



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**Farklı Konsantrasyonlarda Uygulanan Kadmiyum (Cd)
Elementinin *Ludwigia glandulosa* Walter ve *Alternanthera
reineckii* Briq. Bitkilerindeki Genotoksik Etkilerinin Moleküler
Yöntemlerle Belirlenmesi**

GİZEM MÜZEYYEN AYGÜN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. İbrahim İlker Özyiğit

İSTANBUL, 2017



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**Farklı Konsantrasyonlarda Uygulanan Kadmiyum (Cd)
Elementinin *Ludwigia glandulosa* Walter ve *Alternanthera
reineckii* Briq. Bitkilerindeki Genotoksik Etkilerinin
Belirlenmesi**

GİZEM MÜZEYYEN AYGÜN
(520113002)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. İbrahim İlker Özyiğit

İSTANBUL, 2017

ÖNSÖZ / TEŞEKKÜR

Farklı Konsantrasyonlarda Uygulanan Kadmiyum (Cd) Elementinin *Ludwigia glandulosa* Walter ve *Alternanthera reineckii* Briq. Bitkilerindeki Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

Tez konumun belirlenmesinde ve bu süreç içerisinde benden desteğini hiç esirgemeyip bilgi ve birikimlerini aktaran sevgili danışmanım **Prof. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT**'e sonsuz teşekkürlerimi ve sevgimi sunarım. Yine çalışma sırasında bana destek veren ve tezimin deney aşamalarında ve tez yazım döneminde bilgi birikimleri ile benden yardımlarını esirgemeyen başta sevgili arkadaşım **Fatih TABANLI** olmak üzere, **Dr. Mehmet Emin URAS**'a ve **Dr. Uğur ŞEN**'e tüm içtenliğim ile teşekkür ederim. Yine tez deney sürecinde bana sonsuz yardımı dokunan laboratuvar takımımızdaki sevgili arkadaşlarım **Uğur AKCAN**, **Aslı HOCAOĞLU**, **Ecem BALCI**, **Onur YILDIRIMER**, **Bihter UÇAR**, **Kaan KARAHAN** ve **Zeynep ŞANVERDİ**'ye sonsuz teşekkürler ederim.

Bu süreçte bana her türlü desteği veren başta sevgili annem **Gönül AYGÜN**, babam **Mehmet Arif AYGÜN** ve ağabeyim **Fatih Sulhi Aygün**'e beni hem yetiştirdikleri hem de tüm anlarımda uzaktan da olsa destek oldukları için sonsuz sevgi ve saygılarımı sunuyorum.

Tez yazım ve deney sürecinde hiç bir zaman manevi olarak desteğini esirgemeyen **Barış Yiğit ÖZER**'e sonsuz sevgimi sunup, teşekkür ederim.

Aşağıdaki sunum bu tezden üretilmiştir

F. Tabanlı, I. I. Ozyigit, Z. Z. Gokce, K. Cilgin, G. M. Aygun, Assessment of Cd induced genotoxic damage in *Ludwigia glandulosa* Walter using RAPD analysis, Ecology 2017, International Symposium, Kayseri, Turkey, May 11-13, 2017

Ağustos, 2017

Gizem Müzeyyen AYGÜN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
SEMBOL LİSTESİ	v
KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
1.1 <i>Ludwigia glandulosa</i> Walter ve <i>Alternanthera reineckii</i> Briq. Bitkilerinin	
Taksonomik Özellikleri.....	3
1.2 <i>Ludwigia glandulosa</i> Walter Bitkisinin Taksonomik Özellikleri	3
1.3 <i>Alternanthera reineckii</i> Briq. Bitkisinin Taksonomik Özellikleri.....	6
1.4 Ağır Metaller ve Özellikleri	7
1.4.1 Ağır Metallerin Bitkiler Üzerine Etkileri	9
1.4.2 Kadmiyum	10
1.5 Genotoksisite ve Bitkiler Üzerine Etkileri.....	15
1.5.1 Ağır Metallerin Genotoksik Etkileri.....	15
1.5.2 Kadmiyumun genotoksik etkileri	16
1.6 Moleküler İşaretleyiciler	16
1.6.1 Moleküler İşaretleyiciler ve Genetik Çalışmalardaki Etkinliği.....	16
1.6.1.1 Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD).....	18
2. MATERYAL METOD	20
3. BULGULAR	28
4. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	31
KAYNAKÇA	33
ÖZGEÇMİŞ.....	42

ÖZET

Farklı Konsantrasyonlarda Uygulanan Kadmiyum (Cd) Elementinin *Ludwigia glandulosa* Walter ve *Alternanthera reineckii* Briq. Bitkilerindeki Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

Onagraceae familyası üyesi *Ludwigia glandulosa* Walter, Kuzey Amerika'da dağılım gösteren ve maksimum 40 cm'ye kadar uzayabilen çok yıllık bir tatlı su bitkisidir. Diğer bir tatlı su bitkisi olan *Alternanthera reineckii* Briq. ise Amaranthaceae familyasına ait bir bitkidir ve bu familya 170 farklı tür içerir. Bu bitkinin kökeni Güney Amerikadır ve 1965 yılında Avrupa'ya getirilmiştir. Bu bitki, düşük ışık ve karbondioksit seviyelerinde büyüme gösterebilir. Ancak maksimum büyüme potansiyeline bu tür çevre koşullarında ulaşamaz.

Bu çalışmada, üç farklı konsantrasyondaki Cd (100, 200 ve 400 µM) CdCl₂ formunda *L. glandulosa* ve *A. reineckii* bitkilerinde akvaryum ortamında 14 gün boyunca uygulanmıştır. Total genomik DNA modifiye CTAB metodu kullanılarak izole edilmiş ve genotoksik etkilere RAPD PCR tekniği ile bakılmıştır.

Elde edilen verilere göre, *L. glandulosa*'da artan Cd miktarına bağlı olarak yeni bant oluşumu, kaybolan bantlar ve bant yoğunluklarında değişiklikler şeklinde bant profillerinde farklılıklar gözlenmiştir. İlaveten *A. reineckii* bitkisinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm örneklerde bant yoğunluklarında azalma gözlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler göstermiştir ki, Cd stresi her iki tatlı su bitkisinde (*L. glandulosa* and *A. reineckii*) de genotoksik etkilere sebep olabilmektedir ve RAPD yöntemi, DNA hasarı ve mutasyon gibi genotoksik etkilerin belirlenmesinde benzer çalışmalarda da başarılı bir şekilde kullanılabilir.

Ağustos, 2017

Gizem Müzeyyen AYGÜN

ABSTRACT

Investigation of Genotoxic Effects of Cadmium Element in *Ludwigia glandulosa* Walter and *Alternanthera reineckii* Briq. Plants in Different Concentrations

Onagraceae family member *Ludwigia glandulosa* Walter is a perennial aquatic plant, which is widely distributed in North America can grow up to a maximum height of 40 cm. Another aquatic plant, *Alternanthera reineckii* Briq., is a member of Amaranthaceae family, and this family contains 170 different species. The origin of this water plant is South America and it is imported to the Europe in 1965. It is also able to grow at low light and carbon dioxide levels. However, the maximum growth potential cannot be reached in these environmental conditions.

In this study, three different concentrations of Cd (100, 200 and 400 μM) were applied in the form of CdCl_2 to *L. glandulosa* and *A. reineckii* plants in water tanks for 14 days. Total genomic DNA was isolated by using modified CTAB method and RAPD PCR technique was used to amplify genotoxic effects.

According to our results for *L. glandulosa*, some changes in band profiles as new and disappearing bands, band intensity differences were observed related to increasing Cd concentrations. Additionally in *A. reineckii*, band intensities of all samples were decreased compared to the control group

The obtained results of this study showed that, Cd stress may cause genotoxic effects in both aquatic plants *L. glandulosa* and *A. reineckii*, and RAPD method can be successfully used to indicate genotoxic effect as DNA damages and mutations in similar studies.

Agust, 2017

Gizem Müzeyyen AYGÜN

SEMBOL LİSTESİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikro molar
bp	: Baz parçası (base pair)
Cd	: Kadmiyum
cm	: Santimetre
Co	: Kobalt
Cr	: Krom
Cu	: Bakır
Dk	: Dakika
Fe	: Demir
Hg	: Civa
g	: Gram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
Mn	: Mangan
Mo	: Molibden
Ni	: Nikel

Se : Selenyum

Zn : inko

W : Volt



KISALTMALAR

- AFLP** : Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış Parça Uzunluklarındaki Farklılıklar)
- DNA** : Deoksiribo Nükleik Asit
- ISSR** : Inter Simple Sequence Repeats DNA (Basit Sekans Tekrarları Arası Polimorfizm)
- PZR** : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- RAPD** : Random Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)
- ROS** : Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
- Rpm** : Revolution per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
- Ppm** : Part per million (Milyonda bir birim)
- Bp** : Base pair (baz parçası)
- SSR** : Simple Sequence Repeat (Basit Dizilim Tekrarları)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	<i>Ludwigia glandulosa</i> bitkisinin çizim	5
Şekil 1.2	<i>Alternanthera reineckii</i> bitkisinin çizimi	7
Şekil 1.3	Kadmiyum yayılımı.....	12
Şekil 1.4	Kadmiyumun çevre dönüşümü.....	13
Şekil 2.1	Akvaryumlarda strese maruz bırakılmış olan <i>Ludwigia glandulosa</i> ve <i>Alternanthera reineckii</i> bitkileri	20
Şekil 2.2	Cd stresindeki akvaryumdaki bitkilerin (<i>Ludwigia glandulosa</i> ve <i>Alternanthera reineckii</i>) üstten görünümü	21
Şekil 2.3	Hasat sonrası <i>Ludwigia glandulosa</i>	22
Şekil 2.4	Hasat sonrası <i>Alternanthera reineckii</i>	22
Şekil 2.5	CTAB ile birlikte örneklerin ezilip homojenize edilmesi	24
Şekil 2.6	Nanodrop cihazında numunelerin incelenmesi	25
Şekil 2.7	Örneklerin PZR tekniğinin yapılması.....	27
Şekil 2.8	<i>Ludwigia glandulosa</i> bitkisinin genotoksisitesini belirlemek için kullanılan UBC733 RAPD primeri ile elde edilen jel elektroforez görüntüsü.....	28
Şekil 2.9	<i>Alternanthera reineckii</i> bitkisinin genotoksisitesini belirlemek için kullanılan UBC733 RAPD primeri ile elde edilen jel elektroforez görüntüsü.....	30

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1	Kadmiyum'un farklı maddelerdeki oranları	14
Tablo 2.1	RAPD primerleri	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Tablo 2.2	<i>Ludwigia glandulosa</i> bitkisinin RAPD bant profillerindeki değişim.....	29
Tablo 2.3	<i>Alternanthera reineckii</i> bitkisinin RAPD bant profillerindeki değişim	30



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Gelişen teknoloji ile beraber her yıl çevre kirliliği sorunları artarak ortaya çıkmaktadır. Çıkan bu sorunlar neticesinde de canlı hayatı tehlikeye girmekte ve ekolojik denge bozulmaktadır.

Yapılan araştırmalar sonucunda, özellikle ağır metal kirliliği tüm dünyada göze çarpmaktadır (Das ve ark., 2017). Önemli çevre kirleticisi olarak kabul gören ağır metallerin tam bir tanımlaması olmamak ile birlikte, özgül ağırlığı 5 g/cm^3 'ten büyük olan metallere ağır metal denmektedir. Bu metaller periyodik cetvelde "geçiş elementleri" olarak adlandırılan kısımda yer almaktadır (Thakur ve ark., 2016). Başlıca ağır metaller; civa (Hg), çinko (Zn), demir (Fe), kadmiyum (Cd), kobalt (Co), krom (Cr), kurşun (Pb), mangan (Mn), nikel (Ni) ve selenyum (Se)'dur.

Ağır metallerin çevreye salınımı durumunda tüm canlıların hayatsal fonksiyonlarında sıkıntılar meydana gelmekte ve besin zinciri yolu ile biyolojik birikim artmakta, bu birikimler neticesinde canlı hayatında aksamalar olmakta hatta ölümle dahi sonuçlanabilmektedir (Gardiner ve ark., 2017). Yapılan araştırmalar göstermiştir ki çevreye salınan ağır metaller insan yaşam alanlarının kısıtlamasına ve hatta yaşam alanı olmayan Antarktika'da dahi çevre kirliliğine sebebiyet vermiştir (Trevizani ve ark., 2016). Bu sebeple, ağır metallerin canlılar üzerine tahribatındaki riskler göz ardı edilmemeli ve önlemleri alınmalıdır (Kovaks ve ark., 2017). Sanayi devrimi sonrasında artan endüstriyelleşme, tarımda bilinçsiz gübre kullanımları, atıklar, boyalar, metallerin katalizör etkileri, maden işletmeleri, ilaçlar, volkanik aktiviteler ağır metal salınımını artıran faaliyetlerin başında gelmektedir (Philips ve ark., 2015).

Periyodik tabloda 2B grubunda yer alan ve ağır toksisitesi bulunan Cd elementi canlı hayatı için oldukça tehditkar bir ağır metaldir. Son yıllarda yapılan araştırmalar sonucu Cd'un ekosistemdeki zararı tespit edilmiş ve büyük tehdit olarak belirtilmiştir (Topacoglu ve ark., 2016). Canlılar bu ağır metale çoğunlukla solunum yolu ile maruz kalmaktadır. Bu bağlamda Cd elementinin etkinliğinde maruz kalma süresi ve dozuna göre bir çoğu hastalığı beraberinde getirmiştir (Clemens ve ark., 2016).

