

**MISIR (Zea mays L.)'İN BAZI ÇEŞİTLERİNDE  
AĞIR METAL (Cd, Pb) STRESİNİN ETKİLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

**EFFECTS OF HEAVY METAL (Cd, Pb)  
STRESSES ON SOME MAIZE  
(Zea mays L.) CULTIVARS**

**BEYCAN AYHAN**

Hacettepe Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
BİYOLOJİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
olarak hazırlanmıştır.

2006

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....

Prof. Dr. Serpil TERZİOĞLU

Üye :.....

Prof. Dr. Işıl ÖNÇEL

Üye :.....

Doç. Dr. Hüsnü ÇAKIRLAR

Üye (Eş Danışman):.....

Doç. Dr. Deniz TANYOLAÇ

Üye (Danışman) :.....

Doç. Dr. Yasemin EKMEKÇİ

ONAY

Bu tez ...../...../2006 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

...../...../2006

Prof. Dr. Ahmet R. ÖZDURAL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

# **BAZI MISIR (*Zea mays* L.) ÇEŞİTLERİNDE AĞIR METAL (Cd, Pb) STRESİNİN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Beycan Ayhan**

## **ÖZ**

Bu araştırmada, kadmiyum (Cd) ve kurşun (Pb) ağır metalinin bazı mısır çeşitleri üzerindeki etkisinin araştırılması ve çeşitlerin gördüğü zararlara bağlı olarak dayanıklı çeşitlerin saptanması ile bu dayanıklılığı sağlayan savunma mekanizmalarının açıklanması amaçlanmıştır.

İki aşamadan oluşan tezin birinci aşamasında bazı mısır çeşitlerine (Vero, Luce, Doge, DK626, DK743, 31G98, 3223 ve 32D99) ait tohumlar erken fide evresinde farklı konsantrasyonlarda Cd (0, 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4mM) ve Pb (0, 1, 2, 4 ve 6mM) stresine maruz bırakılmıştır. Çeşitlerin çimlenme yüzdelerinde önemli bir inhibisyon görülmezken, kök ve koleoptil uzunluklarında önemli derecede azalma belirlenmiştir. Kök uzunluklarında meydana gelen inhibisyonların kontrole göre % oranları belirlenerek yapılan sınıflandırmada az etkilenen çeşitlerin Cd için 32D99, Pb için Vero, en çok etkilenen çeşidin ise her iki ağır metal içinde 3223 olduğu saptanmıştır.

İkinci aşamada ise belirlenen çeşitlere ait fideler, perlit kültür yetiştirme ortamında, 25°C sıcaklıkta, 16 saat gün uzunluğunda ve  $250\mu\text{mol.m}^{-1}\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğunda, %50 nemde kontrollü iklim odasında, belirli bir gelişim evresine gelinceye kadar (4-5 yaprak) 14 gün süre ile yetiştirilmiştir. Daha sonra bitkilere 8 gün süre ile farklı konsantrasyonlarda Cd (0, 0.3, 0.6 ve 0.9mM) ve Pb (0, 2, 5, 8mM) ağır metalleri uygulanmıştır. Deneme sonucunda Cd ve Pb ağır metallerinin, mısır çeşitlerinin kök ve gövde uzunluklarında önemli derecede inhibisyona neden olduğu belirlenmiş, her iki ağır metal içinde dayanıklı çeşitlerin (Vero, 32D99) yapraklarında az dayanıklı çeşide (3223) göre daha az ağır metal biriktirdikleri saptanmıştır. Tüm çeşitlerin yapraklarında ağır metal konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak iyon sızıntısı ve MDA miktarının arttığı belirlenmiştir. Antioksidan enzimlerin aktivitelerinde ise, ağır metalin ve mısırın çeşidine göre farklılıklar görülmekle birlikte, konsantrasyona bağlı genellikle artış yönünde önemli değişiklikler saptanmıştır. Pb ve Cd konsantrasyonunun artışına bağlı olarak çeşitlerin yapraklarındaki pigment içeriğinin önemli derecede azaldığı, ayrıca klorofil miktarının karotenoidlere göre ağır metal stresinden daha çok etkilendiği tespit edilmiştir. Klorofil a floresans ölçümleri sonucunda, Cd ve Pb ağır metallerine dayanıklı çeşitlerin fotosentetik aktivitelerinde önemli değişiklikler gözlenmezken, az dayanıklı çeşidin (3223) yapraklarında sadece yüksek Cd ve Pb konsantrasyonlarında önemli aktivite değişiklikleri tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler :** Ağır metal, antioksidan enzimler (SOD, POD, APX, GR), kadmiyum (Cd), klorofil floresansı, kurşun (Pb), MDA, mısır (*Zea mays* L.).

