenat	82.9

4.3 Arsenik Uygulamasının Arpa Çeşitlerinde Kök Taze ve Kuru Ağırlığı Üzerine Etkisi

Taze ağırlıkların tespiti için gelişen kökler hipokotilden kök saçağı dikkatlice kesildikten sonra, kurutma kağıdı ile suyu alındıktan sonra hızlıca tartıldı. Kuru ağırlık ölçümü için kökler 60°C'lik etüvde 72 saat süre ile kurumaya bırakıldı, kurutma işleminin sonunda kökler tartılıp sonuçlar kaydedildi. Arsenik uygulanan deney grubunda konsantrasyon artışına bağlı olarak taze ve kuru ağırlıklar da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azalmalar olduğu tespit edildi (Tablo 4.2).

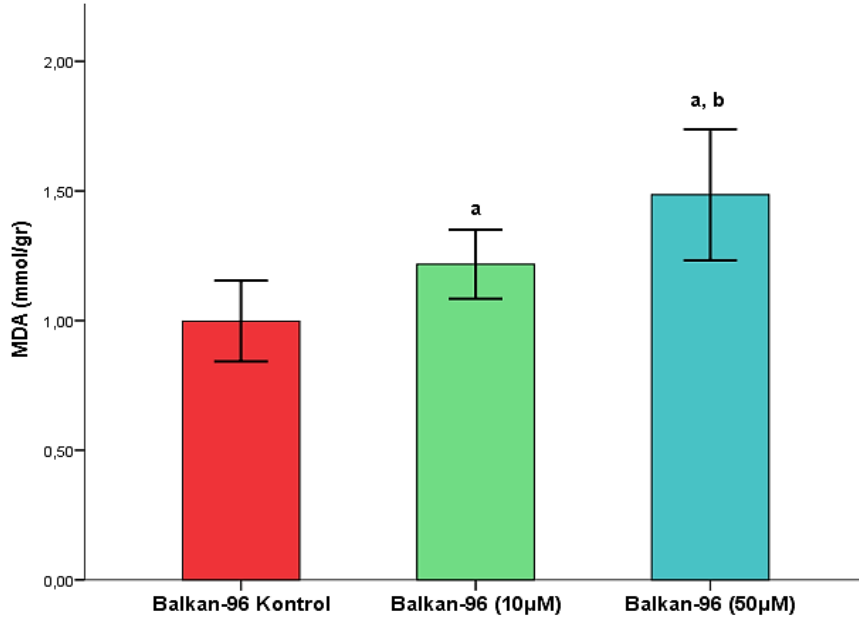
Tablo 4.2. Farklı konsantrasyonlarda arsenik uygulanmış Balkan 96 ve Sladoran arpa köklerinde taze ve kuru ağırlık değişimleri

BALKAN-96	Kök Taze Ağırlık (gr)	Kök Kuru Ağırlık (gr)
Kontrol	1.147	0.199
10µM sodyum arsenat	1.132	0.170
50µM sodyum arsenat	1.100	0.160

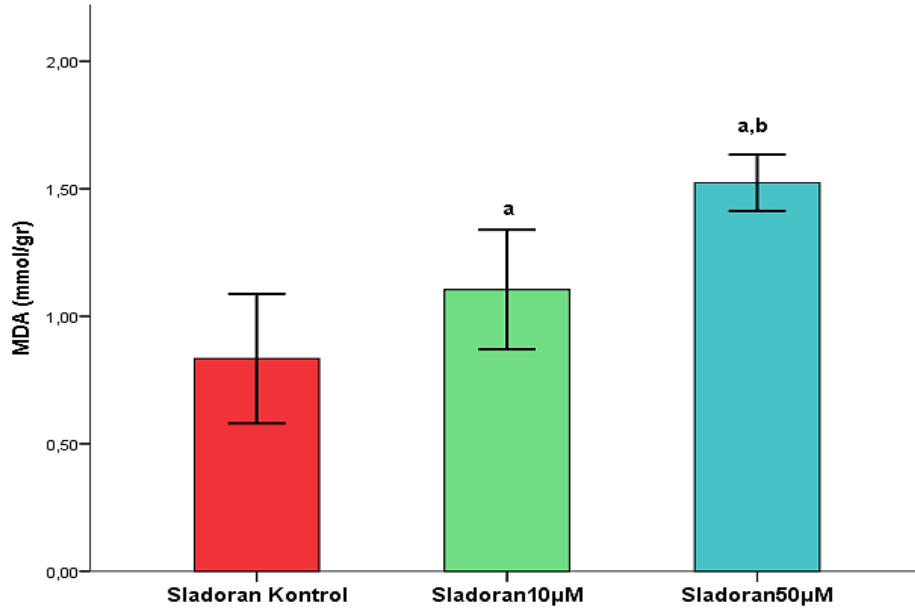
SLADORAN	Kök Taze Ağırlık (gr)	Kök Kuru Ağırlık (gr)
Kontrol	1.418	0.220
10µM sodyum arsenat	1.342	0.190
50µM sodyum arsenat	0.650	0.140

4.4 Arseniğin Arpa Çeşitlerinin Köklerindeki MDA İçeriği Üzerine Etkisi

Köklerde meydana gelen lipid peroksidasyonun derecesinin belirlenmesi için lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA seviyesi ölçüldü. As uygulanan deney gruplarında Balkan 96 ve Sladoran çeşitlerinde konsantrasyon artışına bağlı olarak, kontrol grubuna göre MDA seviyelerinde anlamlı bir artış ($p < 0.005$) tespit edildi (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). Bu durum lipid peroksidasyonunun gerçekleştiğini ve membran hasarının meydana geldiğini düşündürdü.



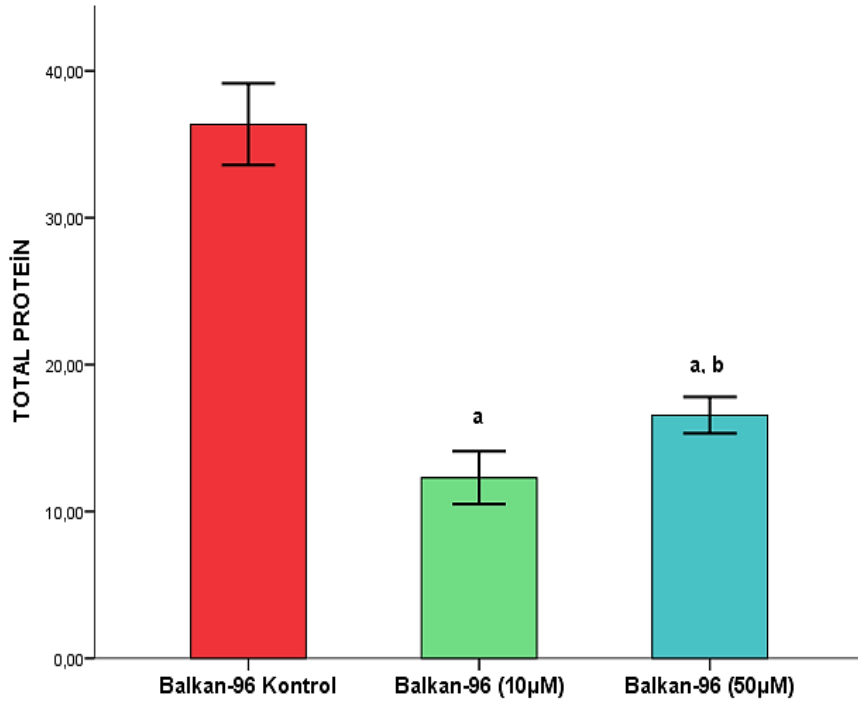
Şekil 4.3.Balkan-96 çeşidinde 10 µM ve 50 µM Arsenik konsantrasyonuna göre MDA içeriğinin kontrol grubuna göre değişimi
a: kontrol grubu ile karşılaştırma, $p < 0.005$
b: Balkan-96 10 µM arsenik uygulaması ile Balkan-96 50 µM arsenik uygulaması karşılaştırma, $p < 0.005$



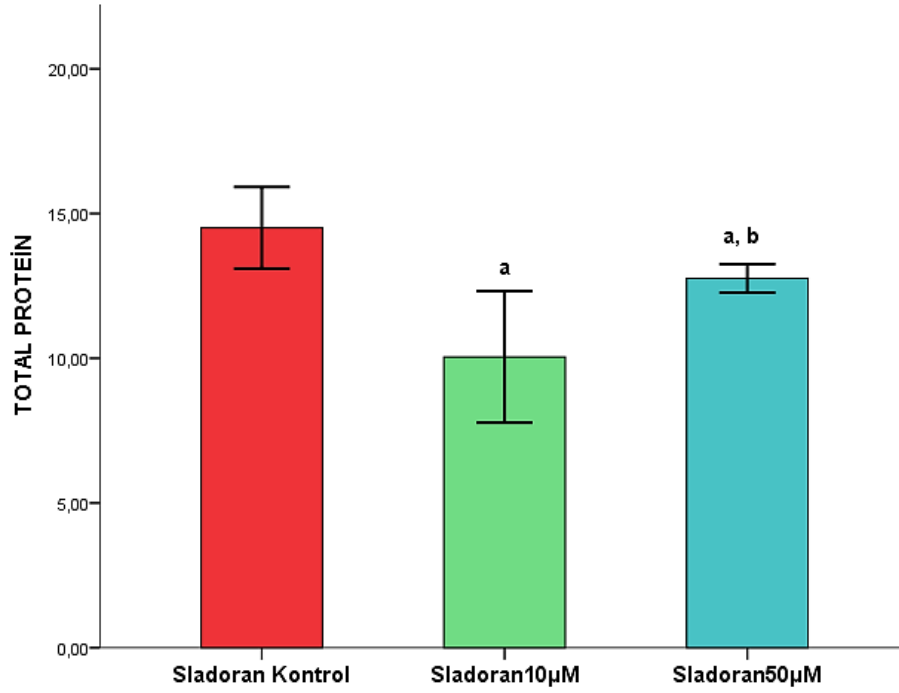
Şekil 4.4.Sladoran çeşidinde 10 µM ve 50 µM Arsenik konsantrasyonuna göre MDA içeriğinin kontrol grubuna göre değişimi
a: kontrol grubu ile karşılaştırma, $p < 0.005$
b: Sladoran 10 µM arsenik uygulaması ile Sladoran 50 µM arsenik uygulaması karşılaştırma, $p < 0.005$