Cd bulaşmasında en büyük etkenlerden birkaçı ise şöyle sıralanabilir; bu ağır metali kullanan fabrikaların atıkları, otomotivde kullanılan cilalama işlemleri, tesislerde yağ ve kömür yakma işlemleri, uzun süreli çamur ve gübrelerin uygulanması ile fosfat gübre kullanımı (Magna ve ark., 2013).

Cd'un bitkilerde bulunan konsantrasyonu 0,1-1,1 ppm aralığında değişmektedir. Yapılan araştırmalar göstermiştir ki Cd elementinin bitkilerde gerekli olmayan bu halinin çok az miktarı dahi enzimlerin çalışmasını baskılayıcı (inhibe edici) etki göstermektedir ve her ne kadar hayvanlara oranla bitkilerin Cd toleransı yüksek olsa da bitki bu elemente aşırı dozlarda maruz kalırsa olumsuz etkileri mevcuttur (Gupta ve ark., 2014). Bitkilerin topraktan aldıkları Cd miktarını bazı faktörler yavaşlatabilir; toprağın yapısı, kireçliliği, pH derecesi vb (Feng ve ark., 2013)

Bitkinin maruz kaldığı toksisite olarak değerlendirilen ölçütlerdeki Cd sonucu, bitki yapraklarında kloroz, fizyolojik boyutlarında negatif değişim ve buna bağlı olarak fotosentez yetersizliği ve nekrozların görölmesine neden olmaktadır (Li ve qrk., 2015). Tabi ki Cd tek başına bunları yapabileceği gibi bu değişimlere bağlı olarak topraktan alınan minerallerden demir ile fosforun yetersiz olması ya da mangan taşınmasında aksamaların olması da kloroz sebebiyetçisi olmaktadır (Yin ve ark., 2017). Bahsi geçen toksisite sonucu fotosentez olaylarının akasaması, enzim inhibisyonunun olması bitkideki metabolik faaliyetleri negatif etkilemekte ve sonuç olarak verimin düşmesine neden olmaktadır (Andresen ve Küper , 2013).

Topraktaki ve sudaki ağır metal kirliliğinin ortadan kaldırılması maksatıyla yapılan çalışmalar arasında elektrokimyasal ve filtreleme işlemleri (Das ve Das, 2013) uygulanabilmektedir. Ancak bu uygulamalar hem maaliyet açısından hem de sonuçları açısından uygulamayı olumsuz kılmaktadır. Çünkü yapılan çalışmalar göstermiştir ki sudaki ve topraktaki ağır metalin temizlenme çalışmaları ardından tekrar bulaşması ve hatta yayılması söz konusudur (Odum, 2016). Bu sebeple maaliyeti düşürmek maksatlı biyolojik çözümlere gidilmiş ve bazı bitkilerin ağır metalleri çeşitli bitki organlarında akümüle edebildiği saptanmıştır (Clemens ve Ma, 2016).

Bu çalışmada akvaryum bitkisi olan *Ludwigia glandulosa* Walter ve *Alternanthera reineckii* Briq. bitkilerinin farklı konsantrasyonlardaki Cd stresinden nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Bu amaçla su tanklarına alınan bitki grupları iki haftalık süreçte üç farklı konsantrasyonda incelenmiştir. Bu amaçla tanklarda 0 (kontrol), 100, 200 ve 400 µM CdCl₂ içeren bitkiler yetiştirilmiş ve Cd'un bazı fizyolojik ve mineral beslenme üzerine etkileri belirlenmiştir.

Stresin bitkiler üzerindeki etkilerinin incelenmesinde, farklı konsantrasyonlardaki ağır metal uygulamalarına maruz bırakılan bireyler ile ağır metal uygulamasına maruz kalmayan kontrol grubu bireylerin, ağır metale maruz kalma durumunda genotoksisitesine bakılmıştır.

1.1 *Ludwigia glandulosa* Walter ve *Alternanthera reineckii* Briq. Bitkilerinin Taksonomik Özellikleri

1.2 *Ludwigia glandulosa* Walter Bitkisinin Taksonomik Özellikleri

Ludwigia glandulosa bitkisi Crassulaceae ailesinin bir üyesidir. Kuzey Amerika kökenli bu bitkinin bakımı ve yetiştirilmesi kısmen zor sayılacak seviyededir (Doyle ve ark.,2003; Brown ve ark., 2008). Bitki yaprakları ve gövdesi kısmen yahut tamamı ile su altında yaşar (Huffman ve Judd, 1998). Eğer bitki tamamen su altında ise yapraklarının rengi koyu yeşil ve kıvı-kahve rengindedir. Bitkinin en üstünde bulunan yaprakları yeşil renkli görülürken aşağı yapraklara doğru gidildikçe rengi kıvı-kahve renklidir (Peng ve ark., 2005).

Regnum: Plantae

Divisio: Spermatophyta

Subdivisio: Angiospermeae

Klassis: Dicotyledonae (Magnoliopsida)

Ordo: Myrtales

Familya: Onagraceae

Genus: *Ludwigia*

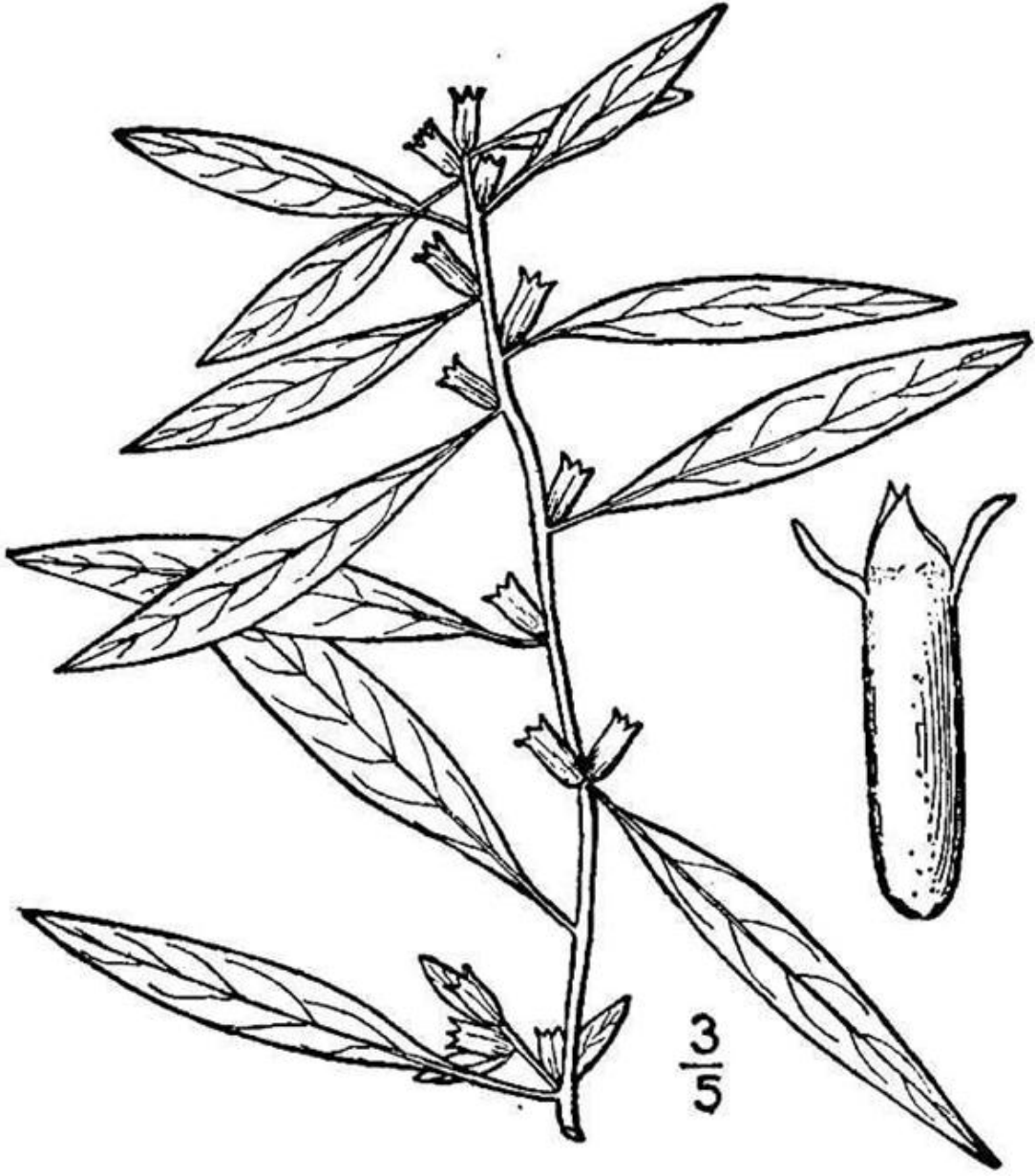
Species: *Ludwigia glandulosa* Walter

Bitkinin yetiştirilmesi zor olduğundan yetiştirmenin kolay olması için bu bitki 0,8w'tan 1,2w'a kadar oldukça yüksek bir ışık gücüne gereksinimi vardır. Eğer bu ışıklandırma kullanılmazsa yaprakları yeşile dönüp zamanla dökülmeler yaşanmaktadır. İyi bir aydınlatmaya rağmen yetiştirme sırasında alt kısımda yer alan yapraklarda yine dökülmeler ile karşılaşabilmektedir. Bitkinin ışık isteğinin yüksek olmasına paralel olmasına bağlı olarak demir ve eser element ihtiyacı oldukça fazladır (Sabetraftar ve ark., 2013). Bitkinin makro besin ihtiyacı karşılandıktan sonra ihtiyaç duyduğu nitrat ve fosfat miktarında azalmalar

vardır. Bitkinin sağlıklı gelişebilmesi için 5-25 ppm nitrat ve 0,5-3 ppm fosfat değerlerine sahip olması gerektiği saptanmıştır. Nitrat seviyeleri düşük olsa bile bu bitki diğer akrabalarına göre rengini kırmızı olarak koruyabilmektedir (Hussner, 2010).

Doğal olarak üremeleri sıcak yaz günlerinde gerçekleşebilmektedir. Üreme döneminde ilen bu bitkinin su yüzeyinde sarı küçük çiçekleri görünür. Çiçeklerin ortaya çıkmasından kısa bir zaman sonra tohumları açığa çıkıp taban kısmına yerleşerek filizlenir (Uddin ve ark., 2013). Bitkinin akvaryum ortamında çoğaltılmasının yapılabilmesi için tıpkı toprak bitkilerinde olduğu gibi dalından ya da direkt orta kısmından kesilip kuma aktarılıp ekilmesi sonucunda çoğaltma sağlanmış olur. Yukarıda bahsi geçen uygun ortamların sağlanması halinde bitki bu akvaryum ortamına adapte olarak yetişebilir (Hernandez ve Cabrera Walsh, 2015).





Şekil 1.1 *Ludwigia glandulosa* bitkisinin çizimi (anonim 1)

1.3 *Alternanthera reineckii* Briq. Bitkisinin Taksonomik Özellikleri

Bu bitki Güney Amerika kökenli olup, sucul bir bitkidir. Bu bitki Amazon nehrinin kenarlarındaki akıntıda bulunan dengesizlik sayesinde de su içinde ve dışında yaşamaya uyum sağlamış bir formdadır. Bitkinin var olan sağlıklı formunu koruyabilmek için sıvı gübreye ihtiyaç duymaktadır ayrıca kökleri ile gereksinim duyduğu besinleri yeterince alabilmesi için iyi bir tabana ihtiyacı vardır (Vogt ve ark., 1979; Anderson ve ark., 2015). Bitkiye yüksek seviyede ışık verilirse yaprakları kırmızıya döner. Bitki litre başına 0,5w'tan 1w'a kadar oldukça yüksek bir ışıklandırmaya gereksinim duymaktadır. Bitkiye akvaryum ortamında iken uygulana düşük ışık sonucunda alt kısımda yer alan yapraklarında dökülmeler gözlenmektedir (Chin ve Lim, 2011). Bitkinin yetiştirilmesi sırasında gruplandırma yerine ayrı ayrı dikme sureti ile daha iyi yetişmesi sağlanır ve bu sayede alt yaprakların da daha iyi ışık alması mümkün olmaktadır (Schikarski ve ark., 2015).

Regnum: Plantae

Divisio: Spermatophyta

Subdivisio: Angiospermae

Klassis: Dicotyledoneae (Magnoliopsida)

Ordo: Caryophyllales

Familya: Amaranthaceae

Genus: *Alternanthera*

Species: *Alternanthera reineckii*

Bitkiden çoğaltma yapabilme suretiyle yeni sürgünler elde edebilmek için taban maddesinin kaliteli olması gerekmektedir. *A. reineckii* bitkisi sert veya yumuşak suda yetişebilmektedir ama optimum gelişiminin yumuşak ve asidik suda gözlenmiştir. Akvaryumda çoğaltma işlemi yapılırken tıpkı kara bitkilerinde olduğu gibi yeni sürgünlerin alınıp direkt olarak kuma dikilmesi sureti ile çoğaltma işlemi gerçekleştirilir (Riehl, 1998).