Danışman: Doç. Dr. Yasemin EKMEKÇİ, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Botanik Anabilim Dalı

Eş Danışman: Doç. Dr. Deniz TANYOLAÇ, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Temel İşlemler ve Termodinamik Anabilim Dalı.

# EFFECTS OF HEAVY METAL (Cd, Pb) STRESSES ON SOME MAIZE (*Zea mays* L.) CULTIVARS

**Beycan Ayhan**

## ABSTRACT

The aim of this research was to investigate effect of cadmium (Cd) and lead (Pb) stress on some maize cultivars, determine tolerant maize cultivars based on the extent of the damage and elucidate the defense mechanisms providing tolerance to these stresses.

In the first stage of this research, the seeds of some cultivars (Vero, Luce, Doge, DK626, DK743,31G98, 3223 and 32D99) at early seedling stage was exposed to different concentrations of Cd (0, 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4mM) and Pb (0, 1, 2, 4 and 6mM) stresses. While significant inhibition in percentage of germination was not observed, the decrease in the length of roots and coleoptile was found to be significant. In reference to the classification based on inhibition in the length of the roots with respect to control treatment, the cultivars tolerant to Cd and Pb was determined as 32D99 and Vero respectively, and the sensitive cultivar for both heavy metals was 3223.

In the second stage, seedlings of the cultivars were grown in a phytotron at 25°C under 250  $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$  light intensity during 12h photoperiod at 50% humidity for 14 days, until a certain growth stage was reached. Then, cultivars were exposed to different concentrations of Cd (0, 0.3, 0.6 and 0.9mM) and Pb (0, 2, 5 and 8mM) stresses for 8 days. At the end of the experiment, it was found that Cd and Pb stresses caused significant inhibition in roots and shoot length of maize cultivars. Accumulation of both heavy metals was found to be less in the leaves of tolerant cultivars than the sensitive cultivars. Electro leakage and MDA content of all cultivars increased with increasing heavy metal concentration. Although activity of antioxidant enzymes varied in reference of heavy metal type and cultivar, the enzymes activity increased with increasing heavy metal concentration. It was determined that pigment content of leaves of the cultivars decreased with increasing concentration of Cd and Pb, and also chlorophyll content was affected by the heavy metal stress at higher levels than carotenoid content. The results of measurement of chlorophyll fluorescence showed that while there was no significant variations in photochemical activity of tolerant cultivars to Cd and Pb stresses, significant variations were observed in the sensitive cultivars only at highly toxic Cd and Pb concentrations.

**Keywords:**Antioxidant enzyme activity (SOD; APX, GR, POD), cadmium (Cd), chlorophyll fluorescence, heavy metal, lead (Pb), MDA, maize (*Zea mays* L.)

Advisor: Doç. Dr. Yasemin EKMEKÇİ, Hacettepe University, Department of Biyoloji.

Co-advisor: Doç.Dr. Deniz TANYOLAÇ, Hacettepe University, Department of Chemical Engineering.