4.5 Köklerdeki Total Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Köklerdeki Protein miktarları Lowry yöntemine göre belirlendi. Her iki arpa türünde de; düşük arsenik dozu (10 μM) uygulanan gruplarda total protein içeriği kontrol grubuna göre azalma gösterirken ($p<0.005$), yüksek dozda arsenik (50 μM) uygulamasının protein içeriğinde 10 μM 'lık doz grubuna göre anlamlı bir artışa neden olduğu görüldü ($p<0.005$)(Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



Şekil 4.5. Balkan-96 çeşidinde 10 μM ve 50 μM Arsenik konsantrasyonuna göre köklerdeki total protein içerikleri
a: kontrol grubu ile karşılaştırma, $p<0.005$
b: Balkan-96 10 μM arsenik uygulaması ile Balkan-96 50 μM arsenik uygulaması karşılaştırma, $p<0.005$



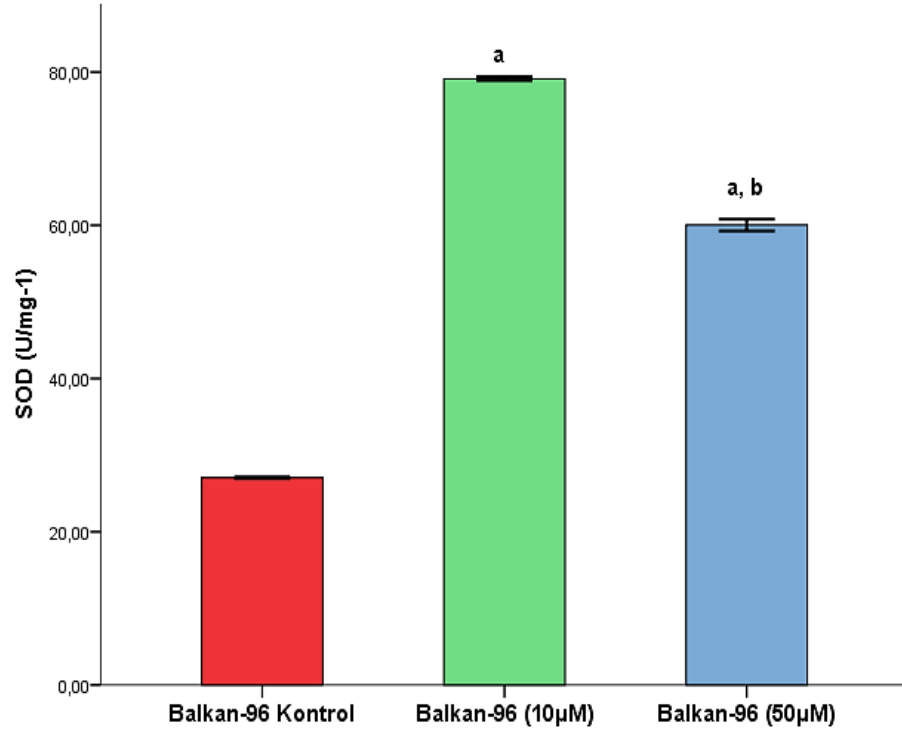
Şekil 4.6.Sladoran çeşidinde 10 µM ve 50 µM Arsenik konsantrasyonuna göre köklerdeki total protein içerikleri
a: kontrol grubu ile karşılaştırma, $p<0.005$
b: Sladoran10 µM arsenik uygulaması ile Sladoran 50 µM arsenik uygulaması karşılaştırma, $p<0.005$

4.6 Arseniğin Arpa Çeşitlerinin Köklerindeki Antioksidan Enzimlerin Aktiviteleri Üzerine Etkisi

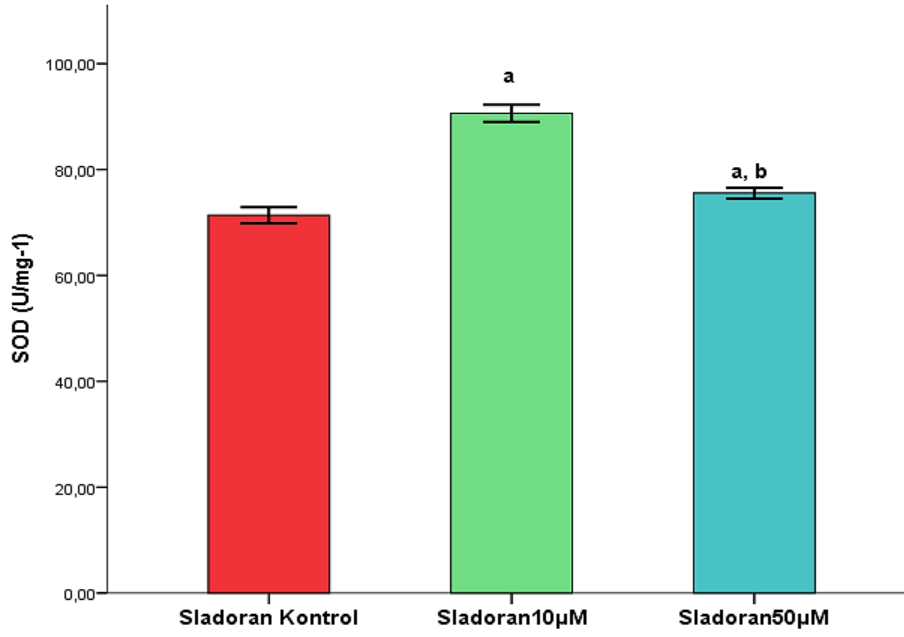
4.6.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi

Her iki türde de Arsenik uygulanan doz gruplarında köklerdeki SOD enzimi aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir. ($p<0.005$) Balkan 96 çeşidinde kontrol grubunda SOD aktivitesi 27,04 U/ml iken, 10 µM'lık dozda 79,13 U/ml'ye yükselmiş, 50 µM'da aktivite 60,02 U/ml'ye düşmekle birlikte kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek kalmıştır. Sladoran çeşidinde köklerde tespit edilen SOD aktiviteleri sırası ile kontrol 71,35 U/ml, 10 µM arsenik uygulamasında 90,61 U/ml ve 50 µM arsenik uygulamasında 75,54 U/ml olarak izlenmiştir.

Her iki arpa çeşidinde de 50 μM 'lık doz uygulanan grupların köklerindeki SOD aktivitesinde 10 μM 'lık doz uygulanan gruba göre anlamlı bir azalma meydana gelmiştir($p<0.005$) (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).



Şekil 4.7: Balkan-96 çeşidinde 10 μM ve 50 μM Arsenik konsantrasyonuna göre köklerdeki SOD enzim aktivitesi değişimleri
a: kontrol grubu ile karşılaştırma, $p<0.005$
b: Balkan-96 10 μM arsenik uygulaması ile Balkan-96 50 μM arsenik uygulaması karşılaştırma, $p<0.005$



Şekil 4.8.Sladoran çeşidinde 10 µM ve 50 µM Arsenik konsantrasyonuna göre köklerdeki SOD enzim aktivitesi değişimleri

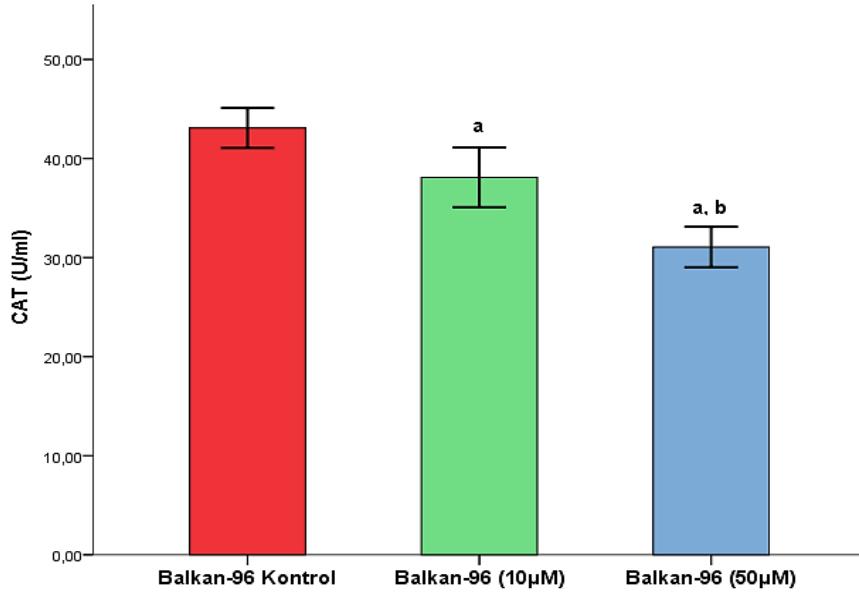
a: kontrol grubu ile karşılaştırma, $p < 0.005$

b: Sladoran 10 µM arsenik uygulaması ile Sladoran 50 µM arsenik uygulaması karşılaştırma, $p < 0.005$

