

**KURŞUN ZEHİRLİLİĞİNİN *Brassica rapa* L.var.  
*rapa*'da BAZI FİZYOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE  
GENOTOKSİK ETKİLERİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Cennet ÖZAY**

**Danışman**

**Yrd. Doç. Dr. Süleyman CENKÇİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Ekim 2008**

Bu tez çalışması “07.FENED.20” numaralı proje ile BAPK tarafından desteklenmiştir.

**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KURŞUN ZEHİRLİLİĞİNİN *Brassica rapa* L.var. *rapa*'da BAZI FİZYOLOJİK,  
BİYOKİMYASAL VE GENOTOKSİK ETKİLERİ**

**Cennet ÖZAY**

**Danışman**  
**Yrd. Doç. Dr. Süleyman CENKÇİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Ekim 2008**

## ONAY SAYFASI

Yrd. Doç. Dr. Süleyman CENKİ danışmanlığında, Cennet ÖZAY tarafından hazırlanan “Kurşun Zehirliliğinin *Brassica rapa* L. var. *rapa*’da Bazı Fizyolojik, Biyokimyasal ve Genotoksik Etkileri” başlıklı bu çalışma, lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 10/10/2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı, SOYADI

İmza

Jüri Üyesi : Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN  
(Başkan)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Muhsin KONUK

Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Süleyman CENKİ  
(Danışman)

Afyon Kocatepe Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun  
..... tarih ve  
.....  
sayılı kararıyla onaylanmıştır.  
Doç. Dr. Zehra BOZKURT  
Enstitü Müdürü

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>vii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Çalışmanın Amacı ve Önemi .....	3
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
2.1 Ağır Metaller .....	4
2.1.1 Ağır Metallerin Genel Özellikleri .....	4
2.1.2 Ağır Metallerin Biyokimyasal Özellikleri .....	4
2.1.3 Ağır Metal-Bitki İlişkisi .....	5
2.1.3.1 Ağır Metallerin Bitkiler Tarafından Alınması .....	7
2.1.3.2 Ağır Metallerin Bitkilerde Taşınması .....	7
2.1.3.3 Bitkilerde Ağır Metal Dirençliliği .....	8
2.1.4 Ağır Metallerin Bitkilerde Fizyolojik ve Biyokimyasal Etkileri .....	8
2.2 Kurşun .....	11
2.2.1 Kurşun Kirliliği .....	12
2.2.2 Bitkilerde Kurşun Alımı, Taşınımı ve Lokalizasyonu .....	14
2.2.3 Kurşun Kirliliğinin Bitkilerde Fizyolojik Etkileri .....	15
2.2.4 Kurşun Kirliliğinin Bitkilerde Biyokimyasal Etkileri .....	17
2.2.5 Kurşun Kirliliğinin Bitkilerde Genotoksik Etkileri .....	18
2.2.6 Kurşunun İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri .....	19
2.3 ALAD Enzimi .....	19
2.3.1 ALAD'ın Metabolizmadaki Rolü .....	19
2.3.2 ALAD'ların Sınıflandırılmaları .....	21
2.3.3 Bitkilerde Klorofil Sentez Metabolizması ve ALAD .....	22
2.3.4 ALAD'ın Kurşun ile Etkileşimi ve Kimyasal Kirlilik İndikatörü Olarak Önemi .....	23
2.4 Genotoksisite .....	25
2.4.1 Genotoksisiteyi Belirleme Teknikleri .....	25
2.4.2 Genotoksisiteyi Belirlemede RAPD Tekniğinin Kullanımı .....	26
<b>3. MATERYAL ve METOT</b> .....	<b>31</b>
3.1 Kimyasallar .....	31
3.2 Bitki Materyali .....	31
3.3 Çimlenme Deneyleri .....	32
3.4 Gelişme Deneyleri .....	33
3.5 Bitkilere Kurşun Uygulaması .....	34
3.6 Kurşun Analizleri .....	35
3.7 Fotosentetik Pigmentlerin Analizi .....	36
3.8 ALAD ve ALA Analizleri .....	36
3.8.1 ALAD Aktivitesinin Tayini .....	36

3.8.1.1 Homojenatin Hazırlanması .....	36
3.8.1.2 Protein Miktar Tayini .....	37
3.8.1.3 ALAD Aktivite Tayini .....	37
3.8.2 ALA Tayini .....	38
3.9 İstatistiksel Değerlendirme .....	38
3.10 RAPD Analizleri .....	39
3.10.1 DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler .....	39
3.10.2 DNA İzolasyonu .....	39
3.10.3 DNA Miktarı ve Kalitesinin Spektral Yöntemle Tayini .....	40
3.10.4 RAPD-PCR Reaksiyonu .....	40
3.10.5 PCR Döngüsü .....	41
3.10.6 Agaroz Jel Elektroforez .....	41
3.10.7 RAPD Bantlarının Analizi .....	42
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>44</b>
4.1 Çimlenme Deneyleri .....	44
4.2 Bitkilere Kurşun Uygulaması Sırasındaki Morfolojik Gözlemler .....	44
4.3 Kurşun Analizleri .....	46
4.4 Fotosentetik Pigment Miktarları .....	47
4.5 ALAD Aktivitesi ve Protein Miktarı .....	49
4.6 ALA Miktarı .....	49
4.7 Kurşun Stresinin RAPD Profilleri Üzerine Etkisi .....	51
4.8 Fotosentetik Pigment Miktarları, ALAD Aktivitesi, ALA Miktarı ve RAPD Profillerinin Karşılaştırılması .....	59
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>61</b>
KAYNAKLAR .....	70
ÖZGEÇMİŞ.....	80
EKLER.....	81

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### **KURŞUN ZEHİRLİLİĞİNİN *Brassica rapa* L. var. *rapa*'da BAZI FİZYOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE GENOTOKSİK ETKİLERİ**

Cennet ÖZAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Süleyman CENKÇİ

Bu çalışmada, kurşunun  $[Pb(NO_3)_2]$  yem şalgamındaki (*Brassica rapa* L. var. *rapa*) bazı fizyolojik, biyokimyasal ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. Yem şalgamındaki çimlenme yüzdeleri, kök ve gövde uzunlukları artan kurşun konsantrasyonu ile birlikte (0-12 mM Pb) önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) azalmıştır.  $\frac{1}{4}$  MS sulu besin çözeltisinde yetiştirilen 14 günlük fideler farklı konsantrasyonlardaki (0, 0.5, 1, 3 ve 5 mM) kurşun ile 6 gün boyunca muamele edilmiştir. Bu süre sonunda induktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometresi (ICP-OES) ile yapılan analiz sonuçları, fidelerin kök ve toprak üstü dokularında biriken kurşun miktarının doza-bağımlı olduğunu göstermiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, uygulama grubu fidelerinin yapraklarındaki fotosentetik pigment içeriği (Klo *a*, Klo *b* ve karotenoidler) ve  $\delta$ -aminolevulinik asit dehidrataz (ALAD) enzim aktivitesi, yüksek kurşun konsantrasyonlarında önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) azalmıştır, bununla birlikte  $\delta$ -aminolevulinik asit (ALA) seviyesinde ise bir artış belirlenmiştir. Kontrol ve uygulama grubu fidelerinin yapraklarından ekstre edilen genomik DNA'lar rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) analizlerinde kullanılmıştır. 11 primer, ebatları 2928-189 bp aralığında değişen toplamda 126 DNA bandı üretmiştir. Kurşun uygulamasını takiben yaprakların RAPD profillerinde gerçekleşen değişiklikler, normal fidelerle karşılaştırıldığında; bant yoğunluğundaki değişimler, normal bantların kaybolması ve yeni bantların oluşması şeklinde sonuçlar vermiştir. Ayrıca RAPD profillerindeki bu değişikliklerin doza-bağımlı olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubu fidelerine göre, genomik kalıp sabitliği (GTS); fotosentetik pigment içeriği, ALAD aktivitesi ve ALA seviyesi gibi rutin göstergelerle

karşılaştırılmıştır. RAPD analizi ile tespit edilen DNA polimorfizmleri, bitkilerde kurşunun genotoksik etkisinin belirlenmesi için uygun bir biyomarkör testi olarak uygulanabilir.

**2008, 87 sayfa**

**Anahtar kelimeler:** Yem Şalgamı, Kurşun, ALAD, ALA, Fotosentetik Pigmentler, RAPD, Genotoksisite.

## ABSTRACT

M. Sc. Thesis

### **THE EFFECTS OF LEAD TOXICITY on VARIOUS PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL and GENOTOXIC PARAMETERS in *Brassica rapa* L. var. *rapa***

Cennet ÖZAY

Afyon Kocatepe University  
Institutes of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Süleyman CENKÇİ

In this study, various physiological, biochemical and genotoxic effects of lead [as  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ] on forage turnip (*Brassica rapa* L. var. *rapa*) were investigated. Germination percentages, root and shoot lengths in forage turnip were significantly decreased ( $P < 0.05$ ) by increasing Pb concentrations (0-12 mM Pb). 14 days-old forage turnip seedlings cultured in  $\frac{1}{4}$  MS liquid media were treated with different concentrations of lead (0, 0.5, 1, 3 and 5 mM ) for 6 days. The results of inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) analysis indicated that accumulation of lead in root and aerial tissues of forage turnip seedlings was dose-dependent. The content of photosynthetic pigments (chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoids) and the activity of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in the leaves of treated seedlings were significantly decreased ( $P < 0.05$ ) at higher concentrations of lead compared to the control group, whereas an increase in the level of  $\delta$ -aminolevulinic acid (ALA) was determined. The genomic DNA extracted from the leaves of control and treated seedlings were used in random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses. A total of 126 RAPD fragments in the range of 2928-189 bp in RAPD profiles were obtained by using 11 random primers. The changes occurring in RAPD profiles of leaf tissues following Pb treatment included variations in band intensity, loss of normal bands and appearing of new bands compared with normal seedlings. Additionally, these variations in RAPD profiles were dose-dependent. As compared to control seedlings, genomic template stability compares favourably with the traditional indices such as photosynthetic pigment content, ALAD activity and ALA level. The DNA



polymorphisms detected by RAPD analysis can be applied as a suitable biomarker assay for the detection genotoxic effects of Pb contamination in plants.

**2008, 87 pages**

**Key Words:** Forage Turnip, Lead, ALAD, ALA, Photosynthetic Pigments, RAPD, Genotoxicity.

## TEŐEKKÖR

Çalıőmalarım boyunca yardımını, desteğini ve ilgisini esirgemeyen danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. SÖleyman CENKCI'ye, bu tezi hazırlarken manevi desteğini her zaman hissettiğim ve değerli yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Gonca KESER'e, deney çalıőmaları sırasında yardımlarını eksik etmeyen değerli hocalarım; Yrd. Doç. Dr. İbrahim Hakkı CİğERCİ ve Yrd. Doç. Dr. Sait BULUT'a, her konuda öneri ve eleőtirileriyle yardımlarını gördüğüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teőekkÖr ederim.

Hayatım boyunca hep yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini benden asla esirgemeyen baőtta sevgili babam Nurettin ÖZAY ve sevgili annem Sultan ÖZAY olmak üzere tüm aileme sonsuz őükranlarımı sunarım.

Cennet ÖZAY

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### 1. Simgeler

nmol	Nanomol
mg/ml	Miligram/Mililitre
$\mu$ l	Mikrolitre
gr/L	Gram/Litre
M	Molarite
N	Normalite
$\mu$ M	Mikromolar
kb	Kilobaz
U	Ünite
nm	Nanometre
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
ml	Mililitre
atm	Atmosfer
sn	Saniye
rpm	Revolutions per minute (r/min)
sa	Saat
G+C	Guanin + Sitozin
dk	Dakika
<i>Taq</i>	<i>Termophilus aquaticus</i>
kg	Kilogram
$\delta$	Delta
$\gamma$	Gama
mM	Milimolar
gr	Gram
%	Yüzde
g	Yerçekim ivmesi (gravity)
cm	Santimetre

## 2. Kısaltmalar

SH	Sülfidril grubu
Y.A	Yaş ağırlık
K.A	Kuru ağırlık
Pb	Kurşun
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
PVP	Polivinilpirrolidon
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RFLP	Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
AFLP	Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
ALAD	$\delta$ -Aminolevulinik Asit Dehidrataz
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ALA	Amino Levulinik Asit
MS	Murashige and Skoog
TCA	Trikloro Asetik Asit
EPA	Amerikan Çevre Koruma Örgütü
PBG	Porfobilinojen Sentaz
Klo <i>a</i>	Klorofil <i>a</i>
Klo <i>b</i>	Klorofil <i>b</i>
DAB	4-Dimetil amino benzaldehit
Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Kurşun nitrat
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Amonyum nitrat
KNO <sub>3</sub>	Potasyum nitrat
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyum dihidrojen fosfat
GTS	Genomic Template Stability (Genomik Kalıp Sabitliği)

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Fitoşeletinin moleküler yapısı .....	8
Şekil 2.2 ALA'nın sentezi .....	20
Şekil 2.3 ALA'dan porfobilinojen oluşumu .....	21
Şekil 2.4 Klorofilin biyosentez yolu .....	24
Şekil 3.1 <i>Brassica rapa</i> L. var. <i>rapa</i> .....	31
Şekil 3.2 Etiyole <i>Brassica rapa</i> L. var. <i>rapa</i> fideleri .....	34
Şekil 4.1 Farklı konsantrasyonlardaki kurşunun yem şalgamı tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisi .....	45
Şekil 4.2 Farklı konsantrasyonlardaki kurşunun yem şalgamı tohumlarının kök ve gövde gelişimi üzerine etkisi .....	45
Şekil 4.3 Kurşun stresinin 6. gününde kontrol (a) ve 5 mM Pb (b) uygulamasına maruz bırakılmış yem şalgamı fidelerinden yaprak örnekleri .....	46
Şekil 4.4 Kurşunun farklı konsantrasyonlarının etkisinde 6 gün bırakılan yem şalgamı fidelerinin kök ve gövdelerinde biriken Pb miktarları .....	47
Şekil 4.5 Kurşunun farklı konsantrasyonlarının etkisinde 6 gün bırakılan yem şalgamı fide yapraklarının fotosentetik pigment miktarlarındaki değişim .....	48
Şekil 4.6 Kurşunun farklı konsantrasyonlarının etkisinde 6 gün bırakılan yem şalgamı fidelerinin yaprak dokularındaki klorofil a/b oranlarındaki değişim .....	48
Şekil 4.7 Kurşunun farklı konsantrasyonlarının etkisinde 6 gün bırakılan yem şalgamı fidelerinin yaprak dokularında ALAD aktivitesi değişimleri .....	49
Şekil 4.8 Kurşunun farklı konsantrasyonlarının etkisinde 6 gün bırakılan yem şalgamı fidelerinin yaprak dokularındaki protein miktarı .....	50
Şekil 4.9 Kurşunun farklı konsantrasyonlarının etkisinde 6 gün bırakılan yem şalgamı fidelerinin yaprak dokularındaki ALA miktarı .....	50
Şekil 4.10 6 gün süre ile farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılmış yem şalgamı fidelerinin yapraklarından elde edilen genomik DNA'ların OPB 7, OPB 8 ve OPB 9 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri .....	53
Şekil 4.11 6 gün süre ile farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılmış yem şalgamı fidelerinin yapraklarından elde edilen genomik DNA'ların OPB 10, OPB 11 ve OPB 12 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri .....	53
Şekil 4.12 6 gün süre ile farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılmış yem şalgamı fidelerinin yapraklarından elde edilen genomik DNA'ların OPB 14 ve OPB 15 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri .....	54
Şekil 4.13 6 gün süre ile farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılmış yem şalgamı fidelerinin yapraklarından elde edilen genomik DNA'ların OPB 17 ve OPB 18 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri .....	54
Şekil 4.14 6 gün süre ile farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılmış yem şalgamı fidelerinin yapraklarından elde edilen genomik DNA'ların OPB 20 primeri ile elde edilen RAPD profilleri .....	55
Şekil 4.15 Kurşunun farklı konsantrasyonlarının etkisinde 6 gün bırakılan yem şalgamı fidelerinin yaprak örneklerinden elde edilen RAPD verilerinin SSPS programı Hierarchical Cluster Analysis opsiyonundaki Euclidean distance ve average linkage (unweighted pair-group average) metodu kullanılarak oluşturulan dendrogram .....	55

Şekil 4.16 Kurşunun farklı konsantrasyonlarının etkisinde 6 gün bırakılan yem şalgamı fidelerinde kontrol grubuna göre fotosentetik pigment miktarları, ALAD aktivitesi, ALA miktarı ve genomik kalıp sabitliğinin (GTS) oransal olarak karşılaştırılması ..... 60

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 DNA hasarı ve mutasyonların RAPD profilleri üzerindeki direkt etkileri .....	29
Çizelge 3.1 Besin çözeltisi hazırlamada kullanılan MS (Murashige and Skoog 1962) tuz ve vitaminleri .....	33
Çizelge 3.2 Bitki örneklerinin mikrodalga fırında yakılması esnasında kullanılan sıcaklık programı .....	35
Çizelge 3.3 RAPD-PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler ve sekansları .....	41
Çizelge 4.1 Kurşunun farklı konsantrasyonlarının etkisine 6 gün süre ile bırakılan <i>Brassica rapa</i> L. var. <i>rapa</i> 'da morfolojik gözlemler .....	46
Çizelge 4.2 RAPD çalışmalarında kullanılan primerler, elde edilen DNA bantlarının moleküler büyüklükleri, kontrol grubu bant sayıları, monomorfik ve polimorfik bant sayıları .....	56
Çizelge 4.3 Kurşun stresinde 6 gün bırakılan yem şalgamı fide yapraklarında Uvi-Software programı kullanılarak belirlenen yeni ortaya çıkan ve kaybolan bantların moleküler büyüklükleri .....	57
Çizelge 4.4 Kurşun stresinde 6 gün bırakılan yem şalgamı fidelerinde kontroldeki toplam bant değişimleri, polimorfik bantlar ve durumu değişen bantların sayıları .....	58
Çizelge 4.5 Kurşun stresinde 6 gün bırakılan yem şalgamı fide yapraklarında her bir primer için GTS değerlerindeki değişimler .....	59

## 1. GİRİŞ

Son yüzyılda kentleşme, sanayileşme ve dünya nüfusunun hızlı artışı nedeniyle evsel ve endüstriyel üretim ve tüketim koşullarına bağlı olarak oluşan organik ve inorganik zararlı maddeler ekosferin madde bütçesini önemli ölçüde değiştirmiştir. Bu maddeler çeşitli kaynaklardan alıcı ortamlara katı, sıvı ve gaz formlarında ulaşabilmektedir. İnsanoğlunun 19. yüzyıla kadar çevreye bıraktığı atıklar, ekosistemin kendini yenileyebilme özelliği ile giderilebilmekteydi. Dolaylı veya doğrudan çevreye bırakılan atıklar, enerji kaynağı ve karbon olarak canlıların anabolik (yapım) ve katabolik (yıkım) faaliyetleri sırasında kullanılarak yok edilmekteydi. Bugün aşırı şekilde çevreye bırakılan atıklar, mevcut ekolojik dengeyi bozarak hayat kalitesini, dahası hayatın kendisini tehdit eder duruma gelmiştir.

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde sanayi ve teknolojik nedenlerle bazı metallerin üretimi artış gösterirken buna bağlı olarak da tüketimin hızla artması bunların çevreye yayılması olasılığını arttırmakta ve ekosistemi geri dönüşümsüz bir duruma getirmektedir. Günümüzde toprakta ağır metal kirliliği önemli çevresel problemlerden birisidir. Ağır metallerin toprakta aşırı birikmesinin sadece toprak verimliliği ve ekosistem fonksiyonları üzerinde değil aynı zamanda besin zinciri yoluyla havyan ve insan sağlığı üzerinde de önemli etkileri vardır.

Toprak, su ve havada değişik oranlarda bulunabilen ağır metaller belirli derişimlerin üzerinde kirliliğe yol açarlar. Ağır metallerin çevrede yaygın bir şekilde birikmesi, tüm canlılar için boyutları giderek artan bir tehlike oluşturmaktadır. Çevreyi kirleten bütün unsurlar bitkilerde strese neden olur. Stres ise bitkilerin fizyolojisini etkiler, onların genetik potansiyellerini değiştirir, verimliliklerini kısıtlar ve ölümlerine yol açarak büyük oranlarda ürün kayıpları meydana getirir. Ağır metal kirliliğinin çeşitli nedenleri vardır. Bunlar antropojenik veya doğal kaynaklı olabilir. Endüstriyel faaliyetler, motorlu taşıtların egzoz gazları, maden yatakları ve işletmeleri, volkanik faaliyetler, tarımda kullanılan gübre ve ilaçlar ile kentsel atıklar ağır metallerin çevreye yayılmasına neden olan etmenlerden bazılarıdır (Evans and Furlong 2003).



Ağır metallerin, özellikle belirli dozlardan itibaren bitkilerdeki fizyolojik fonksiyonları ve biyokimyasal olayları doğrudan veya dolaylı olarak etkilediği bilinmektedir. Bitki dokularında ağır metal birikimi tolerans düzeyini aştığında mineral besin alımı, transpirasyon, fotosentez, enzim aktivitesi (Nussbaum et al. 1988), nükleik asit yapısı, klorofil biyosentezi ve çimlenme (Munzuroğlu ve Geçkil 2002) gibi çok sayıda fizyolojik ve biyokimyasal aktivite olumsuz yönde etkilenir. Bunlara membranlarda hasar, hormon dengesinin bozulması, su ilişkisinin değişmesi gibi işlevler de eklenebilir (Ouzounidou et al. 1992).

Çevre ve doğal kaynakların kirlenmeye karşı korunması, çevre kirliliğinin önlenmesi açısından son derece önemli olmakla birlikte kirlenmiş alanların temizlenmesi de mevcut çevre kirliliklerinin çözümünde büyük önem arz etmektedir. Toprak kirliliği açısından bakıldığında, ağır metallerin en önemli kirletici kaynaklar arasında olduğu görölmektedir. Amerikan Çevre Koruma Örgütü (EPA)'nın tespit ettiği öncelikli kirleticiler listesinde 129 kirletici bulunmaktadır. Bunlardan 13 tanesi metal, diğerleri organik bileşikler, pestisitler, poliklorobifeniller ile asbestler ve siyanidler gibi bazı metal olmayan inorganik bileşiklerdir. Bu metal ve metaloitler; kadmiyum, kurşun, antimon, arsenik, berilyum, krom, bakır, civa, nikel, selenyum, gümüş, talyum ve çinkodur. Bu metaller dünyanın birçok yerinde çevre koruma örgütleri tarafından öncelikli kirleticiler listesine alınmıştır (Evans and Furlong 2003).

Topraklara karışan ve buralarda birikme yapan ağır metaller, mikrobiyal aktiviteye, toprak verimliliğine, biyolojik çeşitlilik ve ürünlerdeki verim kayıplarına, hatta besin zinciri yoluyla sıcakkanlılarda zehirlenmelere kadar birçok çevre ve insan sağlığı problemlerinin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Ağır metaller, biyotaya yüksek düzeyde dayanıklılık ve zehirlilik etkisi göstermesi nedeniyle çevredeki en tehlikeli maddelerden biri olarak kabul edilmektedir. Toprakların ağır metallerle kirlenmesi, endüstriyel ve tarımsal faaliyetler sonucu olabildiği gibi, ağır metal içeren kayaçların çeşitli nedenlerle çözünerek su ve toprak ortamına taşınması ile de ortaya çıkabilmektedir (Sharma and Dubey 2005).

Bitkilerin ağır metal toksisitesine karşı toleransları bitki türüne, element türüne, strese maruz kalma süresine ve strese maruz kalan doku veya organın yapısına bağlı olarak değişmektedir. Bu nedenle ağır metalin tür ve miktarı, yarayışlılığı, zararın şiddeti ve türü ayrıca zarar oluşum sürecinin bilinmesi bitkilerin gelişimi ve canlılığı açısından oldukça önemlidir. Bazı bitkilerin topraktan ağır metal alımında yüksek oranda etkili olduğu ve bu tür bitkilerin ağır metal toksisitesine karşı toleranslı olduğu belirlenmiştir. Hiperakümülatör olarak da isimlendirilen bu bitkilerin arasında *Brassicaceae*, *Euphorbiaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae* ve *Scrophulariaceae* gibi bitki familyaları sayılabilir (Cunningham and Ow 1996).

### 1.1 Çalışmanın Amacı ve Önemi

Yaptığımız literatür taramasına göre, Brassica cinsine ait ağır metallerin toksisitesi hakkında çok sayıda araştırma raporları mevcut olmakla birlikte, kurşunun özellikle yem şalgamının (*Brassica rapa* L. var. *rapa*) “Siloganova” çeşidi üzerine çeşitli fizyolojik, biyokimyasal ve genotoksik etkileri üzerine yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Diğer yem şalgamı çeşitleriyle ilgili olarak da literatürde böyle bir toksisite çalışması tespit edilmemiştir. Yem şalgamının hiperakümülatör bitki familyalarından olan Turpgiller (*Brassicaceae*) familyasına ait olması da bu bitkinin önemini arttırmaktadır. Çünkü günümüzde ağır metaller ile kirlenen toprakların temizlenmesinde (fitoremediasyon) hiperakümülatör bitkilerin kullanılması ve bu özelliğe sahip bitkilerin tespit edilmesi önem kazanmaktadır.

Bu çalışmada, *Brassicaceae* familyasına ait olan yem şalgamının (*Brassica rapa* L. var. *rapa*) “Siloganova” çeşidinin tohum ve fidelerine farklı konsantrasyonlarda nitrat tuzu şeklinde uygulanan kurşun ağır metal katyonlarının  $[Pb(NO_3)_2]$  tohum çimlenmesi ve fide büyümesi üzerine olan etkileri araştırılmıştır.  $\frac{1}{4}$  MS sulu besin çözeltisinde yetiştirilen 14 günlük fideler farklı konsantrasyonlardaki (0, 0.5, 1, 3 ve 5 mM)  $Pb(NO_3)_2$  ile 6 gün boyunca muamele edildikten sonra yaprak dokularında kurşun stresine bağlı olarak; ALAD ( $\delta$ -aminolevulinik asit dehidrataz) aktivitesi, protein miktarı, ALA ( $\delta$ -aminolevulinik asit) seviyesi, fotosentetik pigment (klorofil *a*, *b* ve karotenoidler) içeriği ve RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) yöntemi ile DNA’da meydana gelen değişikliklerin belirlenmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1 Ağır Metaller**

#### **2.1.1 Ağır Metallerin Genel Özellikleri**

Metaller fizikokimyasal özelliklerine ve yer kabuğu katmanlarında yerleşmelerine göre hafif metaller, ağır metaller, zor eriyen metaller, nadir toprak metalleri ve radyoaktif metaller olarak birkaç gruba ayrılırlar. Bununla birlikte metallerin bu tür sınıflandırılması şartlı anlam taşır. Ağır metallerin çoğu periyodik tablonun d bloğundaki geçiş metalleridir. A grubu elementlerinden kurşun, kalay, germanyum ve diğer birkaç elementin dahil edildiği ağır metaller grubuna sodyumdan sonraki metaller girer. Bu metallerin yoğunluğu  $7 \text{ gr/cm}^3$ 'den yüksektir (Paşayev 2005).

Ağır metaller normalde, kayaların ve maden cevherlerinin bünyesinde bulunduğu için toprakta, sulara, sedimentlerde ve yaşayan organizmalarda da bulunması doğaldır (Alloway and Ayres 1993). Bazı ağır metaller bitki beslenmesi için önemli oldukları halde yüksek konsantrasyonlarda fitotoksiktirler. Bunlar bakır (Cu), demir (Fe), mangan (Mn), molibden (Mo), çinko (Zn), kobalt (Co) ve nikel (Ni)'dir. Bununla birlikte kadmiyum (Cd), krom (Cr), civa (Hg) ve kurşun (Pb) gibi ağır metaller de çeşitli yollardan tarımsal ekosisteme girerler. Bunların bitki bünyesinde bulunmaları derişimlerine, çözünebilirliklerine ve bitkinin cinsine bağlıdır (Bergmann 1992).

#### **2.1.2 Ağır Metallerin Biyokimyasal Özellikleri**

Bu gruptaki bazı elementler yaşayan organizmaların çoğu için eser miktarda da olsa gereklidir. Şüphesiz gerekli olan bu metallerin eksikliğinde canlılar zarar görür. Hem bitki hem de hayvanlar için çinko, demir, mangan ve bakır gerekli iken bunlara ek olarak yalnız hayvanlar için kobalt, krom selenyum iyot ve yalnız bitkiler için bor ve molibden gereklidir. Biyokimyasal işlevleri bilinmeyen, canlılar için birinci derecede önemli olmayan fakat toksik olan elementler de vardır. Bunlar arsenik, kadmiyum, kurşun, antimon, titanyum ve uranyum'dur. Bunlar organizmaların toleransını aşan konsantrasyonlarda toksisiteye neden olmaktadır. Biyokimyasal düzeyde bu metallerin aşırı konsantrasyonlarının neden olduğu olumsuz etkiler ATP ve ADP'nin

fosfat gruplarıyla olan reaksiyonları, hücre membranlarının zarar görmesi, SH gruplarıyla olan reaksiyonları, esas iyonların yerine geçmesi ve esas metabolitlerle rekabet etmesidir. Organizmalar sahip oldukları homeostatik mekanizmalarıyla çoğu elementin alınmasında ortaya çıkan bu düzensizlikleri tolere edebilirler (Alloway and Ayres 1993).

### 2.1.3 Ağır Metal-Bitki İlişkisi

Bitkiler elementleri seçici özelliklerle alırlar. Ağır metallerin bitkilerde birikimi ve organlarda dağılımı bitkinin ve elementin türüne, kimyasal ve biyolojik aktiviteye, oksidasyon-redüksiyon potansiyeline, pH değerine, kation değişim kapasitesine, oksijenin çözülmesine, ısıya ve köklerin salgı yeteneğine bağlıdır (Sharma and Dubey 2005).