## TEŞEKKÜR

Araştırma konusunun ve uygulama yöntemlerinin belirlenmesinde, deneylerin yürütülmesinde ve sonuçlarının değerlendirilip tartışılmasında, tezin yazılmasında ve anlatım dilinin düzeltilmesinde her türlü yardımlarını gördüğüm tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Yasemin EKMEKÇİ (Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü) ve tez yardımcı danışmanım Sayın Doç. Dr. Deniz TANYOLAÇ (Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü)'a, değerli önerileri ve sağladığı olanaklar için Sayın Prof. Dr. Serpil TERZİOĞLU (Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü)'na, laboratuvar imkanlarından faydalanmamı sağlayan Sayın Doç. Dr. Hüsnü ÇAKIRLAR (Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü)'a, atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile metal analizinde yardımcı olan Sayın Uzman Duygu GÜLAY (Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü)'a, kuru yaprak örneklerin öğütülmesinde yardımcı olan Sayın Dr. Akın SEMERCİ (T.C. Çevre ve Orman Bakanlığı, İç Anadolu Ormancılık Araştırma Müdürlüğü)'ye, örneklerin yakılmasında yardımcı olan Sayın Yelda ZENCİR (Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü)'e, tezin her aşamasında emeği bulunan, sabırlı ve anlayışlı çalışma arkadaşım Kimya Yüksek Mühendisi Şeniz ÜNALAN'a, tezin uygulama aşamalarında emekleri bulunan Dr. Nuran ÇİÇEK, Araştırma görevlileri Ali DOĞRU, Tuğçe KALEFETOĞLU, Bilim uzmanlığı öğrencisi Özlem TURAN, bölüm lisans öğrencileri Sevgi ASLIYÜCE ve Merve ŞAHİN'e, eleştirileriyle bana destek olan hocalarıma ve arkadaşlarıma, maddi ve manevi destekleri için Kamuran DEMİR'e ve AİLEME teşekkür ederim.

Ayrıca, 02 02 60 2013 nolu proje kapsamında bu araştırmayı destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne ve çalışanlarına teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

## Sayfa

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Mısır Bitkisinin Sınıflandırılması, Kökeni, Morfolojisi, Uyumu, İklim ve Toprak isteği.....	5
2.1.1 Mısırın kökeni ve sistematik sınıflandırılması .....	5
2.1.2. Mısırın morfolojisi.....	5
2.1.3. Mısırın uyumu, iklim ve toprak isteği.....	6
2.1.4. Dünyada ve Türkiye’de mısır üretimi.....	7
2.2. Stres Faktörleri ve Ağır Metal Stresi.....	8
2.2.1. Ağır metallerin bulaşma kaynakları.....	10
2.2.2. Ağır metal kirlenmesinin engellenme yöntemleri.....	10
2.2.3. Ağır metal kirliliğinin giderilme yöntemleri ve fitoremediasyon .....	11
2.3. Bitkilerde Ağır Metal Stresi .....	12
2.3.1. Bitkilerde ağır metal alınımı.....	12
2.3.2. Bitkilerde ağır metal taşınımı.....	13
2.3.3. Ağır metale maruz kalmanın bitkilerde yol açtığı zararlar.....	14
2.3.3.1. Kök, gövde ve yapraklardaki değişiklikler.....	14

2.3.3.2. Ağır metallerin enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	15
2.3.3.3. Ağır metallerin membranlar üzerine etkisi.....	16
2.3.3.4. Ağır metallerin fotosentez üzerine etkisi.....	17
2.3.3.5. Ağır metallerin serbest radikal oluşumu üzerine etkisi.....	18
2.3.4. Bitkilerin ağır metal zararlarından korunma mekanizmaları.....	21
2.3.4.1. Ağır metal alınımından sakınma.....	21
2.3.4.2. Antioksidan savunma sistemi.....	21
Antioksidan enzimler.....	22
Enzim olmayan antioksidanlar.....	24
2.3.4.3. Ağır metalleri ligandlara bağlama ve zarar veremeyecekleri bölgelerde biriktirme.....	26
Ligandlara bağlama.....	26
Oksijen verici ligandlar.....	27
Azot verici ligandlar.....	27
Sülfür verici ligandlar.....	28
Metalotiyainler.....	28
Fitokelatinler.....	29
<b>3. MATERYAL VE METOTLAR.....</b>	<b>32</b>
3.1. Mısır Çeşitlerinin Erken Fide Evresinde Cd ve Pb Ağır Metallerine Karşı Dayanıklılıklarının Belirlenmesi .....	32
3.1.1. Bitki materyalleri.....	32
3.1.2. Yöntemler.....	32
3.1.2.1. Tohum kabuk sterilizasyonu.....	32
3.1.2.2. Çimlendirme yöntemi.....	32
3.1.3. Ölçüm ve analizler.....	33
3.1.3.1. Fide kök ve koleoptil uzunluğu.....	33