Şekil 1.2 *Alternanthera reineckii* bitkisinin çizimi (Anonim 2)

1.4 Ağır Metaller ve Özellikleri

Son zamanlarda metallerin doğaya ve ekolojik düzene toksik etki yarattığına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda özellikle ağır metal tanımına giren metal grubu elementlerin toksik etkilerinin ekolojik basamakta yukarıya doğru gidildikçe birikiminin

arttığını ve bu artmış birikim sonucu canlıların yaşamlarında büyük sıkıntılara yol açtığı gösterilmiştir. Ağır metal grubuna giren elementlerin herbirinin tolerans seviyeleri ve toksik etkileri birbirinden farklıdır (Prasad, 2013; Zalewska ve Danowska, 2017).

Tanımlaması kesin olarak bulunmamakla birlikte, özgül ağırlığı 5 g/cm³'ten büyük olan metallere ağır metal denmektedir (Anghelache ve ark. 2016). Bu metaller periyodik cetvelde 'geçiş elementleri' olarak adlandırılan kısımda yer almaktadır (Lange ve ark., 2017). Başlıca ağır metaller; civa (Hg), çinko (Zn), demir (Fe), kadmiyum (Cd), kobalt (Co), krom (Cr), kurşun (Pb), mangan (Mn), nikel (Ni) ve selenyum (Se)'dur (Thakur ve ark., 2016).

Ağır metaller yapıları gereği doğada serbest halde bulunmazlar. Doğada genellikle karbonat, silikat, oksit veya sülfür'e bağlı şekilde bileşik halinde bulunurlar (Karnib ve ark. 2014).

Ağır metal grubuna giren elementlerin herbirinin tolerans seviyeleri ve toksik etkileri birbirinden farklıdır. Ağır metaller az miktarda da olsa canlıların yapısında önemli rol oynarlar. Bunlara esansiyel ağır metallere denilebilir. Bu esansiyel ağır metaller Fe, Cu, Mn, Mo, Ni ve Zn'dir (Bonanno ve ark., 2017). Diğer ağır metallerin (As, Cd, Hg ve Pb) herhangi bir canlının biyokütlesinde oluşan mikro düzeydeki artışlar toksik etkiye sebebiyet verebilir (Aderonke ve ark., 2017).

Bitkiler ağır metalleri depoladıkları yerlere ve tolerans düzeylerine ayrılabilir (Guarino ve Sciarillo, 2017). Toprakta biriken ağır metal miktarını tayin etmek için indikatör türler kullanılır. İndikatör bitkiler çevredeki küçük değişikliklere duyarlıdır ve ağır metalleri toprak üstü dokularından biriktirirler (Wickramasinghe ve ark., 2017).

Normalin üstünde ağır metal miktarına sahip ve toksik etki göstermeyen bitkilere akümülatör bitki olarak adlandırılır (Wen ve ark., 2017). Normalden 50-500 kat fazla ağır metal toplayan bitkilere hiperakümülatör bitki denir (Tian ve ark., 2017).

Alınan ağır metallerin göstereceği toksik etki bitkinin türüne bağlı olarak değişebilir. Bitkilerin türler arasında farklı düzeyde bu toksik etkiden kaçınabilir. Bu türe bağlı değişikliklerin yanında ağır metalin türü, maruz kalınan ağır metal miktarı, süresi ve bunun gibi diğer dış faktörler bitkilerde oluşan ağır metal toksisitesini etkiler (Hassan ve ark., 2017, Bonanno ve ark., 2017).

Bitkilerin ağır metallere maruz kalması durumunda bitkilerde stres oluşumu gözlenir. Bitkiler bu stres durumdan kurtulmak için tolerans ve kaçınma mekanizmalarını geliştirmişlerdir.

Bitkiler ağır metallere maruz kaldığında, ağır metalle ilk temas gösteren dokularında sinyal mekanizmaları çalışmaya başlar ve bitki kendini fizyolojik olarak stress faktörlerine cevap vermeye hazır hale getirir (Cheng ve ark., 2017, Shabala, 2017).

Kaçınma yöntemiyle ağır metal stresinden kaçınmak isteyen bitkiler kendi vücutlarında morfolojik ve hücrel değişiklikler yaratarak bu stres durumundan kaçınırlar. Bitkilerin çevreyle etkileşimde olduğu vücut yüzeylerini küçültmek, stoma miktarını ve açıklığını değiştirmek, kutikulanın kimyasal yapısında değişiklikler oluşturmak, kök ve yaprak gibi birincil olarak çevreyle etkileşim halinde olduğu dokularındaki salgıları ağır metal alınımını engelleyici kimyasal bileşikler üretmesi kaçınmaya örnektir (Paschke ve ark., 2005).

Kimi bitkiler alınan ağır metalleri hücre duvarında silikat yapısına ya da proteinlere bağlayarak hücre içi toksik etkiden kurtulabilirler veya hücre içinde üretilen antioksidan vasıtasıyla ağır metal stresinden kurtulabilirler. Bu ve bunun gibi bitkinin ağır metale maruz kaldıktan sonra toksik etkiyi azaltmasına, yok etmesine tolerans adı verilir. Tolerans mekanizmaları bitki türleri arasında farklılık gösterebilir. Örneğin *Silene vulgaris* subsp. *humulis* bitkisi ağır metalleri epidermal hücre duvarına bağlayarak saklayabilir (Bringezu ve ark., 1999; Frey ve ark., 2000).

Ağır metaller direkt veya indirekt yollardan serbest radikallerin oluşumuna sebebiyet verirler. Bitkiler bu serbest radikallerden kurtulmak için, antioksidan üretimi, stress proteinlerinin oluşumu ve fenol polimerlerinin üretimindeki değişiklikler diğer tolerans mekanizmalarına örnektir. (Bringezu ve ark., 1999).

Ağır metal toksisitesi ağır metal cinsine, canlının türüne, canlının direncine, kaçınma mekanizmalarına bağlı olarak birbirinden değişik etkiler gösterebilir (Kennedy ve Gonsalves, 1987; Shabala, 2017).

1.4.1 Ağır Metallerin Bitkiler Üzerine Etkileri

Çevrede bulunan ağır metaller bitkileri fizyolojik açıdan çeşitli şekillerde ve özellikle yüksek konsantrasyonları oldukça olumsuz yönde etkilemektedir. Bununla birlikte olması gerekenden daha az ya da hiç olmaması da bitki açısından olumsuz yönden etkiler. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki bu etkilerin başında enzimatik reaksiyonları yavaşlatma veya durdurma, hücrelerin içinde birikerek antioksidan etkiyi bozma, protein yapılarını ve katlanmalarını

bozarak diğerk partiküller ile aralarında olan korelasyonu kırma etkileri mevcuttur (Farooqui ve ark., 2017).

Bazı ağır metal etkileşimlerinde ise birinin bitkiye bağlanması neticesinde diğerkinin bağlanması engellenir ve dolaylı olarak bir ağır metal sebebi ile diğerkinin eksikliğinden kaynaklı problemler yaşanabilir ya da bağlanan ağır metalin fazlası toksik etkiler ortaya çıkarabilmektedir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki bitki bünyesinde eğer yüksek konsantrasyonda Mn var ise bitkinin Fe alınımında sekteler meydana gelmekte ve klorofil sentezinde görev alan Fe eksikliğine bağlı olarak bitkilerde kloroz durumu ortaya çıkmaktadır, bununla birlikte yüksek pH düzeylerinde bulunan alkali topraklarda Fe olsa dahi bitkiye bağlanamamaktadır. Tüm bunların sonucunda bitkide klorozis meydana gelmektedir. Ayrıca bitkide yüksek konsantrasyonda bulunan Fe elementi de toksik etkiye neden olmakta ve nekrozlara sebebiyet vermektedir (Liebthal ve Dietz, 2017; Hindt ve ark., 2017). Yapılan çalışmalar doğrultusunda bakırın (Cu) bitkiler için önemli bir mikroelement olduğu saptanmıştır ancak bu mikroelemente yüksek konsantrasyonlarda maruz kalan bitkilerde büyümenin, dokularda bulunan su miktarının ve fotosentez hızının dahi değiştiği gözlemlenmiştir (Lange ve ark., 2017). Bununla birlikte ağır metaller hücre membranında bulunan lipidler ve diğerk biyomoleküllere zarar vererek, reaktif oksijen stresinin oluşmasına sebep olmaktadır (Burzynski ve Klobus, 2004).

Yapılan diğerk çalışmalar doğrultusunda Cd'un bitki bünyesinde yer yer renk değişikliklerine, gelişme ve büyüme geriliği üzerine etkisi olduğu saptanmıştır. Ayrıca bitkilerde Cd stresi neticesinde özellikle azot metabolizmasında yer alan enzimlerin aktivitelerini azalttığı saptanmıştır. Bununla birlikte Cd'un bitki bünyesinde yüksek konsantrasyonlarda bulunması sebebi ile Calvin döngüsünde görev alan bir çoğu enzimin bağlanma mekanizmasını bozarak, fotosentezi sekteye uğrattığı saptanmıştır. Cd daha çok protein ve aminoasit organik bileşiklerine etki ederek, enzimatik faaliyetleri yavaşlattığı veya durdurduğu saptanmıştır (Rai ve ark.,2016; Carneiro ve ark., 2017).

1.4.2 Kadmiyum

Cd, atom numarası 48, atom ağırlığı 112,41 g/mol, özkütlesi 8,65 g/cm³ olan bir metaldir. Kaynama noktası 767°C, erime sıcaklığı ise 321°C olan gümüş renkte işlenebilir bir elementtir. Cd doğada CdS, CdCl₂ ve CdSO₂ olarak ve Cd tuzlarının içerisinde bulunur.

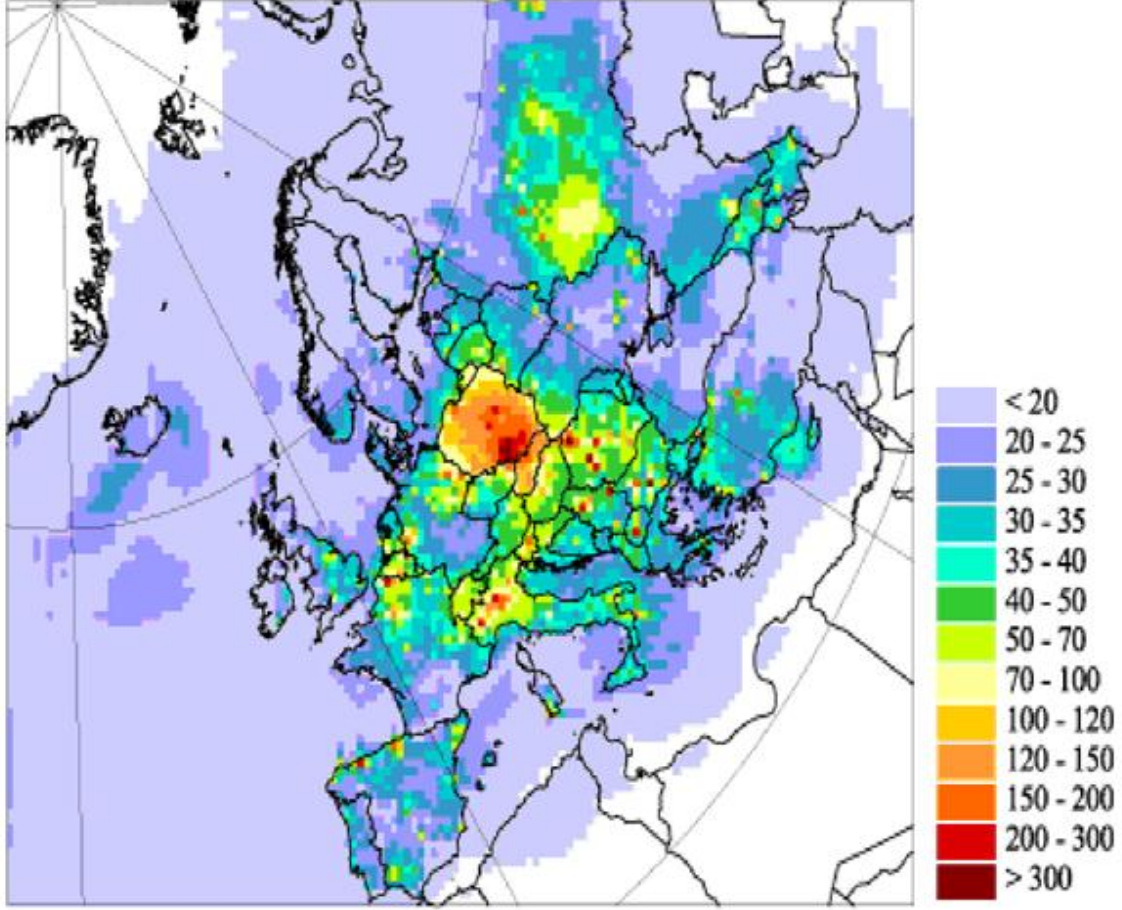
Cd, çevre için toksik etkiye sahip bir elementtir. Etkileri Zn'ye benzerdir fakat Zn'den farklı olarak bütün canlılar için toksik etkiye sahiptir. Cd'un günlük alım sınırı 40-50 µg'dır. Bunun üstünde alındığı takdirde tüm canlılar için toksik etki gösterir.