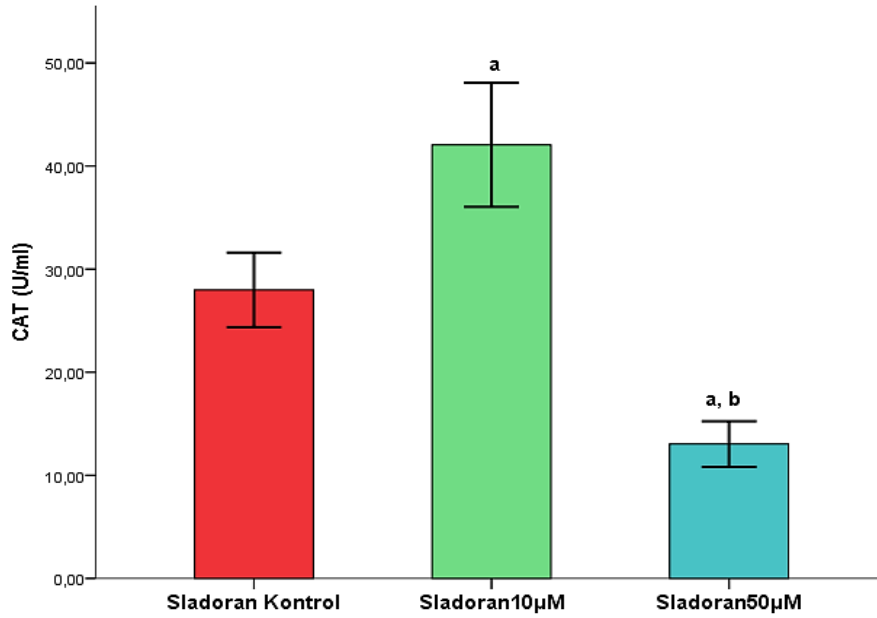
4.6.2. Katalaz (CAT) Aktivitesi Üzerine Etkisi

Arsenik uygulanan deney gruplarında konsantrasyon artışına bağlı olarak, kontrol grubuna göre ve 10 µM ve 50 µM lık her iki doz arasında Balkan-96 çeşidinde katalaz aktivitesinde önemli bir azalma meydana gelmektedir ($p < 0.005$). Kontrol grubunda 43,08 U/ml olarak belirlenen katalaz aktivitesi 10 µM'lık arsenik uygulamasında 38,10 U/ml ye düşerken, 50 µM'lık uygulamada 31,06 U/ml olarak belirlenmiştir (Şekil 4.9).

Sladron çeşidinde ise düşük arsenik dozu uygulaması sonucunda (10 µM) kontrol grubuna göre katalaz aktivitesinde anlamlı bir artış görülmüş, yüksek arsenik dozu (50 µM) uygulamasında katalaz aktivitesi 10 µM'lık doza ve kontrol grubuna göre de anlamlı bir azalma göstermiştir ($p < 0.005$). Kontrol grubunda katalaz aktivitesi 27,99 U/ml iken, 10 µM'lık arsenik uygulamasında aktivite 42,06 U/ml olarak belirlenmiş, 50 µM'lık arsenik uygulamasında ise aktivite 13,03 U/ml olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.9.Balkan-96 çeşidinde 10 µM ve 50 µM Arsenik konsantrasyonuna göre köklerdeki CAT enzim aktivitesi değişimleri
a: kontrol grubu ile karşılaştırma, $p < 0.005$
b: Balkan-96 10 µM arsenik uygulaması ile Balkan-96 50 µM arsenik uygulaması karşılaştırma, $p < 0.005$

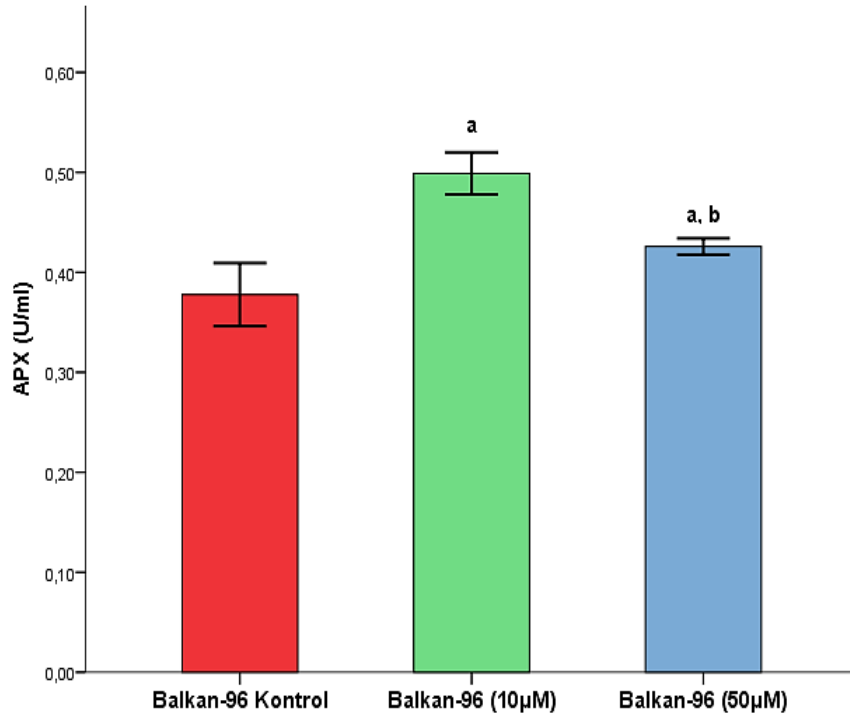


Şekil 4.10.Sladoran çeşidinde 10 µM ve 50 µM Arsenik konsantrasyonuna göre köklerdeki CAT enzim aktivitesi değişimleri
a: kontrol grubu ile karşılaştırma, $p < 0.005$
b: Sladoran10 µM arsenik uygulaması ile Sladoran 50 µM arsenik uygulaması karşılaştırma, $p < 0.005$

4.6.3. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi Üzerine Etkisi

Arsenik uygulanan deney grubunda konsantrasyon artışına bağlı olarak, her iki arpa çeşidinde de 10 μM 'lık konsantrasyon da APX aktivitesin de anlamlı bir artış görülürken ($p<0.005$), 50 μM 'lık konsantrasyon da APX aktivitesin de 10 μM 'lık konsantrasyona göre anlamlı bir azalma görülmüştür($p<0.005$) (Şekil 4.11). Ancak her iki konsantrasyonda doz artışına bağlı olarak kontrol grubuna göre anlamlı bir aktivite artışı görülmüştür($p<0.005$) (Şekil 4.11).

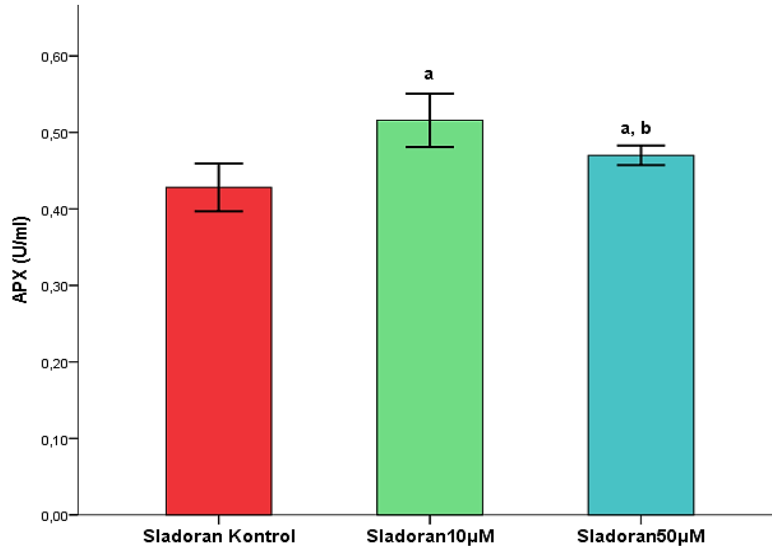
Balkan 96 kontrol grubu APX aktivitesi 0,38 U/ml iken, 10 μM 'lık dozda 0,50 U/ml, 50 μM 'lık dozda ise 0,43 U/ml olarak belirlenmiştir. Sladoran çeşidinde ise 0,43U/ml olarak tespit edilen kontrol APX aktivitesi, 10 μM arsenik uygulamasında 0,52 U/ml'ye ve 50 μM arsenik uygulamasında 0,47 U/ml ye yükselmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.11.Balkan-96 çeşidinde 10 μM ve 50 μM Arsenik konsantrasyonuna göre köklerdeki APX enzim aktivitesi değişimleri

a: kontrol grubu ile karşılaştırma, $p<0.005$

b: Balkan-96 10 μM arsenik uygulaması ile Balkan-96 50 μM arsenik uygulaması karşılaştırma, $p<0.005$

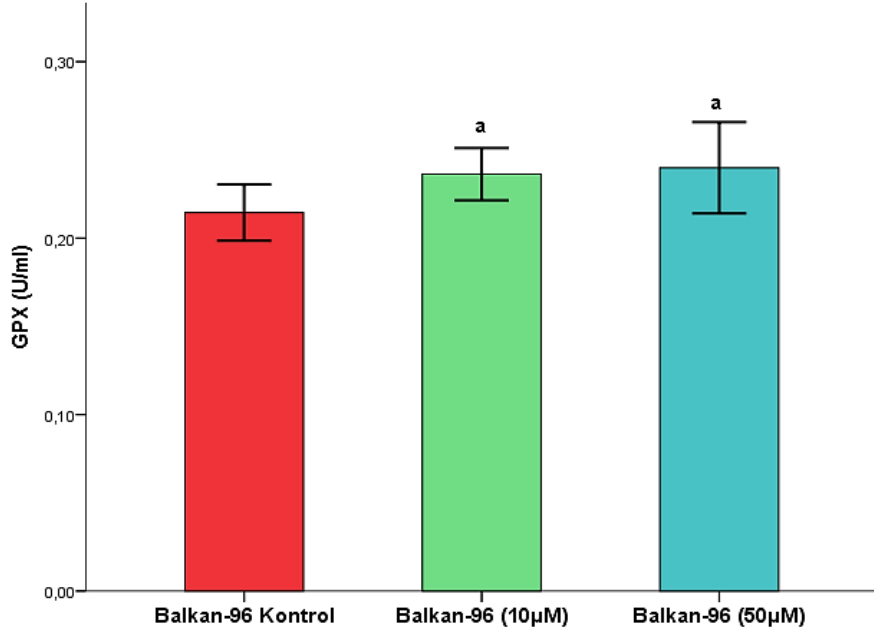


Şekil 4.12.Sladoran çeşidinde 10 µM ve 50 µM Arsenik konsantrasyonuna göre köklerdeki APX enzim aktivitesi değişimleri
a: kontrol grubu ile karşılaştırma, $p<0.005$
b: Sladoran10 µM arsenik uygulaması ile Sladoran 50 µM arsenik uygulaması karşılaştırma, $p<0.005$