Bitkileri ağır metallere olan tepkilerine göre üç ana grupta toplamak mümkündür. Bunlar; (1) ağır metalleri bünyesine almayan bitkiler; (2) topraktaki ağır metal seviyesi kadarını bünyesine alan indikatör (belirteç) bitkiler; ve (3) toprak üstü kısımlarında topraktaki seviyelerinden daha fazlasını aşırı biriktiren dolayısı ile ağır metal kirliliğinin temizlenmesinde (fitoremediasyon) kullanılan hiperakümülatör bitkilerdir. Hiperakümülatör bitki türleri genellikle *Brassicaceae*, *Euphorbiaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae* gibi bitki familyaları içerisinde yer almaktadır. Hiperakümülatör bitkileri kendi içerisinde iki ana grupta toplamak mümkündür. Birincisinde, *Thalaspis* L. genusuna ait bitki türlerinde olduğu gibi birden fazla ağır metali aşırı miktarda bünyesinde biriktirebilen fakat az miktarda biyokütle oluşturan hiperakümülatör bitkiler yer almaktadır. İkincisinde ise orta seviyede ağır metal biriktirebilen fakat yüksek miktarda biyokütle oluşturan *Helianthus annuus* L., *Nicotiana tabacum* L. *Brassica juncea* L. ve *Zea mays* L. gibi bitki türleri yer almaktadır (Memon et al. 2001).

Hardal (*Brassica*) veya alpin teresi (*Thalaspis caerulescens*) gibi bitkilerin de dahil olduğu az sayıda bir bitki grubu, başka bitkiler için toksik olan ağır metallerce zengin topraklarda büyüyebilirler. Bu tip topraklar eski maden ocakları veya askeri üslerin olduğu yerlerde bulunur. Ağır metallere dirençli bitkiler; çinko, kadmiyum, kurşun, bakır, civa, selenyum, krom ve nikeli kendi içlerine alarak biriktirirler. Bu çeşit ağır

metaller bitki içinde küçük peptidlere bağlanır ve kofullarda depo edilirler. Bu şekilde peptidlere bağlanıp kofulda depolanan ağır metaller bitkiye zarar vermezler. Bu olgu, metal hiperakümüasyonu olarak bilinir. Bu tür bitkilere de hiperakümülatör bitkiler denir (Işık 2004).

Hiperakümülatör bitkiler ağır metalleri hücre zarlarındaki taşıyıcı proteinler yoluyla alırlar. Bu taşıyıcı proteinler, bitkilerin mineralleri kökleri yoluyla içeri almasını sağlayan ya da mineral iyonlarını kofullarda biriktiren taşıyıcılara benzerler. Bu bitkilerdeki taşıyıcı proteinler ağır metallerin taşınımını gerçekleştirecek şekilde, diğer bitkilere göre değişikliğe uğramışlardır. Değişikliğe uğramış taşıyıcı proteinleri kullanarak *Thalasspi caerulea* bitkisi, kuru ağırlığının %3'ü oranında çinkoyu, hiçbir zehirlenme belirtisi göstermeksizin depolayabilir. Bir eğrelti türü (*Pteris vittata*), toprakta bulunanın 100 katı kadar arseniği, kendi dokuları içinde biriktirebilir. Bazı durumlarda bitki dokularında depolanan ağır metaller, bitkiye otçul hayvanlara karşı savunma sağlar. Çünkü otçul hayvanlar genel olarak metalik tadı olan bitkileri sevmezler. Çevre bilimciler, ağır metal kirliliğine maruz kalmış toprakları ve atık suları temizlemekte kullanmak amacıyla, metal biriktirici bitkiler üzerindeki çalışmalarını sürdürmektedirler. Metal depolayan bitkiler hasat edilerek metaller geri kazanılabilir; ya da böyle bitkiler görevlerini yaptıktan sonra toksik atıklar için ayrılmış depolama alanlarına gömülebilirler. Bu örneklerde açıklandığı gibi bitkilerin çevredeki metal kaynaklı atıkların temizlenmesi amacıyla kullanılmasına fitoremediasyon (bitkilerle tekrar iyileştirme) denir (Işık 2004).

Ağır metaller toprakta tuzlar, mineraller veya oksitler halinde hareketli ve hareketsiz halde bulunurlar. Ağır metallerin toprakta hareketliliğine humus miktarı, toprak pH'sı, mikrofloranın çeşitliliği ve karbonat miktarı önemli etki etmektedir. Toprakta ağır metal miktarının değişimi topraktaki nem, sıcaklık ve oksidasyon-redüksiyon potansiyeline bağlıdır. Ağır metallerin ekosistemde taşınımının araştırılmasında onların atmosferden toprağa veya göl ve denizlerin dibindeki çöküntülere, oradan ise bitkilere geçtiği belirlenmiştir (Paşayev 2005).

### 2.1.3.1 Ağır Metallerin Bitkiler Tarafından Alınması

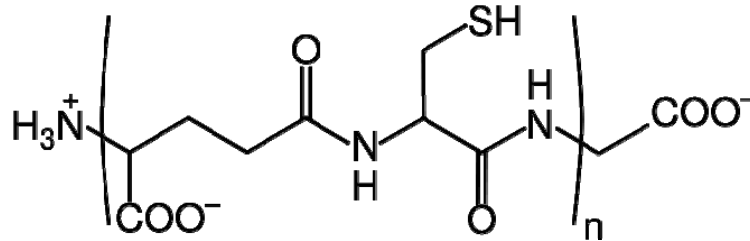
Toprakdaki metallerin bir kısmı bitkiler tarafından alınırken bir kısmı da toprakta kalır. Bu metalleri depo eden bitkiler öncelikle metalleri toprakta harekete geçirmelidir. İlk olarak metal şelatlayıcı moleküller (fitosideroforez) rizosfere salınır. Bunun nedeni toprağa bağlı olan metalleri topraktan çözmek içindir. İkinci olarak kökler spesifik plazma membranına bağlı metal redüktazlar ile metal iyonlarını azaltabilirler. Üçüncü olarak da bitki kökleri saldıkları protonlar ile toprak ortamını asitleştirerek ağır metalleri çözebilirler. Metalleri toprakta harekete geçirme işi, kök mantarları veya kökte kolonileşmiş bakteriler tarafından da yapılabilmektedir. Düşük pH toprak içindeki bağlı metal iyonlarının serbest kalmasına neden olur. Kök içine intraselüler (hücre içi, simplastik) veya ekstraselüler (hücre dışı, apoplastik) yollarla giren metal iyonları spesifik veya genel iyon taşıyıcıları vasıtasıyla ya da kanallarla bitki hücrelerine girerler. Bitki için gerekli olmayan ağır metaller de aynı transmembran taşıyıcılarını kullandıklarından aralarında rekabet ederler (Salt et al. 1995).

### 2.1.3.2 Ağır Metallerin Bitkilerde Taşınması

Metal iyonları kök içine girdiklerinde ya depolanırlar ya da sürgünlere taşınırlar. Sürgünlere metal taşınımı muhtemelen ksilemler aracılığıyla olur. Ancak metaller floem yoluyla da bitkide taşınabilirler (Stephan and Scholz 1993). Metal iyonları ksilem borularına girmek için öncelikle kaspari şeridini geçmek zorundadırlar. Kaspari şeridi nedeniyle ekstraselüler geçiş bloke edildiğinden, metal iyonları bu suya geçirimsiz hücre duvarı şeridini geçmek için intraselüler olarak hareket etmek zorundadırlar. Ksilem hücre duvarları, metal protonların hareketini önemli ölçüde yavaşlatması beklenen yüksek bir proton değişim kapasitesine sahiptir. Bu nedenle kadmiyum-sitrat gibi metal-şelat kompleksleri transpirasyon akımında metal hareketlerini kolaylaştırırlar. X-ışını spektroskopisi kullanılarak 7 gün süreyle kadmiyum etkisinde *Brassica juncea*'nın ksilem özsuunda metalin oksijen atomları tarafından şelat hale gelmesi, Cd translokasyonuna organik asitlerin karıştığını destekler. Floemde de metaller ya organik asitlerle şelatlı olarak ya da fitoşelatinlerle veya metalotiyoninlerle taşınabilirler (Salt et al. 1995).

### 2.1.3.3 Bitkilerde Ağır Metal Dirençliliği

Toksik etkili ağır metallere dayanıklı olan bir bitki ya hücreye giren ağır metalleri derhal detoksifiye etmeli ya da hücreye alınımını sınırlı tutmalıdır. Ağır metallere kirlenmiş topraklardaki bazı endemik bitkilerin asit fosfatazlar gibi ağır metale dayanıklı enzimler içerdiği görülmüştür. Ağır metaller hücre içinde biriktirildiklerinde detoksifiye edilmeleri gerekir. Detoksifikasyonda iki temel yöntem vardır. Birinci yöntemde metaller; asetat, malat ve sitrat gibi organik asitler veya sistein, metiyonin ve düşük molekül ağırlıklı moleküllere bağlanarak organometalik bileşikler oluştururlar. İkinci yöntemde ise, bitkiler metalleri kendilerinin sentezlediği ve kükürt bakımından zengin polipeptit molekülleri arasına bağlarlar. Bu şekilde oluşturulan moleküller “fitoşelatinler” olarak adlandırılırlar (Şekil 2.1). Bitkilerde yaygın olarak bulunan fitoşelatin yapısı tripeptit glutatyona benzer ( $\gamma$ -glutamil-sisteinil-glisin). Glutasyon, peroksitlerin detoksifikasyonunda önemli rol oynar. Kurşun etkisinde bırakılan *Brassica juncea*'nın köklerinde de fitoşelatinlerin üretildiği ve böylece fitoşelatinlerin kurşun detoksifikasyonu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Salt et al. 1995).



Şekil 2.1 Fitoşelatinin moleküler yapısı

### 2.1.4 Ağır Metallerin Bitkiler Üzerindeki Fizyolojik ve Biyokimyasal Etkileri

Besin zinciri ve biyolojik döngünün temel basamağı konumundaki bitkilerin ağır metal kirliliğinden etkilenmesi kaçınılmazdır. Ağır metaller arasında yer alan Mn, Fe, Cu, Zn ve Ni gibi elementler yüksek bitkiler için gerekli besinlerdir (Welch 1995). Örneğin, bakır ve çinko gibi ağır metallerin normal konsantrasyonları bitkideki metabolik işlemler için gereklidir. Bitki için gerekli olsun veya olmasın ağır metallerin doku ve

organlardaki aşırı birikimi toksik etki yapar ve sonunda bitkiyi ölüme götürür. Ağır metallerin bitkilerde transpirasyonu (Costa et al. 1994), fotosentezi (Chung and Sawhney 1993), enzim aktivitesini, çimlenmeyi, protein sentezini olumsuz yönde etkilediği yapılan birçok çalışmayla anlaşılmıştır. Ayrıca membranlarda hasar, hormonal dengenin bozulması, su ilişkisinin değişmesi gibi fizyolojik olaylar üzerine de ağır metallerin önemli etkileri vardır (Costa et al. 1994).

Çevresel stres faktörlerinin bitkiler üzerindeki etkilerini anlamak amacıyla sıkça başvurulan yollardan biri organizmadaki klorofil içeriğini belirlemektir. 7 günlük fasulye fidelerine, 10 gün süreyle klor tuzu halinde uygulanan farklı konsantrasyonlardaki Nikel ( $Ni^{+2}$ ), kobalt ( $Co^{+2}$ ), krom ( $Cr^{+3}$ ) ve çinko ( $Zn^{+2}$ ) ağır metalleri klorofil a, klorofil b, total pigment I ve total pigment II miktarlarını önemli oranlarda azaltırken, karotenoid miktarını artırmıştır. Klorofil ve karotenoid miktarlarındaki bu azalış ve artışların ağır metalin türü ve konsantrasyonu ile yakından ilişkili olduğu ve ağır metalin yüksek konsantrasyonlarında belirtilen artış ve azalışların daha belirgin bir şekilde ortaya çıktığı görülmüştür. Gerek klorofil miktarındaki azalış ve gerekse karotenoid miktarındaki artışta nikelin etkisi en fazla olmuş ve bu metali sırasıyla kobalt, krom ve çinko izlemiştir (Zengin ve Munzuroğlu 2005).

Ağır metaller bitkinin klorofil içeriğini önemli oranlarda etkiler. Bakır-nikel içeren topraklarda yetişen *Empetrum nigrum*'un klorofil miktarı kontrol bitkilerine göre %15-30 oranında azalma göstermiştir (Monni et al. 2001). *Brassica oleracea* bitkisine nikel uygulandığında klorofil a ve b'nin miktarında bir azalmanın olduğu, bunun sonucunda yapraklarda nekrozis ve klorozisin meydana geldiği bildirilmiştir. Ayrıca nikelin hem genç hem de yaşlı yapraklardaki kloroplastların yapısal organizasyonunu değiştirdiği, grana ve stroma tilakoidlerinin sayısının azalttığı, kloroplastların şekil ve boyutunun değişmesine neden olduğu tespit edilmiştir (Molas and Bran 2004). Kadmiyumun klorofil biyosentezi üzerine etki yaptığı ve protoklorofil reduktaz ile aminolevulinik asit (ALA) sentezini engellediği kaydedilmiştir (Prasad and Prasad 1987).

Ağır metallerin kök, gövde ve yaprak büyümesi üzerine önemli etkiler yaptığı ve bu durumun bitki türüne ve gelişme şartlarına göre değiştiği bilinmektedir. *Phaseolus*



*aureus* Roxb. cv. T-44 bitkisine kobalt uygulandığında yaprak gelişiminin engellendiği ve klorozisin olduğu ayrıca internod uzunluğunun azaldığı, böylece bitki gelişiminin engellendiği rapor edilmiştir (Tewari et al. 2002). Kobaltın yapraklarda kalın bir kutikula tabakasının oluşmasına neden olduğu ve bunun ise su durumunu engellediği bildirilmiştir (Chatterjee and Chatterjee 2000). Çinko ve bakırın Brassica türlerinde (*Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Brassica juncea*) kök ve gövde uzunluklarını; çinkonun ise arpa fidelerinde kök uzunluğunu engellediği rapor edilmiştir (Ebbs and Kochian 1997).

Kökte metal birikiminin merkezdeki hücrelere göre korteks hücrelerinde daha fazla olduğu, bu nedenle kök korteks hücrelerinin daha erken hasar gördüğü bilinmektedir. Ağır metallerin etkisiyle suberin miktarının artarak kökün kahverengileştiği, bu durumun da su alımını sınırladığı ileri sürülmüştür (Barcelo and Poschenrieder 1990). *Nigella sativa* ve *Triticum aestivum* bitkileri çinkoya maruz bırakıldıklarında kök gelişimlerinin azaldığı tespit edilmiştir. Çinkonun kök meristem hücrelerinin mitotik fazlarını engellediği, özellikle de bölünecek olan hücrelerde çinko iyonları birikerek profazın sonundaki olayları bloke edip mitoz bölünmeyi engellediği rapor edilmiştir (El-Ghamery et al. 2003). Ayrıca epiderma hücrelerinin ligninleşmesine sebep olarak hem kök hem de gövde büyümesini engellediği bildirilmiştir (Paivöke 1983).

Ağır metale maruz kalmış birçok bitkide strese cevap olarak serbest prolin birikiminin olduğu görülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda kurşun ve kadmiyuma maruz bırakılan iki buğday varyetesinde (*Triticum aestivum* L. cv. Gerek-79 ve Bolal-2973) prolin birikiminin olduğu tespit edilmiştir. *Oryza sativa* bitkisi  $CuSO_4$ 'a maruz bırakıldığında prolin miktarının arttığı kaydedilmiştir (Chen et al. 2001).

Ağır metallerin bitkilerdeki protein miktarının azalmasına neden olduğu bulunmuştur. Ağır metal stresinin bitkide oluşturduğu önemli etkilerden biri senesensi teşvik etmek veya protein sentezini engellemek yoluyla bitkinin protein içeriğini azaltmaktır. Örneğin civa uygulanan *Bacopa monnieri* bitkisinde protein içeriği azalma göstermiştir. Kurşun, çinko ve kadmiyumun *Hordeum vulgare* bitkisinde (Stiborova et al. 1986), bakır ve

çinkonun ise *Scenedesmus acutus*'da protein miktarını azalttığı bildirilmiştir (Abd-El Monem et al. 1998).

Hücresele seviyede ağır metallerin en önemli etkilerinden biri de membran bütünlüğünü değiştirerek reaktif oksijen türlerinin oluşmasını sağlamaktır. Oluşan bu reaktif oksijen türlerinin proteinlerin parçalanmasına neden olduğu rapor edilmiştir. Reaktif oksijen türleri atmosferik oksijenin (O<sub>2</sub>) kısmen indirgenmiş ara ürünleridir. Atmosferik oksijenin aksine, reaktif oksijen türleri çeşitli hücresele bileşenleri sınırsız oksitleme yeteneğine sahiptirler ve hücrenin oksidatif hasarına neden olurlar. Bitkiler, oksijen türleri tarafından başlatılan hasarı tamir etmek ve hafifletmek için kompleks antioksidant (hem enzim hem de enzim olmayan) sistemler geliştirmişlerdir (Dat et al. 2000).

## 2.2 Kurşun

Periyodik cetvelin 4A grubunun en metalik elementi olan kurşun, biyolojik sistemlerin her ortamda karşılaşılabildikleri, metabolik işlevi olmayan eser bir elementtir. Düşük erime noktasına (327 °C) sahip olan kurşun, yumuşak ve işlenebilen bir metaldir. Doğada daha çok, galen adlı kurşun sülfür formunda veya demir, bakır, çinko, antimon ve gümüş metalleriyle birleşik olarak bulunur. Kolayca çeşitli şekillere dönüştürülebilir ve diğer metallerle alaşım oluşturabilir (Kitman 2000).

Kurşun önemli ağır metallerden birisidir ve çevresel kirleticilerden dolayı büyük bir önem kazanmıştır (Chaney and Ryan 1994). İnsanlar tarafından binlerce yıldan beri kullanılan kurşun, dünyadaki bütün sanayileşmiş ülkelerin ekonomisinde büyük rol oynamıştır. ABD'de kurşunun endüstriyel tüketiminin her yıl için 1.3 milyon ton olduğu tahmin edilmekte ve kirleticiler ile çevreye 600.000 ton Pb yayılımı olmaktadır (Landis and Yu 2004).

Kurşuna dayalı ürünlerin üretimi ve kullanımı olduğu gibi kurşun rafinerisi, madencilik ve kurşunun tasfiye edilmesi işlemleri de çevreye kurşun salınımını arttırmaktadır. Böylece kurşun öncelikle sucul sistemlere ve hava içine toz şeklinde karışmaktadır. Kurşunun çevreye verilmesini kısıtlamak için birçok ülkede düzenleyici önlemler

alınmış olmasına rağmen, kurşun tüm dünyada çevre ve insanlar için en önemli tehditlerden birisi olmaya devam etmektedir (Chaney and Ryan 1994).

### **2.2.1 Kurşun Kirliliği**

Önemli sanayi ürünlerinden borular, boyalar, lehimler, cam, çömlek sıırı, plastik ve insektisitler de kurşun içerirler (Landis and Yu 2004). Bu metal kablo, lehim ve boya üretiminin yanı sıra akü imalatı ile çini ve seramik yapımında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Kurşun; çelik ve demirlerin korozyona karşı korunması için yapılan yağlı boyaların, patlayıcı maddelerin, saç boyalarının yapımında ve ipeğe ağırlık vermede kullanılırken, bazı formları da zirai mücadelede ve fotoğrafçılıkta oldukça önemlidir (Vural 1984).

Endüstrideki kullanımı nedeniyle kurşun, biyosferde yoğun olarak bulunmaktadır. Özellikle kuzey yarım küredeki havada 1000 ton civarında kurşun sirkülasyonu söz konusudur (Grandjean 1992). Kurşunlu otomobil yakıtları, kurşun içeren boyalar, bu boyaların kullanıldığı oyuncak ve diğer malzemeler, vinil güneşlikler, sırlı porselen ve seramik malzemeler, kurşun içeren kap ve cam ürünleri, otomobillerde kullanılan kurşun-asit bataryalar, kurşun lehimli ambalajlardaki konserve, mama ve diğer gıda ve içecekler, kurşunla kontamine olmuş su ve arazilerden elde edilen sebze ve meyveler ile bu ortamlardan etkilenen balık, beyaz ve kırmızı et, süt, süt ürünleri kurşunun başlıca kaynaklarıdır (Landis and Yu 2004).

Petrol bağımlı iş kolları, tamirhaneler ve yoğun trafik de kurşun kirliliğinin önemli etmenleri arasındadır (Kaiser et al. 2001). Araç trafiğinin çok az olduğu tarımsal topraklarda 3.75 kg/dekar kurşun; kent tozlarında ise 250 kg/dekar kurşun tespiti, büyük ölçüde egzozla atılan kurşun bileşikleriyle ilişkilidir. Genelde uçucu ve çapları 2.5 µm'nin altında olan mikro partikül kurşun bileşikleri atmosferde 7 ila 30 gün gibi uzun süre kalabilirler (Günay 1993).

Atmosferik kurşun kaynakları; kurşun tasfiyehaneleri, kömürün ve kurşun içeren maddelerin yanması, rüzgarla toprakta bulunan kurşunun ayrılması ve kurşunlu benzinin yanması sonucu havaya karışan kurşun alkileridir. Motorlarda benzin buhar

halinde ve hava ile karışmış iken, pistonun sıkıştırması esnasında istenilen andan önce patlayarak motorda detonasyon denilen vuruntuya neden olur. Benzinin sebep olduğu vuruntu motoru mekanik olarak hızlı bir şekilde tahrip eder. Vuruntuyu azaltmak ve motor performansını iyileştirmek için benzine kurşun tetraetil veya kurşun tetrametil ilave edilmektedir (Landis and Yu 2004). Atmosferdeki kurşunun en büyük kaynağı kurşunlu benzinlerdir. Gelişmekte olan ülkelerde şehir içi bölgelerde atmosferdeki kurşun ve kurşun bileşiklerinin % 90'ı kurşunlu benzinle çalışan motorlu taşıtlardan ileri gelmektedir. Türkiye genelinde 2003 yılı verilerine göre benzinli araçlardan atmosfere atılan kurşun miktarı yaklaşık olarak 230.000 kg/yıldır. Şehir içi bölgelerde kurşun kirleticilerinin ana kaynağı, süper benzin kullanan otomobillerdir. Eğer hemen katkılı kurşunsuz benzine geçilse atmosfere atılacak kurşun miktarı 38.100 kg düşecektir. Yani atmosfere atılan kurşun miktarı 6.1 kat azalacaktır (Öztürk 2004).

Onlarca yıl önce kullanılan kurşun borulardan akan içme suyu şebekelerindeki sular, Dünya Sağlık Örgütü tarafından belirlenen ve önerilen 0.01mg/l düzeyinin çok üzerinde kurşun içermekteydi. 1960'lı yıllardan sonra terk edilen bu borular yerine kullanılan bakır alaşımlı borular ise, bağlantı noktalarındaki kurşun lehimler ve metal korozyonu nedeniyle, içme suyu yoluyla toksikasyonun devam etmesini engelleyememiştir (Landis and Yu 2004).

İnsanlar ve hayvanların vücutlarına kurşun girişinin esas kaynağı uzun dönemde kurşun içeren besinlerin yenmesidir. Hayvanlar kurşun bulaşmış bitkileri yiyerek zehirlenebilirler. İnsanlar da kurşunu, çömlekçilikte kullanılan sırlardan veya kurşun bulaşmış varil, şişe gibi kaplardan vücutlarına alabilirler. Araştırmacıların raporlarına göre bazı Roma İmparatorlarının yüksek düzeyde kurşun ile kontamine olmuş şarapları içerek kurşun zehirlenmesinden hasta oldukları hatta öldükleri bildirilmektedir (Landis and Yu 2004).

Ana caddelerin yakınlarında bulunan bitkiler otomobil egzozlarından dolayı yüksek miktarlarda kurşun biriktirirler. Kurşun içeriği fazla olan bitkilerin insanlar ve hayvanlar tarafından doğrudan yenilmeleri tehlikelidir. Trafiği yoğun olan otoyolların hemen kenarında bulunan bitkilerin kuru maddede yaklaşık 60 ppm'lik kurşun içerdikleri tespit

edilmiştir. Bunun büyük bir kısmı sadece yüzeysel olarak bitkilere yapışmış durumdadır. Yola olan mesafe arttıkça kurşun içeriği azalır. Bu yaklaşık 100 m mesafede normal değerlere (kuru maddede 4 ppm kurşun) ulaşır (Özbek vd. 1984).

### **2.2.2 Bitkilerde Kurşun Alımı, Taşınımı ve Lokalizasyonu**

Kurşun bitkiler tarafından topraktan ve havasal kaynaklardan alınabilir. Kurşunun bitkilere yapraklar aracılığı ile girmesi hava kaynaklarından kurşunu alabilme, absorblayabilme kabiliyetine bağlı olarak bitkinin yaprak morfolojisiyle alakalıdır. Tüylü yapraklar atmosferden ağır metalleri absorbe eder. Bununla beraber bitkilerce alınan kurşunun büyük bir miktarının köklerde kaldığı anlaşılmıştır (Kumar et al. 1995). Kurşun toprağın üst tabakalarında birikir ve bundan dolayı bitkilerin doğrudan kullanacağı kurşun miktarını güvenilir bir şekilde ölçmek zordur. Kullanılabilirliği büyük oranda toprak şartlarına bağlıdır. Kurşun topraktaki organik materyale bağlanır. Toprak partikül boyutu ve katyon değişim kapasitesi, aynı zamanda kök yüzey alanı, kök salgıları, mikorizasyon ve transpirasyon oranı gibi bitkisel etkenler de kurşun alınımını ve kullanılabilirliğini etkiler. Toprakta bulunan kurşun büyük oranda organik veya kolloidal maddelere sıkı bir şekilde bağlı olarak veya çökelmiş şekilde bulunur ki tüm bunlar bitki köklerine kurşun alımını azaltan etmenlerdir (Kumar et al. 1995).

Kurşun köklerden alındıktan sonra gövdeden daha çok köklerde lokalize olur. Kurşun, hücre duvarında galakturonik asit ve glukuronik asit karbonhidratlarının karboksil gruplarına çok kuvvetli bağlanır ki bu apoplast yolla kurşunun taşınımını kısıtlar. Genel olarak dikotlar monokotlara göre köklerinde daha fazla miktarda kurşun biriktirirler (Huang and Cunningham 1996).

Kurşun, genelde kök apoplastında taşınır, radyal olarak kortekse geçer ve endodermis yakınında birikir. Endodermis, kök ve gövde arasında kurşunun hareketinde kısmi bir bariyer olarak rol oynar. Bu aynı zamanda kurşunun köklerde gövdelere göre daha çok biriktiği ile ilgili raporlara bir açıklık getirir (Verma and Dubey 2003). Köklerden diğer organlara kurşun taşınımının kısıtlanması, kök endodermis bariyerinden dolayıdır. Endodermisteki kaspari şeridinin, kurşunun endodermisten merkezi silindire taşınımını kısıtlayan en önemli faktör olduğu bildirilmektedir (Seregin and Ivanov 1997). Kurşun

genelde apoplastik yolla taşınsa da merkezi silindire geçmeden önce simplastik yola da girebilir.

Genellikle bitkinin toprak yüzeyindeki organlarında bulunan kurşun miktarı kökten uzaklaştıkça azalır. Bu yüzden kökün hücre duvarlarında bitkinin diğer kısımlarına göre daha fazla kurşun birikir. Ayrıca kurşun, odunlaşmış dokularda odunlaşmamış dokulara oranla göre daha fazla bağlanma gösterir. Suchodoller (1967) çalışmalarında arpayı kurşuna maruz bıraktığında vasküler dokularda çok az miktarda kurşuna rastlarken, büyük bir kısmının kök epidermisinde tutulduğunu tespit etmiştir. Bu durum kurşunun, bitkinin farklı dokularda lokalize olmasının bitki türüne göre de değiştiğini göstermektedir. Tohumlarda testa (tohum kabuğu) parçalanıp kök gelişimi oluncaya kadar kurşunun içteki dokulara girmesi testa tarafından engellenir. Testa parçalandıktan sonra kurşun hızlı bir şekilde alınır (Lane and Martin 1980). Kurşun çeşitli bitki organlarında birikimi bakımından çoktan aza doğru şöyle sıralanabilir: kökler>yapraklar>gövde>çiçek>tohum. Bununla birlikte bu sıralama bitki türlerine göre değişebilir (Antosiewicz 1992). Kurşun en çok hücrelerarası boşlukta, hücre duvarında ve vakuollerde depolanır. Absorblanmış kurşunun yaklaşık %90'ının hücre duvarları ve vakuolde biriktiği tespit edilmiştir (Wierzbicka and Antosiewicz 1993). Bitkilerin kurşun içeriği havadaki kurşun miktarına, dağılım kaynağına yakınlığın artmasına, bitki vejetasyon döneminin uzamasına bağlı olarak artmaktadır. Bu nedenlerden dolayı ağaçların yaprak ve iğnelerindeki kurşun miktarı sebze ve çayır bitkilerine oranla yüksektir. Özellikle yosun ve liken gibi yavaş büyüyen bitkiler yüksek bitkilere göre gram kuru madde başına 100-1000 kez daha fazla ağır metal biriktirme özelliğine sahiptir ve bu nedenle toksik madde birikimi için biyoindikatör olarak tanımlanırlar (Özbek vd. 1984).

### **2.2.3 Kurşun Kirliliğinin Bitkilerde Fizyolojik Etkileri**

Kurşun toksisitesinin kök büyümesinin inhibisyonu (Lane and Martin 1980), klorozisin ortaya çıkması (Johnson and Proctor 1977) ve fotosentezin azaltılması ile ilişkili olduğunu gösteren çalışma raporları mevcuttur. Kurşun etkisiyle klorofil biyosentezi engellenmekte ve bu nedenle klorofil miktarında azalmalar meydana gelmektedir (Van

Assche and Cliisters 1990). Kurşun, kök ve gövdenin kuru ağırlığında önemli oranlarda azalışa sebep olmaktadır (Rauser 1997).