Cd ağır metaller içinde suda en iyi çözünen elementtir. Suda çözünür ve canlıların yapısında birikim gösterir. Zehirlilik oran çok yüksektir (Satarug ve ark., 2017).

Cd'un kullanım alanları:

1. Paslanmayı önlemek amacıyla elektrolizle kaplama ve galvanizleme işlemlerinde,
2. Ni-Cd pillerinin yapımında,
3. Metallerin aşınmalara karşı korunması için kaplanmalarında,
4. Akülerde,
5. Plastik üretiminde sağlamlılaştırıcı ve dayanıklılık arttırıcı olarak,
6. Seramik yapımı ve cam endüstrisinde,
7. Metal alaşımı hazırlanmasında,
8. Çinko, bakır ve kurşun cevherlerinin arındırılmasında,
9. Boya maddesi yapımında,
10. Ev eşyalarının, otomobillerin, zirai ve endüstriyel aletlerin, tutturucu özelliği olan malzemelerin (vida, çivi vb.) yüzeylerini kaplamada,

Kadmiyum'un farklı maddelerdeki oranları Tablo 2'de verilmiştir.



Şekil 1.3 Kadmiyum yayılımı (Kahvecioğlu ve Ark. 2001)

Kadmiyumun zirai bitkilerde birikmesi sanayi atıkları, gübre vb. endüstriyel ürünlerin sebebiyle olur. Bitkilerde birikmesi ise genellikle havada bulunan kadmiyum parçacıkları sebebiyle olur. Yol kenarında yetişen bitkilerde ki biriken kadmiyum miktarı, normal bitkilere oranla yılda 0,1 ile 0,2 gr daha fazladır. (Haktanır, 1987) Şekil 1.4'te Cd'nin biyosistem üzerinde nasıl taşındığı şematize edilmiştir.



Şekil 1.4 Kadmiyumun çevre dönüşümü (Anonim 3)

Kadmiyum bitkilerin enzimatik sistemlerine zarar verir. Cd protoklorofil reduktaz ile aminolevulinik asit enzimlerini inhibe ederek klorofil oluşumunu engeller (Sheoran ve ark., 1990). Bunların dışında Cd proteinlerde bulunan -SH bağlarına bağlanarak enzimlere inaktive eder. İnaktive edilen bu enzimler bitkilerin, fotosentez yolağında ve su dengesinde rol alan enzimlerdir. Bu inaktivasyon sonrası bitkilerin fotosentez ve su dengesi bozulur (Rai ve ark., 2017).

Cajanus cajan L. bitkisinin yaprakları Cd ve Ni toksititesi üzerinde yapılan çalışmalar göstermiştir ki bu iki ağır element fotosentez mekanizmasını en çok etkileyen ağır metallerdir (Sheoran ve ark., 1990). Bitkinin yapraklarında yapılan fotosentez miktarı uygulanan ağır metalin türüne ve miktarına göre fotosentez miktarını %2 ve %61 oranında azaltmıştır. Bunun dışında fotosentez miktarında azalmaya bağlı olarak bitkilerde alınan O_2 miktarında da azalmalar gözlenmiştir (Sheoran ve ark., 1990, Chaoi ve ark., 1997; Lu ve ark., 2017).

Tablo 1.1 Kadmiyum'un farklı maddelerdeki oranları (Haktanır, 1987)

Materyalin Cinsi	Cd içerikleri (ppm)
Kömür	1 - 2
Motor Yağları	0 - 5
Taşıt Lastikleri	20 - 90
Süper Fosfat	38 - 48
Ham Fosfatlar	31 - 90
Yer Kabuğu (ort.)	0,18
Kirlenmemiş Topraklar	1
Kirlenmiş Topraklar	1 - 53

Kumar ve Chopra *Phaseolus vulgaris* L. (fasülye) bitkisini kullanarak Cd'nin nitrat mekanizmaları üzere olan etkilerini araştırmışlardır. Bitkilerin yetiştiği topraklara uzun süreli (24 saat) ve kısa süreli (7 saat) olmak üzere Cd eklemiştir. Bu çalışma sonucunda Cd uygulanan bitkilerdeki nitrat oranının, Cd uygulaması yapılmamış bitkilere oranla nitrat miktarının %24 ila %62 oranında azaldığı gözlenmiş buna karşın ise toplan amino asit miktarının ise arttığını göstermişlerdir. Nitrat enzimleri bitkilerde köklerin, madde taşınması üzerinde etki etmektedir. *Phaseolus vulgaris* L. bitkisinde uygulanan Cd %90 oranında kökte gözlenmiş ve kökteki nitrat metabolizmasını etkilemiştir. Bu etkileşim sonucu, ayrıca bitkide biyokütlede azalmada saptamışlardır (Kumar ve Chopra., 2014).

Salt ve arkadaşlarının *Brassica juncea* L. (Indian Mustard) bitkisinde yaptığı çalışmalar göstermiştir ki Cd bitkilerin köklerinde ve stomaları üzerinde etki etmektedir. Bu etkiler sonucunda köklerden su ve iyon alınmasını azalttığı gözlenmiştir. Bir diğer etki olarak stomaların açılışını ve kapanışını etkilemesidir. Bilindiği üzere bitkiler sıvıyı taşırken stomalar üzerinden dışarı attığı su buharını da kullanmaktadır. Kadmiyum bitkinin yaprağında birikim yaparak stomalarını etkileyerek sıvı kaybını azaltır. Bu azalmada bitkilerin sıvı dengesini bozmaktadır. Kadmiyumun sıvı ve iyon mekanizması üzerinde etkisi bu iki organı etkilemesi sonucu oluşmuştur (Salt ve ark., 1995).

1.5 Genotoksisite ve Bitkiler Üzerine Etkileri

Genotoksisite organizmaların genetik bilgilerinin zararlı maddelere maruz kalması sonucunda meydana gelen olumsuz değişikliklerdir. Meydana gelen olumsuz değişiklikler arasında gen mutasyonları, kromozom anomalileri, DNA'da meydana gelen delesyon, translokasyon, inversiyon gibi değişimler örnek olarak verilebilir. Kopyalanması gereken DNA ya da genomun, replikasyonu sırasında, replikasyon enzimleri ile etkileşime giren ve mutajen etki gösteren yani genotoksik maddelerin genetik materyal olan DNA'da aksaklıklar oluşturması veya hasara yol açmasına genotoksik etki denir (Young, 2002).

Mutajenlerin DNA üzerindeki etkisi ya doğrudan ya da dolaylı olarak proteinlere bağlanması üzerinden ortaya çıkmaktadır. Bu etki doğrultusunda transkripsiyon basamakları etkilenmekte ve ihtiyaç duyulan enzimlerin sentezlenmesinde, yapıların ve katlanmalarında çeşitli aksaklıklar olmakta ve hücre döngüsü ile hücre metabolizmasının yeterli düzeyde çalışmaması ve hatta bazen bunun durması sonucunda ilgili dokuda fizyolojik olarak çeşitli aksaklıklar gözlemlenmiştir. Bitkilerde ise bu aksaklıklar neticesine örnek olarak nekrozis, klorozis, doku kaybı, köklerden madde alımının aksaması, klorofil aktivitesindeki yavaşlama veya durma ve buna bağlı olarak bitkinin fotosentez mekanizmasının bozulması sonucu yaşam döngüsünün sona ermesine kadar karşılaşılabılır.

1.5.1 Ağır Metallerin Genotoksik Etkileri

Ağır metallerin eser miktarda bulunmaları bitkiler için gereklidir (Knasmüller ve ark., 2017). Ancak ağır metallerin bulunma miktarlarında azlık ya da çokluk ise DNA zincirlerinde mutasyonlar sonucu ortaya çıkan hasarlar gibi çeşitli genotoksik etkilere sebebiyet vermektedir. Örneğin, Fe elementi varlığında klorofil enzimlerinin çalışması etkilenmektedir ancak demirin az olması sonucunda klorofil üretim mekanizmasının aksamasından dolayı klorozis meydana gelmektedir. Eğer bitkide bu ve bunun gibi ağır metal varlığının aksaması olur ise DNA zincirinde ağır metallerin mutajenik etkileri görülmektedir. Bu etkilerin başlıcaları arasında klorofil enzim mekanizmasının aksamasına, transkripsiyon ile RNA üretim devrinin bozulması sonucunda gerekli olan enzimlerin görev yapamaması sonucunda hücrelerde ve dokuda fizyolojik sıkıntılara rastlanmaktadır.

1.5.2 Kadmiyumun Genotoksik Etkileri

Kadmiyumun organizmalardaki moleküler genotoksitesisi tam olarak anlaşılammakla birlikte, Cd'un doğrudan adenin, guanin, ve timin nükleotidlere bağlanma mekanizmalarına rastlanmıştır. Bunun sonucunda DNA'daki yanlış baz eşleşmelerini tamir mekanizmasını bozduğu tespit edilmiştir (Hossain ve Huq, 2002; Jin ve ark., 2003). Cd'un etkilerinden olan nükleik asit deformasyonu sonucunda reaktif oksijen türlerini (ROS) dolaylı yoldan etkinleştirdiği saptanmıştır (Fodor, 2002).

Yapılan çalışmalar doğrultusunda yüksek konsantrasyonlarda bulunan Cd ağır metalinin hücreyi mitotik döngüde sapmalara ve engellere maruz bıraktığı tespit edilmiştir. Buna örnek olarak bir hücre döngüsünde ortaya çıkan çok sayıda anafaz evresi, kromozom anomalileri, DNA yapılarında meydana gelen kırılmalar ve silinmeler verilebilir. Bununla birlikte bitkilerde Cd akümüasyonu sonucu fotosentez olaylarında düşüş, su ve besin alınımında azalma, kloroz ve büyüme inhibisyonu ile sonuçlanmıştır (Drazkiewicz ve ark., 2003).

1.6 Moleküler İşaretleyiciler

1.6.1 Moleküler İşaretleyiciler ve Genetik Çalışmalardaki Etkinliği

Moleküler işaretleyiciler, DNA üzerindeki ilgili bölgelerin çoğaltılmasını sağlayan küçük DNA bölgelerine verilen isimdir. Bunun neticesinde DNA'nın istenilen gen bölgesinin tespiti sağlanabilmektedir. Genom analizleri ve moleküler çalışmalarda kullanılmak amacıyla 3 tip moleküler işaretleyici ön plana çıkmaktadır. Bu işaretleyiciler sırasıyla, morfolojik işaretleyiciler, protein işaretleyicileri ve DNA tabanlı işaretleyicilerdir (Vazhacharickal ve ark., 2017).

Organizmaların fenotipik görünümleri bakımından genotiplerinin birbirinden ayırma işlemi uzun senelerdir çalışılmaktadır. Genotipleri kendi aralarında ayırmayı sağlayan morfolojik ve mutasyonlar neticesinde ortaya çıkan yeni özelliklerin fenotipe yansıyanları uzun zamandır bilinmektedir. Uygulanan bu işlemin günümüzdeki formunda ise protein ve DNA farklılığını ortaya koyabilmek için moleküler belirleyiciler tercih edilmiştir (Westemeier, 2016).

Morfolojik işaretleyiciler, organizmaların genetik işlemlerinde uygulanmakta ve bu işaretleyiciler neticesinde, genetik çalışmalarda bilgi eksikliğinden kaynaklı ilk moleküler ve genetik çalışmaları uygulayan Mendel kalıtımının kurallarını gösteren özellikler

kullanılmıştır. Bu işaretleyiciler ile yapılan çalışmaların dezavantajlı olmasının sebebi ise kullanım kolaylığı olmasına karşın yeterli miktarda alel olmayışıdır (Verga ve ark., 2015).

Aminoasitlerin yapısı, molekül ağırlıklarındaki farklılıklarından mütevellit proteinlerin alellerinde diğer organik bileşiklere göre değişiklikler görülmektedir. Bu farklılıktan kaynaklı olarak proteinlerin jel elektroforez metodu uygulanması sonucu kolaylıkla farkedilebilmelerine olanak sağlar. İşaretleyicilerin tarihteki ilk kullanımları sırasında yaygın olarak doku ve kan örneklerinde yer alan proteinleri belirteç olarak kullanılması söz konusuydu ancak daha sonra bu işlemin uzun vakit alması neticesinde bu doku ve kan örnekleri yerine bugün olduğu gibi çalışmalar artık DNA tabanlı işaretleyicileri kullanılmaya başlanmıştır (Philips ve Vasil, 2013).

DNA tabanlı işaretleyiciler ise, taksonomik basamaklarda yer alan aynı türün farklı bireylerinde ortaya çıkan polimorfizm farklılıklarının görüldüğü DNA kısımlarıdır ve şu an en fazla kullanılan moleküler işaretleyicidir. Bu işaretleyicilerin çok fazla kullanılmasının temel sebebi ise polimeraz zincir reaksiyon basamaklarının bulunması ile ortaya çıkmıştır. Bunun neticesinde de genetik haritanın çıkarılması, filogenetik olarak sınıflandırmada analiz, doğal seçim çalışmalarında fazlaca kullanılmıştır (Passari ve ark., 2015).