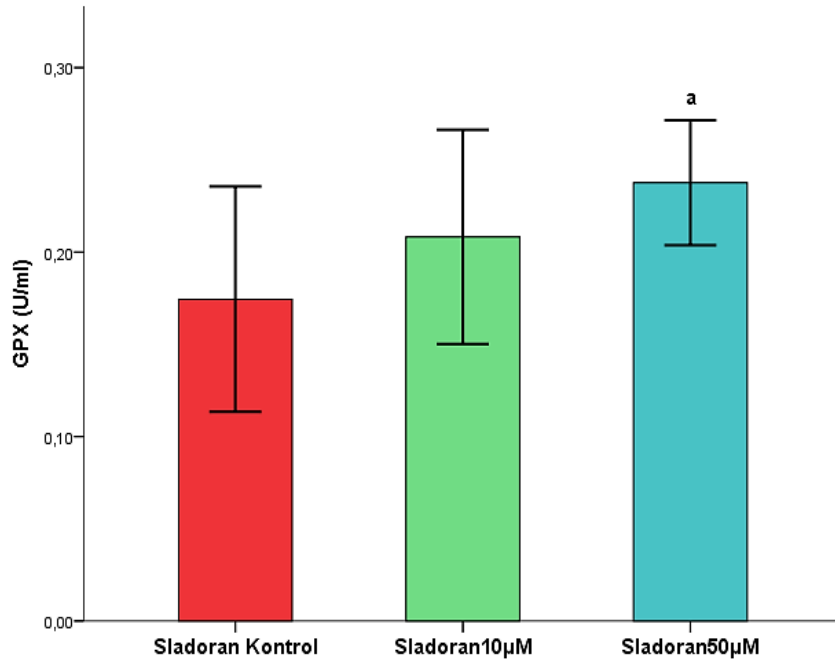
4.6.4 Guaicol Peroksidaz (GPX) aktivitesi üzerine etkisi

Balkan-96 çeşidinde kontrol grubuna göre; hem 10 µM lık hem de 50 µM lık doz gruplarında köklerdeki GPX aktivitesinde anlamlı bir artış görülürken ($p<0.005$); her iki doz arasında aktivitedeki artış anlamlı değildir($p<0.005$). Kontrol grubunda köklerdeki GPX aktivitesi 0,21 U/ml olarak ölçülürken, 10 µM ve 50 µM'lık arsenik dozlarında GPX aktivitesi 0,24 U/ml olarak ölçülmüş ve doz artışına rağmen her iki konsantrasyonda da GPX aktivitesi aynı kalmıştır (Şekil 4.13).

Sladoran çeşidinde köklerdeki GPX aktivitesin de arsenik uygulanan deney gruplarında konsantrasyon artışına bağlı olarak, yükselme görülmektedir. Ancak bu yükselme sadece kontrol grubuyla 50 µM lık doz grubu arasında anlamlıdır($p<0.005$). Kontrol grubunda GPX aktivitesi 0,17 U/ml iken, 50 µM arsenik muamelesi görmüş arpa köklerinde 0,24 U/ml GPX aktivitesi tespit edilmiştir (Şekil 4.14).



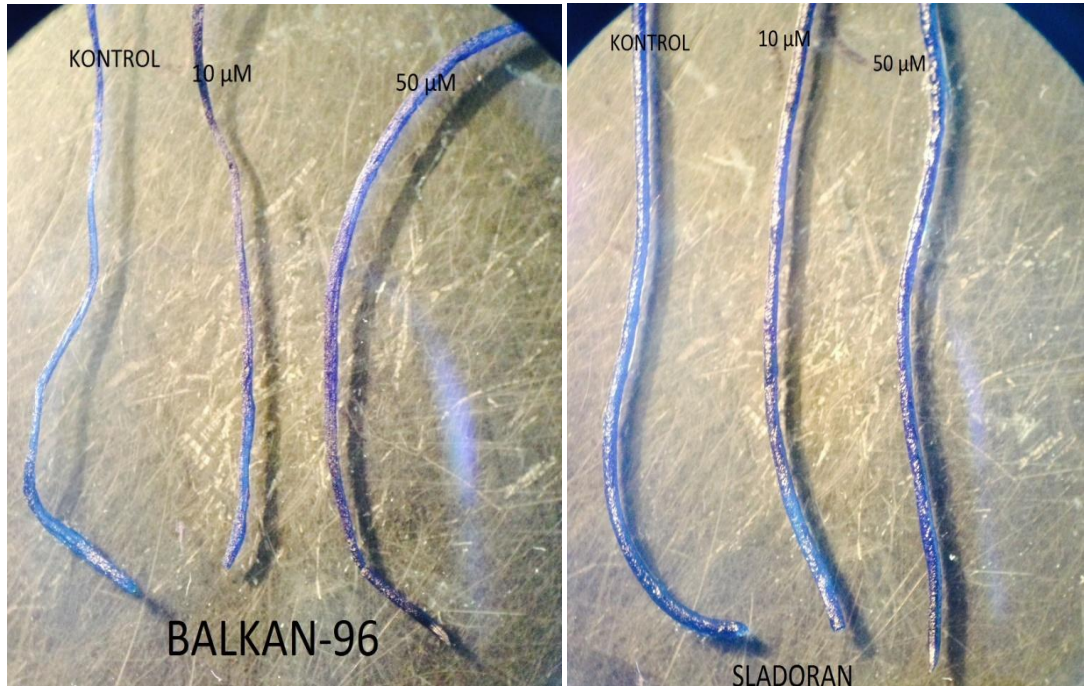
Şekil 4.13.Balkan-96 çeşidinde 10 µM ve 50 µM Arsenik konsantrasyonuna göre köklerdeki GPX enzim aktivitesi değışimleri
a: kontrol grubu ile karşılaştırma, p<0.005)



Şekil 4.14.Sladoran çeşidinde 10 µM ve 50 µM Arsenik konsantrasyonuna göre köklerdeki GPX enzim aktivitesi değışimleri
a: kontrol grubu ile karşılaştırma, p<0.005)

4.7 Hücre Ölümünün Belirlenmesi

Her iki türde de As uygulamasına maruz kalmış kökler doz artışıyla birlikte köklerde Evans blue alımı artmıştır. 50 μ M yüksek dozun 10 μ M'lık doza göre daha koyu renk boyandığı; her iki dozunda kontrole göre daha koyu boyandığı görülmüştür (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. 10 μ M ve 50 μ M arsenik doz uygulanmış arpa köklerinde Evans Blue ile hücre ölümünün gösterilmesi.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Günümüzde, endüstriyel faaliyetler, motorlu taşıtların egzozları, maden yatakları ve işletmeleri, kentsel atıkların gübre olarak kullanımı, kimyasal gübre ve pestisit uygulamaları, atık su ile yapılan sulamalar, çöp depolama alanlarındaki sızıntılar nedeniyle önemli miktarda ağır metal toprağa ulaşmaktadır.

Ağır metallerin toprakta birikmesi sadece toprak verimliliği ve ekosistem faaliyetleri üzerinde etkili olmayıp, bitki bünyesindeki fotosentez, solunum, büyüme ve gelişme, enzim aktivitesi, çimlenme, protein sentezi, membran stabilitesi, hormonal denge, nükleik asit yapısı, hücre bölünmesi, kök tüyü yoğunluğunun azalması gibi birçok metabolik olayları etkilemeleri nedeniyle bitki sağlığını, bozulan besin zinciri nedeniyle de hayvan ve insan sağlığını önemli düzeyde etkilemektedir.

Ülkemizde özellikle hayvan yemi ve maltlık olarak yetiştirilen arpa bitkisinde ağır metal (As, Cd, Pb, Al) kirlenmesine maruz kalmaktadır. Bu durum ürün verimini çok yakından etkilemektedir. Bu çerçevede bu çalışmanın amacı arpa (*Hordeum vulgare* L.) bitkisinin farklı çeşitlerinin fizyolojik ve biyokimyasal süreçler üzerindeki etkilerini araştırmak ve ağır metal stresi altında sergiledikleri metabolik değişimleri incelemektir. Bütün değişimler genel olarak incelendiğinde artan As konsantrasyonunun metabolik olayları olumsuz etkilediği ve bu süreçte bitkinin koruma sistemlerinden antioksidatif enzimlerin aktivitelerinde değişiklik olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda, her iki arpa çeşidine uygulanan 10 μ M ve 50 μ M konsantrasyonlarındaki As muamelesi doza bağlı olarak, tohumlarda çimlenme oranında azalma görülmesine, kök uzamasının önemli ölçüde yavaşlamasına neden olmuştur. Kök uzamasında meydana gelen yavaşlama sonucunda taze ve kuru kök ağırlıklarda da azalmalar görülmüştür. Benzer şekilde arsenik etkisi ile kök büyümesindeki inhibisyon birçok bitki türünde rapor edilmiştir [10, 14].