Mercimek (*Lens culinaris* Medik.) tohumlarının çimlenmesi, fide büyümesi ve yaş-kuru ağırlık değişimleri üzerine klor tuzu halinde kullanılan kurşunun etkileri araştırılmıştır. Denemelerde 1, 2, 3 ve 4 mM'lık  $PbCl_2$  çözeltileri kullanılmış ve uygulanan kurşunun gerek tohum çimlenmesi, gerekse çimlenme sonrası aşamada kök uzamasını önemli oranlarda engellediği saptanmıştır. Bu durumun, kurşun konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak daha belirgin bir şekilde ortaya çıktığı görülmüştür. Mercimek tohumlarının çimlendirilmesiyle geliştirilen 15 günlük fidelerin 10 gün süreyle aynı konsantrasyonlardaki kurşun tuzuna maruz bırakılması sonucu gövde ve kök uzunluğu ile yan kök sayısının azaldığı belirlenmiştir. Aynı şekilde, kurşun uygulanan fidelerin yaş ve kuru ağırlıklarında da önemli düşüşler tespit edilmiştir. Fidelerin kurşun tuzuna maruz bırakılma periyodu sonunda, özellikle 3 ve 4 mM  $PbCl_2$  çözeltisinde yetişen fidelerde solgunluk, klorozis ve nekrozis görülmüştür (Kıran ve Munzuroğlu 2004).

$PbCl_2$ 'nin farklı konsantrasyonları *Triticum aestivum* ve *Cucumis sativus* tohumlarının çimlenmelerinde, kök, koleoptil ve hipokotil büyümelerinde konsantrasyon artışına bağlı olarak belirgin bir azalmaya neden olduğu (Munzuroğlu ve Geçkil 2002), *Picea abies* fideleri kurşun çözeltileri ile muamele edildiğinde primer, sekonder ve üçüncül kök gelişmelerinde bir azalma olduğu ve bitkide en fazla yan köklerin oluşum ve gelişmelerinin etkilendiği bildirilmiştir (Godbold and Kettner 1991). Farklı konsantrasyonlarda  $Pb(NO_3)_2$ 'in, *Zea mays*, *Brassica pekinensis* Rupr. ve *Brassica juncea* L. tohumlarının çimlenmesi ile kök ve fide gelişimini engelleyip, mitotik indeksi ve normal bölünen hücre sayısını olumsuz etkileyerek, kök ile gövdenin yaş ve kuru ağırlıklarını azaltıp, kloroza neden olduğu belirtilmiştir (Jiang et al. 2000). Kurşunun tohum çimlenmesi için belirlenen bu engelleyici etkileri, aynı zamanda polen çimlenmesi ve polen tüpü oluşumunda da tespit edilmiştir. Bu etki, çalışılan *Quercus cerris*, *Picea abies*, *Pinus nigra* ve *Malus sylvestris* polenlerinde gözlenmiştir (Holub and Ostrolucka 1984)

#### 2.2.4 Kurşun Kirliliğinin Bitkilerde Biyokimyasal Etkileri

Birçok biyokimyasal işleyiş kurşunun aşırı hareketli olmasından etkilenir. Pb toksisitesinin enzim aktivitelerinin inhibisyonu ile ilişkili olduğunu gösteren birçok çalışma vardır. Metal, önemli fonksiyonel grup olarak hareket ettiğinden birçok enzimin (bunların bazıları fotosentez ve azot için önemlidir) aktivitesini etkiler. Kurşunla muamele edilen bitkilerde hidrolitik enzimlerin ve peroksidazların aktivitesinin bozulduğu, senesente bir artış olduğu görülmüştür. Kurşun muamelelerinde çözünebilir protein ve serbest aminoasit içeriğinde de artış gözlenmiştir. Bitkiler tarafından ortamdaki kurşun çok düşük derişimlerde hücre bölünmesini azaltabilir. Kurşunun mısır mitokondrilerinde elektron geçişini inhibe ettiği gösterilmiştir (Koepe and Miller 1970).

Kurşun ve kadmiyum uygulanan *Lemna minor* bitkisinde katalaz ile proteaz aktivitesinin azaldığı, peroksidaz aktivitesinin arttığı ve protein miktarının ise azaldığı bildirilmiştir. Peroksidaz enzimi aktivitesinin artışının metal etkisiyle fenol, tiol, hidrojen peroksit gibi sekonder metabolitlerin oluşmasıyla (bitki senesensi) ilgili olduğu düşünülmüştür. Katalaz ve proteaz gibi enzimlerin aktif bölgelerine metal iyonlarının bağlanarak enzimin aktivitesini engellediği görülmüştür. Bu ağır metaller tarafından azot metabolizmasının engellendiği ve protein miktarının azaldığı ileri sürülmüştür (Chatterjee and Chatterjee 2000).

Lupin (acı bakla) köklerinde yapılan bir çalışmada 150 mg/L Pb derişiminde serbest radikallerin kontrol düzeylerinde kaldığı, oysaki 350 mg/L Pb derişiminde önemli miktarda arttıkları tespit edilmiştir. Kök ucu özütlerinden yapılan analizde SOD (Süperoksit dismutaz) aktivitelerinde artış gözlenirken CAT (Katalaz) ve AP (Askorbat peroksidaz) aktivitelerinde yüksek derişimlerde azalma gözlenmiştir. Araştırmacılar, bu sonuçlardan elde ettikleri bulgularla, yüksek kurşun derişimlerinde hem serbest radikallerin hem de reaktif oksijen türlerinin antioksidant sistem kapasitesinin üstünde olduğunu ve bunun kök büyümesinin azalmasına katkıda bulunduğunu ileri sürmüşlerdir (Rucinska et al. 1999).



### 2.2.5 Kurşun Kirliliğinin Bitkilerde Genotoksik Etkileri

Ağır metaller bitkilerde çeşitli morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal olayları etkileyebilir. Kurşun, özellikle bitki büyümesini, kök uzamasını, tohum çimlenmesini, fide gelişimini, hücre bölünmesini, fotosentezi, transpirasyonu, klorofil üretimini, etioplast gelişimini ve kloroplastlardaki lamellerin organizasyonunu engeller (Wierzbicka 1995). Kurşun ileri derecede toksik bir ağır metal olmasına rağmen moleküler anlamda genotoksik etki mekanizması çok iyi bilinmemektedir. Bununla birlikte kurşunun bitki kromozom ve DNA'ları üzerine etkileri hakkında bazı çalışma raporları mevcuttur. Kurşun çekirdekte bir çok mitotik bozukluklara sebep olur. İğ ipliklerinin parçalanmasıyla c-mitoza, anafaz köprülerinin oluşmasına, kromozom yapışiklıklarına, interfaz hücrelerinde mikronükleus oluşumlarına, nüklear materyalin parçalanmasına neden olur (Sharma and Dubey 2005). Kurşun toksisitesine toleransı olmayan bitkilerde, Pb toksisitesinin mitoz hasarı ve çekirdek hasarına (Liu et al. 1994) sebep olduğu gösterilmiştir. Kurşunun *Allium cepa*'nın kök gelişimini ve meristematik hücrelerindeki mitoz bölünme frekansını azaltarak, kromozomal anormalliklerin görüldüğü rapor edilmiştir (Lerda 1992). *Zea mays* (mısır), *Cicer arietinum* (nohut), *Phaseolus vulgaris* (fasulye) ve *Phaseolus vulgaris* L. cv. Barbunia (barbunya) kök uçlarında civa ve kurşun etkisiyle mikronükleus oluşumları gözlenmiştir ve bu durumun bitki türüne ve gelişme şartlarına göre değiştiği belirlenmiştir (Çavuşoğlu vd. 2007).

DNA hasarının tespitini test etmede hassas bir metot olan alkaline comet testi acı bakla (*Lupinus luteus* cv. Juno) kök hücrelerinde kurşunun genotoksitesini analiz etmek amacı ile kullanılmıştır. Çekirdekten uzağa doğru göç eden DNA parçalarının miktarı, kök içindeki kurşun içeriği ile doğrusal olarak artmıştır ve kök hasar derecesi ile pozitif ilişkilidir (Rucinska et al. 2004).

Tütün (*Nicotiana tabacum* L. var. *xanthi*) ve patates (*Solanum tuberosum* var. *korela*) bitkilerinin ağır metallerce (Cd, Cu, Pb, ve Zn) kirli olan veya kirli olmayan topraklarda yetiştirilmesi sonucunda muhtemel DNA hasarları comet tekniği ile belirlenmiştir. Araştırmacılar, ağır metallerce kirli topraklarda yetişen bitkilerde fizyolojik ve anatomik etkilenmelerin yanı sıra ciddi tek-iplik DNA kırıkları tespit etmişlerdir. Tütün

(*Nicotiana tabacum* L. var. *xanthi*) fidelerinin kurşun nitratla değişik konsantasyon ve sürelerde strese maruz bırakılması sonucunda comet testiyle yapılan analizlerde kök çekirdeklerinin yaprak çekirdeklerinden daha fazla hasara maruz kaldığı tespit edilmiştir. Çalışmacılar kurşun stresine maruz kalmış bitkilerin yaprak alanlarının azaldığını, büyümenin durduğunu, kök uçlarının kahverengileştiğini belirtmişlerdir. Yapılan kurşun birikimi analizlerinde köklerde yapraklara göre daha fazla miktarda kurşun biriktiği saptanmıştır. Bu durum DNA hasarının yapraklara göre köklerde daha fazla olmasını açıklamaktadır (Gichner et al. 2008).

## **2.2.6 Kurşunun İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri**

Kurşun çok toksik bir ağır metaldir. Benzinli taşıtlardan atmosfere atılan çıplak gözle görülmeyen çapları 2.5 µm'den küçük mikro partiküller, solunum sistemlerinde filtre edilemediğinden dolayı ciğerlere kadar kolayca ulaşırlar ve ciğerler tarafından absorbe edilerek kana karışırlar. Kurşun sadece solunum yolu ile değil kurşunla kirlenmiş gıda, su, toprak veya tozla, sindirim yolu ile de vücuda girebilir. Kurşun başka bir maddeye asla dönüşmediğinden vücutta birikmeye başlar. Serbest radikal oluşumlarına sebep olan kurşun, kanser hücrelerinin büyümesini kolaylaştıran içsel bir enzim olan hyaluronidase enzimini aktive ederek kanser riskini artırır.

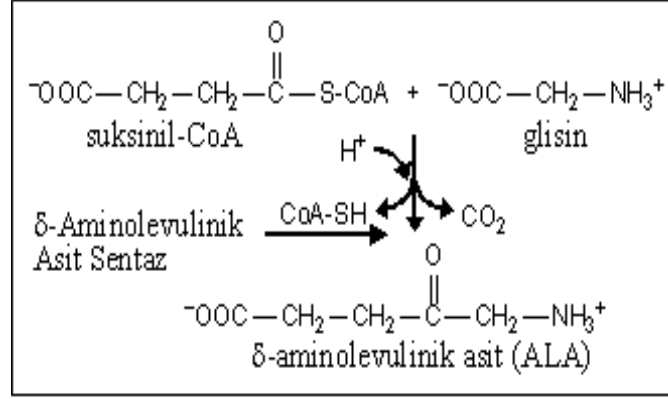
Kurşun, kandaki hemoglobin ile reaksiyona girerek öğrenme düzensizliği, öğrenme zorluğuna, dikkat dağınıklarına, davranış bozukluğuna, hipertansiyona, baş ve karın ağrısına, konuşma zorluğuna, anemiye, kusmaya ve zayıflamaya, felce ve hatta ölüme neden olmaktadır. Yarı ömrünün fazla olması nedeniyle (insanlarda 5-20 yıl) endüstrinin yoğun olduğu ülkelerdeki insanlarda yaş ilerlemesine bağlı olarak vücuttaki kurşun miktarı da artmaktadır (Landis and Yu 2004).

## **2.3 ALAD Enzimi**

### **2.3.1 ALAD'ın Metabolizmadaki Rolü**

Canlı hücre içinde klorofillerin ve demir porfirinlerin nasıl sentez edildiği kesin olarak gösterilememiştir. Fakat yapılan pek çok araştırmalardan elde edilen kanıya göre bir

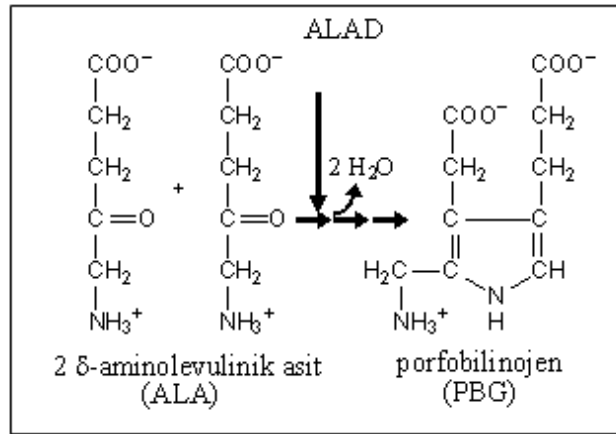
aminoasit olan glisin ile Krebs çemberinin ara ürünlerinden olan suksinil CoA birleşerek  $\alpha$ -amino- $\beta$ -ketoasit verir. Sonra bir kofaktör olan piridoksal fosfat,  $\delta$ -aminolevulinik asit sentetaz enzimi ve ışık ile  $\delta$ -aminolevulinik asit (ALA) meydana gelir (Şekil 2.2) (Gibson et al. 1958).



Şekil 2.2 ALA'nın sentezi

ALA; bitkilerde hem, klorofil, Vitamin B ve özel ürünlerin sentezlenmesini sağlayan tetrapirrol üretiminin ilk basamağında yer alan önemli bir ara metabolittir. ALA bitkilerde klorofil biyosentezinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Beale 1978). ALA'nın bitkilerde klorofil sentezine olan bu düzenleyici etkisinin yanı sıra  $\delta$ -aminolevulinik asit dehidrataz enzimi (ALAD) aktivitesinin de klorofil sentezini regüle ettiği bilinmektedir (Naito et al. 1980).

Diğer bir ismi de porfobilinojen sentaz (PBGS) olan ALAD (EC 4.2.1.24), monopirrol porfobilinojeni (PBG) oluşturmak için 2 molekül ALA'nın asimetric bir kondensasyonunu gerçekleştiren tüm modifiye tetrapirrollerin biyosentezinde ilk adımı katalize eder (Şekil 2.3) (Jordan 1989).



Şekil 2.3 ALA'dan porfobilinojen oluşumu

İki molekül ALA birleşerek PBG (porfobilinojen) oluşur. Porfobilinojen tüm porfirinlerin ön maddesidir. Hem bitkilerin fotosentez yapıcı pigmenti olan klorofil ve hem de hayvanlarda hemoglobinin bir demir protoporfirini olan “hem” canlı hücreler içinde ortak bir yol aracılığı ile sentez edilmektedir. İnsektisidler ve ağır metaller gibi birçok bileşik ALAD'ı inhibe ederek porfobilinojenin dolayısıyla klorofilin, hemoglobinin ve diğer hemoproteinlerin oluşumunu engellemektedir. Tetrapireol yolunun bu son ürünleri, elektron transportundan fotosenteze kadar metabolizmanın birçok noktasında karmaşık şekilde yer alır (Jordan 1989).

### 2.3.2 ALAD'ların Sınıflandırılmaları

Değişik kaynaklardan elde edilen bu enzim moleküler ağırlığı, optimum pH'sı, metal gereksinimi ve EDTA'ya olan hassasiyetleri bakımından iki sınıfta gruplandırılmıştır (Cheh and Neilands 1976). ALAD'ların I. Sınıfı, memeli ve kuşlardakini içeren sınıftır ve moleküler ağırlığı 260.000–285.000 kDa arasında olup, sekiz benzer alt birimden oluşmuştur (Gibbs et al. 1985). II. sınıf ALAD'lar ise temel olarak bakteri ve mayalarda bulunan tiptir. Bakteriyel enzimin optimum pH'sı 8–8.5 (Jordan 1989) arasında olup, maksimum aktivite için  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  ve K gibi katyonlara ihtiyaç göstermektedir (Cheh and Neilands 1976). Mayalardan izole edilen enzim, çinko metallo enzimine benzerlik gösterir, EDTA'ya duyarlıdır ve optimum pH aralığı 9.5–9.7'dir. Ispanak ve diğer bitkilerdeki enzim ise  $Mg^{+2}$  ile aktive olup, EDTA'ya duyarlıdır. Daha az yüksek optimum pH'ya ihtiyaç duyarlar (Leidgens 1983).

ALAD'lar, sığır karaciğeri (Gibson et al. 1958), insan eritrositleri (Anderson and Desnick 1979), *Escherichia coli* (Spencer and Jordan 1995), *Spinacia oleracea* (Schneider and Liedgens 1981) ve *Pisum sativum*, *Saccharomyces cerevisiae* (Jordan 1989) gibi farklı kaynaklardan izole edilmiştir.

PBGS enzimleri aktivite bölgesinde  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ve K içerdiği bilinen tek enzim ailesidir. Tüm ALAD'ların temel katalitik özellikleri birbirine benzer olmasına rağmen enzim yapısı, metal iyon gereksinimleri ve thiol hassaslığı ile farklı organizmalardan saflaştırılmış enzimler arasında farklılıklar gözlenmiştir (Jordan 1989).

### 2.3.3 Bitkilerde Klorofil Sentez Metabolizması ve ALAD

Klorofiller, fotosentezi gerçekleştirmek üzere ışık soğurma, enerji aktarımı ve elektron aktarımı işlevlerine çok uygun düzenlenmiş karmaşık moleküllerdir. Diğer tüm biyomoleküller gibi klorofiller de bir biyosentetik yolla yapılır. Bu yolda basit moleküler daha karmaşık moleküller oluşturmak için yapıtaşları olarak kullanılır. Biyosentetik reaksiyon yolundaki her basamak enzimler tarafından katalizlenir. Klorofilin biyosentetik reaksiyon yolu bir düzineden fazla basamaktan oluşmaktadır. İşlem birkaç evreye ayrılabilir (Şekil 2.4). Her biri ayrı olan bu evreler başarılı bir eşgüdüm ile düzenlenmiştir. Bu düzenleme gereklidir, çünkü serbest klorofil ve klorofil sentezinde yer alan ara ürünlerin çoğu hücre elemanları için zararlıdır. Reaksiyon yolu glutamik asidin 5-aminolevülinik aside (ALA) dönüşümü ile başlar. İki ALA molekülü, porfobilinojen (PBG) oluşturmak üzere birleşirler. Dört PBG molekülü birbirine bağlanarak protoporfirin IX'u oluştururlar. Magnezyum katıldıktan sonra E halkasının ışığa bağlı oluşumu; D halkasının indirgenmesi ve fitol kuyruğunun bağlanmasıyla işlem tamamlanır (Türkan 2008).

Tetrapirel biyosentezinde gerçekleşen ilk olay ALA'nın oluşumudur. Bakteri, maya ve hayvanlarda ALA oluşumunu gerçekleştiren ALA sentetaz enzimi yüksek bitkilerde gösterilememiştir. Bununla birlikte bitki ve alglerde ALA'nın glutamik asitten sentez edildiği tespit edilmiştir. Tetrapirellerin sentezinde görev alan ALAD (PBG Sentaz) enziminin metallere duyarlı bir enzim olduğu ortaya çıkarılmıştır. Araştırmacılar *Pennisetum typhoideum* bitkisinde kurşunun porfirin sentezinin anahtar enzimlerini

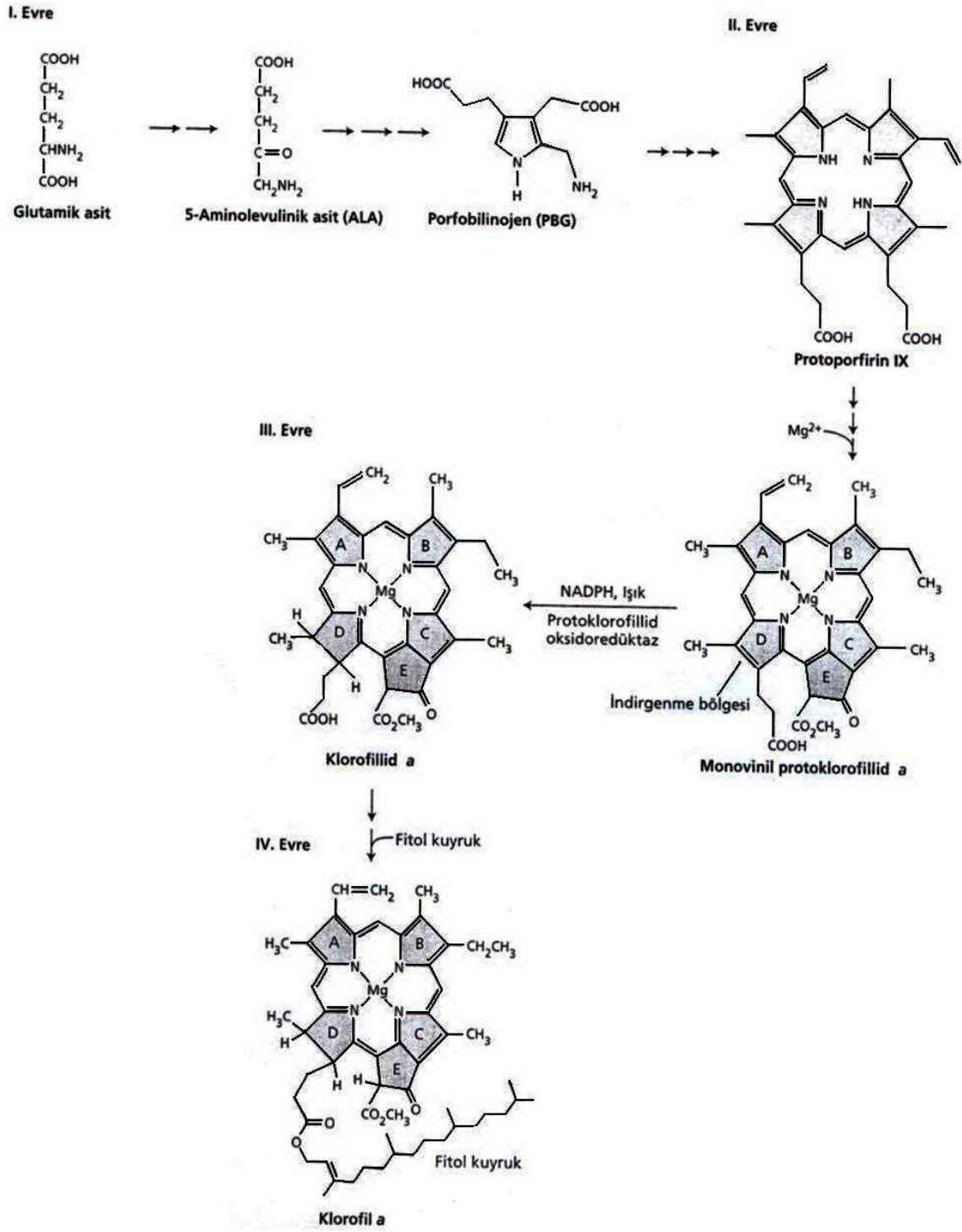
inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Porfirin sentezindeki ikinci enzim olan ALAD'ın kurşun ve civa tarafından inhibe edildiği bulunmuştur (Prasad and Prasad 1987).

Ağır metal uygulanması sonucu ALA sentezinin ve dolayısıyla klorofil biyosentezinin engellendiği bildirilmiştir. *Pennisetum typhoideum* ve *Phaseolus vulgaris* bitkilerine yüksek konsantrasyonda kurşun uygulandığında ALA miktarının değişmediği fakat ALAD aktivitesinin azaldığı, bunun sebebinin ise enzimin aktif bölgesindeki SH gruplarıyla kurşunun birleştiği ve böylece aktivitesini engellediği rapor edilmiştir. 5-aminolevulinik asit dehidrataz ve porfobilinojen deaminaz enzimlerinin aktivitelerinin kurşun tarafından engellendiği bildirilmiştir (Prasad and Prasad 1990).

#### **2.3.4 ALAD'ın Kurşun ile Etkileşimi ve Kimyasal Kirlilik İndikatörü Olarak Önemi**

$\delta$ -aminolevulinik asit dehidratazın kurşun ile seçici inhibisyonu, kimyasal kirliliğin önemli bir biyolojik belirleyicisidir. Kurşuna ve çeşitli kimyasallara maruz kalmada ALAD aktivitesinin belirlenmesi bu enzimin kullanışlı bir biyomarkör olabileceğini göstermiştir (Morsch et al. 2002).

Ağır metallerin kırmızı turp yapraklarında ALAD aktivitesi üzerine *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Çalışılan elementler içerisinde  $Cd^{+2}$ 'nin bu bitki için en yüksek toksisiteye sahip olduğu anlaşılmıştır. ALAD aktivitesindeki %50 inhibisyon için *in vitro* değerler  $Cd^{+2}$  0.39 mM,  $Zn^{+2}$  0.39 mM,  $Hg^{+2}$  2.29 mM,  $Pb^{+2}$  1.38 mM olarak bulunmuştur. *In vivo*da  $Cd^{+2}$  %40,  $Zn^{+2}$  %26,  $Hg^{+2}$  %34,  $Pb^{+2}$  %15 oranında ALAD'ı inhibe etmiştir (Morsch et al. 2002).



Şekil 2.4 Klorofilin biyosentez yolu (Türkan 2008).

## 2.4 Genotoksisite

### 2.4.1 Genotoksisiteyi Belirleme Teknikleri

Mutajenik uygulamalara bitkilerin yanıtları organizasyonun farklı düzeylerinde (DNA, kromozom ve genom) değerlendirilebilir. Yüksek yapılı bitkiler, çevresel kimyasalların sitotoksik (hücre yapısı ya da fonksiyonunda hasar oluşturan etkileri), sitogenetik (kromozomlar üzerindeki etkileri) ve mutajenik (genetik değişime neden olan etkileri) etkilerinin mükemmel bir göstergesidir. Bu bağlamda yüksek yapılı bitkiler, kimyasalların kullanımı veya çevresel kirliliğin neden olduğu muhtemel genetik hasarın belirlenmesinde birinci sırada yer alan alternatif test sistemleri olarak deneysel çalışmalarda özgül avantajlara sahiptir (Ma et al. 1995).

Çevresel kirleticilerin (atık sular, ağır metaller, pestisitler, herbisitler vb.) toksik ve genotoksik etkileri, yaygın olarak kullanılan *Allium* kök büyümesi inhibisyonu testi ile belirlenen etkili konsantrasyon ve farklı uygulama süreleri temelinde mitotik indeks, mitotik anormallikler, kromozom aberasyonları ve mikronükleus oluşumları ile belirlenebilmektedir (Antonsie-wiez 1990).

Bitkilerde ağır metallerin mutajenisitesinin belirlenmesinde bazı testler ileri sürülmüştür ki bunlar; kromozom aberasyon analizleri (Rank and Nielsen 1994), mikronükleus testleri (Steinkellner et al. 1998), DNA fingerprint analizleri (Conte et al. 1998) ve somatik nokta ve homolog rekombinasyon mutasyonlarının tespitidir (Kovalchuk et al. 2001). Ayrıca Comet testi (tek hücre jel elektroforez testi) de oldukça etkili, basit ve ucuz olmasından dolayı genotoksisitenin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu teknik esasen hayvan hücrelerinde uygulanıyor olmasına rağmen, bitki dokularıyla (Gichner and Plewa 1998) comet testinin birleştirilmesi çevresel mutajenesisteki temel ve uygulamalı çalışmalarda bitkilerin kullanılabilirliğini önemli derecede genişletmiştir. Comet testi, bileşiklerin genotoksik potansiyellerinin hızlı bir şekilde tahminini sağlar ve çevresel kirleticilerin *in vivo* ve *in vitro* görüntülenmesinde yararlıdır. DNA hasarı, ince bir agaroz tabakasına gömülmüş ve daha sonra elektroforeze tabi tutulmuş bireysel hücreler ya da izole edilmiş çekirdeklerin anoda doğru göçü sırasında comet şekli (kuyruklu yıldız) oluşturma oranlarıyla belirlenir (Menke et al. 2001).



Markörler, kalıtsal modelleri morfolojik, biyokimyasal veya moleküler seviyede izlenebilen “karakter”lerdir. Bu karakterler doğrudan olmamasına rağmen, bir organizmadaki ilgilenilen diğer özelliklerin genetikleri hakkında bilgi sağlamalarından dolayı markör diye adlandırılırlar. Moleküler markörler genomik DNA sekanslarındaki varyasyona dayanırlar. En önemli avantajları çok sayıda olmaları, çevreden etkilenmemeleri ve bitki gelişiminin hemen hemen her döneminde değerlendirilebilir olmalarıdır.

Genetik varyasyonun ve güçlü markör sistemlerinin elde edilebilirliğinin öneminin idrak edilmesi, markör teknolojilerinin biyoçeşitlilik konularına yaygın bir şekilde uygulanmasına olanak sağlamıştır. DNA’ya dayalı moleküler markör teknolojileri; hibridizasyona dayalı DNA markörler (RFLP ve oligonükleotid fingerprinting), PCR’a dayalı DNA markörleri (RAPD, AFLP vb.) ve DNA çiplerine ve sekanslamaya dayalı DNA markörler şeklinde üç ana grup altında toplanabilir (Gupta et al. 1999).

#### **2.4.2 Genotoksitelyi Belirlemede RAPD Tekniğinin Kullanımı**

RAPD ilk defa 1990 yılında rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve PCR’ı temel alan bir teknik olarak ortaya çıkmıştır. RAPD yönteminin temel prensibi ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş 9-10 bazlık oligonükleotidlerin, düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanarak PCR ile çoğalma yapmasıdır. Tekniğin devamında elde edilen çoğalma ürünü radyoaktif olmayan standart jel elektroforezinde yürütülür ve çoğalma ürünleri bantlar halinde gözlemlenerek incelenir. Bantların varlığı veya yokluğuyla sonuçlar değerlendirilebilir. RAPD, genetik varyasyonun tespiti için yaygın olarak kullanılan bir PCR tekniğidir (Weising et al. 1995).