3.1.3.2. Fide kök ve koleoptil su içeriği.....	34
3.1.4. İstatistiksel analizler.....	34
3.2. Cd ve Kurşun Ağır Metallerinin Büyüme Evresindeki Mısır Çeşitleri Üzerine Etkileri ve Bu Etkiye Karşı Oluşturulan Yanıtın Saptanması.....	35
3.2.1. Bitki materyalleri.....	35
3.2.2. Yöntemler.....	35
3.2.3. Ölçüm ve analizler.....	36
3.2.3.1. Kök ve gövde uzunluğu tayini.....	36
3.2.3.2. Yaprak dokularında metal iyon (Cd, Pb) analizleri.....	36
3.2.3.3. Yaprak dokularındaki iyon sızıntısı.....	36
3.2.3.4. Yaprak dokularında Malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi.....	37
3.2.3.5. Klorofil a fluoressans ölçümü.....	37
3.2.3.6. Yaprak dokularında pigment miktarının belirlenmesi.....	38
3.2.3.7. Enzim aktivitelerinin belirlenmesi.....	40
Protein içeriğinin belirlenmesi.....	40
Süperoksit Dismutaz (SOD) aktivitesinin belirlenmesi.....	40
Askorbat Peroksidaz (APX) aktivitesinin belirlenmesi.....	40
Glutasyon Redüktaz (GR) aktivitesinin belirlenmesi.....	41
Peroksidaz (POD) aktivitesinin belirlenmesi.....	42
3.2.2.8. İstatistiksel analizler.....	42
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>43</b>
4.1. Cd ve Pb Ağır Metallerinin Çimlenme ve Erken Fide Gelişim Evresindeki Mısır Çeşitleri Üzerine Etkisi.....	43
4.1.1. Cd ve Pb ağır metallerinin erken fide gelişim evresinde mısır çeşitlerinin kök büyümesi üzerine etkisi.....	43
4.1.2. Cd ve Pb ağır metallerinin erken fide gelişim evresinde mısır çeşitlerinin koleoptil büyümesi üzerine etkisi.....	44



4.1.3. Cd ve Pb ağır metallerinin erken fide gelişim evresinde mısır çeşitlerinin kök büyüme hızı (gerçek ve nispi) üzerine etkisi.....	46
4.1.4. Cd ve Pb ağır metallerinin erken fide gelişim evresinde mısır çeşitlerinin kök ve koleoptil su içeriği üzerine.....	49
4.1.5. Cd ve Pb ağır metallerine dayanıklı mısır çeşidinin belirlenmesi.....	50
4.2. Cd ve Pb Ağır Metallerinin Büyüme Evresindeki Mısır Çeşitleri Üzerine Etkisi.....	53
4.2.1. Cd ağır metalinin büyüme evresindeki mısır çeşitleri üzerine etkisi.....	53
4.2.1.1. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin kök ve gövde uzaması üzerine etkisi.....	53
4.2.1.2. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki Cd birikimi üzerine etkisi.....	53
4.2.1.3. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki iyon sızıntısı üzerine etkisi.....	54
4.2.1.4. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki MDA içeriği üzerine etkisi.....	55
4.2.1.5. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki fotokimyasal aktivite üzerine etkisi.....	55
4.2.1.6. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki pigment içeriği üzerine etkisi.....	60
4.2.1.7. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki antioksidan enzimlerin aktiviteleri üzerine etkisi.....	61
Cd ağır metalinin toplam SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	61
Cd ağır metalinin toplam APX enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	62
Cd ağır metalinin toplam GR enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	63
Cd ağır metalinin toplam POD enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	64
4.2.2. Pb ağır metalinin büyüme evresindeki mısır çeşitleri üzerine etkisi.....	65
4.2.2.1. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin kök ve gövde uzaması üzerine etkisi.....	65