Shri M. ve ark (2009) 0, 1, 2, 4, 8 mg As/L arsenik dozu uygulayarak buğday tohumlarında yaptığı çalışmada arsenik konsantrasyonunun artmasıyla kontrol grupları ile karşılaştırıldığında çalışma kapsamında değerlendirilen türlerde çimlenme yüzdesinin anlamlı derece azaldığını gösterilmiştir[42]. Yine Shri M. ve ark (2009) pirinç tohumlarında yaptıkları çalışmada kontrol grubuna göre artan arsenit [50µM As(V) ve 500µM As(V)] ve arsenat [50µM As(III) ve 500µM As(III)] konsantrasyonu etkisiyle hem çimlenme yüzdesinde hem de kök uzunluğunda azalma görüldüğünü rapor etmişlerdir [42].

Diğer metaller ile yapılan benzer çalışmalarda da metal iyonlarının bitki de kök gelişimi üzerine olumsuz etkileri rapor edilmiştir. Bu tür çalışmalara örnek olarak; Karabal E. ve ark (2003) arpa tohumlarında yaptığı çalışmada 5mM ve 10 mM bor toksitesi altında çalışılan iki arpa türünde de artan bor konsantrasyonuna bağlı olarak taze ve kuru ağırlıklarda azalma olduğunu belirtmişlerdir [70]. Uysal.İ.(2007) 2, 5, 8, 10 mM alüminyum dozu uyguladığı buğday tohumlarında yaptığı çalışmada artan Al konsantrasyonuna bağlı olarak kök uzamasının önemli ölçüde yavaşladığını göstermiştir [4]. Türkay A. (2011) 2.5, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mM Al dozu uyguladığı arpa tohumlarında yaptığı çalışma da artan Al konsantrasyonuna bağlı olarak alüminyumun arpa tohumlarının çimlenmesini hem geciktirmiş hem de engellemiş olduğunu rapor etmiştir [71]. Çakır.S(2007) 2, 4, 8, 16 ppm selenyum uyguladığı arpa tohumlarıyla yaptığı çalışmada selenyum dozu artıkça bitki kök uzunluğunda azalma meydana geldiğini belirtmiştir [21].

Çalışmamızda artan arsenik konsantrasyonlarıyla doğru orantılı olarak her iki arpa çeşidinde de kök uçlarında zayıf ve cansız bir görüntü, köklerde kahverengileşme gözlemlenmiştir. Hücre ölümünün köklerde izlenmesini sağlayan bir boyama yöntemi olan Evans Blue ile kökleri boyadığımızda konsantrasyon artışına bağlı olarak köklerde boya alımının kontrol grubuna göre hızla arttığı ve koyu boyanmanında köklerde hücre hasarının bir belirtisi olması sebebiyle uygulanan arsenik dozlarının her iki arpa çeşidinde köklerde hücre ölümüne sebep olduğu tespit edilmiştir.

Duquesnoy I. ve ark.(2010) bakla bitkisinde artan arsenik dozu (134, 334, 534, 628µM) göre köklerde sararma ve kahverengileşme olduğunu gözlemlemiştir [72].

Siroka, B. Ve ark (2004) mısır kökleriyle yaptığı çalışmada 0, 1, 10, 50, 250 ve 1000 μM Cd dozu uygulamış ve hücre ölümünü belirleme de Evans blue kullanmıştır. Cd doz artışına bağlı olarak kökler de hücre ölümünün arttığını gözlemlemiştir [73].

Simonovicova ve ark. (2004) arpa tohumları ile yaptıkları çalışmalar sonucunda kök uzamasındaki yavaşlama ve durmanın Al'in hücre zarı bütünlüğünü bozmasına ve beraberinde gelen hücre ölümüne bağlamışlardır [45].

Çalışmamızda kök uzamasının azalması sonucu taze ağırlık önemli ölçüde azalmıştır. Köklerden alınamayan su kontrol grubuna göre gittikçe azalan kök taze ağırlığı azalmasının temel sebebidir. Minerallerin alınamamasıyla büyümede azalma, buna bağlı olarak kök kuru ağırlığında ortaya çıkan azalma görülmektedir. Benzer bulgular Uysal.İ.(2007) tarafında da buğday da alüminyum toksitesi ile ilgili çalışmada da bildirilmiştir [4].

Çalışmamızda köklerdeki total protein değerlerinin arsenik uygulamasından etkilendiği görülmüştür. Arseniğe maruz bırakılan arpa köklerinde 10 μM 'lık arsenik dozu kontrol grubuna göre protein miktarında anlamlı bir azalma meydana getirmiş, 50 μM 'lık doz uygulamasında köklerdeki total protein miktarında 10 μM 'lık arsenik uygulanmasına göre artış görülmüştür. Ancak her iki dozda da total protein miktarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma görülmektedir.

Benzer şekilde Sanal, F. ve ark (2014) arpa tohumuyla yaptığı çalışmada arsenik doz uygulamasında 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 mM sodyum arsenat ve sodyum arsenit uygulamalarında köklerde total protein miktarının düştüğü gözlemlemiştir [41]. Bitkiler arsenik stresine maruz kaldıklarında, bu olumsuz şartlar altında protein miktarlarında düşüş meydana geldiği bir çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir [41, 74].

Ağır metallere maruz kalmanın meydana getirdiği diğer bir büyük zarar ise; aktif oksijen türleri'nin artmasına bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif strestir. Membrana bağlı elektron iletim aktiviteleri dahil birkaç metabolik yolda açığa çıkan O_2^- , OH^- ve H_2O_2 gibi aktif oksijen türlerinin miktarlarındaki artışa bağlı olarak membran lipitleri, proteinler, klorofil pigmentleri, enzimler, nükleik asitler gibi biyomoleküller zarar görebilir [4, 34].

Arsenik stresi sonucu oluşan aktif oksijen türlerinin neden olduğu lipid peroksidasyonu, membran doymamış yağ asitlerinin kompozisyonunun bozulmasına ve

zar geçirgenliğin değişmesine sebep olur Lipit peroksidasyonunun en önemli ürünü MDA'dir. Oluşan MDA, hücre membranlarında iyon alış-verisine etki eder ve membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açarak iyon geçirgenliğini ve membran enzim aktivitelerini olumsuz etkiler.

Bu araştırma da artan arsenik konsantrasyonuna bağlı olarak MDA miktarında artış gözlenmiştir. Özellikle Sladoran çeşidinde köklerde Balkan-96 çeşidine göre MDA miktarında daha fazla artış görölmektedir. Her iki arpa çeşidinde de özellikle 50 µM'lık arsenik dozunda artan MDA miktarına bakılarak lipid peroksidasyonunun gerçekleştiğini ve membran hasarının meydana geldiğini hücre zarlarının hasar gördüğünü, zar yapısındaki lipitlerin çoğunun parçalandığını ve hücre yapısının ileri düzeyde bozulduğunu düşünebiliriz. Artan MDA miktarı, Arsenik uygulamasının arpa bitkisinde bir strese sebep olduğuna işaret etmektedir.

Benzer metal stresi çalışmalarında; Singh P. ve ark. (2007) bezelye kökleriyle yaptığı çalışmalar da As toksitesi (50 mM) karşısında köklerde lipid peroksidasyonun gerçekleştiğini ve bu durumun bir çok bitki türünde de görüldüğünü rapor etmişlerdir [10]. Yine Tamas ve ark. (2008)'nin arpa kökleri üzerinde yaptığı bir çalışmada 1 mM'lık kadmiyum uygulaması sonucu köklerdeki MDA miktarının yükseldiği rapor edilmiştir [75]. Çakır. S (2007) selenyum toksitesi altında farklı iki arpa türünde yaptığı çalışmada selenyum dozunun artmasıyla MDA miktarının arttığını belirtmiştir[21]. Jimenez E. ve ark (2009) sakız ağacının kök ve yaprakları ile yaptığı çalışmada artan arsenik (5, 20, 250, 500 µM) ve civa (5, 10, 50 ,100 µM) konsantrasyonlarında MDA miktarının arttığını rapor etmiştir [28].

Shri M. ve ark (2008) pirinç kökleriyle yaptığı çalışmada arsenik stresinin artmasıyla [50uM, 500uM] birlikte MDA miktarının yavaş yavaş arttığını belirtmişlerdir. Ancak 500 µM arsenik dozuna maruz bırakıldığında köklerde meydana gelen arsenik stresi gövde de meydana gelen stresden daha fazla olduğunu, bu durumdan GPX aktivitesindeki önemli artıştan kaynaklanıldığını, bu enzimin lipid peroksidasyonundan sorumlu olduğunu belirtmişlerdir [42]. MDA düzeyindeki artış çoklu yağ asidi peroksidasyonu nedeniyle membran hasarı oluşumuna neden olur. Membran hasarının oluşması sonucunda ROT oluşumuna ve sonraki aşamada oksidatif

stres oluşumuna neden olmaktadır. As tehdidi sonucunda ROT üretimindeki artış enzim aktiviteleriyle ilişkilendirilir.

Hücrelerde meydana gelen ROT ile enzim seviyeleri arasında bir denge olduğu bilinir. Bu dengede bir aksama görülürse diğer enzim aktivitelerinin artışıyla bu aksama giderilir. SOD, aktif oksijen türlerinden süperoksit anyon radikallerini katalizleyerek reaksiyon sonucunda moleküler oksijen ve hidrojen peroksit açığa çıkarır [21].

İntraselüler ve ekstraselüler membranlarda bulunan lipitlerin reaktif oksijen türlerinden süperoksit radikalının zararlı etkilerinden korunmasında sorumlu önemli bir antioksidan enzimdir [4]. SOD büyük bir oksijen temizleyicisidir ve çevresel strese karşı hücre yaralanmalarında ilk savunma yoludur [10].