RAPD (Williams et al. 1990) ve diğer DNA parmakizi metotları (Caetano-Anolles et al. 1991) doğrudan genom seviyesinde genetik çeşitliliği gösterir. Genomik örnekte önyargısız bilgi temin eder ve sınırsız sayıda markörleri meydana getirebilir. RAPD çalışmalarında PCR ile çoğaltılan DNA parçalarının başlangıç sekansları kullanılmış olan primerle komplementtir ve PCR ile oluşturulan bu DNA parçalarının boyutları

genellikle 0.3-3 kb aralığındadır (Fritsch and Rieseberg 1996). Son zamanlarda moleküler biyolojideki ilerlemeler genotoksikoloji alanında DNA analizi için hassas ve seçici bir takım gelişmelere neden olmuştur. Kısa primerlerle genomik DNA'dan rastgele DNA parçaları çoğaltan PCR temelli bir teknik olan RAPD, türlerin sınıflandırılmasında, genetik haritalama ve filogeni gibi birçok çalışmada yaygın olarak kullanılmaktadır (Williams et al. 1990). RAPD parmakizi basit ve tekrarlanabilir bir tekniktir. Aynı anda birkaç yüz DNA parçası RAPD çalışmalarında elde edilebilir. Bu özellik filogenetik ve ontogenetik olayların değerlendirme ve tespitinde RAPD'i güçlü bir teknik yapmaktadır.

10 bazlık RAPD primerindeki tek nükleotid değişikliği verilen kalıp DNA'nın parmakizinde önemli farklılıklara neden olur. Benzer şekilde, genomik DNA'daki tek nükleotid değişikliklerinin de DNA parmakizinde aynı etkiye sahip olması beklenir. Teorik olarak, genomik DNA'daki tek baz değişim mutasyonları RAPD ile tespit edilebilir. Buna ek olarak omurgalı ve omurgasız hayvanlar (Savva 1998), bitkiler ve bakterilerde genomik DNA'da meydana gelen çeşitli DNA hasarı ve mutasyonların (örneğin nokta mutasyonları, DNA'daki insersiyon ve delesyonlar) belirlenebildiğini gösteren çalışmalar RAPD'in güçlü bir biyomarkör olduğunu göstermiştir. RAPD-DNA parçaları agaroz jel elektroforezi ve etidyum bromür boyamasından sonra belirlenir. DNA hasarı ve mutasyonel olaylar yeni bantların oluşmasına, mevcut bantların kaybolmasına ve bantların görünüşünde çeşitli değişikliklere (parlaklığın artması veya azalması) neden olur (Atienzar et al. 1999). RAPD tekniği kullanılarak genotoksik etkinin teşhisi, kontrol ve uygulama örneklerinden elde edilen DNA profillerin karşılaştırılmasıyla yapılır.

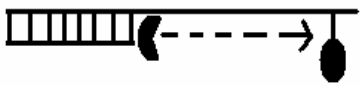
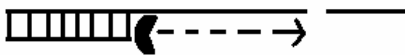
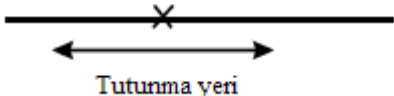

RAPD, DNA profillerinde bazı değişikliklere neden olabilecek etkenlerin sonuçlarını belirlemeye yönelik bir tekniktir. DNA köprüleri, DNA kırıkları ve mutasyonların (nokta mutasyonu ve homolog kromozom değişimleri) RAPD profilleri üzerine muhtemel etkileri Çizelge 2.1'de gösterilmiştir. Bir primer bağlanma yerindeki DNA hasarı ve mutasyonların varlığı kontrol DNA ile karşılaştırıldığında DNA parmakizinde değişikliklere neden olacaktır. Bununla birlikte, sadece primer bağlanma yerlerinde meydana gelen DNA değişiklikleri RAPD ile tespit edilebildiğinden RAPD tekniği

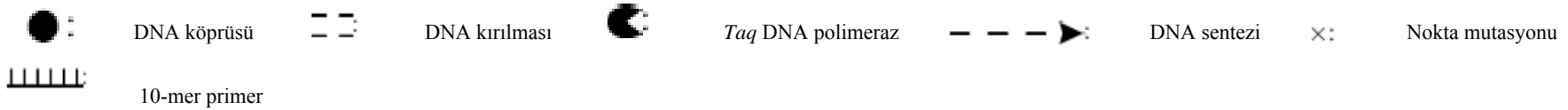
beklenenden daha az DNA hasarını belirleme kapasitesine sahiptir. Bunun nedeni primer bağlanma yerlerinin çok küçük (10 bç) olmasıdır. DNA lezyonlarının doğrudan etkisinin (örneğin *Taq* DNA polimerazın bir DNA hasarı ile karşı karşıya gelmesi) RAPD profilleri üzerine nokta mutasyonlarından daha fazla etkiye sahip olması beklenir, çünkü bu mutasyonların RAPD profilini etkilemesi için doğrudan primer bağlanma yerlerinde oluşması gerekmektedir. Stress koşulların şiddetli olması sonuçları büyük oranda etkiler ve bu şartlar altında meydana gelebilecek olan primer bağlanma yerlerindeki tek baz değişiklikleri RAPD ile tespit edilebilir. *Taq* DNA polimeraz enziminin bir DNA köprüsü ile karşılaşması durumunda bloke olma, atlama, DNA köprüsünde enzimin kompleksten ayrılması gibi muhtemel bazı sonuçlar ortaya çıkabilir ve bunun sonucunda RAPD profilleri değişir (Çizelge 2.1) (Atienzar and Jha 2006).

DNA kırıkları, mutasyonlar ve yeniden düzenlemelerin RAPD profilleri üzerine doğrudan etkileri de Çizelge 2.1’de gösterilmiştir. Kalıp DNA’da birbirine zıt iki primer bağlanma yeri arasında kalan bir noktada meydana gelen bir kırılma PCR ürününün oluşumunu engeller. Nokta mutasyonları ve yeniden düzenlemeler ise yeni bağlanma yerlerinin meydana gelmesi veya mevcut bağlanma yerlerinin kaybolmasından sorumludur ve bu da yeni PCR ürününün oluşmasına veya kontrole göre mevcut olan bir PCR ürününün kaybolması anlamına gelir. Meydana gelme olasılığı hakkında ise; yeniden düzenlemeler RAPD profillerinin değişimini ve özellikle de yeni bantların meydana gelmesini belirleyen en temel etmendir (Çizelge 2.1). Nokta mutasyonları da RAPD profillerini etkileyebilir fakat bir primer bağlanma yerinde nokta mutasyonunun oluşması yeniden düzenlemeler ile karşılaştırıldığında oldukça düşüktür (Atienzar and Jha 2006).

RAPD profillerinde bantların kaybolması veya yeni bantların ortaya çıkmasına neden olan kromozomal lezyonlar ve yeniden düzenlemeler bağlamında DNA’yı hasarlı kılan ajanlar genomun karasız hale gelmesine katkıda bulunurlar (Wurgler 1992). DNA köprüleri nedeni ile bant yoğunluklarındaki değişimler de RAPD analizi ile tespit edilebilir (Çizelge 2.1). Buna ek olarak, DNA metilasyonu ve gen amplifikasyonu gibi

Çizelge 2.1 DNA hasarı ve mutasyonların RAPD profilleri üzerindeki direkt etkileri (Atienzar and Jha 2006'dan uyarlanmıştır)

DNA'daki Değişiklikler	Sonuçları	RAPD profilleri üzerine etkileri	Lezyonun RAPD tarafından tespit edilebilme olasılığı
<p>DNA Köprüleri</p> 	<p>Atlama → süreklilik etkilenir</p> <p>Atlama → süreklilik etkilenmez</p> <p>Bloklama → Enzim köprüde ayrılır</p> <p>Bloklama → Enzim köprüde ayrılır</p> <p>Bloklama → Enzim ayrılmaz</p> <p>Primer/DNA bağlanması yok (köprü primer bağlanma yerinin içinde)</p>	<p>Bant parlaklığında azalma/bant kaybı</p> <p>Etkilemez</p> <p>Bant kaybı</p> <p>Bant parlaklığı artar</p> <p>Bant kaybı</p> <p>Bant kaybı</p>	<p>Orta</p> <p>-</p> <p>Düşük</p> <p>Orta</p> <p>Düşük</p> <p>Düşük</p>
<p>DNA Kırılmaları</p> 	<p>Engelleme → Enzim DNA ayrılması</p>	<p>Bant kaybı</p>	<p>Düşük</p>
<p>Nokta mutasyonu</p> 	<p>Primer /DNA bağlanması yok</p> <p>Yeni tutunma yeri oluşması</p>	<p>Bant kaybı</p> <p>Yeni bant</p>	<p>Düşük</p> <p>Düşük</p>
<p>Yeniden düzenleme</p> 	<p>Mevcut primer bağlanma yerinin kaybolması</p> <p>Yeni primer bağlanma yeri oluşması</p>	<p>Bant kaybı</p> <p>Yeni bant</p>	<p>Düşük</p> <p>Yüksek</p>



olaylar RAPD profilini etkileyebilir. Sonuç olarak, Çizelge 2.1’de verilmiş olan DNA seviyesindeki tüm olaylar (örneğin DNA köprüleri, kırılmaları, nokta mutasyonları, yeniden düzenlemeler) bir bütün halinde RAPD profilleri üzerinde bireysel lezyonlara göre çok daha fazla değişikliklere neden olur.

DNA hasarı ve mutasyonlar RAPD profillerinde değişikliklere neden olabilecek kalıp DNA’daki yapısal değişiklikleri de başlatabilirler. Sonuçta, kimyasal olarak başlatılan DNA hasarı ve mutasyonların yanında gen ifadesi, genetik etkilenmelerin denge seviyesi ve metabolik işlevlerde medyana gelen değişimler gibi bazı etkenler de RAPD profilinde değişimlere neden olabilir. Bununla birlikte, RAPD profillerinde meydana gelen değişikliklere en çok DNA hasarları ve mutasyonların neden olduğu düşünülmektedir. DNA’daki modifikasyonları ve mutasyonları tespit etmek amacı ile RAPD metodunun başarılı bir şekilde uygulanması genotoksinlerce uyarılmış DNA hasarının rastgele gerçekleşmediğinin bir göstergesidir (Atienzar et al. 2002).

Fasulye fidelerinde ağır metallerin genotoksisitesini değerlendirmek için RAPD analizleri yapılmıştır. 150 ve 350 mg/L konsantrasyonlarda kurşun, bakır, mangan ve kadmiyum ile muamele edilen fasulye fidelerinde DNA hasarı tespit edilmiştir. Kontrol ile ağır metal uygulanan örnekler arasında DNA bantlarının varlığı ve/veya yokluğu ile polimorfizmler açıkça ortaya çıkarılmıştır. 350 mg/L’de tüm ağır metal uygulamalarında çok miktarda hem kaybolan hem de yeni ortaya çıkan bantlar gözlenmiştir. Sonuçlar, test edilen ağır metallerin yüksek konsantrasyonlarda (350 mg/L) RAPD profillerinde önemli değişiklikleri yansıttığını göstermektedir. 6 adet primer kullanılarak elde edilen RAPD profillerinden toplam 467 RAPD fragmentinin 224 tanesi polimorfizm göstermiştir. Sonuç olarak, uygulama yapılmış ve yapılmamış genomlar karşılaştırıldığında, çevresel kirleticilerin canlı organizmaların DNA yapısını nasıl değiştirdiğinin değerlendirilmesinde RAPD analizinin kullanılabileceği gösterilmiştir (Enan 2006)

### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1 Kimyasallar

Bu araştırmada kullanılan kimyasallar Sigma, Merck, Duchefa, Fluka ve Riedel de-Haen'in analitik grade ürünleridir. Besin çözeltisi distile su, kurşun nitrat [Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] ve diğer çözeltiler ise bidistile su ile hazırlanmıştır. RAPD analizlerinde kullanılan tüm stok solüsyonlar distile su ile hazırlandıktan sonra otoklavlanmış ve kullanım süresince oda sıcaklığında ve karanlıkta muhafaza edilmiştir. Kullanılan *Taq* DNA polimeraz enzimi Fermentas'dan temin edilmiştir.

#### 3.2 Bitki Materyali

Araştırmalarda bitkisel materyal olarak yem şalgamının (*Brassica rapa* L. var. *rapa*) "Siloganova" çeşidi kullanılmıştır (Şekil 3.1). Yem şalgamındaki çeşit sayısı sınırlıdır. Piyasada Siloganova, Polybra, Agressa, Vobra adında tescilli çeşitler mevcuttur. Yem Şalgamı tohumları, Neobi Tohumculuk şirketinden temin edilmiştir. Siloganova çeşidi "diploid" olup Almanya'da bulunan "Bruno Nebelung Co." Firması tarafından ıslah edilmiş ve üretimi yapılmaktadır. Islah yılı 1980 olup ıslah yöntemi olarak "tek bitki seleksiyonu" kullanılmıştır.



Şekil 3.1 *Brassica rapa* L. var. *rapa*

Yem şalgamı çok geniş bir familya olan Turpgiller (Brassicaceae) familyasındandır. Brassicaceae familyası dünyada 350 cins ve yaklaşık 4000 tür içermekte olup ülkemizde ise 85 cins ve 515 tür ile doğal yayılış göstermektedir. Familyanın bazı üyeleri sebze ve yem bitkisi olarak, bazıları tohumlarından yağ elde etmek amacıyla, bir kısmı ise süs bitkisi olarak yetiştirebilme potansiyeline sahip olup, ekonomik bakımdan değerli bitkilerdir (Kürşat 1999).

Yem (hayvan) şalgamı, yaprakları ve kökü koyun, keçi, düve, sığır, süt inekleri tarafından büyük bir iştahla yenen ikinci ürün olarak değerlendirilen, çok iyi sindirilebilen, yüksek verimli (7.5-10 ton/dekar), kış soğuklarına dayanıklı (-6), 2.5-3 ay sonra hasada başlanabilen % 45'i kök, % 55'i yapraklardan oluşan, iyi bir yem bitkisidir. Ham protein oranı bitkinin yapraklarında %15-20, yumrularında ise %10-15 arasındadır (Ayan vd. 2006).

### 3.3 Çimlenme Deneyleri

Tohumlar yüzey sterilizasyonu için önce üç defa distile su ile yıkanmıştır. Bunu takiben % 10'luk sodyum hipoklorid içinde 15 dk bekletilmiş ve daha sonra % 70'lik etanolde 30 sn çalkalanmıştır. Son olarak, tohumlar 3 defa steril distile su ile durulanmıştır. Yüzey sterilizasyonu sonrası, tohumlar  $Pb(NO_3)_2$ 'in çeşitli konsantrasyonlardaki (2, 4, 6, 8, 10 ve 12 mM) 5 ml'lik çözeltilerinde, kontrol grubu ise bidistile su içerisinde bitki büyüme kabininde  $23\pm 1$  °C'de karanlık ortamda 6 sa şişirmeye bırakılmıştır. Bu süre sonunda şişme ortamından alınan tohumlardan, 9 cm'lik plastik petriyer içerisindeki 5 ml şişme ortamı sıvısıyla ıslatılmış çift katlı kaba filtre kağıtlarının üzerine, her bir petriye 25'er tohum gelecek şekilde ekim yapılmıştır. Ekimden hemen sonra kapağı kapatılan petriyer bitki büyüme kabinine kaldırılmıştır ve 72 sa süreyle  $23\pm 1$  °C'de karanlık ortamda çimlenmeye bırakılmıştır. Radikula belirimi esasına göre tohumların çimlenme oranları 72 saat sonunda tespit edilmiştir. Ayrıca süre sonunda her bir gruptaki tohumların kök ve gövde uzunlukları da ölçülerek kaydedilmiştir.

### 3.4 Gelişme Deneyleri

Tohumlar yüzey sterilizasyonu sonrası *in vitro* vent kültür kutularındaki agar yatağı üzerine steril kabin içerisinde ekilmiştir. Çimlendirme yatağı olarak ¼ MS (Murashige and Skoog 1962) (Çizelge 3.1) hazır tuz ve vitaminleri (2.15 gr/L), sükröz (10 gr/L) ve agar (4 gr/L) kullanılmıştır. MS tuzları, vitaminleri ve sükröz 0.5 L distile suda manyetik karıştırıcı ile çözüldükten sonra pH, 0.1 N HCl ve 0.1 N NaOH ile  $5.7 \pm 0.1$ 'ye ayarlanmıştır. Daha sonra agar eklenmiş ve hacim 1 L'ye tamamlanmıştır. Ardından besi yeri  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  ısı, 1 atm basınç altında 15 dk otoklavlanmıştır. Otoklavlanmış besi yeri oda sıcaklığında bir miktar soğutulduktan sonra steril kabin içerisinde *in vitro* vent kültür kutularına 100'er ml olacak şekilde dökülmüştür. Besi yeri katılaştıktan sonra tohumlar agar yatağı üzerine ekilmiştir. Tohumlar ekim sonrası bitki büyüme kabineye yerleştirilmiştir ve 72 sa süreyle  $23 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  ve karanlık ortamda çimlenmeye bırakılmıştır.

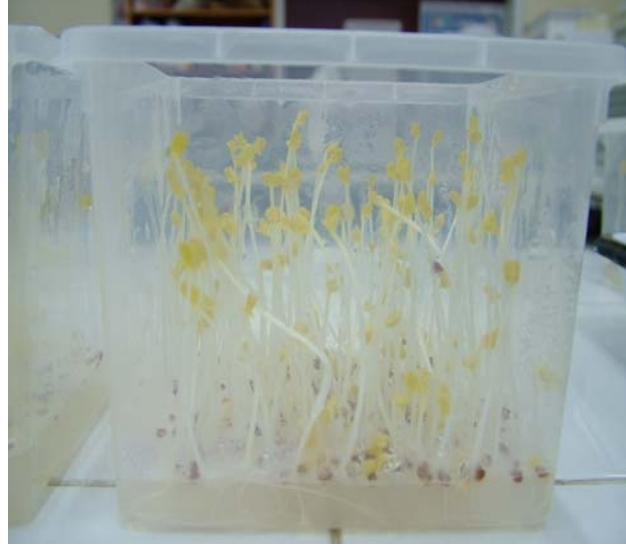
Çizelge 3.1 Besin çözeltisi hazırlamada kullanılan MS (Murashige and Skoog 1962) tuz ve vitaminleri

MS makro tuzları (mg/l)	MS mikro tuzları (mg/l)	MS vitaminleri (mg/l)			
KNO <sub>3</sub>	1900	KI	0.83	Nicotinic acid	0.5
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	Pyridoxine-HCl	0.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6	Thiamine-HCl	0.1
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	<i>myo</i> -Inositol	100
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	Glycine	2.0
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22.3	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025		
		FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8		
		Na <sub>2</sub> EDTA	37.3		

Fide gelişimi için ¼ MS sulu besin çözeltisi (pH 5.7) kullanılmıştır. Su kültürü için cam kavanozlar kullanılmış ve kavanozların etrafları köklerin ışık almaması için alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Kavanozlar sünger kapaklar ile kapatılmıştır. Her bir kavanoza 160 ml ¼ MS besin çözeltisi eklenmiştir. 3 günlük etiyole fideler (Şekil 3.2) dikkatlice besin ortamından çıkarılmıştır. Kökler, önce çeşme suyuyla ardından da saf su ile iyice yıkayıp agar kalıntıları uzaklaştırılmıştır. Fidelerin kökleri tümüyle besin çözeltisi içinde kalacak şekilde ve her kavanoza 20'şer fide gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Bitkiler  $23 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  sıcaklık ve Grolux<sup>TM</sup> floresan lamba ışığında 16/8 sa



(aydınlık/karanlık) fotoperiyoda ayarlı büyüme kabininde 14 gün boyunca gelişmeye bırakılmıştır. Bu süre içerisinde besin çözeltileri üç günde bir değiştirilmiştir.



Şekil 3.2 Etiyole *Brassica rapa* L. var. *rapa* fideleri

### 3.5 Bitkilere Kurşun Uygulaması

14 günün sonunda fideler üçüncül yaprak evresine ulaşmıştır. Bu aşamada bitkiler sulu besin ortamından çıkarılıp, kökleri distile su ile iyice yıkandıktan sonra kurşun stresi ortamına alınmıştır. Stres faktörü olarak kullanılan  $Pb(NO_3)_2$  ile 100 mM kurşun stok çözeltisi bidistile su ile hazırlanmıştır.  $\frac{1}{4}$  MS besin çözeltileri hazırlanırken son hacimde 0.5, 1, 3 ve 5 mM kurşun olacak şekilde stok kurşun çözeltisinden yeterli miktarda eklemeler yapılmıştır. Kontrol grubu için ise  $\frac{1}{4}$  MS besin çözeltisi kullanılmıştır. Son pH 5.5-6.0 arasında ayarlanmıştır. Bitkiler yukarıda tarif edildiği (3.4) gibi alüminyum folyo kaplı ve sünger kapaklı kavanozlarda 6 gün boyunca  $23 \pm 1$  °C sıcaklık ve beyaz Grolux™ floresan lamba ışığında 16/8 sa (aydınlık/karanlık) fotoperiyoda ayarlı büyüme kabininde kurşun stresine maruz bırakılmıştır. Bu süre içerisinde  $\frac{1}{4}MS+kurşun$  çözeltileri iki günde bir değiştirilmiştir. Bitkilerin morfolojik gelişimleri günlük olarak gözlemlenip kaydedilmiştir. Stres süresinin 6. gününe ulaşmış fideler çeşitli fizyolojik, biyokimyasal ve genotoksik etkilerin analizi için kullanılmıştır.

### 3.6 Kurşun Analizleri

Kurşun analizleri bitkilerin kök ve gövdeleri için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Belirlenen koşullar altında (3.5) 6 gün süreyle  $Pb(NO_3)_2$  etkisinde bırakılan bitki örnekleri bu süre sonunda ortamlarından çıkarılmış, önce çeşme suyu ardından da bolca distile su ile yıkanmıştır. Kök yüzeylerinde birikmiş olan kurşunun temizlenmesi için fideler 5 mM'lık EDTA (pH 8.0) çözeltisi içerisinde 4°C'de 30 dk bekletilmiştir. Bu işlemi takiben bitki kökleri tekrar bidistile su ile yıkandıktan sonra kaba filtre kağıdı ile suları alınmıştır. Bitkiler kök ve gövde kısımlarına ayrılmıştır. Yaş ağırlıkları alınmış olan kök ve gövdeler 90 °C'ye ayarlanmış etüvde 24 sa süresince kurutulmuştur. Etüvden çıkarılan bitki kısımları desikatöre konulmuş ve oda sıcaklığına gelince kuru ağırlıkları ölçülmüştür. Kurutulmuş örnekler temiz bir havan içerisinde öğütüldükten sonra 0.3 g'lık paketler halinde kurşun analizi için saklanmıştır.

Kurşun analizleri, Afyonkarahisar İl Kontrol Laboratuvar'ında yaptırılmıştır. Bitki örnekleri, %65'lik  $HNO_3$  solüsyonunda Berghof mikrodalga yakma sistemi (Berghof Products + Instruments, Germany) kullanılarak yakılmıştır. ~300 mg kuru bitki örneği yakma kabına konulduktan sonra üzerine 7.5 ml nitrik asit ilave edilmiştir. Karışım dikkatlice temiz cam bir çubuk ile karıştırılıp, kabın ağzı kapatıldıktan sonra mikrodalga fırına yerleştirilmiştir ve fırın aşağıdaki programa göre (sıcaklık programı) ayarlanıp, işlem başlatılmıştır.

Çizelge 3.2 Bitki örneklerinin mikrodalga fırında yakılması esnasında kullanılan sıcaklık programı

<b>Basamaklar</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>T [°C]</b>	150	190	100	100
<b>Ta [min]</b>	5	1	1	1
<b>Time [min]</b>	5	5	10	10

Yakma işlemi sonucunda dipte kalan tortu, başka bir kaba alınıp, bidistile su ile sulandırılmıştır. Sulandırılan örnekler, kurşun standartları ile karşılaştırmalı olarak Perkin Emler 2100 DV marka ICP-OES cihazında okutulmuştur. Her bir uygulama grubu kök ve gövde için en az 8 örnek çalışılmıştır.

### 3.7 Fotosentetik Pigmentlerin Analizi

Fotosentetik pigmentlerin [klorofil a ve b (Klo *a* ve *b*) ve karotenoidler] sentezi ve birikimi üzerine belirli konsantrasyonlardaki (0, 0.5, 1, 3, 5 mM Pb) kurşun uygulamalarının etkisi incelenmiştir. Kurşun stresinin 6. gününde fotosentetik pigmentlerin analizi için her bir uygulamadan 70 mg olacak şekilde yaprak örnekleri alınmıştır. Toplam klorofiller (Klo *a* ve *b*) ve karotenoidlerin ekstraksiyonu ve konsantrasyonlarının belirlenmesi Wellburn (1994)'e göre yapılmıştır. Her bir yaprak örneği 10 ml soğutulmuş metanol içeren 15 ml'lik falcon tüplerine alınmıştır. Pigmentlerin tamamen metanole geçmesi için tüpler 48 sa süresince 4 °C ve karanlıkta bekletilmiştir. Her bir uygulama üç kez ve deneyler de üçer kez olmak üzere tekrarlanmıştır. Her uygulamaya ait çözeltinin Klo *a*, *b* ve karotenoidlerin absorbanları sırasıyla 666, 653 ve 470 nm dalga boylarında, TU-1880 Double Beam UV-VIS spektrofotometre kullanılarak ölçülmüş ve pigment miktarları aşağıdaki formüllere göre yaş ağırlık (YA) temelinde mg/gYA olarak hesaplanmıştır (Wellburn 1994):

---

$$\text{Klorofil a (Klo } a) = (15,65 \times A_{666} - 7,34 \times A_{653}) \times 10 / \text{mgYA}$$

$$\text{Klorofil b (Klo } b) = (27,05 \times A_{653} - 11,21 \times A_{666}) \times 10 / \text{mgYA}$$

$$\text{Karotenoidler} = (1000 \times A_{470} - 2,86 \times \text{Klo } a - 129,2 \times \text{Klo } b) / 221 \times 10 / \text{mgYA}$$

---

### 3.8 ALAD ve ALA Analizleri

#### 3.8.1 ALAD Aktivitesinin Tayini

##### 3.8.1.1 Homojenatın Hazırlanması

6 gün boyunca çeşitli konsantrasyonlardaki Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> çözeltisinde bırakılan yem şalgamı fidelerinin yaprak dokuları ALAD aktivitesinin tayini için kullanılmıştır. Yaprak dokularından ALAD ekstraksiyonu Naito et al. (1980)'a göre yapılmıştır. Bu metodun bazı kısımları laboratuvarlarımızda modifikasyona uğratarak uygulanmıştır. 1 gr yaş yaprak dokusu, 0.1 mM dithioeritol (DTT) içeren 0.05 M Tris-HCl tamponunda (pH 8.2) soğutulmuş porselen havan içerisinde homojenize edilmiştir.

Homojenat, dört katlı gazlı bezden süzöldükten sonra süzöntöler 1.5 ml eppendorf tüplerine alınmış ve 4 °C’de 10.000 g’de Nüve NF 800 R soğutmalı santrifüjde 1 sa boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar hem ALAD aktivite tayini hem de protein miktar tayini için kullanılmıştır.

### 3.8.1.2 Protein Miktar Tayini

Protein miktarının belirlenmesi ve hesaplanması için Bradford (1976) metodu kullanılmıştır. Öncelikle her bir tüpe (test, kör ve standart) 2.5 ml protein assay solusyonu (fosforik asit ve metanol içerisinde çözülmüş 0.35 mg/ml Brilliant Blue G-250) konulmuştur. Daha sonra kör tüpüne 50 µl sodyum klorid solüsyonu, standart tüplerine 50 µl protein standart solüsyonu (%1’lik sodyum azid içinde 0.3 mg/ml insan albumini) eklenmiştir. Test tüplerine ise 3.8.1.1’de elde edilen süpernatantlardan 50 µl eklenmiştir. 2 dk sonunda protein miktarını (mg/ml) belirlemek için spektrofotometrede (TU-1880 Double Beam UV-VIS) 595 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmıştır. Kör tüpüne karşı okunan standartların absorbansından standart eğri çizilmiştir. Bu standart grafiği kullanılarak derişimini bilmediğimiz test örneklerimizin protein miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Protein konsantrasyonu (mg/ml)} = \frac{A (\text{test}) \times \text{Standart konsantrasyonu}}{A (\text{standart})}$$

### 3.8.1.3 ALAD Aktivite Tayini

3.8.1.1’de hazırlanan süpernatantlar Scheneider (1970)’in tarif ettiği metoda göre ALAD aktivitesi için enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Süpernatantlardan 1’er ml önceden işaretlemlmiş ağız kapaklı deney tüplerine konulmuştur. Her bir deney tüpüne 0.27 ml ALA (1 mg/ml), 1.35 ml Tris-HCl (0.05 M) tamponu ve 0.08 ml MgCl<sub>2</sub> (0.2 M) çözeltilisi konulmuştur. Tüpler 37 °C’de 2.5 sa inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyon 2.5 saat sonunda 0.3 ml trikloro asetik asit (TCA; 3.0 M) eklenerek durdurulmuştur. Tüpler 2 dk buz içerisinde soğutulduktan sonra 2000 g’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant ile modifiye Ehrlich Ayırıcı [1gr DAB (4-Dimetil amino benzaldehit), 30 ml asetik asit, 16 ml %70’lik perklorik asit ile karıştırılıp son hacim 50 ml’ye asetik asit

ile tamamlanarak hazırlanmıştır) 1:1 oranında karıştırıldıktan 10 dk sonra absorbanslar 555 nm dalga boyunda TU-1880 Double Beam UV-VIS spektrofotometre ile belirlenmiştir.

Bir enzim birimi yukarıda belirtilen koşullar altında 2.5 saatte bir nanomol PBG oluşumuna neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Özgül aktivitesi ise nanomol PBG/2.5 sa/mg/ml protein olarak ifade edilmiştir. Her bir deneme grubu için üç örnek çalışılmıştır ve deneyler üçer kez tekrarlanmıştır.