Bu işaretleyicilerin çok sayıda olması ve ekolojik etmenlerden etkilenmemeleri nedeni ile kullanım açısından avantaj sağlamaktadır. Bu avantaj sayesinde de DNA'nın bazı dizilimlerdeki değişimler kolaylıkla ve doğru bir şekilde ortaya çıkarılabilmektedir. İşaretleyicilerin kullanım açısından bir diğer avantajı ise bitki ıslah çalışmalarında yararlanılmasıdır ve bu çalışmaların her geçen gün gelişmesidir. Moleküler işaretleyiciler kullanılarak tarımsal ürün elde etme sürecinde yapılacak seleksiyon ile verim artırılıp, seleksiyon işlemi ile buna devam ettirilebilir. Düşük bütçeli olmasından kaynaklı diğer uygulamalara göre de avantajlı kabul edilir (Kumar ve ark., 2016).

DNA tabanlı işaretleyiciler kullanım maksatları bakımından farklı şekilde gruplandırılırlar:

- Geçiş türü bakımından (biparental ve parental nükleus kalıtımı ile maternas - paternal kalıtım)
- Gen işleyişine göre (dominant ve kodominant işaretleyiciler),

- Tahsil ve çözümlene metodlarına göre (Hibritleme yani PZR temelli olmayan işaretleyiciler ile PZR temelli işaretleyiciler) (Collier ve ark., 2017)

PZR temelli olmayan yöntemlere örnek olarak RFLP (Restriksüyon ile kesilmiş DNA parçalarındaki uzunluk farklarını ortaya koyan yöntem) verilebilir (Tanksley ve ark., 1989; Pharmawati ve Imaniar, 2016). PZR temelli olan yöntemlere örnek olarak ise sıklıkla uygulanan RAPD (Rastgele Arttırılan Polimorfik DNA) ve AFLP (Arttırılan Parça Boylarındaki Farklılıklar) (Vos ve ark., 1995; Chang ve ark., 2017) ve microsattelites (SSR ya da ISSR: Kısa DNA Baz Segmentleri ya da Basit Dizi Tekrarı) (Rafalski ve Tingey, 1993; Khalil ve Hassan, 2013) verilebilir.

İşaretleyiciler ile ilgili belirlemeler çoğunlukla, uygulana elektroforez metodu sonucunda sağlanmaktadır. Bu metod ile DNA'nın ve/veya proteinin parçaları belirli bir konsantrasyonda bulunan jelin üzerinde boyut farklılıklarından dolayı birbirlerinden farklı şekillerde hareket ederek ilerlemektedir. Jel elektroforezinde hareket eden küçük DNA parçaları daha sonra çeşitli boya ve radyoaktif madde kullanılarak görüntülenebilmektedir (Tran ve Ho, 2017). Moleküler işaretleyiciler sayesinde ayrıca bir türün farklı varyasyonlarını belirlemek yani o türe ait geniş kapsamlı olarak genetik haritalaması yapılabilmekte, buna ek olarak bu türün taksonomisini yapabilmekte ve ilerleyen dönemlerde de patentini alma işlemlerinde kullanılabilmektedir (Zanke ve ark., 2017).

1.6.1.1 Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD)

Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA-RAPD), PZR tekniği kullanarak sentetik primerlerin yardımıyla yapılan rastgele DNA parçası çoğaltımına dayanan bir yöntemdir (Sharma ve ark., 2017). RAPD işaretleyicileri genelde 10 baz çifti uzunluğundadır. Kullanılan primerler hem ön hem de ters primer rolünü üstlenmektedir. Çoğaltılan DNA parçacıkları genellikle 0.5-5 kb arasında bir büyüklüğe sahiplerdir. Primerlerin bağlanma bölgelerinin çeşitli oluşu ve buna bağlı olarak oluşan farklı uzunluktaki DNA parçacıklarından dolayı polimorfizm ortaya çıkmaktadır (Pareek ve ark., 2017; Thakar ve ark., 2017).

RAPD yöntemi de her teknikte olduğu gibi belli bazı avantajlara ve dezavantajlara sahiptir. Avantajları arasında düşük miktarda DNA ihtiyacı, zaman olarak daha kısa sürede sonuç vermesi, primerlerinin tasarımlarının kolay olması, RAPD işaretleyicilerinin genomik

dağılımlarının bol ve bütün genoma dağılmış olması sayılabilir. Buna karşın RAPD tekniğinin dezavantajı ise tekrarlanabilirliğinin az olması ve bilgilendirme gücünün diğer yöntemlere göre düşük olmasıdır (Filiz ve Koc, 2012).

Moleküler işaretleyiciler aracılığıyla genotoksitenin belirlenmesi için kullanılan tekniklerden birisi de RAPD yöntemidir. Bu yöntemin de her yöntemde olduğu gibi bazı olumlu ve olumsuz yönleri vardır. Az miktarda DNA gereksinimi, zaman olarak önemli kazançlar sağlaması, tüm genoma yaygınlığa sahip olması ve yönteme ait primerlerinin kolay sentezlenebilir olması yöntemin olumlu yanlarıdır. Düşük tekrarlanabilirliğe sahip olması ve sonuç verme kapasitesinin diğer yöntemlere göre daha yetersiz olması olumsuz yönlerindedir (Ebadi ve Eghbali, 2017).



2. MATERYAL METOD

Elde edilen su bitkileri 40 lt hacmindeki akvaryumlarda gruplara ayrılmış ve 14 gün boyunca kontrol (0), 100, 200 ve 400 μM 'lık CdCl_2 stresine maruz bırakılmıştır.



Şekil 2.1 Akvaryumlarda strese maruz bırakılmış olan *Ludwigia glandulosa* ve *Alternanthera reineckii* bitkileri



Şekil 2.2 Cd stresindeki akvaryumdaki bitkilerin (*Ludwigia glandulosa* ve *Alternanthera reineckii*) üstten görünümü

Bitkilerin daha sonra hasat işlemleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.3 Hasat sonrası *Ludwigia glandulosa*



Şekil 2.4 Hasat sonrası *Alternanthera reineckii*

Hasat sonrası toplanan bitkilerin yapraklarından CTAB metodu kullanılarak DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

CTAB DNA izolasyon solüsyonu hazırlarken kullanılan kimyasallar aşağıdaki gibidir:

1 M TrisHCl 25 ml

5 M NaCl 70 ml

0,5 M EDTA 10 ml

CTAB 5 g

Distile Su (250 ml'ye tamamlandı)

Diğer Bileşikler:

%95'lik İsoopropanol

Kloroform - octanol (24:1 oranında)

5 M NaCl

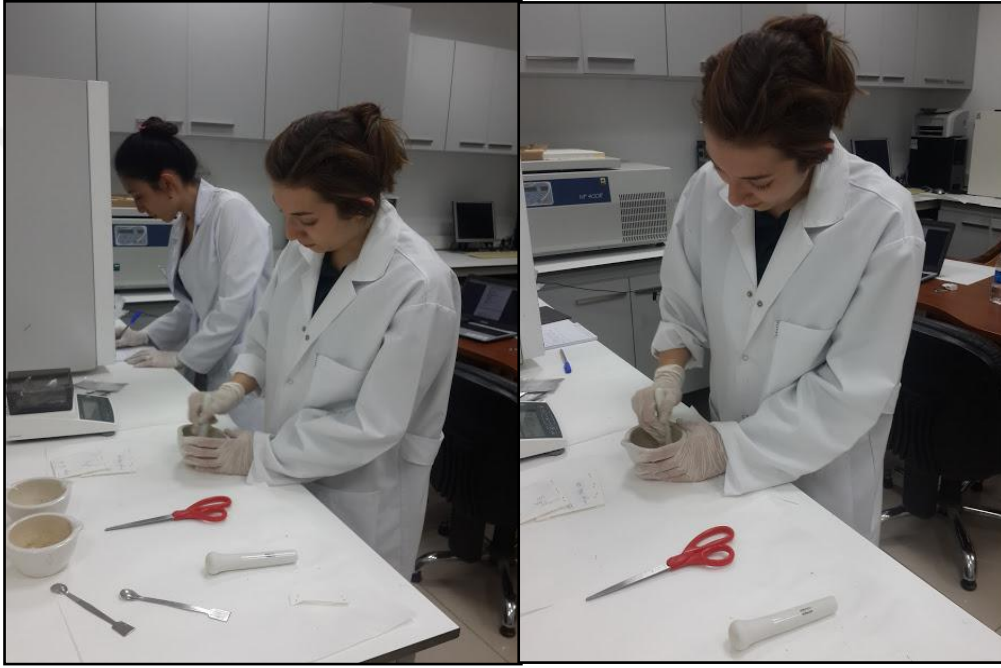
DNA izolasyonun yapım protokolü aşağıda belirtildiği gibi yapılmıştır:

1. Buz üstünde havan içinde hızlıca doku ezilir (0,1 g).
2. 65°C'de ısıtılmış olan CTAB, 200 µl CTAB eklenir ve ezilmeye devam edilir, 600 µl CTAB daha eklenir ve homojenizat çözülünceye kadar ezilir. 0,05 g PVP eklenir.
3. Homejenizat 2'lik tüpe alınarak 65°C'de 45 dk inkübe edilir. inkübasyon sırasında 5 dk'da bir invert edilir.
4. 10 dk. oda sıcaklığında bekletilir.
5. 800 µl Kloroform - octanol (24:1 oranında) eklenir.
6. 13000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilir.
7. Üst fazı pipet ile alınır.
8. Elde edilen süpernatantın hacminin ½'si kadar 5 M NaCl, hacmin 1 katı %95'lik isopropanol eklenir.
9. -20°C'de bir saat bekletilir (ya da +4 °C'de bir gece)
10. 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir ve süpernatant atılır.

11. 1000 μ l %75'lik alkol eklenerek, 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
12. Ethanol atılır ve DNA kurumaya bırakılır.
13. 100 - 200 μ l nükleaz free suda (veya TE buffer pH:8'de) çözülür.
14. 2 μ l RNAaz A eklenir ve 37°C'de 60 dakika inkübe edilir.
15. Çözeltiyi RNAaz A denaturasyonu için 65°C'de 60 dakika inkübe edilir.

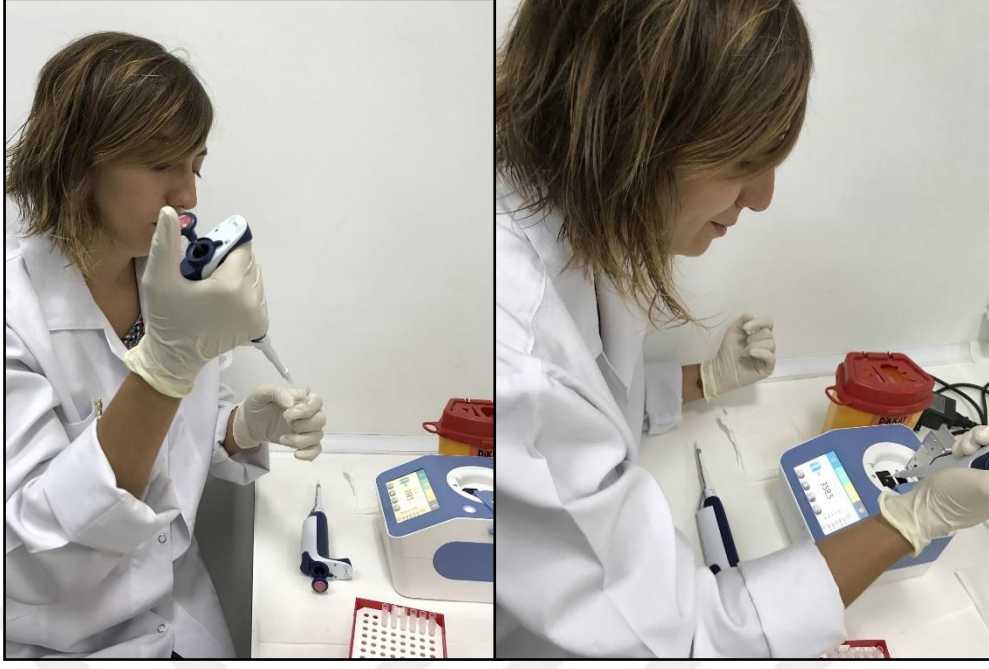
0,5 M EDTA için 18,61 g + 100 ml distile su

1 M Tris HCl için 15.76 + 100 ml distile su



Şekil 2.5 CTAB ile birlikte örneklerin ezilip homojenize edilmesi

İzolasyon sonrası elde edilen DNA örnekleri nanodrop yardımı ile ölçülüp, miktar ve saflık analizleri yapılmıştır.



Şekil 2.6 Nanodrop cihazında numunelerin incelenmesi

Bitkilerde genotoksisiteyi belirlemek için yararlanılan RAPD primerleri aşağıdaki listede belirtilmiştir.

Tablo 2.1 RAPD primerleri

5' -CTGGCGAACT- 3'
5' -TCCGATGCTG- 3'
5' -CTGCGCTGGA- 3'
5' -CTGAGGTCTC- 3'
5'-TCATCCGAGG- 3'
5' -TCTCCGCCCT- 3'
5' -AATGCGGGAG- 3'
5' -GGGSSGGGAG- 3'

Bu primerler kullanılarak RAPD-PZR tekniği aracılığıyla genotoksisite belirlenmeye çalışılmıştır.

İzole edilen DNA örnekleri için PZR kimyasalları aşağıda verilmiştir.