Bu çalışmada kökteki SOD enziminin 10 μM ve 50 μM As konsantrasyonlarındaki aktiviteleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, enzim aktivitesi her iki arpa çeşidinde de sırasıyla önce artmış, 50 μM dozda azalma göstermiştir. Ancak her koşulda kontrol grubuna göre artış göstermektedir. 50 μM 'lık arsenik dozunda SOD aktivitesinin düşüyor olması SOD'un oksijen radikallerini yakalama fonksiyonunun bozulmaya başladığının bir göstergesidir. Çakır S. (2007) iki farklı arpa türünde yaptığı çalışmada selenyum dozunun yükselmesiyle (2, 4, 8,16 ppm) en yüksek dozların kontrol grubuyla karşılaştırdığında SOD miktarının artmış olduğunu belirtmiştir [21, 59]. Ayhan B. (2006) mısırdaki kursun stresinin artmasıyla (0, 1, 2, 4 ve 6mM) birlikte yine aynı şekilde SOD içeriğinin artmış olduğunu ama en yüksek doz da azalma olduğunu göstermiştir [34]. Singh P. Ve ark. (2007) bezelye kökleriyle yaptığı çalışmada artan arsenik dozuna göre (10.0 ve 50.0 μM) SOD aktivitesi kontrol grubuna göre artış göstermiştir [10]. Shri M. ve ark (2009) pirinç de yaptığı çalışmada arsenik stresinin artmasıyla birlikte SOD aktivitesinin kontrol grubuna göre artış gösterdiğini rapor etmişlerdir [42]. Lamhamdi, M. ve ark (2011) buğday tohumlarına 0.15, 0.3, 1.5, 3 mM dozlarında kurşun uygulamışlardır. Bu uygulama sonucunda buğday köklerinde SOD aktivitesinde artan doza bağlı olarak artış meydana gelmiştir [44]. Khan, I. ve ark (2009) *Indian mustard* (Hint hardalı) bitkisi ile yaptıkları çalışmada köklere 5 μM ve 25 μM arsenik doz uygulamıştır. Bu tür de artan arsenik dozuna bağlı olarak kökler de SOD enzim aktivitesinde anlamlı bir artış görülmüştür [76].

SOD'un aktivitesinin artması son ürünü olan H_2O_2 üretiminin artmasına sebep olur. SOD ürünü olan H_2O_2 hala organizma için toksik bir bileşiktir ve uygun reaksiyonlarla H_2O ya dönüşümünün sağlanması gereklidir. Bitkilerde H_2O_2 bir çok enzimin birlikte çalışması ile elimine edilmeye çalışılır. Bu enzimlerin en önemlileri CAT, GPX ve APX tir [77]. Ortamda biriken H_2O_2 , CAT aktivitesinin artmasına sebep olur[4]. CAT H_2O_2 'yi direk olarak H_2O ve O_2 ye yıkar. Böylece SOD aktivitesi nedeniyle oluşan aşırı H_2O_2 CAT tarafından detoksifiye edilir [10, 77].

Bu çalışmada Balkan-96 arpa çeşidinde arsenik dozunun yükselmesiyle katalaz enziminin aktivitesinde bir azalma meydana gelmiştir. Slodran çeşidinde ise $10 \mu M$ 'lık arsenik dozunda CAT aktivitesinde önce artış meydana gelmekle birlikte $50 \mu M$ 'lık arsenik dozunda önemli ölçüde azalma göstermiştir. Her iki arpa çeşidinde de CAT aktivitesinin kontrol grubuna göre düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. Zhang, F.Q ve ark (2007) Mangrov bitkisinde yaptığı çalışmada *Kandelia candel* türünde katalaz aktivitesi artan doz miktarına bağlı olarak önce artış göstermekle birlikte en yüksek doza ulaşıldığında katalaz aktivitesinde azalma meydana geldiği gözlenmiştir [77]. Singh P. ve ark. (2007) bezelye kökleriyle yaptığı çalışmada artan arsenik dozuna bağlı olarak (10.0 ve $50.0 \mu M$) CAT aktivitesi kontrol grubuna göre düşüş göstermiştir [10]. Mallick S. ve ark (2011) mısırdaki yaptığı çalışmalar da *Azad uttam* türünde artan arsenik dozuna göre 3. Günde CAT aktivitesinin önce arttığını daha sonra azaldığını, 7. Günde ise CAT aktivitesinin düşüş gösterdiğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak her iki gün de yapılan deneyde katalaz aktivitesinin kontrol grubuna göre düşüş gösterdiğini rapor etmişlerdir [78]. Liang, Y ve ark (2003) tuz stresi (120 mmol/L^{-1}) ve silikon (Si) (1.0 mmol/L^{-1}) stresi altında arpa tohumlarıyla yaptıkları çalışmada 2. Gününde hem tuz stresi uygulamasında hem de tuz+Si uygulamasında katalaz aktivitesi artış göstermiştir [79]. Lamhamdi, M. ve ark (2011) buğday tohumlarına 0.15 , 0.3 , 1.5 , 3 mM dozlarında kurşun uygulamışlardır. Bu uygulama sonucunda buğday köklerinde CAT aktivitesinde artan doza bağlı olarak önce artış meydana gelmekle beraber 1.5 mM lık doz uygulamasından sonra CAT aktivitesinde anlamlı bir azalma görülmektedir [44]. Diğer araştırmacıların farklı bitkilerle yaptığı çalışmalarda As uygulaması CAT aktivitesindeki değişimler çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

SOD, oksijen radikalini, hidrojen peroksit'e çevirerek savunma sisteminin ilk aşamasında rol oynar. APX ve CAT da oluşan H_2O_2 'leri detoksifiye ederler. Bu iki

enzim H_2O_2 süpüren enzimlerin iki farklı sınıfına aittirler. APX ROT'nin son modülasyonundan sorumluyken, CAT, stres sırasında ROT'nin fazlasının ortadan kaldırılmasından sorumludur [4].

Bu çalışmada APX aktivitesi her iki arpa çeşidinde de 10 μM lık arsenik dozunda kontrole göre artış gösterirken 50 μM 'lık arsenik dozunda APX aktivitesi azalma göstermektedir. Benzer şekilde Singh, P.ve ark. (2007) bezelye köklerinde yaptığı çalışmada 10 μM 'lık arsenik dozunda APX aktivitesinde artış gösterirken 50 μM 'lık arsenik dozunda azalma gösterdiğini rapor etmişlerdir [10]. Karabal E. ve ark. (2003) arpa tohumlarıyla bor toksitesiyle yaptığı çalışmada Hamidiye çeşidinde köklerde APX aktivitesi kontrol grubuna göre 10 mM'lık doz da artış gösterirken; 50 mM'lık doz da azalma göstermiştir [70]. Mallick S. ve ark (2011) mısırdaki yaptığı çalışmalar da *Azad uttam* türünde artan arsenik dozuna göre (2.5, 7.5 ve 12.5 $\mu g/ml$) 7. Günde APX aktivitesinin önce arttığını, en yüksek arsenik dozuna gelindiğinde APX aktivitesinin azaldığını belirtmişlerdir [78].

APX ağırlıklı olarak kloroplastlarda yerleşmiş durumdadır ve kloroplastlarda meydana gelen olası bir hasar sonucu aktivite göstermektedir. Kloroplastlarda oluşan As hasarı, diğer metabolik aktivitelerle de ilişkilendirilerek bütünlük gösterdiği rapor edilmiştir. Arsenik, ayrıca enzim aktiviteleriyle birlikte intraselüler tiol bağlı (-SH) proteinlerinde inaktif olmalarını sağlar. Arsenikle indüklenen oksidatif stres CAT ve APX aktivitesinde azalma ve dejenerasyon meydana getirir [10].

Peroksidazlar bitkiler aleminde reaktif oksijen türlerinin (ROT) ortadan kaldırılmasında aktif rol oynayan başlıca enzimlerden birisidir. Daha önce diğer bitkilerle yapılmış bir çok çalışmada ağır metallere maruz kalmanın bir cevabı olarak peroksidaz enzimlerinin aktivitelerinde artış, azalış yada düzeyinde bir değişikliğin olmadığı bildirilmiştir [80-82].

Guaicol Peroksidaz; hidrojen peroksit yıkımına katılan hücre içi ve hücre dışı her iki durumda da önemli görev alan bir enzimdir. Guaicol peroksidaz aktivitesi Balkan-96 arpa çeşidinde doz artışına bağlı olarak artış göstermiştir. Slodran çeşidinde ise 10 μM doz uygulamasında kontrol grubuna göre önemli bir değişiklik kaydedilmese de 50 μM doz uygulamasında anlamlı bir artış kaydedilmiştir. Ayhan B. (2006) da mısır köklerinde yaptığı çalışmada 32D99 çeşidinde artan kadmiyum konsantrasyonunda

(0.3 mM, 0.6 mM, 0.9 mM) peroksidaz aktivitesinin arttığını göstermiştir [34]. Singh P. ve ark. (2007) bezelye köklerinde yaptığı çalışmada uyguladığı arsenik dozu arttıkça (10uM ve 50uM) GPX aktivitesinde artış kaydetmişlerdir [10]. Lamhamdi, M. ve ark (2011) buğday tohumlarına 0.15, 0.3, 1.5, 3 mM dozlarında kurşun uygulamışlardır. Bu uygulama sonucunda buğday köklerinde GPX aktivitesinde artan doza bağlı olarak artış meydana gelmiştir. Özellikle 1.5 mm lık doz dan sonra bu artış anlamlıdır [44]. Stoeva, N. ve ark. (2005) *Phaseolus vulgaris* L. türünde; Plovdiv 10 ve Prelom çeşitlerine 5 gün boyunca 2 mg ve 5 mg dozlarda arsenik uygulamışlardır. Bu uygulama sonucunda her iki çeşit de de kontrol grubuna göre artan doza bağlı olarak GPX aktivitesinde anlamlı bir artış görülmüştür [83].