### **3.8.2 ALA Tayini**

ALA tayini için kurşun stresine bırakılan bitki örneklerinden 6. günün sonunda 0.2 gr taze yaprak dokusu, ALAD aktivitesinin tayini için alınan örneklerle birlikte eş zamanlı olarak alınmıştır. Alınan yaprak dokusu, %10'luk TCA çözeltisinin 1 ml'sinde 100 °C'ye ayarlanmış sıcak su banyosunda falcon tüplerinin içerisinde 15 dk boyunca ekstrakte edilmiştir (Miller et al. 1979). Ekstrakt süzöldükten sonra kalan doku parçaları bidistile su ile yıkayıp süzöntöler birleştirilmiştir. 2 ml potasyum fosfat tamponu (0.2 M; pH 6.8) eklendikten sonra 2 damla asetil aseton damlatılıp örnekler 100 °C'de 15 dk tutulmuştur. Örnekler soğutulduktan sonra 2000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. 1 ml örnek, 1 ml Ehrlich Ayıracı ile karıştırıldıktan 15 dk sonra absorbanslar 553 nm dalga boyunda TU-1880 Double Beam UV-VIS spektrofotometre ile belirlenmiştir. Her bir deneme grubu için üç örnek çalışılmıştır ve deneyler üçer kez tekrarlanmıştır.

### **3.9 İstatistiksel Değerlendirme**

Denemeler sonunda kaydedilmiş olan tüm verilerin istatistik analizleri SPSS 10 paket programı ile gerçekleştirilmiştir. Hangi grubun ya da grupların farklı olduğunu belirlemek amacıyla tek yönlü varyans analizi (ANOVA), elde edilen veriler arasındaki farklılıklar ise Duncan testi kullanılarak belirlenmiş ve  $P < 0.05$  önemli düzey olarak kabul edilmiştir.

### 3.10 RAPD Analizleri

#### 3.10.1 DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

- a) **CTAB-Bitki DNA Ekstraksiyon Tampon Çözeltisi:** 2% CTAB, 1% PVP-40.000, 20 mM 2-merkaptoetanol, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0), 1.4 M NaCl. 2-merkaptoetanol, öğütülmüş bitki örneğine CTAB tamponu eklenmeden hemen önce CTAB tamponuna eklenmiştir.
- b) **TE tampon çözeltisi:** 10 mM Tris HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)
- c) **Ribonükleaz A solüsyonu (10 mg/ml RNase A):** 10 mg RNaz A 1.5 ml steril eppendorf tüpü içerisinde 1 ml 50 mM NaAcO (pH 5.5) çözeltisi ile çözülmüştür. Daha sonra, 10 dk DNaz aktivitesinin tamamen yok edilmesi için sıcak su banyosunda bekletilmiş ve çalışma anına kadar -20 °C'de saklanmıştır.
- d) **Agaroz:** %1.5 agaroz PCR ürünlerinin analizi için; %0.7 agaroz ise genomik DNA'ların analiz için kullanılmıştır.
- e) **TBE Tamponu:** Tris-HCl, Borik asit ve EDTA
- f) **Diğer Solüsyonlar:** Saf Etanol, %70 Etanol, 2-propanol ve kloroform

#### 3.10.2 DNA İzolasyonu

Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda kurşun stresine maruz bırakılan bitki örneklerinden DNA izolasyonu için genç yapraklardan 0.3 gr alınmıştır. Genomik DNA, RADP-PCR çalışmalarında yeterli olan Doyle and Doyle (1990) CTAB-DNA izolasyon metodunun modifiye edilmesi ile ekstrakte edilmiştir. 0.3 g taze yaprak dokusu önceden soğutulmuş steril havan içine yerleştirilmiştir. Örneğin üzerine sıvı azot eklenerek bir müddet örneklerin donması beklendikten hemen sonra yapraklar hızlı ve etkin bir şekilde öğütülmüştür. Bu işlemi takiben, önceden soğutulmuş bir spatula sayesinde havan içindeki iyice öğütülmüş donmuş haldeki bitki örneği iki ayrı steril 1.5 ml eppendorf içine eşit miktarda aktarılmıştır. Aktarma işleminin hemen sonrası daha önceden su banyosunda 90°C'de ön ısıtmaya tutulmuş CTAB ekstraksiyon tampon çözeltisinden 1 ml her tüpe eklenmiştir. Eppendorf tüpleri parmaklar arasında ters-düz edilerek karıştırılmıştır. Daha sonra tüplere 0.4 ml kloroform eklemiştir. Ardından örnekler 60 °C'deki su banyosunda 30 dk bekletilmiştir. Bu süre zarfında her 5 dakikada

bir örnekler yine ters-düz edilerek karıştırılmıştır. Örnekler, inkübasyon sonrası oda sıcaklığında 12000 rpm'de 10 dk santrifuj edilmiştir. Daha sonra, örneklerin sıvı fazı (süpernatant) dikkatlice temiz bir eppendorf tüpe dökülerek alınmış ve tüplerin tabanındaki tortunun temiz tüpe geçmemesine özen gösterilmiştir. Tüplere 10 µl RNaz eklendikten sonra 60 °C'de 20 dk bekletilmiştir. RNA temizleme işlemini takiben -20 °C'de önceden soğutulmuş iso-propanol son hacmin %60'ı olacak şekilde örneğe eklenmiş ve örnekler sarsılmadan dikkatlice her iki faz birbirine karıştırılmıştır. Bu aşamada tel tel iplikçik halinde ve beyaz renkli bir kütle toplanması gözlenmiştir. Örnekler 4 °C'de 30 dk bekletildikten sonra 1500 rpm'de 4 dk santrifuj edilmiştir. Santrifuj sonrası süpernatant dökülmüş ve son sıvı damlaları tekrar santrifuj edildikten sonra mikropipetle alınmıştır. Örnek tüpleri daha sonra 1 ml %70'lik etanol ile yıkanmış ve sonrasında sıvı kısım tüplerden uzaklaştırılmıştır. Tüpler daha sonra 2-3 dk hava ortamında kurumaya bırakılmıştır. Son olarak, DNA çökeltileri 0.2 ml TE tampon çözelti içinde çözüldükten sonra 1 gece boyunca örnekler 4 °C'de bekletilmiştir. DNA'ların spektrofotometrik miktar tayini ve agaroz jel elektroforezde kontrolü yapıldıktan sonra, DNA örnekleri -20 °C'de saklanmıştır.

### **3.10.3 DNA Miktarı ve Kalitesinin Spektroskopik Yöntemle Tayini**

DNA örnekleri 5 ml kuvars küvetler kullanılarak 260 ve 280 nm dalga boylarında TU-1880 Double Beam UV-VIS spektrofotometre ile okunmuştur. DNA miktarları; DNA ( $\mu\text{g/ml}$ ) =  $A_{260} \times \text{Seyreltme Oranı} \times 50$  formülü kullanılarak belirlenmiştir. DNA saflığı,  $A_{260}/A_{280}$  oranı hesaplanarak tespit edilmiştir. DNA örnekleri TE tamponunda çözüldüğü için çalışmada kör olarak TE tamponu kullanılmıştır.

### **3.10.4 RAPD-PCR Reaksiyonu**

Her bir PCR reaksiyonu 0.2 ml ince cidarlı eppendorf tipi tüplerde 25 µl toplam solüsyon içerisinde gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu bileşenleri ön denemelerle optimize edilmiştir. Ön denemeler sonunda PCR karışımı: 1xPCR tampon çözeltisi (50 mM KCl, 1 mM Tris-HCl; pH 8.8), 1 U *Taq* (*Thermus aquaticus*) DNA Polimeraz enzimi (Fermentas, Vilnius, Litvanya), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM her bir dNTP (Sigma), 10 µM 10 baz dizilimli primer (QIAGEN Operon GmbH, Cologne, Almanya), 25 ng/µl genomik DNA karışımının steril ddH<sub>2</sub>O ile 25 µl'ye tamamlanması ile oluşturulmuştur.

Bu çalışmada toplam 11 adet primer kullanılmıştır. Kullanılan primerler ve sekansları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.3 RAPD-PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler ve sekansları

	<b>Primer</b>	<b>G+C (%)</b>	<b>5’-&gt;3’sekans</b>
1	OPB-07	70	GGTGACGCAG
2	OPB-08	70	GTCCACACGG
3	OPB-09	70	TGGGGGACTC
4	OPB-10	70	CTGCTGGGAC
5	OPB-11	60	GTAGACCCGT
6	OPB-12	60	CCTTGACGCA
7	OPB-14	50	TCCGCTCTGG
8	OPB-15	60	GGAGGGTGTT
9	OPB-17	60	AGGGAACGAG
10	OPB-18	60	CCACAGCAGT
11	OPB-20	60	GGACCCTTAC

### 3.10.5 PCR Döngüsü

PCR reaksiyonu, Uvigene (Uvitech Ltd., UK) marka cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler 94°C’de 4 dk başlangıç denatürasyonuna maruz bırakıldıktan sonra PCR cihazı toplamda 40 döngü olmak üzere; 94°C’de 45 sn denatürasyon, 36°C’de 45 sn annealing (primerlerin bağlanması) ve 72 °C’de 60 sn polimerizasyona programlanmıştır. Örnekler en son olarak 72 °C’de 8 dk son uzatmaya bırakıldıktan sonra PCR döngüleri tamamlanmıştır. PCR örnekleri bekletilmeden agaroz jel elektroforezde yüzdürülmüştür.

### 3.10.6 Agaroz Jel Elektroforez

PCR ürünlerine 2µl 6X yükleme tamponu (10mM Tris-HCl pH 7.6, %0.03 bromofenol mavisi, %0.03 ksilen siyanol FF, %60 gliserol, 60mM EDTA) eklenerek örnekler boyanmıştır. 1 x TBE (90 mM Trisma base, 90 mM Borik asit, 2 mM EDTA, pH 8.0) ile hazırlanan %1.5’lik agaroz jelle boyanmış örneklerden 25’er µl ve yine boyanmış 100 bp’lik DNA ladder (Fermentas GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus, 10 mM Tris-HCl, pH:7.6, 1 mM EDTA)’dan 5 µl yüklenerek yürütücü tampon çözeltisi (1xTBE) bulunan jel tankı içerisinde (BIO-RAD Wide Mini Sub-Cell GT System, İtalya) 70 voltta 130 dk



DNA yürütülmüştür. Agaroz jel daha sonra 10 µl (0.625 mg/ml) etidyum bromür eklenmiş 200 ml saf su içinde 20 dk bekletilerek boyanmaya bırakılmıştır. Agaroz jel net görüntü alabilmek için, 200 ml saf su içinde 5 dk yıkandıktan sonra ultraviyole ışık altında renkli kamera ile görüntülenmiştir.

### 3.10.7 RAPD Bantlarının Analizi

Jel fotoğraflarından yararlanılarak markör sonuç tabloları hazırlanmıştır. Tablolar üzerinde her bir PCR bandının varlığı "1" ve yokluğu "0" ile gösterilmiştir. Bantların moleküler boyutları UVI TEC UVI PHOTO. MW Electrophoresis Gel Analysis yazılımı kullanılarak tespit edilmiştir. Kontrol ve farklı konsantrasyonlardaki kurşun uygulamalarından elde edilen RAPD profilleri hiyerarşik kümeleme analizi kullanılarak analiz edilmiştir. Gruplar-arası bağlantı metodunda kareköklü Euclidean mesafe ölçümü kullanılarak bir dendogram oluşturulmuştur. Tüm hesaplamalar ve grafik çizimi SPSS sürüm 10.0 (SPSS, Chicago, IL, U.S.A.) bilgisayar istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Genotoksisite yargısı örnekler arasındaki genetik mesafeler dikkate alınarak yapılmıştır.

Her bir primerle elde edilen RAPD profilleri kendi içerisinde değerlendirilmiştir. Kurşuna maruz bırakılmayan bitki örneklerinden elde edilen RAPD profilleri ile farklı konsantrasyonlarda kurşunla muamele edilmiş bitkilerin RAPD profilleri karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalar yapılırken kontrol RAPD profiline göre uygulamalarda gözlenen bant kayıpları ve yeni bant oluşumları ile bant parlaklıklarının azalması veya artması her bir PCR ürünü için belirlenmiştir (Atienzar and Jha 2006). Her bir primer için RAPD profillerindeki kalitatif değişiklikleri yansıtan Genomik Kalıp Sabitlik (Genomic Template Stability; GTS, %) oranı Atienzar et al (1999)'e göre bant kayıpları ve yeni bant oluşumları esas alınarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$GTS = (1 - (a/n)) \times 100$$

Formüldeki *a* her bir uygulama örneğinde tespit edilmiş polimorfik bantların sayısını, *n* ise kontrol grubundaki toplam bant sayısını ifade etmektedir. Kurşun stresi ile fotosentetik pigment miktarlarında, ALA miktarında ve ALAD aktivitesinde kontrol

grubuna göre meydana gelen değişim yüzdeleri RAPD sonuçlarından elde edilen GTS değerleri ile karşılaştırılmıştır.

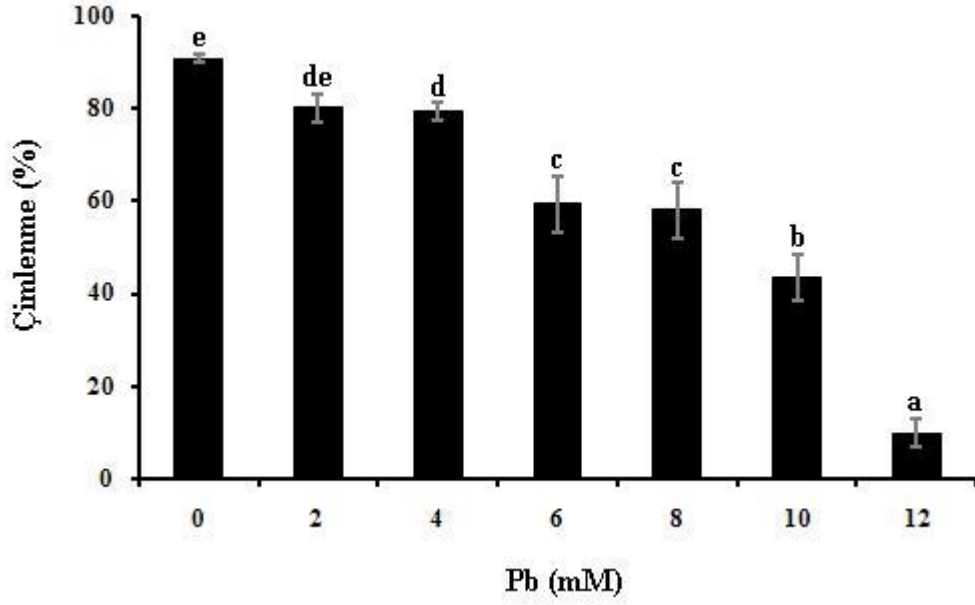
## 4. BULGULAR

### 4.1 Çimlenme Deneyleri

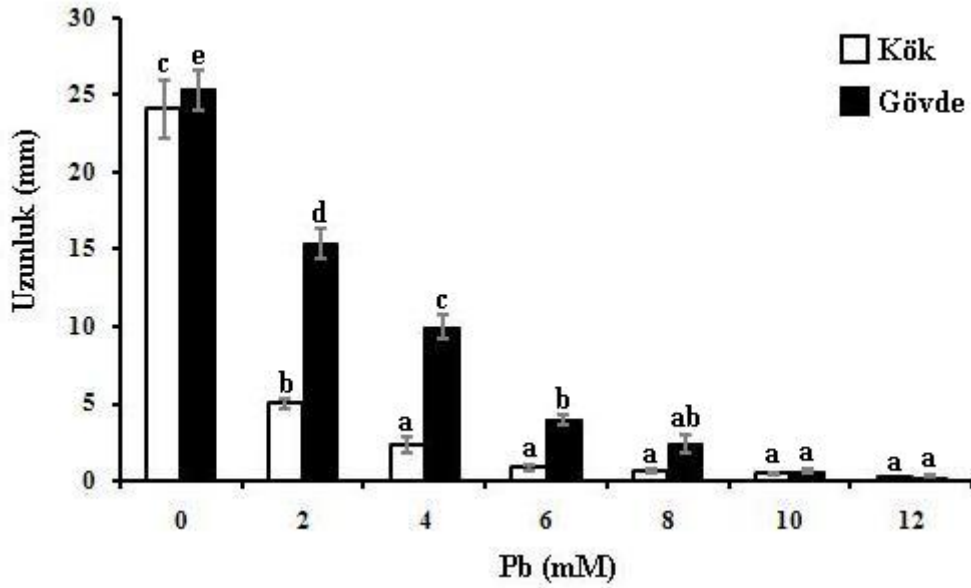
Kurşunun farklı konsantrasyonlarının (0-12 mM Pb) etkisinde  $23\pm 1$  °C ve karanlık ortamda çimlenmeye bırakılan yem şalgamı (*Brassica rapa* L. var. *rapa*) tohumlarının çimlenme verileri 72 saat sonunda kaydedilmiştir. Test edilen kurşun konsantrasyonlarının çimlenme yüzdeleri ile kök ve gövde uzunluklarına olan etkileri Şekil 4.1 ve 4.2’de gösterilmiştir. Tespit edilen çimlenme yüzdeleri konsantrasyonun artmasına bağlı olarak önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) azalmıştır (Şekil 4.1). 6 ve 8 mM Pb konsantrasyonlarında çimlenme oranları bakımından önemli seviyede fark bulunmamıştır. Kontrol grubunda çimlenme oranı % 90.7 iken 10 mM Pb uygulamasında çimlenme oranı %43.3’e düşmüştür. Yani 10 mM Pb uygulaması çimlenmeyi % 52 oranında azaltmıştır. En düşük çimlenme yüzdesi 12 mM Pb’de gözlenmiştir (%10.0). Ölçülen kök ve gövde uzunlukları kurşun konsantrasyonunun artışına bağlı olarak önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) azalmıştır (Şekil 4.2). 2 mM Pb uygulaması kontrol grubuna göre kök ve gövde uzunluklarında sırası ile % 78.3 ve % 39.1 azalmaya neden olmuştur. 4-12 mM Pb uygulamasında fidelerin kök uzunlukları arasında önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) bir fark gözlenmemiştir. 0-10 mM Pb uygulamalarında fidelerin gövde uzunlukları kademeli olarak önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) azalmıştır.

### 4.2 Bitkilere Kurşun Uygulaması Sırasındaki Morfolojik Gözlemler

Kurşunun farklı konsantrasyonlarında (0, 0.5, 1, 3, 5 mM Pb) 6 gün süre ile bırakılan yem şalgamının kök ve yapraklarındaki morfolojik gözlemler Çizelge 4.1’de özetlenmiştir. Kurşun stresi uygulamasının ilk üç gününde tüm uygulamalarda olumsuz bir gelişim tespit edilmemesine rağmen, yüksek kurşun konsantrasyonlarında (3 ve 5 mM Pb) stresin 3. günden sonra kurşunun bitki morfolojisi üzerindeki etkileri belirgin bir şekilde gözlenmiştir. Kök gelişiminde, zayıflık ve yan köklerin gelişmemesi gibi belirtiler görülürken yapraklarda ise yer yer nekrotik lekeler ve damarlarda kararma meydana gelmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.1 Farklı konsantrasyonlardaki kurşunun yem şalgamı tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisi. Barlar üzerindeki farklı harfler ortalama çimlenme değerleri arasında Duncan testine göre önemli düzeydeki ( $P < 0.05$ ) farklılıkları ifade etmektedir. Barlar ortalamaların standart hatasını ( $\pm SH$ ) göstermektedir.

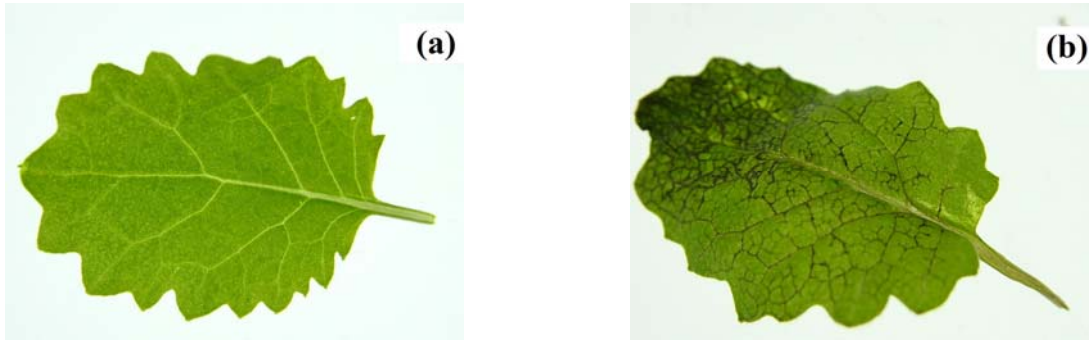


Şekil 4.2 Farklı konsantrasyonlardaki kurşunun yem şalgamı tohumlarının kök ve gövde gelişimi üzerine etkisi. Barlar üzerindeki farklı harfler kök ve gövde uzunluk değerleri arasında Duncan testine göre önemli düzeydeki ( $P < 0.05$ ) farklılıkları ifade etmektedir. Barlar ortalamaların standart hatasını ( $\pm SH$ ) göstermektedir.

Çizelge 4.1 Kurşunun farklı konsantrasyonlarının etkisine 6 gün süre ile bırakılan *Brassica rapa* L. var. *rapa*'da morfolojik gözlemler

Derişim (mM)	Bitki Gelişimi	Kök Gelişimi	Yaprak Sararması	Damarlarda Kararma	Nekrotik Lekeler
Kontrol	+++	+++	-	-	-
0.5	+++	+++	-	-	-
1	+++	+++	-	-	-
3	++	++	+	+	+
5	+	+	++	++	++

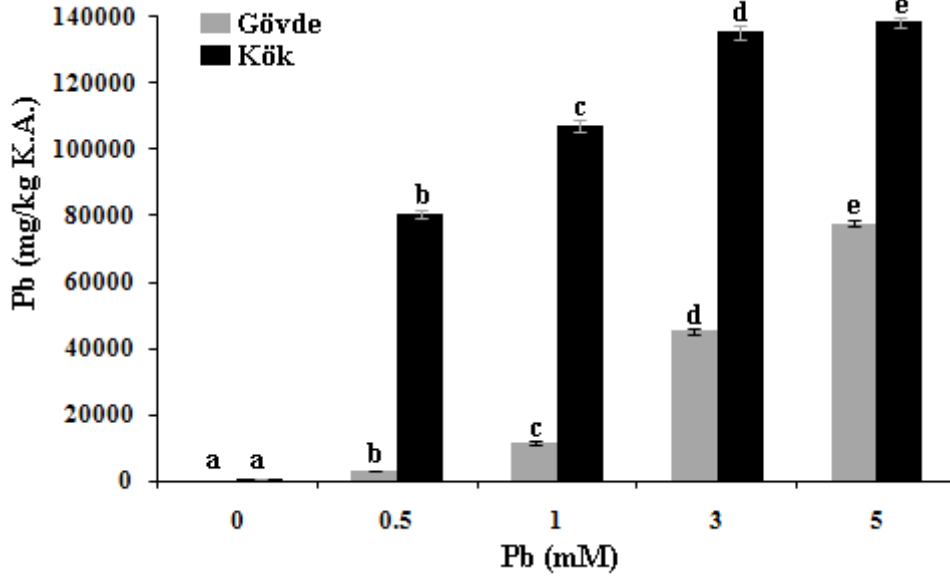
+++ : normal ++ : orta + : az - : yok



Şekil 4.3 Kurşun stresinin 6. gününde kontrol (a) ve 5 mM Pb (b) uygulamasına maruz bırakılmış yem şalgamı fidelerinden yaprak örnekleri.

### 4.3 Kurşun Analizleri

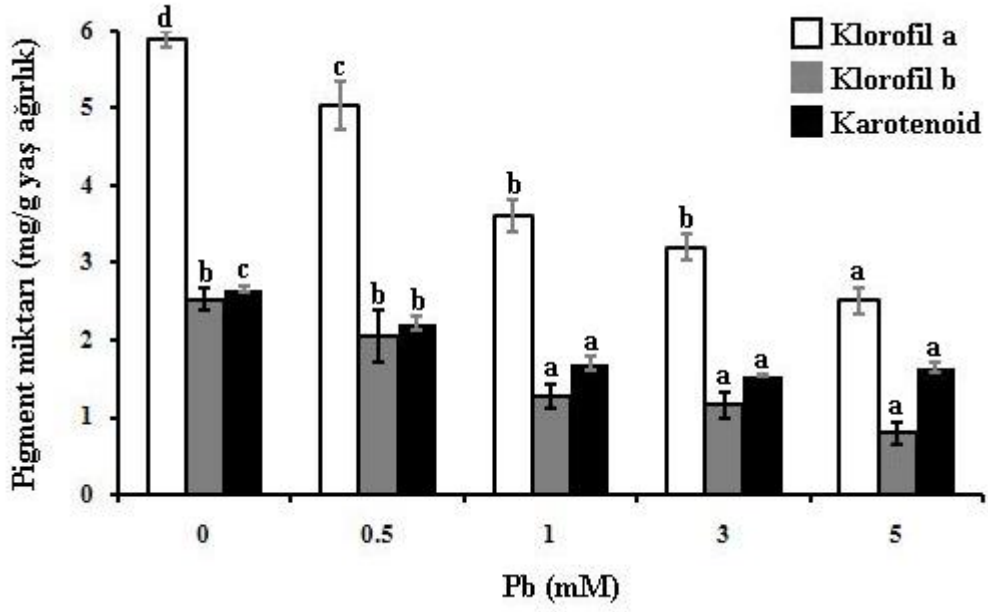
Kurşunun farklı konsantrasyonlarında 6 gün süre ile bırakılan yem şalgamı fidelerinin kök ve gövdesinde biriken Pb miktarları Şekil 4.4'te verilmiştir. Kök ve gövdede belirlenen kurşun miktarları, uygulanan kurşun konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak önemli derecede ( $P<0.05$ ) artma göstermiştir. Uygulamalar arasında en fazla birikim kök ve gövdede 5 mM Pb etkisinde görülmüştür. Uygulanan aynı Pb konsantrasyonlarında köklerde biriken Pb miktarı gövdede biriken Pb miktarından daha fazla bulunmuştur.



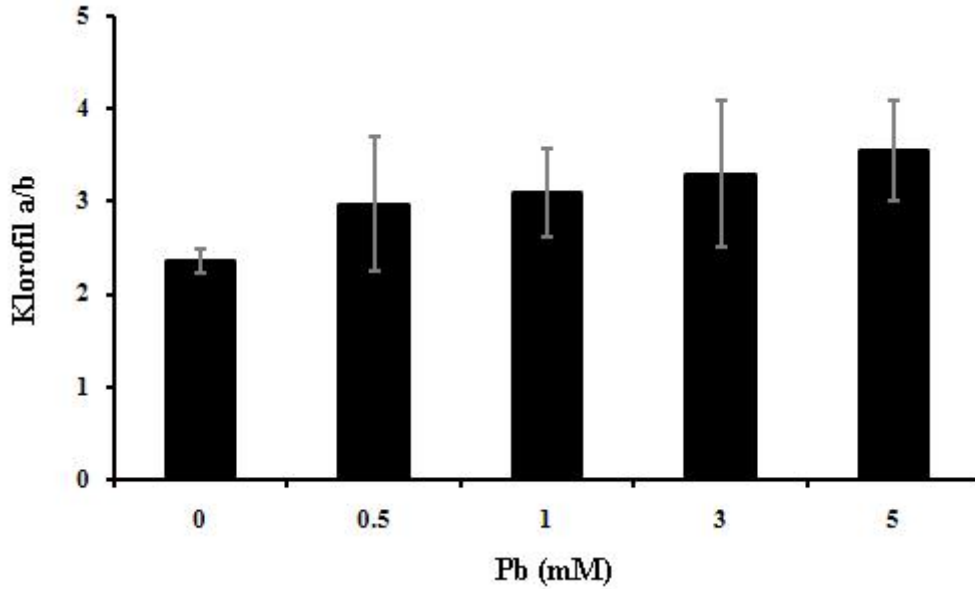
Şekil 4.4 Kurşunun farklı konsantrasyonlarının etkisinde 6 gün bırakılan yem şalgamı fidelerinin kök ve gövdelerinde biriken Pb miktarları. Barlar üzerindeki farklı harfler kök ve gövdede biriken Pb miktarları arasında Duncan testine göre önemli düzeydeki ( $P<0.05$ ) farklılıkları ifade etmektedir. Barlar ortalamaların standart hatasını ( $\pm SH$ ) göstermektedir.

#### 4.4 Fotosentetik Pigment Miktarları

Kurşunun farklı konsantrasyonlarının etkisinde 6 gün bırakılan yem şalgamı fide yapraklarının fotosentetik pigment (Klo *a*, Klo *b* ve karotenoid) miktarlarındaki değişim Şekil 4.5’de gösterilmiştir. Artan kurşun konsantrasyonunda Klo *a* miktarı kontrole göre kademeli olarak önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) azalma göstermiştir. Klo *b* miktarında, 0.5 mM Pb uygulaması kontrole göre önemli düzeyde bir fark oluşturmamıştır. 1-5 mM Pb uygulamalarında Klo *b* miktarları arasında önemli düzeyde bir fark tespit edilmemişken bu uygulamalar Klo *b* miktarını kontrol ve 0.5 mM Pb’ye göre önemli düzeyde azaltmıştır. Kontrol grubuna göre 0.5 ve 1 mM Pb uygulamalarında karotenoid miktarlarında önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) kademeli bir azalma tespit edilmişken, 1-5 mM Pb uygulamaları arasında önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) bir fark gözlenmemiştir. Klorofil a/b oranı kurşun konsantrasyonunun artışı ile birlikte göreceli olarak artmış olmasına rağmen, bu artış istatistiki bakımdan önemli bulunmamıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.5 Kurşunun farklı konsantrasyonlarının etkisinde 6 gün bırakılan yem şalgamı fide yapraklarının fotosentetik pigment miktarlarındaki değişim. Barlar üzerindeki farklı harfler Klo *a*, Klo *b* ve karotenoid miktarları arasında Duncan testine göre önemli düzeydeki ( $P < 0.05$ ) farklılıkları ifade etmektedir. Barlar ortalamaların standart hatasını ( $\pm SH$ ) göstermektedir.