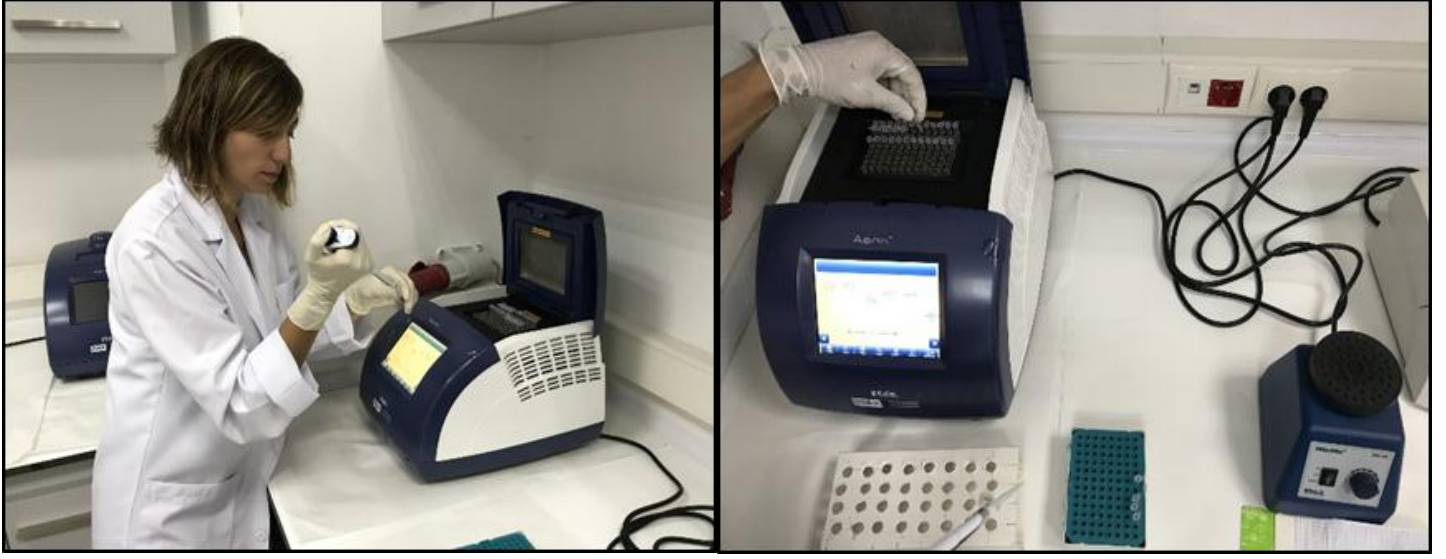
1. 3,6 µl H₂O
2. 2 µl, 10X Buffer (mg)
3. 4 µl, (10 - 50 µM) dNTP
4. 1,2 µl, 1 - 4 mM MgCl₂
5. 2 µl, 0,1 - 1 µM primer I
6. 2 µl, 0,1 - 1 µM primer II
7. 0,2 µl, 5U Taq polymerase kimyasallarından toplamda 15 + 5 µl kalıp DNA olacak şekilde kullanılmalıdır.

Uygulanan PZR döngüsü basamakları aşağıda mevcuttur.

1. 94°C'de 3 dakika bir döngü denaturasyonu,
2. 94°C'de 1 dakika, 36°C'de 1 dakika ve 72°C'de 1 dakika kırk döngü bağlanma,
3. 72°C'de 5 dakika bir döngü uzama aşamaları şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen PZR ürünlerinden %4'lük agaroz jel elektroforezi yardımıyla görüntülemeler yapılmıştır. Agaroz jelin hazırlanması şu şekildedir:

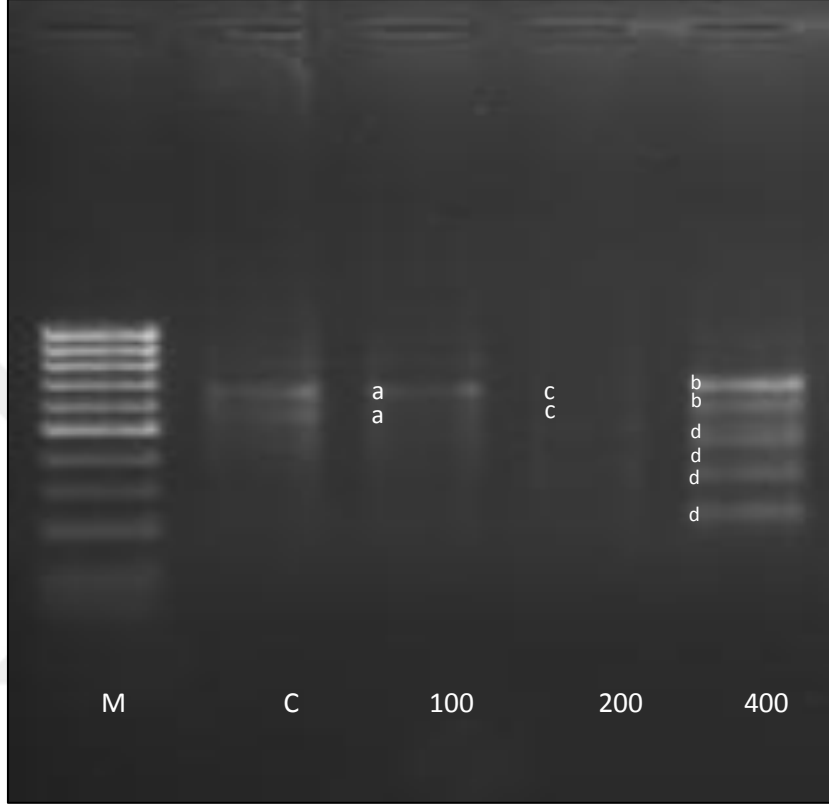
1. 4 g toz agoroz tartılır,
2. Üzerine 250 mL 1xTBE (trisboric acid EDTA) eklenir.
3. Karışım kaynatıldıktan sonra yürütülen jellerin görüntülenmesinin yapılabilmesi için 5 µl EtBr₂ eklenir.



Şekil 2.7 Örneklerin PZR tekniğinin yapılması

3. BULGULAR

A. reineckii ve *L. glandulosa* bitkilerindeki CdCl₂ stresine bağlı genotoksisitenin belirlenmesi amacıyla yapılan denemelerde yukarıda belirtilen primerlerden UBC733 ile verimli sonuçlar elde edilmiş, ve elde edilen sonuçlar ve görüntüler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

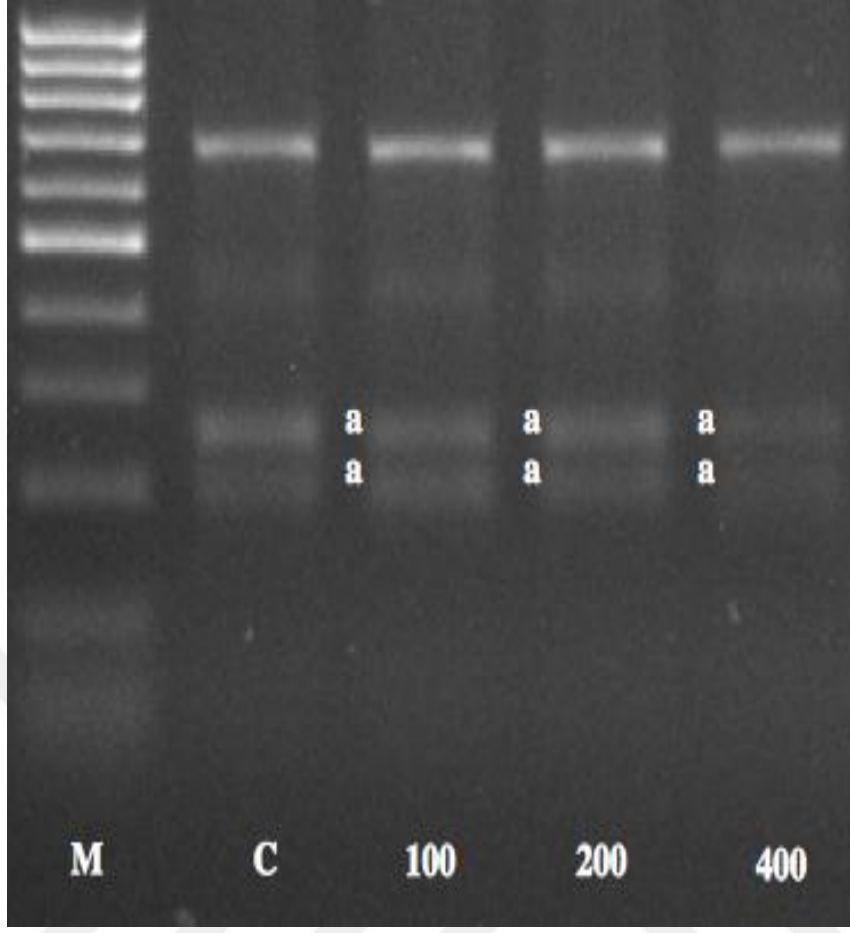


Şekil 2.8 *Ludwigia glandulosa* bitkisinin genotoksisitesini belirlemek için kullanılan UBC733 RAPD primeri ile elde edilen jel elektroforez görüntüsü

(M: Marker, C: Kontrol grubu, 100: 100 µM Cd uygulanan grup , 200: 200 µM Cd uygulanan grup , 400: 400 µM Cd uygulanan grup, a: bant yoğunluklarında azalma, b: bant yoğunluklarında artma, c: kaybolan bantlar, d: yeni bant oluşumu)

Tablo 2.2 *Ludwigia glandulosa* bitkisinin RAPD bant profillerindeki değişim

UBC733 (5' -GGGSSGGGAG- 3')					
Gruplar	Toplam Band Numarası	a	B	A	B
Kontrol	2	-	-	-	-
100 µM Cd	2	-	-	2	-
200 µM Cd	0	-	2	-	-
400 µM Cd	5	3	-	2	-
a: yeni bant görüntüleri, b: kaybolan bant, A: bant yoğunluğundaki artma, B: bant yoğunluğundaki azalma					



Şekil 2.9 *Alternanthera reineckii* bitkisinin genotoksisitesini belirlemek için kullanılan UBC733 RAPD primeri ile elde edilen jel elektroforez görüntüsü

(M: Marker, C: Kontrol grubu, 100: 100 μ M Cd uygulanan grup , 200: 200 μ M Cd uygulanan grup , 400: 400 μ M Cd uygulanan grup, a: bant profillerinde azalma)

Tablo 2.3 *Alternanthera reineckii* bitkisinin RAPD bant profillerindeki değişim

UBC733 (5' -GGGSSGGGAG- 3')					
	Toplam Band Numarası	a	B	A	B
Kontrol	4	-	-	-	2
100 μM Cd	4	-	-	-	2
200 μM Cd	4	-	-	-	2
400 μM Cd	4	-	-	-	2
a: yeni bant görüntüleri, b: kaybolan bant, A: bant yoğunluğundaki artma, B: bant yoğunluğundaki azalma					

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada tatlı su bitkisi olan *Ludwigia glandulosa* Walter ve *Alternanthera reineckii* Briq. bitkilerinin farklı konsantrasyonlardaki Cd stresinden nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Bu amaçla su tanklarına alınan bitki grupları iki haftalık süreçte üç farklı konsantrasyonda 0 (kontrol), 100, 200 ve 400 µM CdCl₂ içeren su dolu tanklarda strese tabi tutulmuşlardır. Daha sonra bitkiler hasat edilmiş, total genomik DNA modifiye CTAB metodu kullanılarak izole edilirlen ve genotoksik etkilere RAPD-PCR tekniği ile bakılmıştır.

Elde edilen verilere göre, *L. glandulosa*'da artan Cd miktarına bağlı olarak yeni bant oluşumu, kaybolan bantlar ve bant yoğunluklarında değişiklikler şeklinde bant profillerinde farklılıklar gözlenmiştir. İlaveten *A. reineckii* bitkisinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm örneklerde bant yoğunluklarında azalma gözlenmiştir.

Benzer bir çalışmada, Liu ve arkadaşları (2005) *Hordeum vulgare* (arpa) bitkisi kullanmışlar, ve Cd stresine bağlı genotoksisiteyi RAPD yöntemi ile analiz etmişlerdir. Çalışmada Cd uygulamasından sonra kök uçlarından izole edilen DNA'lara ait rastgele amplifiye polimorfik DNA (RAPD) profillerinde ortaya çıkan farklılıklar normal fideler ile kıyaslandığında bant yoğunluğunda artma ve azalmalar, normal bantların kaybı ve yeni bantların ortaya çıkması gibi değişiklikler gözlemlenmiştir. Araştırmacılar ayrıca, ortaya çıkan farklılıklarının etkisinin konsantrasyona bağlı olduğunu saptamışlardır.

Enan'ın 2006 yılında *Phaseolus vulgaris* tohumlarındaki ağır metallere bağlı genotoksisitenin araştırılması adlı çalışmasında RAPD analizi yapılmış ve sonuçta uygulama yapılan örneklerin DNA parçalarının varlığı ve / veya yokluğu kontrol grubu örnekleri ile karşılaştırıldığında polimorfizmlerin belirginleştiği saptanmıştır.

Al-Qurainy ve arkadaşlarının (2010) *Eruca sativa* bitkisi ile yaptıkları çalışmalarında Cd, Zn ve Pb ağır metallerinin büyüme üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu üç ağır metalin genotoksik potansiyeli bakımından sıralandığında Cd'un etkisinin diğerlerinden daha fazla olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar, metallerin oluşturduğu genotoksisiteyi saptamak amacıyla RAPD tekniği kullanmışlar ve bantlarda farklılıklar tespit etmişlerdir. Buna göre deney gruplarının bazı bireylerinde yeni bant oluşumları görülürken bazı uygulamalarda bantların hiç çıkmadığı ya da kaybolduğunu tespit edilmiştir.