Bu sonuçlar altında benzer çalışmalardaki bulgular dikkate alınarak arsenik stresinin arpa bitkisinde kök büyümesinde ve metabolik faaliyetlerde azaltıcı bir etki gösterdiği söylenebilir [4, 83]. Ağır metaller genel olarak; Arsenik stresi dahil olmak üzere Lipid peroksidasyonun artışına paralel olarak membran hasarına yol açmakta bunun sonucunda da oksitadif strese neden olmaktadır ve H₂O₂'in ortamdan uzaklaştırması için enzim aktivitelerinin değişmesiyle sonuçlanmaktadır [41, 76].

Bunun sonucunda antioksidan enzim aktivitelerinde değişiklikler meydana gelirken bitki savunma mekanizmaları harekete geçer [4]. MDA artışına bağlı olarak gerçekleşen hasar sonucu SOD enzimi artış göstermekle birlikte bu artış sonucu meydana gelen H₂O₂ in elimine edilmesi için CAT, GPX ve APX enzimleri faaliyet göstermeye başlar.

Bu veriler ışığında arseniğin Arpa bitki köklerinde oksidatif stres meydana getirmesi sonucunda oluşan hasarın giderilmesi yolunda antioksidan savunma mekanizmasının etkileri gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda elde edilen veriler ışığında arpa bitkisinin hem yemlik olarak kullanılan Balkan-96 çeşidinde hem de maltlık olarak kullanılan Sladoran çeşidinde arsenik uygulamasının oksidatif strese neden olduğu, antioksidan enzimlerin devreye girdiği ancak reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırmada tam olarak başarılı olamadığı gözlemlendi. Yükselen MDA seviyeleri sebebiyle lipid peroksidasyonunun meydana geldiği; lipid peroksidasyonuna ise oluşan ROT'lerinin sebep olduğu membran hasarının bir sonucu olduğu düşünülmektedir.

Tarım alanlarında artan toprak ve su kirliliğinin önemli bir parçası olan ağır metal kirliliğinin tarımsal alan üzerindeki olumsuz etkileri yadsınamaz. Bu çalışma ile bira ve yem sanayinde önemli bir yeri olan arpa bitkisinin; üretim alanlarında yaygın olarak bulunan çöp depolama yerlerinden meydana gelen sızıntılardan, kullanılan gübrelerden, insektisitler ve herbisitlerden kaynaklanan arsenikten uzak tutulması gerçeği bir kez daha vurgulanmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Özmen, M., *Farklı Arpa (Hordeum Vulgare) Çeşitlerinin Çinko Alım Etkilerinin Belirlenmesi*, Gazi Osmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (2013).
- [2] www.tuik.gov.tr
- [3] Yılmaz, N., *Teae-Bakış*, 9(ARPA): p. 2., (2007)
- [4] Uysal, D.İ., *Buğdayda, Kök Büyümesi ve Antioksidatif Enzim Aktivitesi Üzerinde Alüminyum Stresinin Etkisi* Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (2007)
- [5] Yadav, S.K., *Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants*. South African Journal of Botany, 76: p. 167–179, (2010)
- [6] Christophersen, H.M., *Arbuscular mycorrhizal colonization reduces arsenate uptake in barley via downregulation of transporters in the direct epidermal phosphate uptake pathway*. New Phytologist, 184: p. 962–974, (2009)
- [7] Castillo-Michel, H., *Use of X-Ray absorpsiyon spectroscopy and biochemical techniques to characterize arsenic uptake and reduction in pea (Pisum sativum) plants*. Plant Physiology and Biochemistry, 45: p. 457-463, (2007)
- [8] LI Chun-xi, F.S.-l., SHAO Yun, JIANG Li-na, LU Xu-yang, HOU Xiao-li *Effects of arsenic on seed germination and physiological activities of wheat seedlings*. Journal of Environmental Sciences, 19: p. 725–732, (2007)
- [9] Panda S.K, U.R.K.N.S., *Arsenic Stress in Plants*. Journal of Agronomy and Crop Science, 196(3): p. 161-174, (2010)
- [10] Singh, H.P.B., D. R. Kohli, R. K. Arora, K., *Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (Phaseolus aureus Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation*. Plant Growth Regul, 53: p. 65-73, (2007)
- [11] Meharg, A.A., *Arsenic in rice--understanding a new disaster for South-East Asia*. Trends Plant Sci, 9(9): p. 415-7, (2004)

- [12] Nath, S., et al., *Arsenic stress in rice: redox consequences and regulation by iron*. Plant Physiol Biochem, 80: p. 203-10, (2014)
- [13] Geng, C.N., ve ark., *Arsenate (As) uptake by and distribution in two cultivars of winter wheat (Triticum aestivum L.)*. Chemosphere, 62(4): p. 608-15, (2006)
- [14] Liu Xi, Z.S., Shan X and Zhu Y. G, *Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seedling growth and amylolytic activity of wheat*. Chemosphere, 61: p 293-301, (2005)
- [15] Gezer. E, *Arpa (Hordeum Vulgare L.) Bitkisinin Bazı Çeşitlerinde Ağır Metal Stresi Etkileirinin Fizyolojik Olarak Araştırılması*, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri enstitüsü, (2011)
- [16] Karadağ, F., *Farklı Dozlarda Selenyum Uygulamalarının Haşhaş (Papaver Somniferum L.) Yapraklarında Antioksidan Enzimler Üzerine Etkisi*, Gazi Osmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (2013):
- [17] İmamoğlu, A., *Bursa Ekoloji Koşullarında Bazı Arpa (Hordeum vulgare L.) Çeşit ve Genotiplerinin Verim ve Bazı Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi*, Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (2011)
- [18] Yürük, M., *Türkiye' de Yetiştirilen Bazı Arpa Çeşitleri Ve Azeri Arpa Çeşitlerinde Genetik Çeşitliliğin Peroksidaz (POGP) Markarı ile Belirlenmesi*, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2012)
- [19] Afşar, N., *Effect Of Cold Stress On Antioksidant Mechanism Of Winter And Spring Barley (Hordeum vulgare L.) Cultivars* Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2007).
- [20] www.diyetkolik.com
- [21] Çakır, S., *Selenyum Toksisitesinin İki Arpa (Hordeum vulgare L.) Çeşitinde (TARM 92, BÜLBÜL 89) Antioksidan Enzim Aktivitesine Etkisi*, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2007)
- [22] Ünalın, Ş., *Ağır Metal Stresi Altındaki Mısır Bitkisinde Antioksidant Enzim Savunma Sisteminin Davranışı ve Metal Kirliliğinin Giderilmesinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması*, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, (2013)
- [23] Dünder, P.S., *Sazan Balıklarına Arsenik Uygulaması Sonucu Biyokimyasal, Histopatolojik, Mikrobiyolojik ve Hematolojik Parametrelerde Meydana Gelen*

- Değişimler Üzerine Propolisin Etkileri*, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (2010)
- [24] Pak, O., *Kırklareli Sınırları İçerisindeki Otoban Kenarlarında Bulunan Tarım Arazilerinde Bazı Ağır Metal Kirliliğinin Araştırılması*, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2011)
- [25] Sharma, S.S. and K.J. Dietz, *The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance*. Trends Plant Sci, 14(1): p. 43-50, (2009)
- [26] Okcu, M., ve ark., *Ağır Metallerin Bitkiler Üzerine Etkileri*. Alinteri Journal of Agrecicultural Sciences, 17: p. 14-26, (2009)
- [27] Fikirdeşici, Ş., *Kadmiyum, Arsenik ve Kadmiyum-Arsenik Karışımının Daphnia magna (Straus 1820) (Cladocera, Crustacea) Üzerine Akut Toksik Etkilerinin Araştırılması*, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2010).
- [28] Moreno-Jimenez, E., et al., *Arsenic- and mercury-induced phytotoxicity in the Mediterranean shrubs Pistacia lentiscus and Tamarix gallica grown in hydroponic culture*. Ecotoxicol Environ Saf, 72(6): p. 1781-9, (2009)
- [29] Juknys, R.R., M. Vitkauskaitė, G., *Cross-adaptation of spring barley (Hordeum vulgare L.) to environmental stress induced by heavy metals*. Ekologija, 56(1-2): p. 1-9, (2010)
- [30] Garg, N.S., P., *Arsenic toxicity in crop plants: physiological effects and tolerance mechanisms*. Environ Chem Lett, 9: p. 303-321, (2011)
- [31] Tomaro, M.P.B.S.M.G.M.L., *Cadmium toxicity in plants*. Brazilian Journal of Plant Physiology, 17 p:-21-34, (2005)
- [32] MEMON, A. R., ÖZDEMİR, A., VERTİİ, A., *Heavy Metal Accumulation and Detoxification Mechanisms in Plants*. Turkish Journal Of Botany, 25: p. 111-121, (2000)
- [33] Hall, J.L., *Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance*. J Exp Bot, 53(366): p. 1-11, (2002)
- [34] Ayhan, B., *Mısır (Zea mays L.)'ın Bazı Çeşitlerinde Ağır Metal (Cd, Pb) Stresinin Etkilerinin Belirlenmesi*, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2006)
- [35] Dogan, M.S.D., S., *Kadmiyumun Ceratophyllum demersum L. Üzerindeki Bazı Fizyolojik ve Morfolojik Etkileri*. Ekoloji Dergisi, 71: p. 57-64, (2009)