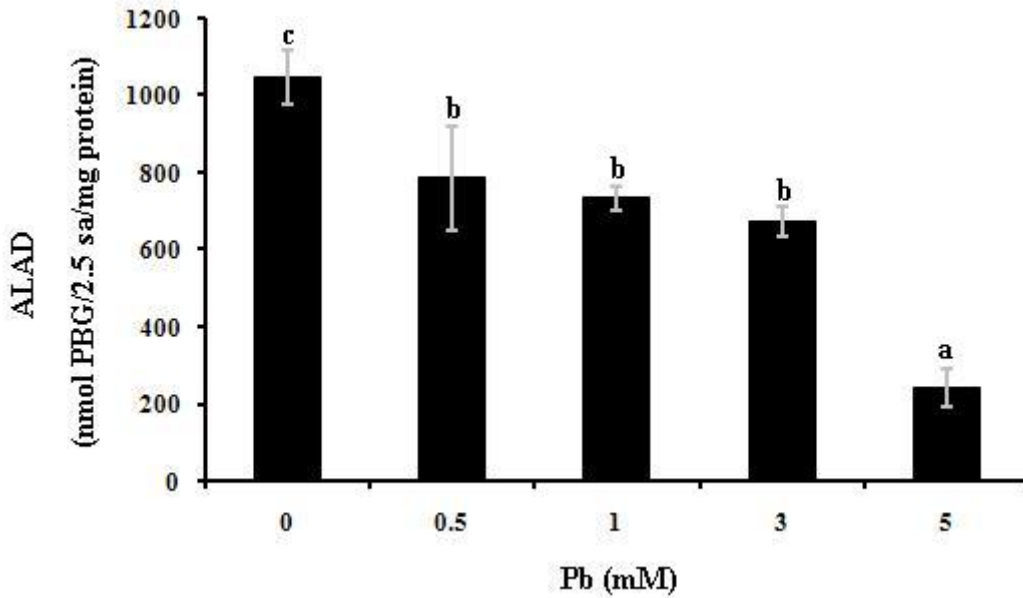
Şekil 4.6 Kurşunun farklı konsantrasyonlarının etkisinde 6 gün bırakılan yem şalgamı fidelerinin yaprak dokularındaki klorofil a/b oranlarındaki değişim. Barlar ortalamaların standart hatasını ( $\pm SH$ ) göstermektedir.

#### 4.5 ALAD Aktivitesi ve Protein Miktarı

Kurşunun farklı konsantrasyonlarının etkisinde 6 gün bırakılan yem şalgamının yapraklarında belirlenen ALAD aktivitesi artan kurşun konsantrasyonuna bağlı olarak önemli derecede ( $P<0.05$ ) azalma göstermiştir. En düşük aktivite 5 mM Pb konsantrasyonunun etkisinde gözlenirken 0.5, 1 ve 3 mM Pb uygulamaları arasında ALAD aktivitesi bakımından  $P<0.05$  önem seviyesinde fark gözlenmemiştir (Şekil 4.7). Yem şalgamının yapraklarında belirlenen protein miktarlarındaki değişim Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Belirlenen konsantrasyonlar arasında protein miktarları bakımından  $P<0.05$  önem seviyesinde fark gözlenmemiştir.

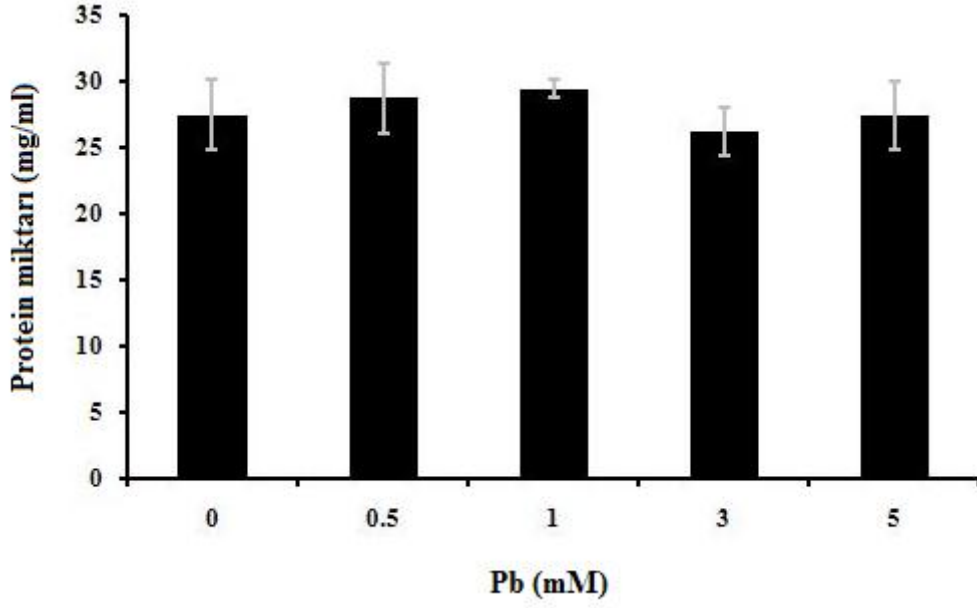
#### 4.6 ALA Miktarı

Yem şalgamının yapraklarında belirlenen ALA miktarı kontrole göre önemli derecede ( $P<0.05$ ) artma göstermiştir. Konsantrasyonlar arasında en fazla artma 5 mM Pb etkisinde görülürken 3 ve 5 mM Pb uygulamaları arasında  $P<0.05$  önem seviyesinde fark gözlenmemiştir (Şekil 4.9).

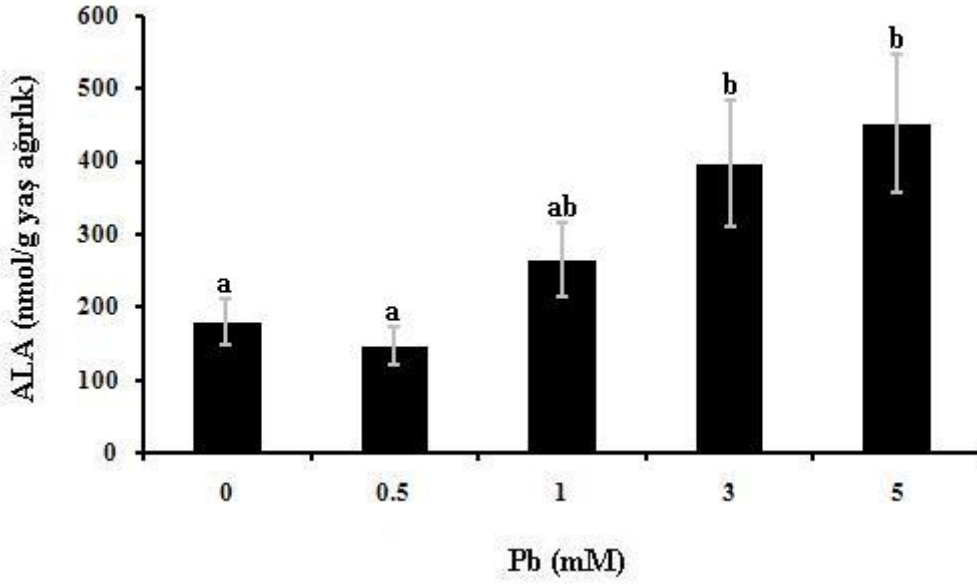


Şekil 4.7 Kurşunun farklı konsantrasyonlarının etkisinde 6 gün bırakılan yem şalgamı fidelerinin yaprak dokularında ALAD aktivitesi değişimleri. Barlar üzerindeki farklı harfler aktiviteler arasında Duncan testine göre önemli düzeydeki ( $P<0.05$ ) farklılıkları ifade etmektedir. Barlar ortalamaların standart hatasını ( $\pm SH$ ) göstermektedir.





Şekil 4.8 Kurşunun farklı konsantrasyonlarının etkisinde 6 gün bırakılan yem şalgamı fidelerinin yaprak dokularındaki protein miktarı.



Şekil 4.9 Kurşunun farklı konsantrasyonlarının etkisinde 6 gün bırakılan yem şalgamı fidelerinin yaprak dokularındaki ALA miktarı. Barlar üzerindeki farklı harfler ALA miktarları arasında Duncan testine göre önemli düzeydeki ( $P < 0.05$ ) farklılıkları ifade etmektedir. Barlar ortalamaların standart hatasını ( $\pm SH$ ) göstermektedir.

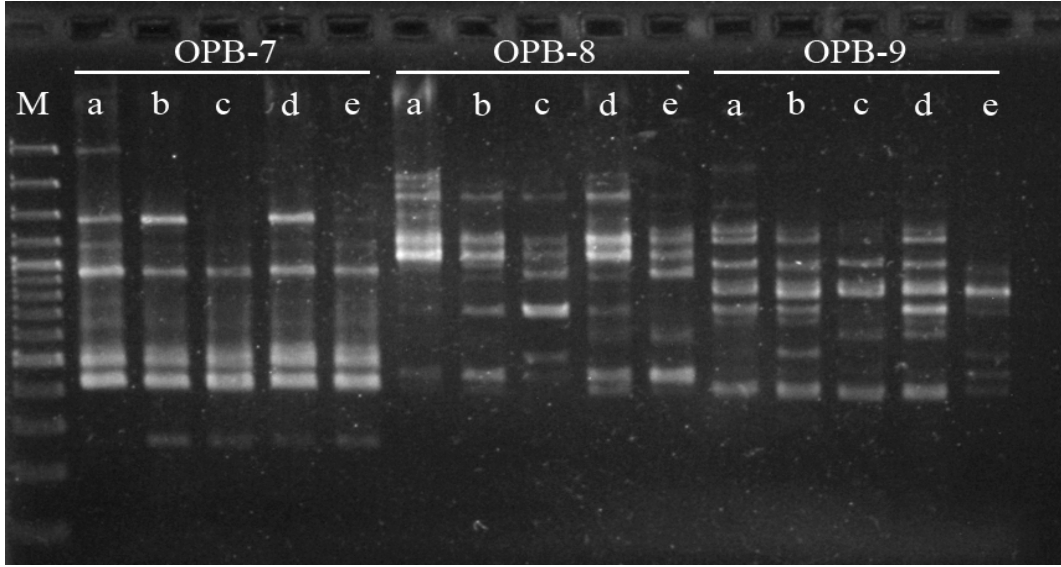
#### 4.7 Kurşun Stresinin RAPD Profilleri Üzerine Etkisi

Kurşun stresi ile uyarılmış DNA'daki değişimleri belirleyebilmek için RAPD analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 6 gün süre ile kurşunun farklı konsantrasyonları (0, 0.5, 1, 3 ve 5 mM Pb) ile muamele edilmiş 5-6 adet yem şalgamı fidesinin genç yaprakları (~300 mg) DNA ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Bu çalışmada Qiagen Operon B (OPB) serisi 20 adet primer ön denemelerde kullanılmıştır. Bu primerlerden 11 tanesi değerlendirilebilir RAPD profilleri üretmiştir. 11 adet primer kullanılarak elde edilen RAPD profillerine ait jel görüntü fotoğrafları Şekil 4.10-14'de verilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen tüm DNA bantlarının ebatları tespit edilmiştir ve RAPD profilinde bir bandın varlığını ("1") ve yokluğunu ("0") gösteren tablolar Ekler bölümünde Ek-Çizelge 1-11'de verilmiştir.

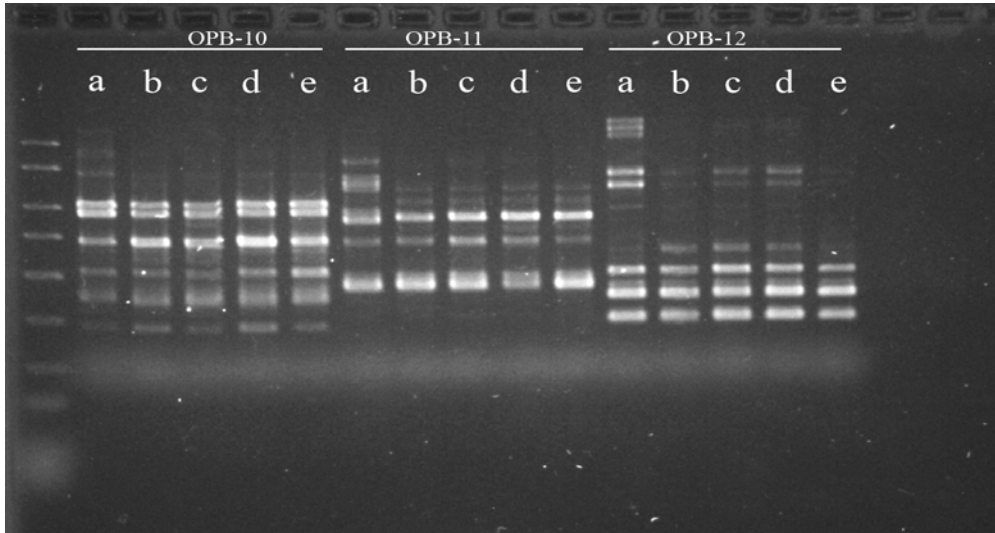
11 primer kullanılarak amplifiye olmuş tüm bantların ebatları 189–2 928 baz çifti (bç) aralığında değişmiştir (Çizelge 4.2). Her bir primer başına ortalama 11.45 bant amplifikasyonu gerçekleşmiştir. Kontrol grubunda toplamda 90 adet DNA bandı çoğalmıştır. Tüm uygulama örnekleri ile birlikte değerlendirildiğinde ise toplamda 126 adet DNA bandı amplifiye olmuştur. 126 adet DNA bandının toplamda 54 tanesi tüm örneklerde çoğaldığından monomorfik olarak değerlendirilmiştir. Polimorfik bant sayısı ise 72 olarak tespit edilmiştir. Dolayısı ile test edilen örnekler arasında % 42.85 oranında benzerlik (monomorfizm) hesaplanırken, % 57.15 oranında da polimorfizm hesaplanmıştır. RAPD sonuçlarından elde edilen "0" ve "1" matriksinin SPSS 10.0 programı, Hierarchical Cluster Analysis (Sıradüzensel Kümeleme Çözümlemesi) fonksiyonu kullanılarak örnekler arasındaki genetik uzaklık belirlenmiştir. Doz artımına bağlı olarak genetik uzaklığın arttığı tespit edilmiştir. 0.5, 1, 3 ve 5 mM Pb uygulamaları kontrol grubuna göre sırasıyla 0.26, 0.33, 0.40 ve 0.59 genetik uzaklıkta olduğu hesaplanmıştır. Genetik uzaklık değerleri üzerinden Euclidean distance ve average linkage (unweighted pair-group average) metodu kullanılarak bir dendrogram (hiyerarşi ağacı) çizilmiştir (Şekil 4.15). 0.5, 1 ve 3 mM Pb uygulanmış örnekler bir alt küme oluşturmuştur. Bu küme kurşun uygulamasının yapılmadığı kontrol grubu ile birleşmiştir. 5 mM Pb uygulama örnekleri ise ayrı bir küme oluşturmuştur.

Kurşun ile uygulamaya maruz bırakılmış örneklerde yeni bantların varlığı ve/veya yokluğu tespit edilmiştir. Bu bantlar Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. Genellikle bant kayıpları büyük moleküler ağırlığa sahip bantlarda meydana gelmiştir. Kontrol grubu RAPD profilinde mevcut olan ve OPB 7 ile elde edilmiş 2 928 bç ebatlı; OPB 9 ile elde edilmiş 2 344 ve 1 592 bç ebatlı; OPB 10 ile elde edilmiş 2 440 ve 1 823 bç ebatlı; OPB 11 ile elde edilmiş 1 591 ve 1 356 bç ebatlı; OPB 12 ile elde edilmiş 2 875, 2 660 ve 2 342 bç ebatlı; OPB 15 ve OPB 17 ile elde edilmiş 1 714 bç ebatlı DNA bantları tüm kurşun uygulama örneklerinde kaybolmuştur (Çizelge 4.3). Dolayısı ile primerler OPB 7,9,10,11,12,15 ve 17 elde edilen RAPD profillerinde daha çok mevcut bantların kaybolması gözlenmiştir. Bununla birlikte OPB 12 haricinde kullanılan tüm primerler kontrol grubu RAPD profilinde mevcut olmayan bazı yeni bantları kurşunla muamele edilmiş örneklerde çoğaltmıştır. OPB 18 primeri ile kurşun uygulanan örneklerde kontrol grubuna göre toplam 7 yeni DNA bandı (2912, 1108, 1000, 927, 672, 559, 403 bç ebatlı) çoğalması gözlenmiştir (Çizelge 4.3). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 0.5, 1, 3 ve 5 mM Pb uygulanmış örneklerde yeni oluşan veya kaybolan bantların toplam sayısı sırası ile 31, 46, 40 ve 52 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). 0.5, 1 ve 5 mM Pb uygulama örneklerinde kaybolan DNA bantlarının sayısı, oluşan yeni bantların sayısına eşit veya fazla olmasına karşın, 3 mM Pb uygulama örneklerinde ise yeni oluşan bantların sayısının kaybolan bantların sayısından daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

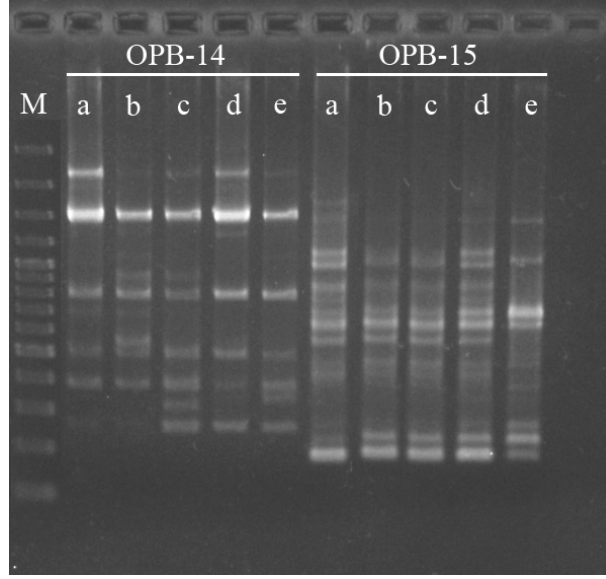
Tüm örneklerde ortak olarak, oluşan her bir bandın parlaklığı kontrol grubu DNA bandına göre parlaklıktaki bir artma veya azalma şeklinde değerlendirilmiştir. Kurşun uygulamasının RAPD bantlarının parlaklıklarını değiştirdiği gözlenmiştir (Çizelge 4.4). Kaybolan, yeni oluşan, parlaklığı artan veya azalan bantların tümü bir arada değerlendirildiğine, 0.5, 1, 3 ve 5 mM Pb uygulanmış örneklerin RAPD profillerinde kontrol grubuna göre sırasıyla 77, 91, 91 ve 99 bantta değişme tespit edilmiştir (Çizelge 4.4).



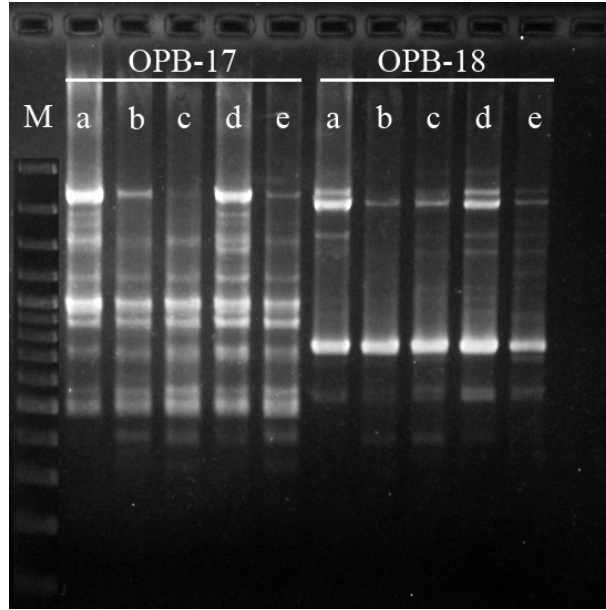
Şekil 4.10 Altı gün süre ile farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılmış yem şalgamı fidelerinin yapraklarından elde edilen genomik DNA'ların OPB 7, OPB 8 ve OPB 9 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri. M: markör, a: kontrol, b: 0.5 mM Pb, c: 1 mM Pb, d: 3 mM Pb, e: 5 mM Pb



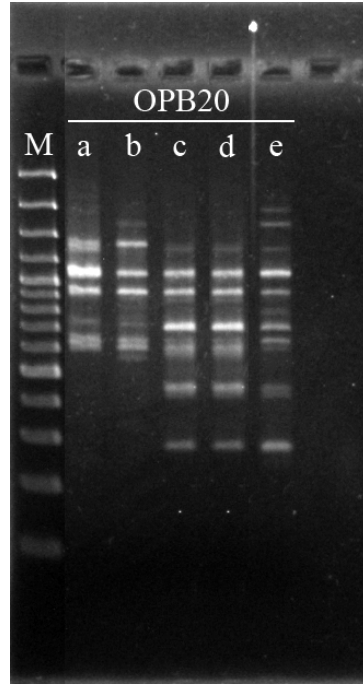
Şekil 4.11 Altı gün süre ile farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılmış yem şalgamı fidelerinin yapraklarından elde edilen genomik DNA'ların OPB 10, OPB 11 ve OPB 12 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri. M: markör , a: kontrol, b: 0.5 mM Pb, c: 1 mM Pb, d: 3 mM Pb, e: 5 mM Pb



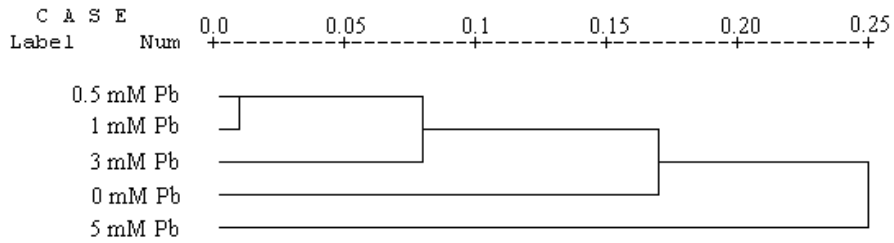
Şekil 4.12 Altı gün süre ile farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılmış yem şalgamı fidelerinin yapraklarından elde edilen genomik DNA'ların OPB 14 ve OPB 15 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri. M: markör, a: kontrol, b: 0.5 mM Pb, c: 1 mM Pb, d: 3 mM Pb, e: 5 mM Pb



Şekil 4.13 Altı gün süre ile farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılmış yem şalgamı fidelerinin yapraklarından elde edilen genomik DNA'ların OPB 17 ve OPB 18 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri. M: markör, a: kontrol, b: 0.5 mM Pb, c: 1 mM Pb, d: 3 mM Pb, e: 5 mM Pb



Şekil 4.14 Altı gün süre ile farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılmış yem şalgamı fidelerinin yapraklarından elde edilen genomik DNA'ların OPB 20 primeri ile elde edilen RAPD profilleri. M: markör, a: kontrol, b: 0.5 mM Pb, c: 1 mM Pb, d: 3 mM Pb, e: 5 mM Pb



Şekil 4.15 Kurşunun farklı konsantrasyonlarının etkisinde 6 gün bırakılan yem şalgamı fidelerinin yaprak örneklerinden elde edilen RAPD verilerinin SSPS programı Hierarchical Cluster Analysis (Sıradüzensel Kümeleme Çözümlemesi) opsiyonundaki Euclidean distance ve average linkage (unweighted pair-group average) metodu kullanılarak oluşturulan dendrogram.

Çizelge 4.2 RAPD çalışmalarında kullanılan primerler, elde edilen DNA bantlarının moleküler büyüklükleri, kontrol grubu bant sayıları, monomorfik ve polimorfik bant sayıları.

Primerler	G+C (%)	5'→3' sekansı	En büyük DNA bandı (bç)	En küçük DNA bandı (bç)	Kontrol bant sayısı	Monomorfik bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	Toplam bant sayısı
OPB-07	70	GGTGACGCAG	2928	281	8	6	3	9
OPB-08	70	GTCCACACGG	2162	389	7	3	9	12
OPB-09	70	TGGGGGACTC	2344	400	9	3	9	12
OPB-10	70	CTGCTGGGAC	2440	313	9	7	4	11
OPB-11	60	GTAGACCCGT	1591	480	6	4	4	8
OPB-12	60	CCTTGACGCA	2875	351	10	4	6	10
OPB-14	50	TCCGCTCTGG	2243	243	7	5	6	11
OPB-15	60	GGAGGGTGTT	1714	189	12	5	10	15
OPB-17	60	AGGGAACGAG	2353	410	10	8	5	13
OPB-18	60	CCACAGCAGT	2912	403	6	5	9	14
OPB-20	60	GGACCCTTAC	1897	288	6	4	7	11
<b>Toplam</b>					<b>90</b>	<b>54</b>	<b>72</b>	<b>126</b>
					Monomorfizm %	42.85		
					Polimorfizm %	57.15		

Çizelge 4.3 Kurşun stresinde 6 gün bırakılan yem şalgamı fide yapraklarında Uvi-Software programı kullanılarak belirlenen yeni ortaya çıkan ve kaybolan bantların moleküler büyüklükleri (baz çifti; bç)

Primer	Kurşun konsantrasyonu (mM)				
	0.5	1	3	5	
OPB-7	+	281	281	281	281
	-	2928	2928; 1437	2928	2928
OPB-8	+	712	915; 712; 514	915; 712; 595; 389	915; 595
	-	2162; 1487	2162; 1962; 1487	1962	2162; 1962; 1773; 1487
OPB-9	+	525	592	592	525; 438
	-	2344; 1592	2344; 1592; 1315	2344; 1592	2344; 1592; 1315; 1211; 651
OPB-10	+	0	872	655	655
	-	2440; 1823	2440; 1823	2440; 1823	2440; 1823
OPB-11	+	1064	1064	1064; 826	1064; 826
	-	1591; 1356	1591; 1356	1591; 1356	1591; 1356
OPB-12	+	0	0	0	0
	-	2875; 2660; 2342	2875; 2660; 2342	2875; 2660; 2342	2875; 2660; 2342; 1452; 1277; 1000
OPB-14	+	925; 528	925; 310	1265	310
	-	0	689	689	689
OPB-15	+	250	250	740; 368; 250	368; 250
	-	1714; 1469; 833	1714; 1469; 833	1714	1714; 1056; 980; 833; 550; 414
OPB-17	+	410	410	740; 368; 250	410
	-	1935; 1714	1935; 1714	1714	1935; 1714
OPB-18	+	1000; 927; 672; 403	1000; 927; 559; 403	2912; 1108; 1000; 927; 672; 559; 403	1108; 1000; 927; 559
	-	2349	0	0	0
OPB-20	+	1660	700; 444; 288	700; 444; 288	1897; 1660; 700; 444; 288
	-	0	788; 600	788	0

“+” yeni bir bandın çoğaldığını ve “-” mevcut bir bandın kaybolduğunu göstermektedir.



Çizelge 4.4 Kurşun stresinde 6 gün bırakılan yem şalgamı fidelerinde kontroldeki toplam bant değişimleri, polimorfik bantlar ve durumu değişen bantların sayıları

Primerler	Kurşun konsantrasyonu (mM)																
	0	0,5 mM				1 mM				3 mM				5 mM			
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>
OPB7	8	1	1	5	1	2	1	3	0	1	1	4	2	1	1	5	2
OPB8	7	2	1	4	1	3	1	3	0	1	1	2	1	4	2	2	2
OPB9	9	2	0	4	1	3	1	2	1	2	1	1	3	5	1	3	1
OPB10	9	2	1	2	4	2	1	2	2	2	2	0	4	2	2	0	6
OPB11	6	2	0	1	1	2	0	0	3	2	0	1	2	2	0	1	2
OPB12	10	3	2	6	1	3	2	4	1	3	1	5	1	6	1	2	0
OPB14	7	0	1	2	1	1	1	3	2	1	3	2	2	1	1	2	2
OPB15	12	3	1	2	1	3	1	2	1	1	3	4	3	6	1	2	3
OPB17	10	2	4	3	1	2	4	3	4	2	7	0	4	2	4	2	2
OPB18	6	1	1	1	0	0	3	1	4	0	3	3	3	0	5	3	0
OPB20	6	0	1	3	1	2	3	3	1	1	3	3	1	0	5	4	1
Toplam	90	18	13	33	13	23	23	26	19	17	23	25	26	29	23	26	21
<i>a+b</i>		31				46				40				52			
<i>a+b+c+d</i>		77					91					99					

*a*, kaybolan bantları; *b*, yeni oluşan bantları; *c*, bant parlaklıklarındaki azalmayı; *d*, bant parlaklıklarındaki artmayı; *a+b*, polimorfik bantları; *a+b+c+d* ise toplamda durumu değişen bantları göstermektedir.