Cansaran-Duman ve arkadaşlarının (2011) yaptıkları çalışmada Karabük'te bulunan sanayi bölgesinde yetişen ve yüksek konsantrasyonlarda ağır metale maruz kalan *Evernia prunasti* bitkisinde bulunan ağır metallerin konsantrasyonları atomik absorpsiyon spektrometresi ile belirlenmiş, çevre kirliliğinden etkilenen bu bitkinin DNA bantları ve varyasyonlarını tespit etmek için RAPD tekniği kullanılmış ve bunun sonucunda da ağır metal kökenli genotoksikite araştırılmıştır.

Aslam ve arkadaşlarının (2014)'te *Capsicum annuum* L. bitkisinde yaptıkları çalışmaya göre Cd stresine bağlı olarak deney gruplarında mevcut bantların kaybolması ve yeni bantların oluşması yoğun bir şekilde gözlemlenmiştir.

Mohan ve Hosetti (1997) ve Asati ile arkadaşlarının (2016)'da yaptığı çalışmalar neticesinde Cd'un esansiyel bir element olmadığı ve bitkiler için fotosentez reaksiyonlarının aksaması, mitoz döngüsünde bozulmalar, yapraklarda su absorpsiyonunu olumsuz etkileme, solmuş ya da yaşlanmış yapraklar, bodur yaprak oluşumu ve kahverengi küçük kök oluşumuna sebebiyet verdiği saptanmıştır. Ağır metale maruz kalmanın ortaya çıkardığı büyük etkisi yaş ağırlık artışının ve gövde büyümesinin ilerlemesine oranla, kök büyümesinin daha yavaş olduğu gözlemlenmiştir.

L. glandulosa bitkisi ile yaptığımız çalışmada elde edilen sonuçlar doğrultusunda 100 µM Cd stresine maruz bırakılan örneklerde 600 bp seviyesinde band yoğunluğunda azalma, 200 µM Cd stresine maruz bırakılan örneklerde tüm bantlarda kaybolma ya da yoğunluklarda azalma, 400 µM Cd stresine maruz bırakılan örneklerde ise 300, 400 ve 500 baz çiftlik bölgelerde yeni bant oluşumları gözlenmiş olup, ayrıca 700 baz çiftlik bölgede görünür bir bant artışı tespit edilmiştir. Aldığımız sonuçlar doğrultusunda Cd konsantrasyonunun yükselmesi ile birlikte kaybolan ve yeni oluşan bantlar şeklinde bant yoğunluğunun değiştiği gözlemlenmiştir. Bu çalışma neticesinde Cd stresinin bir su bitkisi olan *L. glandulosa* için genotoksik etkilerinin olduğu tespit edilmiştir.

A. reineckii bitkisi ile yaptığımız çalışmada kontrol grubuna kıyasla diğer gruplarda 200-250 baz çiftlik bölgelerde bant yoğunluklarının düştüğü, bunu dışındaki bölgelerde ise bant yoğunluklarının kontrol grubu ile benzerlik gösterdiği izlenmiştir. Bu çalışma neticesinde Cd'un *A. reineckii* bitkisi üzerine genotoksik etkiler, DNA hasarları ve mutasyonlara sebebiyet verebildiği tespit edilmiştir ve bu etkiler RAPD PZR tekniği kullanılarak başarılı bir şekilde saptanabileceği ortaya konmuştur.

KAYNAKÇA

1. Aderonke, A. K., Oladimeji, O., Olufunke, S., Caroline, O., & Michael, T. O. (2017). Bioaccumulation of Heavy Metals using Selected Organisms Isolated from Electronic Waste Dumpsite of two South-Western States in Nigeria. *Applied Environmental Research*, 39(2), 29-40.
2. Al-Qurainy, F., Alameri, A. A., & Khan, S. (2010). RAPD profile for the assessment of genotoxicity on a medicinal plant; *Eruca sativa*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(7), 579-586.
3. Anderson, L. W., Fried, G., Gunasekera, L., Hussner, A., Newman, J., Starfinger, U., ... & Tanner, R. (2015). Pest risk analysis for *Alternanthera philoxeroides*. European and Mediterranean Plant Protection Organization, Organisation Europeenne Et Mediterraneenne Pour La Protection Des Plantes
4. Andresen, E., & Küpper, H. (2013). Cadmium toxicity in plants. In *Cadmium: From toxicity to essentiality* (pp. 395-413). Springer Netherlands.
5. Anghelache, A. M., Kim, L., Cuciureanu, A., Batrinescu, G., & Pascu, L. F. (2016). Heavy metal contamination of roadside soil near sun highway in Romania. National Research and Development Institute for Industrial Ecology, INCD-ECOIND
6. Anonim 1, http://eol.org/data_objects/1387455'dan alınmıştır.
7. Anonim 2, <http://idtools.org>'dan alınmıştır.
8. Anonim 3, technologytimes.pk'dan alınmıştır.
9. Asati, A., Pichhode, M., & Nikhil, K. (2016). Effect of heavy metals on plants: an overview. *International Journal of Application or Innovation in Engineering & Management*, 5(3), 56-61.
10. Aslam, R., Ansari, M. Y. K., Choudhary, S., Bhat, T. M., & Jahan, N. (2014). Genotoxic effects of heavy metal cadmium on growth, biochemical, cyto-physiological parameters and detection of DNA polymorphism by RAPD in *Capsicum annuum* L.–An important spice crop of India. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(5), 465-472.
11. Atienzar, F.A., Cordi, B., Donkin, M.E., 2000. Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palnaria palnata*. *Aquatic Toxicology*. 50, 1–12.

12. Azimi, A., Shahriari, F., Fotovat, A., Qale, R. K., & Agje, K. H. (2013). Investigation of DNA changes in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by cadmium using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *African Journal of Biotechnology*, 12(16).
13. Bonanno, G., Borg, J. A., & Di Martino, V. (2017). Levels of heavy metals in wetland and marine vascular plants and their biomonitoring potential: a comparative assessment. *Science of the Total Environment*, 576, 796-806.
14. Bringezu, K., Lichtenberger, O., Leopold, I., & Neumann, D. (1999). Heavy metal tolerance of *Silene vulgaris*. *Journal of Plant Physiology*, 154(4), 536-546.
15. Brown, L. E., Pruess, W. W., Elsik, I. S., MacRoberts, B. R., MacRoberts, M. H., & Walker, S. B. (2008). Annotated checklist of the vascular flora of the Loblolly Unit of the Big Thicket National Preserve, Liberty County, Texas. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 1481-1489.
16. Burzyński, M., & Kłobus, G. (2004). Changes of photosynthetic parameters in cucumber leaves under Cu, Cd, and Pb stress. *Photosynthetica*, 42(4), 505-510.
17. Cansaran-Duman, D., Atakol, O., & Aras, S. (2011). Assessment of air pollution genotoxicity by RAPD in *Evernia prunastri* L. Ach. from around iron-steel factory in Karabük, Turkey. *Journal of Environmental Sciences*, 23(7), 1171-1178.
18. Carneiro, J. M., Chacón-Madrid, K., Galazzi, R. M., Campos, B. K., Arruda, S. C., Azevedo, R. A., & Arruda, M. A. (2017). Evaluation of silicon influence on the mitigation of cadmium-stress in the development of *Arabidopsis thaliana* through total metal content, proteomic and enzymatic approaches. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*.
19. Chairiyah, R. R., Guchi, H., & Rauf, A. (2014). Bioremediasi Tanah Tercemar Logam Berat Cd, Cu, Dan Pb Dengan Menggunakan Endomikoriza. *Agroekoteknologi*, 2(1).
20. Chang, Y., Oh, E. U., Lee, M. S., Kim, H. B., Moon, D. G., & Song, K. J. (2017). Construction of a genetic linkage map based on RAPD, AFLP, and SSR markers for tea plant (*Camellia sinensis*). *Euphytica*, 213(8), 190.
21. Cheng, S., Tam, N. F. Y., Li, R., Shen, X., Niu, Z., Chai, M., & Qiu, G. Y. (2017). Temporal variations in physiological responses of *Kandelia obovata* seedlings exposed to multiple heavy metals. *Marine Pollution Bulletin*.
22. Chin, E. H. S., & Lim, A. L. (2011). Comparative pollen morphology of three *Alternanthera* species (Amaranthaceae). *Gardens' Bulletin Singapore*, 63, 471-483.
23. Clemens, S., & Ma, J. F. (2016). Toxic heavy metal and metalloid accumulation in crop plants and foods. *Annual Review of Plant Biology*, 67, 489-512.

24. Collier, R., Dasgupta, K., Xing, Y. P., Hernandez, B. T., Shao, M., Rohozinski, D., ... & McCue, K. F. (2017). Accurate measurement of transgene copy number in crop plants using droplet digital PCR. *The Plant Journal*, 90(5), 1014-1025.
25. DAS, Kingsuk, Chiranjib, M., Ghosh, Nirmalya, *et al.* (2017). Effects of exogenous spermidine on cell wall composition and carbohydrate metabolism of Marsilea plants under cadmium stress. *Journal of Plant Physiology & Pathology*, vol. 2014.
26. Das, N., & Das, D. (2013). Recovery of rare earth metals through biosorption: an overview. *Journal of Rare Earths*, 31(10), 933-943.
27. Doyle, R. D., Francis, M. D., & Smart, R. M. (2003). Interference competition between *Ludwigia repens* and *Hygrophila polysperma*: two morphologically similar aquatic plant species. *Aquatic Botany*, 77(3), 223-234.
28. Drazkiewicz, M., Tukendorf, A. and Baszynski, T. (2003). Age-dependent response of maize leaf segments to cadmium treatment: effect on chlorophyll fluorescence and phytochelatin accumulation. *Journal of Plant Physiology*, 160, 247–254.
29. Ebadi, M., & Eghbali, M. (2017). The comparison of ISSR and RAPD markers with different species of *Triticum*. *An International Peer Reviewed Open Access Journal For Rapid Publication*, 288.
30. Enan, M. R. (2006). Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect the genotoxic effect of heavy metals. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 43(3), 147-154.
31. Farooqui, A., Suhail, S., & Zeeshan, M. (2017). Cadmium induced oxidative stress and biochemical responses in cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 64(1), 124-132.
32. Feng, R., Wei, C., & Tu, S. (2013). The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany*, 87, 58-68.
33. Filiz, E., & Koc, I. (2012). In silico chloroplast SSRs mining of *Olea* species. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 13(3).
34. Fodor, F. (2002). Physiological responses of vascular plants to heavy metals. In *Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants* (pp. 149-177). Springer Netherlands.
35. Forstner, U., & Prosi, F. (2013). Heavy metals pollution in freshwater ecosystems. Ravera O., *Biological aspects of freshwater pollution*, Ergamon Press, Oxford, New York, 129-150.

36. Frey, B., Keller, C., & Zierold, K. (2000). Distribution of Zn in functionally different leaf epidermal cells of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant, Cell & Environment*, 23(7), 675-687.
37. Gardiner, M. M., & Harwood, J. D. (2017). Influence of heavy metal contamination on urban natural enemies and biological control. *Current Opinion in Insect Science*.
38. Gouia, H., Suzuki, A., Brulfert, J., Ghorbal, M.H., 2003. Effect of cadmium on the co-ordination of nitrogen and carbon metabolism in bean seedlings. *Journal of Plant Physiology*. 160, 367–376.
39. Guarino, C., & Sciarrillo, R. (2017). The effectiveness and efficiency of phytoremediation of a multicontaminated industrial site: Porto Marghera (Venice Lagoon, Italy). *Chemosphere*.
40. Gupta, B., & Huang, B. (2014). Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics*.
41. Haktanır, K. (1987). Toprak Kirliliği ve Bu Konuda Hazırlanacak Yönetmelik Üzerine Düşünceler. TÇSV. Çalışma Grubu Raporu, 2.
42. Hassan, T. U., Bano, A., & Naz, I. (2017). Alleviation of heavy metals toxicity by the application of plant growth promoting rhizobacteria and effects on wheat grown in saline sodic field. *International Journal of Phytoremediation*, 19(6), 522-529.
43. Hernández, M. C., & Cabrera Walsh, G. (2014). Insect herbivores associated with *Ludwigia* species, Oligospermum section, in their argentine distribution. *Journal of Insect Science*, 14(1).
44. Hindt, M. N., Akmakjian, G. Z., Pivarski, K. L., Punshon, T., Baxter, I., Salt, D. E., & Gueriot, M. L. (2017). BRUTUS and its paralogs, BTS LIKE1 and BTS LIKE2, encode important negative regulators of the iron deficiency response in *Arabidopsis thaliana*. *Metallomics*.
45. Hossain, Z., Huq, F., 2002. Studies on the interaction between Cd²⁺ ions and nucleobases and nucleotides. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 90, 97–105.
46. Huffman, J. M., & Judd, W. S. (1998). Vascular flora of Myakka River State Park, Sarasota and Manatee Counties, Florida. *Castanea*, 25-50.
47. Hussner, A. (2010). Growth response and root system development of the invasive *Ludwigia grandiflora* and *Ludwigia peploides* to nutrient availability and water level. *Fundamental and Applied Limnology/Archiv für Hydrobiologie*, 177(3), 189-196.