- [36] Akdeniz, İ., *Toprak ve Su Gibi Çevre Örneklerinde Arsenik Tayini ve Spesiyasyonu (Türlemesi)*, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (2002)
- [37] Pirselova, B., ve ark., *Biochemical and physiological comparison of heavy metal-triggered defense responses in the monocot maize and dicot soybean roots*. Mol Biol Rep., 38(5): p. 3437-46, (2011).
- [38] Rudra D. Tripathi, S.S., Seema, M., Singh, N. and Tuli, R., *Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants*. Trends in Biotechnology., 25(4), (2006)
- [39] Sun Y., L.Z., Guo B., Chu G., Wei C. And Liang Y, *Arsenic mitigates cadmium toxicity in rice seedlings*. Environmental and Experimental Botany, 64: p. 264-270, (2008)
- [40] Zhao, F.J., et al., *Arsenic uptake and metabolism in plants*. New Phytol, 181(4): p. 777-94, (2009)
- [41] Sanal, F., G. Seren, and U. Guner, *Effects of arsenate and arsenite on germination and some physiological attributes of barley Hordeum vulgare L.* Bull Environ Contam Toxicol, 92(4): p. 483-9, (2014)
- [42] Shri, M., et al., *Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings*. Ecotoxicol Environ Saf, 72(4): p. 1102-10, (2009)
- [43] Smith, S.E.C., M.H. Pope, S. Smith, F.A., *Arsenic uptake and toxicity in plants: integrating mycorrhizal influences*. Plant Soil., 327: p. 1-21, (2010)
- [44] Lamhamdi, M., et al., *Lead phytotoxicity on wheat (Triticum aestivum L.) seed germination and seedlings growth*. C R Biol, 334(2): p. 118-26, (2011)
- [45] Simonovicova, M.T., L. Huttova, J. Mistrík, I., *Effect of aluminium on oxidative stress related enzymes activities in barley roots*. Biologia Plantarum, 48(2): p. 261-266, (2004)
- [46] Kaya, A., *Bazı Tekstil Boyalarının Phaseolus vulgaris L. cv. Gina (Fasulye) Bitkisinde Peroksidaz Aktivitesi, Lipid Peroksidasyonu ve Pigment Sistemi Üzerine Etkileri*, İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (2007)
- [47] Büyük, İ. S., Soydam, A., and Aras, S., *Molecular responses of plants to stress conditions*. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 60(2): p. 97-110, (2012)

- [48] Zengin, F.K.M., Ö., *Effects of Lead (Pb⁺⁺) and Copper (Cu⁺⁺) on The Growth of Root, Shoot And Leaf of Bean (Phaseolus vulgaris L.) Seedlings.* Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 17: p. 1-10, (2004)
- [49] Cargnelutti, D., et al., *Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedlings.* Chemosphere, 65(6): p. 999-1006, (2006.)
- [50] Zengin, F.K.M., Ö., *Effects of Lead (Pb⁺⁺) and Copper (Cu⁺⁺) on The Growth of Root, Shoot And Leaf of Bean (Phaseolus vulgaris L.) Seedlings.* Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 17: p. 1-10, (2004)
- [51] Munzuroglu, O. and Geckil, H., *Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in Triticum aestivum and Cucumis sativus.* Arch Environ Contam Toxicol, 43(2): p. 203-13, (2002)
- [52] Verma, S.D., R.S., *Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants.* Plant Science, 164(4): p. 645–655, (2003)
- [53] Yıldız, M.T., H. Uruşak, B., *Bitkilerde krom toksisitesi ve hücresel cevaplar.* Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 27(2)(3): p. 163-176, (2011)
- [54] Cummins, J.M., A.M. Jequier, and R. Kan, *Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress?* Mol Reprod Dev, 37(3): p. 345-62, (1994)
- [55] Halliwell, B. and Gutteridge, J.M., *The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases.* Mol Aspects Med, 8(2): p. 89-193, (1985)
- [56] Soydam Aydın, S., et al., *Characterization of stress induced by copper and zinc on cucumber (Cucumis sativus L.) seedlings by means of molecular and population parameters.* Mutat Res, 746(1): p. 49-55, (2012)
- [57] www.betaalkaliyasam.com
- [58] Shiyab, S., et al., *Mercury-induced oxidative stress in Indian mustard (Brassica juncea L.)* Environ Toxicol, 24(5): p. 462-71, (2009)

- [59] Acar, O., *Kurağa Dayanıklı Bazı Arpa (Hordeum spp.) Çeşitlerinde Süperoksit Dismütaz (SOD) Aktivitelerinin Araştırılması*, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (1999)
- [60] Baykal, F., *Tuz Stresinin Triticale ve Bazı Secale Taksonlarında Süperoksit Dismütaz (SOD; EC 1.15.1.1) ve Peroksidaz (POD; EC 1.11.1.7) Aktiviteleri Üzerinde Etkilerinin Araştırılması*, Çanakkale On Sekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2006)
- [61] Yıldırım, E., *Tuzlu Topraklarda Katalaz Emziminin Aktivitesi ve Kinetiği*, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (2010)
- [62] Madhusudhan, R., et al., *Characterization of an ascorbate peroxidase in plastids of tobacco BY-2 cells*. *Physiol Plant*, 117(4): p. 550-557, (2003)
- [63] Mittler, R. and Zilinskas, B.A., *Regulation of pea cytosolic ascorbate peroxidase and other antioxidant enzymes during the progression of drought stress and following recovery from drought*. *Plant J*, 5(3): p. 397-405, (1994)
- [64] Bueno, P. and Piqueras, A., *Effect of transition metals on stress, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in tobacco cell cultures*. *Plant Growth Regul*, 36: p. 161-167, (2002)
- [65] Davis, D.G. and Swanson, H.R., *Activity of stress-related enzymes in the perennial weed leafy spurge (Euphorbia esula L.)*. *Environmental and Experimental Botany*, 46(2): p. 95-108, (2001)
- [66] Demiral, T., *Genç Prinç Fidelerine Dışarıdan Glisinbetain Uygulamasıyla, Tuza toleransının Arttırılmasında Antioksidant Enzim Aktivitelerinin Rolünün Araştırılması*, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2003)
- [67] Uysal, B., *Ispanakta kadminyum Toksisitesine Bağlı Oksidatif Stres Üzerine Potasyum Beslenmesinin Etkisi*, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2012)
- [68] Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J Biol Chem*, 193(1): p. 265-75, (1951)
- [69] Cakmak, I. and Marschner, H., *Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves*. *Plant Physiol*, 98(4): p. 1222-7, (1992)

- [70] Baker, C.J. and Mock, N.M., *An improved method for monitoring cell death in cell suspension and leaf disc assays using evans blue*. Plant Cell, Tissue Organ Cult, 39: p. 7-12, (1994)
- [71] Karabal, E.Y., Öktem, A., *Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity*. Plant Science, 164: p. 925-933, (2003)
- [72] Türkay, A., *Alüminyum Stresi Altında Yetiştirilen Arpa (Hordeum vulgare L. cv. Meta 2) Fidelerinde Bazı Morfolojik ve Anatomik Gözlemler*, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (2011)
- [73] Duquesnoy, I., et al., *Enzymatic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in Zea mays and genotoxic effect of arsenic in root tips of Vicia faba and Zea mays*. C R Biol, 333(11-12): p. 814-24, (2010)
- [74] Siroka, B., et al., *Effect of cadmium on hydrolytic enzymes in maize root and coleoptile*. Biologia, Bratislava, 59(4): p. 513-517, (2004)
- [75] Seth, C.S., Chaturvedi, P.K., and Misra, V., *Toxic effect of arsenate and cadmium alone and in combination on giant duckweed (Spirodela polyrrhiza L.) in response to its accumulation*. Environ Toxicol, 22(6): p. 539-49, (2007)
- [76] Tamas, L., et al., *Alterations of the gene expression, lipid peroxidation, proline and thiol content along the barley root exposed to cadmium*. J Plant Physiol, 165(11): p. 1193-203, (2008)
- [77] Khan, I., Ahmad, A. and Iqbal, M., *Modulation of antioxidant defence system for arsenic detoxification in Indian mustard*. Ecotoxicol Environ Saf, 72(2): p. 626-34, (2009)
- [78] Zhang, F.Q., et al., *Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (Kandelia candel and Bruguiera gymnorhiza)*. Chemosphere, 67(1): p. 44-50, (2007)
- [79] Mallick, S., Sinam, G. and Sinha, S., *Study on arsenate tolerant and sensitive cultivars of Zea mays L.: differential detoxification mechanism and effect on nutrients status*. Ecotoxicol Environ Saf, 74(5): p. 1316-24, (2011)
- [80] Liang, Y., et al., *Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (Hordeum vulgare L.)*. J Plant Physiol, 160(10): p. 1157-64, (2003)

- [81] Schützendübel, A., et al., *Cadmium and H₂O₂-induced oxidative stress in Populus × canescens roots*. Plant Physiol Biochem, 40(6-8): p. 577–584, (2002)
- [82] Schützendübel, A., et al., *Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots*. Plant Physiol, 127(3): p. 887-98, (2001)
- [83] Shaw, B.P., *Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedlings of Phaseolus aureus*. Biologia Plantarum, 37(4): p. 587-596, (1995)
- [84] Stoeva, N., Berova, M. and Zlatev, Z., *Effect of arsenic on some physiological parameters in bean plants*. Biologia Plantarum, 49(2): p. 293-296, (2005)

ÖZ GEÇMİŞ

1987 yılında Malatya'da doğdum. Lise eğitimimi 2004 yılında Malatya Atatürk Lisesinde tamamladım. Lisans eğitimimi 2010 yılında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde tamamladım.

2010 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans programına başladım.

2012 yılından beri Medsantek Ltd.Şti. firmasında satış temsilcisi olarak çalışmaya devam etmekteyim.