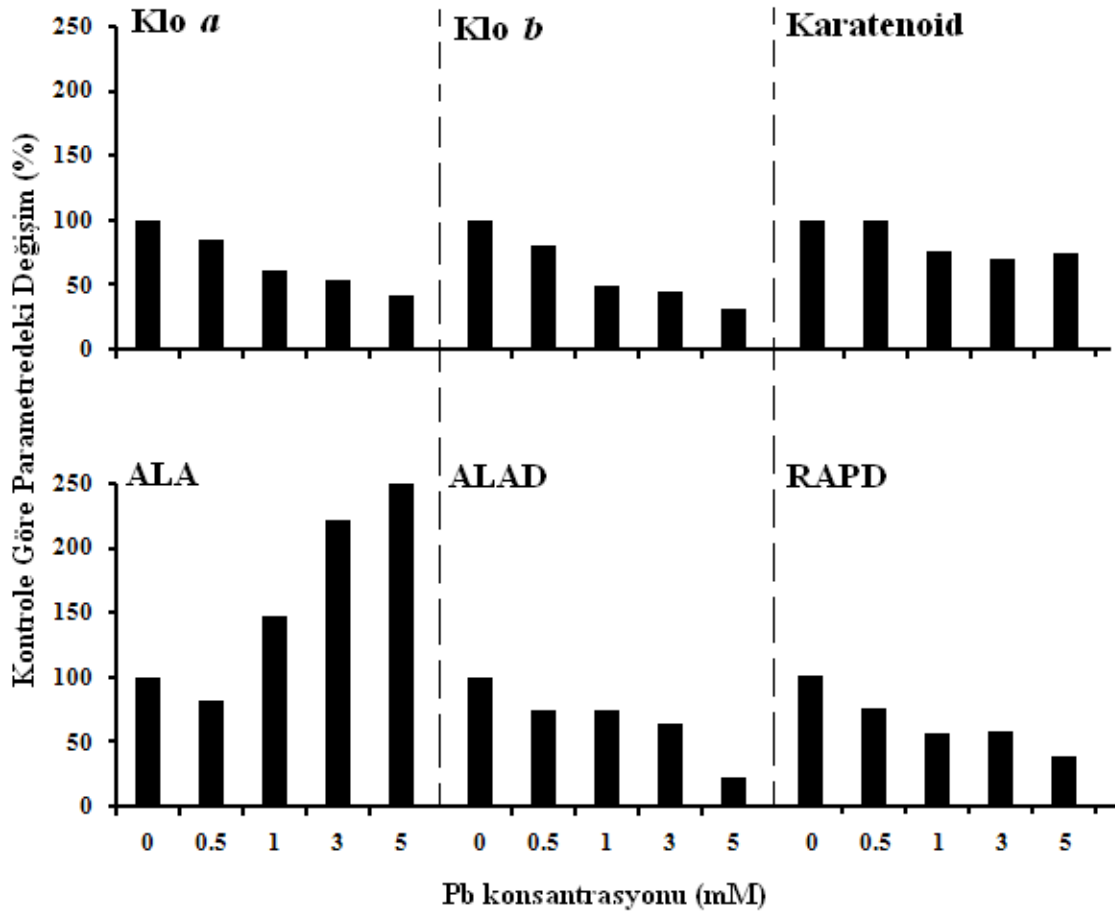
#### 4.8 Fotosentetik Pigment Miktarları, ALAD Aktivitesi, ALA Miktarı ve RAPD Profillerinin Karşılaştırılması

Her bir duyarlılık indeksini (GTS, fotosentetik pigment miktarları, ALAD aktivitesi, ALA miktarı) karşılaştırabilmek için, bu verilerin kontrollerine göre yüzde değişimleri Atienzar et al. (1999)'e göre tekrar düzenlenmiştir. RAPD profillerindeki değişimler GTS değerlerindeki bir azalma olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubu RAPD profillerine göre kurşuna maruz bırakılmış fidelerin RAPD profillerindeki değişim GTS değerlerine yansımıştır. Bu, meydana gelen değişikliklerin diğer parametrelerle rahatlıkla karşılaştırılabilmesini mümkün kılmıştır. Her bir primer için hesaplanan GTS değerleri Çizelge 4.5'de verilmiştir. Tüm primer ortalamaları dikkate alındığında, kontrol grubu RAPD profillerine göre, 0,5, 1, 3 ve 5 mM Pb ile muamele edilmiş bitkilerin GTS değerleri sırasıyla %67,3, %53,5, %54,9 ve %40,7 olarak hesaplanmıştır. GTS ve diğer biyokimyasal parametrelerin (fotosentetik pigment miktarları, ALAD aktivitesi, ALA miktarı) karşılaştırılması Şekil 4.16'da verilmiştir.

Çizelge 4.5 Kurşun stresinde 6 gün bırakılan yem şalgamı fide yapraklarında her bir primer için GTS değerlerindeki değişimler

Primerler	Pb konsantrasyonu (mM)				
	0	0,5	1	3	5
OPB7	100	75,0	62,5	75,0	75,0
OPB8	100	57,1	42,9	71,4	14,3
OPB9	100	77,8	55,6	66,7	33,3
OPB10	100	66,7	66,7	55,6	55,6
OPB11	100	66,7	66,7	66,7	66,7
OPB12	100	50,0	50,0	60,0	30,0
OPB14	100	85,7	66,7	33,3	50,0
OPB15	100	71,4	71,4	71,4	50,0
OPB17	100	40,0	40,0	20,0	40,0
OPB18	100	66,7	50,0	50,0	16,7
OPB20	100	83,3	16,7	33,3	16,7
Ortalama	100	67,3	53,5	54,9	40,7

Elde edilen sonuçlara göre kurşun dozunun artması ile birlikte K<sub>lo a</sub> ve K<sub>lo b</sub>, içerikleri, ALAD enzim aktivitesi ve GTS değerleri kontrol grubuna göre bir azalma göstermiştir. Bununla birlikte kurşun dozunun artırılmasıyla karotenoid miktarında göreceli bir azalma olmakla birlikte 5 mM Pb uygulamasından elde edilen karotenoid miktarında 3 mM Pb uygulamasına göre bir artış tespit edilmiştir. Kurşun dozunun artırılması ile birlikte yapraklarda biriken ALA miktarında bir artış meydana gelmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 5 mM Pb uygulaması ALA miktarında yaklaşık 2.5 kat bir artışa neden olmuştur.



Şekil 4.16 Kurşunun farklı konsantrasyonlarının etkisinde 6 gün bırakılan yem şalgamı fidelerinde kontrol grubuna göre fotosentetik pigment miktarları, ALAD aktivitesi, ALA miktarı ve genomik kalıp sabitliğinin (GTS) oransal olarak karşılaştırılması.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Ağır metallerle toprağın kirlenmesi çevresel stres koşullarından biridir. Artan endüstriyel kirlenme, kentsel faaliyetler ve tarımsal uygulamalar sonucunda bitki büyüme ortamında toksik düzeylerde ağır metallerin birikimi görülmektedir. Kadmiyum, krom, civa ve kurşun gibi ağır metaller bitkiler tarafından hiçbir şekilde değerlendirilemeyen toksik metallere aittir. Bu ağır metallerden kurşun, tüm dünyada doğal kaynaklar içinde çeşitli formlar halinde bulunan ve günümüzde en yaygın ve sürekli olarak karşılaşılan ağır metallerdendir (Bergmann 1992). Kurşun genellikle toprakta bulunmakla beraber, motorlu taşıtların egzoz gazları, maden ocakları, metal işleyen tesisler, endüstriyel faaliyetler, kurşun ile kirlenmiş atık sular, sanayi atıkları ve tarımda gübreleme gibi pek çok etmen bitkilerin maruz kaldığı kurşun kirlenmesinin başlıca sebepleridir. Yerkabuğu üzerindeki kurşun, geçmişte 16 µg/g olmasına karşın günümüzde özellikle topraktaki kurşun endüstriyel faaliyetler sonucunda büyük ölçüde artmıştır. Kurşunun, toprakta 5000 µg/g'ın, tatlı suda ve havada ise 10 µg/g'ın üzerine çıktığı bildirilmiştir (Pang et al. 1995). Havada ve toprakta bulunan yüksek miktarlardaki kurşunu bitkiler biriktirebilirler ve sonuç olarak toksisiteye maruz kalabilirler. Bitkilerde kurşun toksisitesinin şiddeti metalin absorpsiyonuna, hareketliliğine ve hücredeki bölgesel birikimine bağlıdır. Yüksek konsantrasyonlardaki ağır metallerin hem tolere edilebilir hem de biriktirilebilir üst sınırları bitki türlerine göre değişmektedir. Bitkilerdeki kurşun toksisitesinin önemli sonuçları olarak; kalsiyum metabolizmasının bozulması, çeşitli enzimlerin aktifliğini kaybetmesi, tohum çimlenmesinin olumsuz yönde etkilenmesi, karbondioksit asimilasyonu, fotosentez, solunum ve transpirasyonun engellenmesi ve dolayısıyla bitki gelişiminin baskılanması sayılabilir (Jiang et al. 2000).

Laboratuvar ortamlarında bitki tohumlarının yüksek miktarlarda kurşun stresine maruz bırakılması çimlenme oranlarında azalmalara veya çimlenmenin tamamen durmasına neden olabilir. Bitki tohumlarının kurşun stresi altında çimlenme yeteneklerinde farklı tepkiler rapor edilmiştir. Kontrol grubuna göre, 1 mM PbCl<sub>2</sub> ile muamele edilen mercimek (*Lens culinaris* Medik.) tohumlarında çimlenmenin %10 oranında (Kıran ve Şahin 2005), pirinç (*Oryza sativa*) tohumlarında ise (Verma and Dubey 2003) % 30 oranında azaldığı rapor edilmiştir. Kültüre alınmış iki farklı pirinç tohumunun (Ratna ve

IR 36) kullanıldığı başka bir çalışmada ise 10 µM PbCl<sub>2</sub> uygulamasının çimlenmeyi büyük oranda engellediği bildirilmiştir (Mishra and Choudhuri 1998). 1 ve 2 mM PbCl<sub>2</sub> uygulamalarının mercimek (*Lens culinaris* Medik.) tohum çimlenmesinde yaklaşık olarak % 10; 3 ve 4 mM PbCl<sub>2</sub> uygulamalarının ise sırasıyla % 55 ve % 65 oranında bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Kıran ve Munzuroğlu 2004). 0,5-8,0 mM PbCl<sub>2</sub> ile muamele edilen buğday (*Triticum aestivum* L.) ve salatalık (*Cucumis sativus* L.) tohumlarında en yüksek kurşun konsantrasyonlarında bile % 20'yi aşmayan çimlenme kayıpları gözlenmiştir (Munzuroğlu ve Geçkil 2002). Yüksek kurşun konsantrasyonları (10.000 mg/l) *Phaseolus vulgaris*, ve *Brassica napus* var. Zerowy tohumlarında çimlenmeyi önemli oranda engellemiş, *Pisum sativum*'da ise çimlenmeyi tamamen durdurmuştur (Wierzbicka and Obidzinska 1998). Yine farklı kurşun konsantrasyonlarının *Oryza sativa* L., *Sinapsis alba* ve *Lens esculenta* tohumlarında çimlenmeyi değişik oranlarda engellediği tespit edilmiştir (Ayaz ve Kadioğlu 1997). 0-12 mM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ile muamele ettiğimiz yem şalgamı tohumlarında doz artımına bağlı olarak çimlenme kayıpları tespit edilmiştir. Bulgularımıza göre 2 ve 4 mM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> uygulamaları yem şalgamında çimlenmeyi yaklaşık olarak % 12 oranında azaltmıştır. Bununla birlikte, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 8, 10 ve 12 mM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> uygulamaları yem şalgamı tohumlarında çimlenmeyi sırasıyla % 36, % 52 ve % 89 oranlarında engellemiştir. Kurşun stresine maruz bırakılan bitki türlerinin farklı çimlenme tepkileri vermeleri, tohum kabuklarının kurşunu farklı oranlarda tohum içine geçirmeleri şeklinde açıklanmıştır (Wierzbicka and Obidzinska 1998).

Bitki kök ve fideleri absorbe edilen kurşuna karşı büyüme hızlarını değiştirerek cevap verirler (Sharma and Dubey 2005). Düşük kurşun konsantrasyonları ile muamele edilen *Lupinus luteus*, *Sesamum indicum*, *Sinapsis alba* (hardal) *Raphanus sativus* (turp) ve *Lactuca sativa* tohumlarının çimlenmesinde, fidelerin kök ve gövde uzunluklarında, kontrole göre belirgin bir farkın olmadığı, ancak yüksek kurşun konsantrasyonlarında tohumların çimlenmelerinde, kök ve gövdenin uzamasında konsantrasyon artışıyla birlikte azalma olduğu, ayrıca kökün gövdeye göre daha fazla etkilendiği bildirilmiştir (Fargasova 1994). Farklı konsantrasyonlarda Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> uygulamalarının *Brassica pekinensis* Rupr. (Xiong 1998), *Brassica juncea* L. (Jiang and Liu 1999), *Triticum aestivum* ve *Cucumis sativus* (Munzuroğlu ve Geçkil 2002) ve *Lens culinaris*'te (Kıran

ve Şahin 2005) kök ve fide gelişimini engellediği bildirilmiştir. Bulgularımıza göre, ağır metal solüsyonunun konsantrasyonundaki artış ile kök ve gövde büyümesinin inhibisyonu arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir. Örneğin, 2 mM Pb uygulaması kontrol grubuna göre kök ve gövde uzunluklarını sırası ile % 78,3 ve % 39,1 oranında azaltmıştır. Yani gövdeye göre kökün kurşuna karşı daha hassas olduğu bulunmuştur. Gövdenin daha az zarar görmesi, kök sistemindeki endodermisin kurşuna karşı bir bariyer oluşturarak kurşunun bitki gövdesine taşınmasının engellemesiyle açıklanmaktadır (Verma and Dubey 2003). Ayrıca, kurşun stresi altında kök büyümesindeki şiddetli inhibisyonun nedeni olarak kök meristemindeki hücrelerin uzamasının ve/veya hücre bölünmesinin zarar görmesi gösterilmektedir (Sharma and Dubey 2005). Çimlenme, kök ve fide gelişimi verilerinden elde ettiğimiz bulgulara göre yem şalgamı bitkisinde kurşun toksisitesinden etkilenme sırası kök gelişimi>gövde gelişimi>çimlenme oranı şekline belirlenmiştir.

Ağır metal stresine bağlı olarak bitkilerde meydana gelen fizyolojik ve biyokimyasal değişimlerle birlikte DNA seviyesinde gerçekleşen tahribatların değerlendirmesinde bitki dokularında biriken ağır metallerin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Kurşunun bitki köklerinden gövdeye hareketini kök endodermisi önemli ölçüde engeller. Bu durum kurşunun bitki köklerinde toprak üstü organlara göre daha çok birikmesi ile sonuçlanır (Verma and Dubey 2003). Endodermisteki kaspari şeridinin, kurşunun endodermisten merkezi silindire taşınımını kısıtlayan en önemli faktör olduğu bildirilmiştir (Seregin and Ivanov 1997). Laboratuvar ortamlarında gerçekleştirilen çalışmalarda, bitki köklerinin gövdelere göre daha fazla kurşun biriktirdiği rapor edilmiştir. Örneğin, 96 sa boyunca 1 mM Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ile muamele edilmiş *P. sativum* fidelerinin köklerinde yaklaşık olarak 50,500 mg/kg K.A. kurşun birikmesine rağmen fidelerin toprak üstü organlarında yaklaşık 5,000 mg/kg K.A. kurşun birikimi tespit edilmiştir (Piechalak et al. 2003). Çeşitli konsantrasyonlarda (0-2.4 mM) Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ile 24 saat muamele edilen tütün fidelerinin (*Nicotiana tabacum* L. var. *xanthi*), köklerinde ve gövdelerinde en fazla kurşun birikimi 2.4 mM Pb uygulamasında belirlenmiştir. Bu uygulamada, tütün fide kökleri 57,800 mg/kg K.A. kurşun biriktirmişken, toprak üstü organlarda ancak 1,460 mg/kg K.A. kurşun içeriği tespit edilmiştir (Gichner et al. 2008). 1000 ppm Pb solüsyonu ile uygulamaya bırakılmış *P. salicifolium* fide

köklerinde 131,600 mg/kg K.A. kurşun birikirken aynı şartlarda bitki gövdesinde 5,500 mg/kg K.A. kurşun biriktiği rapor edilmiştir (Doğan 2002). *Lupinus luteus*, *Pisum sativum*, *Vicia faba* ve *Phaseolus vulgaris* ile yapılan çalışmalar da köklerde % 90'ın üzerinde Pb biriktiğini göstermektedir (Piechalak et al. 2003).

*Brassicaceae* familyasına ait bitki türlerinin büyük bir kısmının, dokularında fazla miktarda ağır metal biriktirme yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Bu bitki familyasının bazı üyeleri köklerinde 100,000 mg/kg K.A. kurşundan, toprak üstü organlarında ise 10,000 mg/kg K.A. kurşundan daha fazla kurşun biriktirebilme yeteneğine sahiptir (Kumar et al. 1995). Çalışmamızda kullandığımız ve *Brassicaceae* familyası içerisinde yer alan yem şalgamı bitkisinin kök ve gövdesinde kurşun biriktirme bakımından oldukça kabiliyetli olduğu tespit edilmiştir. Yapılan kurşun birikimi analizlerine göre, uygulanan kurşun miktarındaki artış ile birlikte kök ve gövdedeki kurşun içerikleri artmıştır. Ayrıca, mevcut literatür bilgileri ile uyum içinde olarak, kökler gövdelere göre daha fazla miktarda kurşun biriktirmiştir. ICP-OES okumalarından elde edilen en yüksek kök ve gövde kurşun içerikleri 5 mM Pb'ye maruz bırakılmış fideler için sırası ile 138,300 ve 77,300 mg/kg K.A. kurşun olarak belirlenmiştir.

Kadmiyum, krom ve kurşun gibi ağır metallerin bitkilerde fotosentetik pigment miktarını ve dolayısıyla fotosentez oranını azaltarak bitki metabolizmasına farklı şekillerde zarar verdiği bilinmektedir (Prasad and Prasad 1987, Chatterjee and Chatterjee 2000, Vajpayee et al. 2000). Fotosentez oranının azalmasına; kloroplastların ultra-yapısının bozulması, klorofil, plastokinon ve karotenoid sentezinin sınırlandırılması, Calvin döngüsünün enzim aktivitelerinin inhibe edilmesi ve stomaların kapanmasından dolayı meydana gelen CO<sub>2</sub> eksikliği neden olmaktadır. Ayrıca farklı bitki türlerinden izole edilen kloroplast ve mitokondrilerde kurşunun elektron taşıma sistemindeki elektronların akışını etkilediği de rapor edilmiştir (Seregin and Ivanov 1997). Kurşun uygulanan *Brassica oleracea* var. *botrytis* bitkisinde klorofil *a* ve klorofil *b* miktarlarının kontrole göre önemli düzeyde azaldığı bildirilmiştir (Chatterjee and Chatterjee 2000). Benzer bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda kurşuna maruz bırakılan *Phaseolus vulgaris* L. fidelerinde klorofil sentezinde görevli

enzimlerin aktivite kaybına bağı olarak, total klorofil miktarının da azaldığı rapor edilmiştir (Verma and Dubey 2003). Araştırmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre, fotosentetik pigment miktarları [(klorofil a ve b (Klo *a* ve *b*) ve karotenoidler] kontrol grubuna göre önemli derecede bir azalma göstermiştir Yapılan bir çalışmada, özellikle klorofil *b*'nin klorofil *a*'dan daha fazla etkilendiği bildirilmiştir (Vodnik et al. 1999). Yaptığımız çalışmada da, klorofil *b*'nin klorofil *a*'dan daha fazla etkilendiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla, klorofil a/b oranı kontrole göre artmıştır fakat bu artış istatistiki bakımdan önemli ( $P < 0.05$ ) bulunmamıştır. Stres indikatörü olarak bilinen klorofil a/b oranının artması ve azalması ile ilgili farklı çalışma sonuçları rapor edilmiştir. Örneğin bakır, çinko ve kurşunun *Cladonia convoluta* ve *Cladonia rangiformis* likenlerinde klorofil a/b oranını azalttığı (Chettri et al. 1998) bildirilmişken, yüksek bakır-nikel içeren topraklarda yetiştirilen *Empetrum nigrum* bitkisinde ise metal etkisiyle bu oranın arttığı rapor edilmiştir (Monni et al. 2001). Kurşun stresine bağı olarak klorofil miktarının azalmasına sebep olarak, klorofil sentezinde görev alan bazı enzimlerin inhibe olması gösterilmektedir (Prasad and Prasad 1987).

Metal stresi altındaki (Pb, Hg ve Cd) karasal bitkilerde ALAD aktivitesinin azalması ile birlikte klorofil biyosentezinde de bir yavaşlamanın olduğu önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Prasad and Prasad 1987). Mevcut çalışmamızda; tespit ettiğimiz fotosentetik pigment miktarlarındaki düşüşle birlikte, kurşun stresine bırakılan yem şalgamı fide yapraklarında kurşun konsantrasyonunun artışına bağı olarak ALAD aktivitesinde bir azalma ve ALA miktarında ise artma belirlenmiştir. Kurşun uygulanan bitkilerdeki klorofil miktarlarındaki düşüşün klorofil biyosentezi için gerekli olan PBG'nin daha az elde edilmesine neden olan ALAD aktivitesindeki azalış ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Prasad and Prasad 1987, Vajpayee et al. 2000). Bulgularımıza göre, kurşun stresi ile birlikte klorofil miktarlarındaki düşüş ALAD aktivitesinde meydana gelen azalma ile pozitif bir korelasyon göstermiştir. Klorofil biyosentezinde önemli bir ara metabolit ve ALAD enzimi için substrat olarak görev yapan ALA miktarındaki, kurşun dozuna bağı olarak gerçekleşen artışın ALAD aktivitesindeki azalmayla ilgili olduğu sanılmaktadır. Dolayısı ile bulgularımız kurşun toksisitesine karşı ALA sentezinin duyarlı olmadığını göstermiştir. Farklı konsantrasyonlardaki kromla birlikte azalan klorofil içeriği ve azalan ALAD aktivitesi ile birlikte ALA miktarında önemli



seviyedeki bir artış, *Nymphaea alba* L. bitkisi için de rapor edilmiştir (Vajpayee et al. 2000). Bununla birlikte klorofil biyosentezinin bir sonraki aşaması olan ve ALAD tarafından katalizlenen PBG oluşumu kurşun toksisitesine karşı oldukça hassastır. Muhtemelen kurşunun ALAD üzerindeki etkisi yeni oluşan ALA'nın kullanımını engelleyerek ve sonuçta da klorofil seviyesinin azalmasıyla meydana gelmiştir. ALAD bir metaloenzimdir (Beale 1978) ve bitkilerdeki aktivitesi Mg'nin kullanılabilirliğine bağlıdır. Bu yüzden kurşun enzimin aktif bölgesindeki metal ile yer değiştirerek ALAD aktivitesinin azalmasına yol açmış olabilir. Bunun yanı sıra kurşunun enzim aktivitesini engellemesi enzimin –SH gruplarıyla etkileşimi sonucu olmuş olabilir. Kurşun enzimin aktif bölgesindeki serbest –SH gruplarıyla etkileşime girer. –SH grupları, enzim aktivitesi için gerekli olmasının yanı sıra enzimin tersiyer yapısının korunmasında da görev yaparlar (Levina 1972).

Biyozleminin temel amacı etkin ve uygulanabilir ekolojik kontrol sistemi için veri temin etmektir. Hassas testlerle gerçekleştirilen biyozleme, kirliliğin etkileri hakkındaki bilgileri erken bir uyarı sistemi olarak temin eder. Birçok kirletici madde genotoksik etki gösterdiğinden, mevcut veya potansiyel kirleticilerle ilgili olarak genotoksik problemlerin test edilmesi oldukça önemlidir (Xue-mei et al. 2006). DNA'da meydana gelen değişikliklerin belirlenmesi genotoksik bir maddenin etkisini izlemede etkin bir metot olarak kabul edilmektedir. Ağır metal gibi kimyasalların bitkilerdeki genotoksik etkileri, comet ve mikronükleus gibi test yöntemleriyle belirlenmekle birlikte (Steinkellner et al. 1998), DNA hasarının moleküler mekanizması hakkında ve sekans seviyesinde bilgi temini amacı ile RAPD (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) ve AFLP (Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi) gibi moleküler markör teknikleri son zamanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Savva 1998). Bu çalışmada, 6 günlük kurşun stresinin sonunda elde ettiğimiz bazı fizyolojik ve biyokimyasal verilere ek olarak kurşun tarafından uyarılan DNA değişikliklerinin belirlenmesi için de RAPD yöntemi kullanılmıştır.

Kurşunun DNA üzerine olan etkileri insan, hayvan (Valverde et al. 2001, Danadevi et al. 2003, Wozniak and Blasiak 2003) ve bitki (Rucinska et al. 2004, Gischner et al. 2008) sistemlerinde comet testi ve mikronükleus testi (Lerda 1992, Liu et al. 1994,

Sharma and Dubey 2005, Çavuşoğlu vd. 2007) kullanılarak belirlenmeye çalışılmış olmasına rağmen, kurşunun moleküler anlamda genotoksik etki mekanizması çok iyi bilinmemektedir (Danadevi et al. 2003, Wozniak and Blasiak 2003, Gischner et al. 2008).

6 gün boyunca 0, 0.5, 1, 3 ve 5 mM Pb uygulamasını takiben elde edilen genomik DNA'ların 11 adet primerle birlikte RAPD analizlerinde kullanılması sonucunda 189-2928 baz çifti (bç) ebatlarında 126 adet DNA bandı amplifiye olmuştur. Kontrol grubuna göre, kurşunla muamele edilmiş fide yapraklarının RAPD profilleri arasında önemli değişiklikler tespit edilmiştir. RAPD sonuçlarına göre kontrol grubu ile uygulama grupları karşılaştırıldığında artan kurşun konsantrasyonuna bağlı olarak genetik uzaklıklar da artmıştır.

Çalışmamızda, kontrol grubu RAPD profilleri ile karşılaştırıldığında, kurşun uygulanmış fidelerde uyarılan DNA hasarı RAPD profillerinde bant parlaklıklarındaki değişim, bantların kaybolması ve yeni bantların ortaya çıkması gibi değişikliklere neden olmuştur. RAPD profillerindeki bu tip değişikliklerin kaynağı, tek baz değişimlerinden (nokta mutasyonları) karmaşık kromozomal düzenlemelere (kromozomal aberasyonlar) kadar geniş bir spektrumda yer alan, kurşun ile uyarılan genomdaki DNA değişimleridir. RAPD profillerindeki bu değişimler ekotoksikolojide kullanışlı bir biyomarkör olarak değerlendirilmektedir (Atienzar et al. 1999). Tespit edilen bant parlaklıklarındaki değişimler ve bantların kaybolması; (i) nokta mutasyonlarından, (ii) primer bağlanma yerindeki DNA hasarından dolayı oligonükleotit bağlanma yerlerinde gerçekleşen değişikliklerden, ve (iii) hasarlı DNA ile *Taq* DNA polimerazın etkileşimlerinden kaynaklanmış olabilir (Atienzar and Jha 2006). Bu tip lezyonlar PCR reaksiyonu sırasında *Taq* DNA polimeraz enziminin polimerizasyon yeteneğini kısıtlar veya bloke eder (Atienzar and Jha 2006). Mevcut RAPD bulgularımıza göre 1 ve 5 mM Pb uygulamaları kontrol grubundaki çok sayıdaki bandın kaybolmasına neden olmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 0.5 mM Pb uygulaması özellikle bant parlaklıklarında azalmalara; 1, 3 ve 5 mM Pb uygulamaları ise bant parlaklarında artmalara neden olmuştur (Çizelge 4.4). DNA'daki hasarlı bölgelerin varlığından dolayı DNA polimeraz enziminin kalıp DNA'nın farklı bölgelerindeki polimerizasyon

yerlerine dağılımındaki dengesizlik DNA parlaklıklarında değişikliklere neden olabilmektedir (Atienzar and Jha 2006).

Yukarıda sayılan çeşitli DNA lezyonlarının ve mutasyonların varlığı, PCR olaylarının kinetiğini etkileyebilecek önemli yapısal değişiklikleri uyarabilir (Liu et al. 2005). Yeni PCR ürünlerinin oluşmasının nedenleri arasında; (i) bazı oligonükleotid primer yerlerindeki yapısal değişiklikten sonra oligonükleotid primerlerinin bağlanması, (ii) yeni bağlanma yeri olayları ile sonuçlanan mutasyonlar, (iii) mevcut iki primer bağlanma yerini daraltarak bir araya getiren büyük delesyonlar ve (iv) homolog rekombinasyonlar sayılabilir (Liu et al. 2005). Mevcut çalışmada 1, 3 ve 5 mM Pb uygulamalarında 23'er yeni bant belirlenmişken, 0.5 mM Pb uygulamasında ise 13 yeni bant oluşumu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). Diğer uygulama gruplarından farklı olarak, 3 mM Pb uygulaması ile belirlenen yeni bant sayısı kaybolan bant sayısından fazla bulunuştur, bu durum DNA ve Pb arasındaki rastgele etkileşimi göstermektedir.

RAPD profillerinde meydana gelen değişikliklerin genomik kalıp sabitliği (GTS) şeklinde değerlendirilebileceği gösterilmiştir (Atienzar et al. 1999). Genotoksik etkinin nitel bir ölçütü olan GTS değerleri diğer parametrelerde meydana gelen değişikliklerle rahatlıkla karşılaştırılabilir (Atienzar et al 1999, Atienzar et al. 2002, Liu et al. 2005, Liu et al. 2007). Toksik kirleticilere maruz bırakılarak RAPD profillerindeki değişikliklerin uyarılması, genomik kalıp sabitliği (GTS) ile bağlantılıdır. GTS (%) oranları genotoksik etki sürecinde ölçülmüş fizyolojik-biyokimyasal parametrelerle karşılaştırılabilir (Atienzar et al. 1999). Bu araştırmada genomik kalıp sabitliğinin toplam protein ve karotenoid içeriğinden daha hassas olduğu; klorofil *a*, klorofil *b* içerikleri ve ALAD aktivitesiyle ise benzer hassaslığa sahip olduğu gösterilmiştir. Benzer çalışma sonuçları Atienzar et al. (1999), Atienzar et al. (2002), Labra et al. (2003), Xue-mei et al. (2006), Liu et al. (2005), Liu et al. (2007) tarafından da rapor edilmiştir. Labra et al. (2003) RAPD veya AFLP yöntemlerinin, mutasyonlara henüz dönüşmemiş olan geçici DNA değişikliklerini bile tespit edebildiğinden (Savva 1998) mikronükleus ve comet gibi klasik genotoksik testlerden daha hassas olduğunu ileri sürmüştür.

Her ne kadar RAPD tekniği bu çalışmada kurşunla uyarılmış DNA değişikliklerinin teşhisi için güvenilir sonuçlar üretmiş olsa da, ileriki deneylerle bunun geçerliliğinin kanıtlanması gerekmektedir. RAPD tekniği kullanılarak genotoksisitenin belirlenmesi kapsamında en zor aşama jelde gözlenen değişikliklerin yorumlanmasıdır. Örneğin bu çalışmada kurşun dozunun arttırılması ile DNA değişikliklerindeki sıklık artmış olmakla birlikte bu değişikliklerin mutasyonlara dönüşüp dönüşmediği kesin değildir. Ayrıca, RAPD tekniğinin DNA hasarı ve mutasyonları ne kadar etkin bir şekilde belirlediğinden emin olmak için RAPD sonuçlarının, kromozom aberasyonlarını ve DNA iplik kırıklarını belirleyen bazı DNA analiz metotları ile desteklenmesinde fayda vardır. Buna ek olarak, RAPD profillerinde kaybolan veya yeni ortaya çıkan DNA bantlarının sekans bilgisine ulaşılması RAPD sonuçlarını daha güvenilir kılacaktır.