48. Jin, Y.H., Clark, A.B., Slebos, R.J.C., Al-Refai, H., Taylor, J.A., Kunkel, T.A., Resnick, M.A., Gordenin, D.A., 2003. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nature Genetics*. 34, 326–329.
49. Karnib, M., Kabbani, A., Holail, H., & Olama, Z. (2014). Heavy metals removal using activated carbon, silica and silica activated carbon composite. *Energy Procedia*, 50, 113-120.
50. Kennedy, C. D., & Gonsalves, F. A. N. (1987). The action of divalent zinc, cadmium, mercury, copper and lead on the trans-root potential and H⁺, efflux of excised roots. *Journal of Experimental Botany*, 38(5), 800-817.
51. KHALIL, R. M., & HASSAN, A. (2016). GENETIC ANALYSIS IN SOME Cucurbitaceae PLANTS. *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*, 42(2).
52. Knasmüller, S., Gottmann, E., Steinkellner, H., Fomin, A., Pickl, C., Paschke, A., ... & Kundi, M. (1998). Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 420(1), 37-48.
53. Koh, J. C., Barbulescu, D. M., Norton, S., Redden, B., Salisbury, P. A., Kaur, S., ... & Slater, A. T. (2017). A multiplex PCR for rapid identification of *Brassica* species in the triangle of U. *Plant Methods*, 13(1), 49.
54. Kovacs, H., & Szemmelveisz, K. (2017). Disposal options for polluted plants grown on heavy metal contaminated brownfield lands—A review. *Chemosphere*, 166, 8-20.
55. Kumar, H., Priya, P., Singh, N., Kumar, M., Choudhary, B. K., Kumar, L., ... & Kumar, N. (2016). RAPD and ISSR marker-based comparative evaluation of genetic diversity among indian germplasms of *euryale ferox*: an aquatic food plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(7), 1345-1360.
56. Kumar, V., & Chopra, A. K. (2014). Accumulation and translocation of metals in soil and different parts of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) amended with sewage sludge. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 92(1), 103-108.
57. Lange, B., Ent, A., Baker, A. J. M., Echevarria, G., Mahy, G., Malaisse, F., ... & Faucon, M. P. (2017). Copper and cobalt accumulation in plants: a critical assessment of the current state of knowledge. *New Phytologist*, 213(2), 537-551.
58. Li, S., Yang, W., Yang, T., Chen, Y., & Ni, W. (2015). Effects of cadmium stress on leaf chlorophyll fluorescence and photosynthesis of *Elsholtzia argyi*—a cadmium accumulating plant. *International Journal of Phytoremediation*, 17(1), 85-92.

59. Liebthal, M., & Dietz, K. J. (2017). The Fundamental Role of Reactive Oxygen Species in Plant Stress Response. In *Plant Stress Tolerance* (pp. 23-39). Humana Press, New York.
60. Liu, W., Li, P. J., Qi, X. M., Zhou, Q. X., Zheng, L., Sun, T. H., & Yang, Y. S. (2005). DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. *Chemosphere*, 61(2), 158-167.
61. Lu, K., Yang, X., Gielen, G., Bolan, N., Ok, Y. S., Niazi, N. K., ... & Liu, D. (2017). Effect of bamboo and rice straw biochars on the mobility and redistribution of heavy metals (Cd, Cu, Pb and Zn) in contaminated soil. *Journal of Environmental Management*, 186, 285-292.
62. Magna, G. A. M., Machado, S. L., Portella, R. B., & Carvalho, M. D. F. (2013). Lead and cadmium detected in plant foods and grasses in Santo Amaro, Bahia. *Química Nova*, 36(7), 989-997.
63. Mohan, B. S., & Hosetti, B. B. (1997). Potential phytotoxicity of lead and cadmium to Lemna minor grown in sewage stabilization ponds. *Environmental Pollution*, 98(2), 233-238.
64. Odum, H. T. (Ed.). (2016). *Heavy metals in the environment: using wetlands for their removal*. CRC Press.
65. Olivé, I., Silva, J., Lauritano, C., Costa, M. M., Ruocco, M., Procaccini, G., & Santos, R. (2017). Linking gene expression to productivity to unravel long- and short-term responses of seagrasses exposed to CO₂ in volcanic vents. *Scientific Reports*, 7.
66. Pareek, N., Jakhar, M. L., & Malik, C. P. (2017). Analysis of genetic diversity in coriander (*Coriandrum sativum* L.) varieties using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1(4), 206-215.
67. Passari, A. K., Mishra, V. K., Saikia, R., Gupta, V. K., & Singh, B. P. (2015). Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their in vitro antimicrobial biosynthetic potential. *Frontiers in Microbiology*, 6.
68. Peng, C. I., Schmidt, C. L., Hoch, P. C., & Raven, P. H. (2005). Systematics and evolution of *Ludwigia section Dantia* (Onagraceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 307-359.
69. Pharmawati, M., & Imaniar, E. F. (2016). PCR-RFLP and Sequencing of trnS/trnFM Fragment of *Enhalus acoriodes* from Sanur Coastal Waters, Bali, Indonesia: A Preliminary Study. *Journal of Tropical Life Science*, 6(2), 118-122.

70. Phillips, D. P., Human, L. R. D., & Adams, J. B. (2015). Wetland plants as indicators of heavy metal contamination. *Marine Pollution Bulletin*, 92(1), 227-232.
71. Phillips, R. L., & Vasil, I. K. (Eds.). (2013). DNA-based markers in plants (Vol. 6). Springer Science & Business Media.
72. Prasad, M. N. V. (Ed.). (2013). *Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems*. Springer Science & Business Media.
73. R.R. Young, "Genetic toxicology", *Toxicology*, 173, 103-21, (2002).
74. Rafalski, J.A., & Tingey, S.V. (1993). Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends in Genetics*, 9(8), 275-280.
75. Rai, R., Agrawal, M., & Agrawal, S. B. (2016). Impact of Heavy Metals on Physiological Processes of Plants: With Special Reference to Photosynthetic System. In *Plant Responses to Xenobiotics* (pp. 127-140). Springer Singapore.
76. Rasouli, M., Martínez-Gómez, P., & Karimi, R. (2015). Application of Random Amplified Microsatellite Polymorphism (RAMP) in *Prunus* Characterization and Mapping. *Journal of Nuts*, 6(1), 1-5.
77. Riehl, R. (1998). *Aquarium atlas* (Vol. 3). Steven Simpson Books.
78. Sabetraftar, K., Zarkami, R., Sadeghi, R., & Van Damme, P. (2013). A review of some ecological factors affecting the growth of *Azolla* spp. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 11(1), 65-76.
79. Satarug, S., Vesey, D. A., & Gobe, G. C. (2017). Health Risk Assessment of Dietary Cadmium Intake: Do Current Guidelines Indicate How Much is Safe?. *Environmental health perspectives*, 125(3), 284.
80. Savva, D., 1996. DNA fingerprinting as a biomarker assay in ecotoxicology. *Toxicol. Ecotoxicol. News Rev.* 3, 110– 114.
81. Schikarski, J., Meisch, O., Edenhofer, S., & von Mammen, S. (2015). The digital aquarist: An interactive ecology simulator. In *Proceedings of the European Conference on Artificial Life 2015 (ECAL)* (pp. 389-396).
82. Shabala, S. (Ed.). (2017). *Plant Stress Physiology*. Cabi.
83. Sharma, N., Singh, R., Pandey, R., & Kaushik, N. (2017). Genetic and biochemical stability assessment of plants regenerated from cryopreserved shoot tips of a commercially valuable medicinal herb *Bacopa monnieri* (L.) Wettst.
84. Sheoran, I. S., Singal, H. R., & Singh, R. (1990). Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and the enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Photosynthesis Research*, 23(3), 345-351.

85. Tabatabaei, S. H., Liaghat, A., & Heidarpor, M. (2004). Use of zeolite to control heavy metals in municipal wastewater applied for irrigation. *Journal of Ion Exchange*, 2, 1-7.
86. Tanksley, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H., & Bonierbale, M.W. (1989-264).
87. Thakar, P., Chauhan, R. M., & Joshi, P. (2017). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis of Released Varieties and Hybrids of Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh] of Gujarat. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, 5(1), 674-678.
88. Thakur, S., Singh, L., Ab Wahid, Z., Siddiqui, M. F., At Naw, S. M., & Din, M. F. M. (2016). Plant-driven removal of heavy metals from soil: uptake, translocation, tolerance mechanism, challenges, and future perspectives. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188(4), 206.
89. Tian, S., Xie, R., Wang, H., Hu, Y., Hou, D., Liao, X., ... & Lu, L. (2017). Uptake, sequestration and tolerance of cadmium at cellular levels in the hyperaccumulator plant species *Sedum alfredii*. *Journal of Experimental Botany*, 68(9), 2387-2398.
90. Topacoglu, O. S. M. A. N., Sevik, H. A. K. A. N., & Akkuzu, E. R. O. L. (2016). Effects of water stress on germination of *Pinus nigra* Arnold. Seeds. *Pakistan Journal of Botany*, 48(2), 447-453.
91. Tran, P. T., & Ho, C. Q. (2017). Breeding New Aromatic Rice with High Iron Using Gamma Radiation and Hybridization. In *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding* (pp. 173-191). Springer International Publishing.
92. Trevizani, T. H., Figueira, R. C. L., Ribeiro, A. P., Theophilo, C. Y. S., Majer, A. P., Petti, M. A. V., ... & Montone, R. C. (2016). Bioaccumulation of heavy metals in marine organisms and sediments from Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Marine pollution bulletin*, 106(1), 366-371.
93. Uddin, S. B., Ratna, R. S., & Faruque, M. O. (2013). Ethnobotanical Study on Medicinal Plants of Rakhaing Indigenous Community of Cox's Bazar District of Bangladesh. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(4).
94. Vazhacharickal, P. J., Mathew, J. J., & Jose, S. (2017). Studies on genetic relationships among six varieties of jackfruit in Kerala employing the " matK" gene using PCR technique and RFLP markers.
95. Verga, D., Welter, M., Steck, A. L., & Marx, A. (2015). DNA polymerase-catalyzed incorporation of nucleotides modified with a G-quadruplex-derived DNAzyme. *Chemical Communications*, 51(34), 7379-7381.

96. Vogt, G. B., McGuire, J. U., & Cushman, A. D. (1979). Probable evolution and morphological variation in South American Disonychine flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) and their Amaranthaceous hosts (No. 1589-1593). Department of Agriculture, Science and Education Administration.
97. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., ... & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407-4414.
98. Welsh, J., & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids research*, 18(24), 7213-7218.
99. Wen, K., Lin, L., Liu, L., Jiang, W., & Liao, M. A. (2017). Effects of Uniconazole on Growth and Cadmium Accumulation of Accumulator Plant *Stellaria media*.
100. Westermeier, R. (2016). *Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations*. John Wiley & Sons.
101. Wickramasinghe, W. A. D., Mubiana, V. K., & Blust, R. (2017). The effects of heavy metal concentration on bio-accumulation, productivity and pigment content of two species of marine macro algae. *Sri Lanka Journal of Aquatic Sciences*, 22(1).
102. Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. V. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-6535.
103. Wittmann, G. (1981). Toxic metals. In *Metal pollution in the aquatic environment* (pp. 3-70). Springer Berlin Heidelberg.
104. Yin, D., Wang, X., Peng, B., Tan, C., & Ma, L. Q. (2017). Effect of biochar and Fe-biochar on Cd and As mobility and transfer in soil-rice system. *Chemosphere*.
105. Zalewska, T., & Danowska, B. (2017). Marine environment status assessment based on macrophytobenthic plants as bio-indicators of heavy metals pollution. **Marine Pollution Bulletin**, 118(1), 281-288.
106. Zanke, C. D., Rodemann, B., Ling, J., Muqaddasi, Q. H., Plieske, J., Polley, A., & Stiewe, G. (2017). Genome-wide association mapping of resistance to eyespot disease (*Pseudocercospora herpotrichoides*) in European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) and fine-mapping of Pch1. *Theoretical and Applied Genetics*, 130(3), 505-514.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Gizem Müzeyyen Aygün

Doğum yeri ve Tarihi : Safranbolu / 1991

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : aygungizemmuzeeyen@gmail.com

Derece	Bölüm/Program	Okul	Yıl
Lise	Fen-Matematik	V.Z. Hanım Anadolu Lisesi	2009
Üniversite	Biyoloji	Marmara Üniversitesi	2013

AKADEMİK ÇALIŞMALAR

Kongre ve Sempozyum Çalışmaları

F. Tabanlı, I. I. Ozyigit, Z. Z. Gokce, K. Cilgin, G. M. Aygun, Assessment of Cd induced genotoxic damage in *Ludwigia glandulosa* Walter using RAPD analysis, Ecology 2017, International Symposium, Kayseri, Turkey, May 11-13, 2017

I. I. Ozyigit, S. Karadeniz, N.Semizoglu, H. Tombuloglu, G. M. Aygun, E. Filiz, F. Tabanlı, M. E. Genc, O. Yi Idirimer, Quantitative Analysis of Three Functional Genes (*Mapk*, *Hsp70* and *Mt*) in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) After in vitro Lead Application, The 5. International Symposium on Sustainable Development (ISSD2014), "Biotechnology for Sustainable Development", Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, May 15-18, 2014