Sonuç olarak, RAPD analizi ile tespit edilen DNA polimorfizmi çevresel toksikolojide yararlı bir biyomarkör olarak kullanılabilir. Ayrıca, fotosentetik pigment miktarları, ALAD aktivitesi ve ALA miktarı gibi diğer parametrelerle birlikte RAPD analizinin güçlü bir ekotoksikolojik yöntem olduğu bu çalışmada sunulan bulgularla gösterilmiştir. Kurşuna maruz kalmada ALAD aktivitesinin belirlenmesi de, bu enzimin kimyasal kirliliğin belirlenmesinde kullanışlı bir biyomarkör olabileceğini göstermiştir.

## KAYNAKLAR

- Abd-El Monem, H., Corradi, M., Gorbi, G., 1998, "Toxicity of copper and zinc to two strains of *Scenedesmus acutus* having different sensitivity to chromium", Environ. Exp. Bot., 40, 59-66.
- Acar, Z., Ayan, İ., Genç, N., 1997, "Samsun koşullarında yüzlek-eğimli arazilerde yetiştirilen mürdümük hat ve popülasyonlarının ot verimi ve bazı özelliklerinin belirlenmesi", Türkiye II. Tarla Bitkileri Kongresi, 441- 445, 22-25 Eylül, Samsun
- Alloway, B.J. and Ayres, D.C., 1993, "Chemical Principles of Environmental Pollution", Chapman & Hall, U.K., pp. 291.
- Anderson, P.M., Desnick, R.J., 1979, "Purification and Properties of  $\delta$ -Aminolevulinic Acid Dehydratase from Human Erythrocytes", J. Biol. Chem., 254, 6924-6930.
- Antonsie-wiez, D., 1990, "Analysis of the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* under the influence of Leda krin", Folia Histochemica et Cytobiologica, 26, 79-96.
- Antosiewicz D.M., 1992, "Adaptation of plants to an environment polluted with heavy metals", Acta Soc. Bot. Polon., 61: 281-299.
- Atienzar, F.A., Cordi, B., Evenden, A.J., 1999, "Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo[a]pyrene", Environ. Toxicol. Chem., 18: 2275–2282.
- Atienzar, F.A., Evenden, A.J., Jha, A.N., Depledge, M.H., 2002, "The use of random amplified polymorphic DNA assay as a biomarker for the detection of diverse genetic alterations: possible implication of confounding factors", Biomarkers 7, 94-101.
- Atienzar, F.A., Jha, A.N., 2006, "The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review", Mutation Research, 613, 76-102.
- Ayan, İ., Aşçı, Ö.Ö., Başaran, U., Mut, H., 2006, "Bazı Yem Şalgamı (*Brassica rapa* L.) Çeşitlerinin Verim Özellikleri", OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 21(3): 310-313.
- Ayaz, F.A., Kadioğlu, A., 1997, "Ağır metallerin (Zn, Cd, Cu, Hg) çimlenen *Lens esculenta* L. tohumlarındaki çözümlü protein bantları üzerine etkileri", Tr. J. of Bot., 21 (2), 85-88.

- Barcelo, J. and Poschenrieder, Ch., 1990, "Plant water relations as affected by heavy metals stress: A review", *J. Plant Nutrition*, 13(1), 1-37.
- Beale, S.I., 1978, "δ-Aminolevulinic acid in plants", *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 29, 95-120.
- Bergmann W., 1992, "Nutritional Disorders of Plants: Development, Visual and Analytical Diagnosis", New York, pp. 695.
- Bradford, M.M., 1976, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.*, 72, 248.
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J., Grenshoff, P.M., 1991, "DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers", *Biotechnology*, 9, 553-557.
- Chaney, R.L., Ryan, J.A., 1994, "Risk based standards for arsenic lead and cadmium in urban soils", Dechema, Frankfurt, Germany.
- Chatterjee, J. and Chatterjee, C., 2000, "Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower", *Environmental Pollution*, 109, 69-74.
- Cheh, A., and Neilands, J.B., 1976, "The aminolevulinic acid dehydratase: Molecular and environmental properties", *Struct. Bond.*, 29, 123-170.
- Chen, C.T., Chen, L-M., Lin, C.C., Kao, C.H., 2001, "Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper", *Plant Sci.*, 160, 283-290.
- Chettri, M.K., Cook, C.M., Vardaka, E., Sawidis, T., Lanaras, T., 1998, "The effect of Cu, Zn and Pb on the chlorophyll content of the lichens *Cladonia convoluta* and *Cladonia rangiformis*", *Environ. Exp. Bot.*, 39: 1-10.
- Chugh, L.K. and Sawhney, S.K., 1993, "Effect of cadmium on activities of some enzymes of glycolysis and pentose phosphate pathway in pea", *Biologia Plantarum*, 42 (3), 401-407.
- Conte, C., Mutti, I., Puglisi, P., Ferrarini, A., Regina, G., Maestri, E. and Marmoroli, N., 1998, "DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution", *Chemosphere*, 37, 2739-2749.
- Costa, G., Michaut, J.C. and Morel, J.L., 1994, "Influence of cadmium on water relations and gas exchanges in phosphorus deficient *Lupinus alba*", *Plant Physiol. Biochem.*, 32, 105.

- Cunningham, S.D., Ow, D.W., 1996, "Promises and prospects of phytoremediation", *Plant Physiology*, 110, 715-719.
- Çavuşoğlu, K., Yalçın, E., Ergene, A., Maraş, M., 2007, "Pb ve Hg ağır metal iyonlarının mısır, nohut, fasulye ve barbunya kök uçlarında mikronükleus oluşumu üzerindeki etkileri", VII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
- Danadevi, K., Rozati, R., Saleha Banu, B., Hanumanth Rao, P., Grover, P., 2003, "DNA damage in workers exposed to lead using comet assay", *Toxicology*, 187, 183-193.
- Dat, J., Vandenaabeele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D. and Van Breusegem, F., 2000, "Dual Action of the Active Oxygen Species During Plant Stress Responses", *Cell. Mol. Life. Sci.*, 57: 779-795.
- Doğan M., 2002, "*Polygonum salicifolium* Brous. Ex Willd.'de pH'in Kurşun Alınımına, Klorofil, Azot ve Proteim Miktarı ile Gelişmeye Etkileri", Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1990, "Isolation of plant DNA from fresh tissue", *Focus*, 12, 13-15.
- Ebbs, S.D. and Kochian, L.V., 1997, "Toxicity of zinc and copper to Brassica species: Implications for phytoremediation", *J. Of Environ. Quality*, 26, 776-781.
- El-Ghamery, A.A., El-Kholy, M.A. and El-Yousser, A., 2003, "Evaluation of cytological effects of Zn<sup>2+</sup> in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L.", *Mutation Research*, 537, 29-41.
- Enan, M.R., 2006, "Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect the genotoxic effect of heavy metals", *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 43, 147-154.
- Eun, S.O., Youn, H.S., Lee, Y., 2000, "Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*", *Physiol. Plant.*, 110: 357-365.
- Evans, G.M., Furlong, J.C., 2003, "Environmental Biotechnology, Theory and Application", University of Durham, UK and Taurus Biotech Ltd., pp. 285.
- Fargasova A., 1994, "Effect of Pb, Cd, Hg, As and Cr on germination and root growth of *Sinapis alba* seeds", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 52: 452-456.

- Fritsch, P., Rieseberg, L.H., 1996, "The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics", In: T.B. Smither, R.K. Wayne (Eds.), Molecular Genetic Approaches in Conservation, Oxford University Press, 55-73.
- Gibbs, P.N.B., Chaudhry, A.G. and Jordan, P.M., 1985, "Purification and properties 5-Aminolevulinatase from human erythrocytes", Biochem. J., 230, 25-34.
- Gibson, K.D., Laver, W.G., Neuberger, A., 1958, "Initial stages in the biosynthesis of porphyrins", Biochem. J., 70:71.
- Gichner, T., Plewa, M.J., 1998, "Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants", Mutation Research, 401: 143-152.
- Gichner, T., Znidar, I., Szakova, J., 2008, "Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants", Mutat. Res., 652(2): 186-90.
- Godbold, D.L., Kettner, C., 1991, "Lead influences root growth and mineral nutrition of *Picea abies* seedlings", J. Plant Physiol., 139, 95- 99.
- Grandjean P., 1992, "Health significance of metals-lead", Maxcy-Rosenau-Last Buc-blic Health and Preventive Medicine Ed: Last JM, Wallace RB, pp. 389-391.
- Gupta, P.K., Varshney, R.K., Sharma, P.C. and Ramesh, B., 1999, "Molecular markers and their applications in wheat breeding", Plant Breeding, 118, 369-390.
- Günay K., 1993, "Bitkisel Üretimde Besin Ürün Dengesi", 2. Baskı, Sayfa: 48-49, TCMB Yay. Ankara.
- Holub, Z. and Ostrolucka, G., 1984, "The effects cadmium and lead on pollen germination and pollen tube growth in *Quercus cerris*, *Pinus nigra* and *Picea abies*", Biologia (Bratisl.), 38, 393-400.
- Huang, J.W., Cunningham, S.D., 1996, "Lead Phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation", New Phytol., 134: 75-84.
- Işık K., 2004, "Bitki Biyolojisi", Palme Yayıncılık, Ankara.
- Jiang, W., Liu, D., Hou, W., 2000, "Hyper accumulation of lead by roots, hypocotyls, and shoots of *Brassica juncea*", Biologia Plantarum, 43(4), 603-606.
- Jiang, W.S. and Liu, D.H., 1999, "Effects of Pb<sup>2+</sup> on root growth, cell division and nucleolus of *Brassica juncea* L.", Israel J. Plant Sci., 47: 153-156.
- Johnson, W.R. and Proctor, J., 1977, "A Comparative Study of Metal Levels in Plants From Two Contrasting Lead mine Sites", Plant Soil, 46: 251-257.



- Jordan P.M., 1989, "Biosynthesis of Heme and Chlorophylls", 55-121, New York.
- Kaiser, R., Henderson, A.K., Daley, W.R. et al., 2001, "Blood lead levels of primary school children in Dhaka, Bangladesh", *Environ. Health Perspect.*, 109(6): 563-566.
- Kıran, Y., Munzuroğlu, Ö., 2004, "Mercimek (*Lens culinaris* Medik.) Tohumlarının Çimlenmesi ve Fide Büyümesi Üzerine Kurşunun Etkileri", *F.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(1), 1-9.
- Kıran, Y., Şahin, A., 2005, "Kurşunun *Lens Culinaris* Medik. Tohumlarının Çimlenmesi, Kök Gelişimi Ve Kök Ucu Hücreleri Üzerindeki Mitotik Etkileri", *G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 18(1): 17-25.
- Kitman J.L., 2000, "The secret history of lead", *The Nation*.
- Koepe, D.E. and Miller, R.J., 1970, "Lead Effects on Corn Mitochondrial Respiration", *Science*, 167: 1376-1378.
- Kovalchuk, O., Titiv, V., Hohn, B. and Kovalchuk, I., 2001, "A sensitive transgenic plant system to detect toxic inorganic compounds in the environment", *Nat. Biotech.*, 19, 568-572.
- Kumar, N.P.B.A., Dushenkov, V., Motto, H., Raskin, I., 1995, "Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils", *Environ. Sci. Technol.*, 29: 1232-1238.
- Kürşat, Z., 1999, "Bazı *Crambe* L. Türleri Üzerinde Morfolojik, Anatomik ve Palinolojik Çalışmalar", Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.
- Labra, M., Di Fabio, T., Grassi, F., Regondi, S.M.G., Bracale, M., Vannini, C., Agradi, E., 2003, "AFLP analysis as biomarker of exposure to organic and inorganic genotoxic substances in plants", *Chemosphere*, 52, 1183-1188.
- Landis, W.G., and Yu, W.H., 2004, "Environmental Toxicology", CRC Press. LLC, Boca Raton, FL. pp. 483.
- Lane, S.D., Martin, E.S., 1980, "Further Observations on The Distribution of Lead in Juvenile Roots of *Raphanus sativus*", *Z. Pflanzen- Physiol.*, 97: 145-152.
- Leidgens W.C., 1983, "Moleculer properties of 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Spinacia oleracea*", *J. Biochem.*, 135, 75-79.
- Lerda D., 1992, "The Effect of Lead on *Allium cepa* L.", *Mutat. Res.*, 281(2), 89-92.

- Levina E.N., 1972, *Obshchaya tosikologiya metallov* (General metal toxicology), Leningrad, Meditsyna.
- Liu, D.H., Jiang, W.S., Wang, W., Zhao, F.M., Lu, C., 1994, "Effects of Lead on Root Growth Cell Division and Nucleolus of *Allium cepa*", *Environ. Pollut.*, 86: 1-4.
- Liu, W., Yang, Y.S., Zhou, Q., Xie, L., Li, P., Sun, T., 2007, "Impact assessment of cadmium contamination on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings at molecular and population levels using multiple biomarkers", *Chemosphere* 67, 1155-1163.
- Liu, Wan., 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, 158-167.
- Ma, T.H., Xu, Z.D., Xu, C., McConnell, H., Rabago, E.V., Arreola, G.A. and Zhang, H., 1995, "The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants", *Mutation Research*, 334, 185-195.
- Memon, A.R., Aktoprakligül, D., Özdemir, A., Vertii, A., 2001, "Heavy metal accumulation and detoxification mechanisms in plants", *Turk J Bot.*, 25: 111-121.
- Menke, M., Chen, I-P., Angelis, K.J., Schubert, I., 2001, "DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins", *Mutation Research*, 493, 87-93.
- Miller, G.W., Denny, A., Wood, J.K., Welkie, G.W., 1979, "Light induced  $\delta$ -aminolevulinic acid in dark grown barley seedlings", *Plant Cell Physiol.*, 20, 131-143.
- Mishra, A., Choudhuri, M.A., 1998, "Amelioration of lead and mercury effects on germination and rice seedling growth by antioxidants", *Biologia Plantarum*, 41 (3), 469-473.
- Molas, J. and Bran, S., 2004, "Relationship between the chemical form of nickel applied to the soil and its uptake and toxicity to barley plants (*Hordeum vulgare* L.)", *Geoderma*, 122, 247-255.
- Monni, S., Uhlig, C., Hansen, E. and Magel, E., 2001, "Ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to heavy metall pollution", *Environ. Pollut.*, 112, 121-129.
- Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C., Martins, A.F., Rocha, J.B.T., 2002, "Effects of cadmium, lead, mercury and zinc on aminolevulinic acid dehydratase activity from radish leaves", *Biologia Plantarium*, 45, 85-89.

- Munzuroğlu, O. and Geçkil, H., 2002, "Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*", Environ. Cont. and Toxi., 43: 203-213.
- Murashige, T., Skoog, F.A., 1962, "A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures", Physiol. Plant., 15: 473-479.
- Naito, K., Ebato, T., Endo, Y., Shimizu, S., 1980, "Effect of benzyladenine on  $\delta$ -aminolevulinic acid synthetic ability and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase: differential responses to benzyladenine according to leaf age", Z. Pflanzenphysiol., 96, 95-102.
- Nussbaum, S., Shemutz, D., Brunold, C., 1988, "Regulation of assimilatory sulfate reduction by cadmium *Zea mays* L.", Plant Physiology, 88: 1407.
- Ouzounidou, G., Eleftheriou, E.P. and Karataglis, S., 1992, "Ecophysical and ultrastructural effects of copper in *Thlaspi ochroleucum*", Can. J. of Bot., 70: 947-957.
- Özbek, H., Kaya, Z., Tamcı, M., 1984, "Bitki Beslemesi ve Metabolizması", Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Yay. 489-490.
- Öztürk M., 2004, "Kurşunlu benzin tüketimi ve kurşunun etkileri", Çevre ve Orman Bakanlığı, Ankara.
- Paivöke A., 1983, "Anatomical response of the roots of pea seedlings to lead and arsenate ions", Ann. Bot. Fenn., 20, 307-315.
- Pang, D.J., Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A., Cairns, Jr., 1995 "Lead in the environment", (Eds) Handbook of ecotoxicology, Lewis, Boca Raton, FL, 336-392.
- Paşayev A., 2005, "Ağır Metal İyonlarının Etkisiyle Bitkilerde Serbest Radikalli Lipoperoksidasyonun İncelenmesi", Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Piechalak, A., Tomaszewska, B., Baralkiewicz, D., 2003, "Enhancing phyto remediate ability of *Pisum sativum* by EDTA application", Phytochemistry, 62: 1239-1251.
- Prasad, D.D.K. and Prasad A.R.K., 1990, "Porphyrin metabolism in lead and mercury treated bajra (*Pennisetum typhoideum*) seedlings", J. Biosci., 15(4), pp. 271-279.
- Prasad, D.D.K., Prasad, A.R.K., 1987, "Effect of and mercury on chylorophyll synthesis in mung bean seedlings", Phytochemistry, 26 (4), 881-88.

- Rank, J. and Nielsen, M.N., 1994, "Evaluation of *Allium cepa* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater", *Mutat. Res.*, 312, 17-24.
- Rausser W.E., 1997, "Early effect of phytotoxic burdens of cadmium, cobalt, nickel and zinc in white beans", *Can. J. Bot.*, 56, 1744-1749.
- Rucinska, R., Sobkowiak, R. and Gwozd, E.A., 2004, "Genotoxicity of lead in lupin root cells as evaluated by the comet assay", *Cellular & Molecular Biology Letters*, 9, 519-528.
- Rucinska, R., Waplak, S. and Gwozd, E.A., 1999, "Free Radical Formation and Activity of Antioxidant Enzymes in Lupin Roots Exposed to Lead", *Plant Physiol. Biochem.*, 37(3): 187-194.
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P.B.A., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I. and Raskin, I., 1995, "Phytoremediation: A Novel Strategy for The Removal of Toxic Metals from The Environment Using Plants", *Biotechnology*, 13: 468-474.
- Savva D., 1998, "Use of DNA fingerprinting to detect genotoxic effects", *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 41, 103-106.
- Schneider, H.A.W., 1970, "Activities and properties of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase in greening tissue cultures of *Nicotiana tabacum* c.v Samsun", *Z. Pflanzenphysiol.*, 62, 133-145.
- Seregin, I.V., Ivaniov, V.B., 1997, "Histochemical investigation of cadmium and lead distribution in plants", *Fiziol. Rast.*, 44: 915-921.
- Sharma, P., Dubey, R.S., 2005, "Lead toxicity in plants", *Braz. J. Plant Physiol.*, 17(1):35-52.
- Soya, H., Avcioğlu, R., Geren H., 1998, "Ege bölgesinde kışlık ikinci ürün yem bitkileri yetiştirme olanakları", *Ege Bölgesi I. Tarım Kongresi*, 250-257, 7-11 Eylül, Aydın.
- Spencer, P., Jordan, P.M., 1995, "Characterization of the two 5-aminolaevulinic acid binding sites, the A- and P- sites, of 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*", *Biochem. J.*, 305(1): 151-158.
- Steinkellner, H., Mun-Sik, K., Helma, C., Ecker, S., Ma, T.H., Horak, O., Kundi, M. and Knasmü, S., 1998, "Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays", *Environ. Mol. Mutagen.*, 31, 183-191.

- Stephan, U.W. and Scholz, G., 1993, "Nicotianamine: Mediator of Transport of Iron and Heavy Metals in The Phloem", *Physiol. Plant.* 88: 522-529.
- Stiborova, M., Doubravova, M., Brezinova, A., Friedrich, A., 1986, "Effect of heavy metal ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley (*Hordeum vulgare* L.)", *Photosynthetica*, 20, 418-425.
- Suchodoller A., 1967, "Untersuchungen über den Bleigehalt von Pflanzen in der Nähe von Strassen und über die Aufnahme and Translokation von Blei durch Pflanzen", *Berichteder Schweizerischen Botanischen Gesellschaft*, 77: 266-308.
- Tewari, R.J., Kumar, P., Sharma, P.N. and Bisht, S.S., 2002, "Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt", *Plant Science*, 162, 381-388.
- Türkan, İ., 2008, "Bitki Fizyolojisi", Palme Yayıncılık, 3.bakıdan çeviri, Ankara.
- Vajpayee, P., Tripathi, R.D., Rai, U.N., Ali M.B., Singh S.N., 2000, "Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L.", *Chemosphere*, 41, 1075-1082.
- Valverde, M., Trejo, C., Rojas, E., 2001, "Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction?", *Mutagenesis*, 16, 265-270.
- Van Assche, F. and Cliisters, H., 1990, "Effects of metals on enzyme activity in plants", *Plant, Cell and Environment*, 13, 195-206.
- Verma, S., Dubey, R.S., 2003, "Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants", *Plant Sci.*, 164:645-655.
- Vodnik, D., Jentschke, G., Fritz, E., Gogala, N., Godbold, D.L., 1999, "Root-applied cytokinin reduces lead uptake and affects its distribution in Norway spruce seedlings", *Physiol. Plant*, 106: 75-81.
- Vural N., 1984, "Toksikoloji", Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 315-323, Ankara.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Meyer, W., 1995, "DNA fingerprinting in plants and fungi", CRC Press, London.
- Welch R.M., 1995, "Micronutrient nutrition of plants", *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14(1), 49-82.

- Wellburn A.R., 1994, "The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution", J. Plant Physiol., Vol.144, pp. 307-313.
- Wierzbicka M., 1995, "How lead loses its toxicity to plants", Acta Soc. Bot. Pol., 64, 81-90.
- Wierzbicka, M., Antosiewicz, D., 1993, "How lead can easily enter the food chain - a study of plant roots", Sci. Total Environ. Suppl., 1: 423-429.
- Wierzbicka, M., Obidzinska, J., 1998, "The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species", Plant Sci., 137: 155-171.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990, "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers", Nucleic Acids Res., 18, 6531-6535.
- Wozniak, K., Blasiak, J., 2003, "In vitro genotoxicity of lead acetate: induction of single and double DNA strand breaks and DNA-protein cross-links", Mutat. Res., 535, 127-139.
- Wurgler F.E., 1992, "Recombination and gene conversion", Mutat. Res., 284, 3-14.
- Xiong Z.T., 1998, "Lead Uptake and Effects on Seed Germination and Plant Growth in a Pb Hyperaccumulator *Brassica pekinensis* Rupr.", Bull. Environ. Contam. Toxicol., 60: 285-291.
- Xue-mei, QI., Pei-jun, LI., Wan, LIU., Li-jing, XIE., 2006, "Multiple biomarkers response in maize (*Zea Mays* L.) during exposure to copper", J. of Environmental Sciences, 18: 1182-1188.
- Zengin, F.K., Munzuroğlu, Ö., 2005, "Fasulye Fidelerinin (*Phaseolus vulgaris* L.Strike) Klorofil ve Karotenoid Miktarı Üzerine Bazı Ağır Metallerin ( $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Cr}^{+3}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ) Etkileri", F. Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 17 (1), 164-172.

## ÖZGEÇMİŞ

<b>Adı Soyadı</b>	Cennet ÖZAY
<b>Doğum Yeri</b>	Manisa
<b>Doğum Tarihi</b>	15.02.1983
<b>Medeni Hali</b>	Bekâr
<b>Yabancı Dili</b>	İngilizce (2007 Mart Dönemi ÜDS: 73.75)

### **Eğitim ve Akademik Durumu**

<b>Lise</b>	İzmir Karşıyaka Şemikler Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı), 2001
<b>Lisans</b>	Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi, 2006
<b>Yüksek Lisans</b>	Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi-
<b>Yayınlar</b>	Bir adet sözlü ve iki adet poster bildirisi bulunmaktadır.

## **EKLER**



**EK-Çizelge-1** 6 gün süre ile farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılmış yem şalgamı fidelerinin yapraklarından elde edilen genomik DNA'ların OPB-7 primeri ile elde edilen ve RAPD analizlerinde kullanılan "1" ve "0" tablosu (Bkz. Şekil 4.10)

Pb <sup>2+</sup> (mM)	Bant ebatı (kb)								
	2,928	1,437	1,170	0,953	0,769	0,645	0,492	0,421	0,281
0,0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
0,5	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1,0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
3,0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
5,0	0	1	1	1	1	1	1	1	1

**EK-Çizelge-2** 6 gün süre ile farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılmış yem şalgamı fidelerinin yapraklarından elde edilen genomik DNA'ların OPB-8 primeri ile elde edilen ve RAPD analizlerinde kullanılan "1" ve "0" tablosu (Bkz. Şekil 4.10)

Pb <sup>2+</sup> (mM)	Bant ebatı (kb)											
	2,162	1,962	1,773	1,487	1,190	1,072	0,915	0,712	0,595	0,514	0,446	0,389
0,0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0
0,5	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0
1,0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0
3,0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
5,0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0

**EK-Çizelge-3** 6 gün süre ile farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılmış yem şalgamı fidelerinin yapraklarından elde edilen genomik DNA'ların OPB-9 primeri ile elde edilen ve RAPD analizlerinde kullanılan "1" ve "0" tablosu(Bkz. Şekil 4.10)

Pb <sup>2+</sup> (mM)	Bant ebatı (kb)											
	2,344	1,592	1,315	1,211	1,000	0,840	0,726	0,651	0,592	0,525	0,438	0,400
0,0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
0,5	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
1,0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1s
3,0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
5,0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1

**EK-Çizelge-4** 6 gün süre ile farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılmış yem şalgamı fidelerinin yapraklarından elde edilen genomik DNA'ların OPB-10 primeri ile elde edilen ve RAPD analizlerinde kullanılan "1" ve "0" tablosu (Bkz. Şekil 4.11)

Pb <sup>2+</sup> (mM)	Bant ebatı (kb)										
	1,823	1,433	1,036	0,958	0,872	0,730	0,560	0,419	0,313	2,440	0,655
0,0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0
0,5	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0
1,0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
3,0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
5,0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1

**EK-Çizelge-5** 6 gün süre ile farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılmış yem şalgamı fidelerinin yapraklarından elde edilen genomik DNA'ların OPB-11 primeri ile elde edilen ve RAPD analizlerinde kullanılan "1" ve "0" tablosu (Bkz. Şekil 4.11)

Pb <sup>2+</sup> (mM)	Bant ebatı (kb)							
	1,591	1,356	1,200	1,064	0,930	0,826	0,733	0,480
0,0	1	1	1	0	1	0	1	1
0,5	0	0	1	1	1	0	1	1
1,0	0	0	1	1	1	0	1	1
3,0	0	0	1	1	1	1	1	1
5,0	0	0	1	1	1	1	1	1

**EK-Çizelge-6** 6 gün süre ile farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılmış yem şalgamı fidelerinin yapraklarından elde edilen genomik DNA'ların OPB-12 primeri ile elde edilen ve RAPD analizlerinde kullanılan "1" ve "0" tablosu (Bkz. Şekil 4.11)

Pb <sup>2+</sup> (mM)	Bant ebatı (kb)									
	2,875	2,660	2,342	1,452	1,277	1,000	0,671	0,546	0,448	0,351
0,0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0,5	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
1,0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
3,0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
5,0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1

**EK-Çizelge-7** 6 gün süre ile farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılmış yem şalgamı fidelerinin yapraklarından elde edilen genomik DNA'ların OPB-14 primeri ile elde edilen ve RAPD analizlerinde kullanılan "1" ve "0" tablosu (Bkz. Şekil 4.12)

Pb <sup>2+</sup> (mM)	Bant ebatı (kb)										
	2,243	1,543	1,265	0,800	0,490	0,925	0,689	0,528	0,378	0,243	0,310
0,0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0
0,5	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
1,0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
3,0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0
5,0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1

**EK-Çizelge-8** 6 gün süre ile farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılmış yem şalgamı fidelerinin yapraklarından elde edilen genomik DNA'ların OPB-15 primeri ile elde edilen ve RAPD analizlerinde kullanılan "1" ve "0" tablosu (Bkz. Şekil 4.12)

Pb <sup>2+</sup> (mM)	Bant ebatı (kb)														
	1,714	1,469	1,056	0,980	0,833	0,740	0,671	0,618	0,550	0,453	0,416	0,368	0,250	0,220	0,189
0,0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1
0,5	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
1,0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
3,0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5,0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1

**EK-Çizelge-9** 6 gün süre ile farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılmış yem şalgamı fidelerinin yapraklarından elde edilen genomik DNA'ların OPB-17 primeri ile elde edilen ve RAPD analizlerinde kullanılan "1" ve "0" tablosu (Bkz. Şekil 4.13)

Pb <sup>2+</sup> (mM)	Bant ebatı (kb)												
	2,353	1,935	1,714	1,567	1,467	1,191	1,000	0,957	0,886	0,733	0,551	0,497	0,410
0,0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0
0,5	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
1,0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
3,0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5,0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1

**EK-Çizelge-10** 6 gün süre ile farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılmış yem şalgamı fidelerinin yapraklarından elde edilen genomik DNA'ların OPB-18 primeri ile elde edilen ve RAPD analizlerinde kullanılan "1" ve "0" tablosu (Bkz. Şekil 4.13)

Pb <sup>2+</sup> (mM)	Bant ebatı (kb)													
	2,912	2,349	2,106	1,643	1,406	1,108	1,175	1,000	0,927	0,743	0,672	0,543	0,559	0,403
0,0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
0,5	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
1,0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1
3,0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
5,0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0

**EK-Çizelge-11** 6 gün süre ile farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılmış yem şalgamı fidelerinin yapraklarından elde edilen genomik DNA'ların OPB-20 primeri ile elde edilen ve RAPD analizlerinde kullanılan "1" ve "0" tablosu (Bkz. Şekil 4.14)

Pb <sup>2+</sup> (mM)	Bant ebatı (kb)										
	1,897	1,660	1,343	1,046	0,922	0,788	0,700	0,641	0,600	0,444	0,288
0,0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0
0,5	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0
1,0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1
3,0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
5,0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1