4.2.2.2. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki Pb birikimi üzerine etkisi.....	65
4.2.2.3. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki iyon sızıntısı üzerine etkisi.....	66
4.2.2.4. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki MDA içeriği üzerine etkisi.....	67
4.2.2.5. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki fotokimyasal aktivite üzerine etkisi.....	68
4.2.2.6. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki pigment içeriği üzerine etkisi.....	72
4.2.2.7. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki antioksidan enzimlerin aktiviteleri üzerine etkisi.....	73
Pb ağır metalinin toplam SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	73
Pb ağır metalinin toplam APX enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	74
Pb ağır metalinin toplam GR enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	75
Pb ağır metalinin toplam POD enzim aktivitesi üzerine etkisi.....	76
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>77</b>
5.1. Cd ve Pb Ağır Metalinin Çimlenme ve Erken Fide Gelişim Evresindeki Mısır Çeşitleri Üzerine Etkisi.....	77
5.2. Cd ve Pb Ağır Metalinin Büyüme Evresindeki Mısır Çeşitleri Üzerine Etkisi.....	81
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>92</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>96</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>121</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Şekil 2.1. Bitkileri etkileyen stres faktörler .....	9
Şekil 2.2. Ağır metallerin neden olduğu AOT oluşumu.....	20
Şekil 2.3 Askorbat-glutasyon döngüsü.....	24
Şekil 2.4. Bitkilerde (A) ve funguslarda (B) kadmiyum zararının giderilmesi ile ilgili metabolik yollar.....	31
Şekil 3.1. Yetiştirilen 20 günlük mısır çeşitlerinin kontrollü iklim odasındaki genel görünüşleri.....	35
Şekil 3.2. Modüle fluoresans ölçüm sisteminden alınan klorofil a fluoresans sinyalleri.....	39
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan Cd (A) ve Pb (B) ağır metallerinin erken fide evresindeki mısır çeşitlerinin kök uzunlukları üzerine etkisi.....	44
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan Cd (A) ve Pb (B) ağır metallerinin erken fide evresindeki mısır çeşitlerinin koleoptil uzunlukları üzerine etkisi.....	45
Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan Cd (A) ve Pb (B) ağır metallerinin erken fide evresindeki mısır çeşitlerinin kök nispi su içeriği üzerine etkisi.....	49
Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan Cd (A) ve Pb (B) ağır metallerinin erken fide evresindeki mısır çeşitlerinin koleoptil nispi su içeriği üzerine etkisi.....	50
Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan Cd (A) ve Pb (B) ağır metallerinin erken fide evresindeki mısır çeşitlerinin kök uzunlukları üzerine etkisinin kontrole göre yüzdesi.....	51
Şekil 4.6. Cd ağır metali uygulanmış mısır çeşitlerinin yapraklarındaki Cd birikimi ...	54
Şekil 4.7. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki iyon sızıntısı üzerine etkisi.....	54
Şekil 4.8. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki MDA içeriği üzerine etkisi (A), MDA içeriğindeki değişimin kontrole göre yüzdesi (B).....	55

Şekil 4.9.	Cd ağır metalinin karanlığa adapte edilmiş mısır çeşitlerinin yapraklarındaki A) minimum fluoresans ( $F_o$ ), B) maksimum fluoresans ( $F_M$ ) ve C) PSII'nin potansiyel fotokimyasal etkinliği ( $F_v/F_M$ ).....	57
Şekil 4.10.	Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin ışığa adapte edilmiş yapraklarındaki A) PSII'nin gerçek fotokimyasal etkinliği, ( $\Phi PS II$ ), B) , PSII'nin eksitasyon enerjisini yakalama etkinliği ( $F_v'/F_M'$ ) ve C) elektron transport hızı (ETH) .....	58
Şekil 4.11.	Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin ışıkla adapte edilmiş yapraklarındaki A) fotokimyasal kullanım ( $qP$ ) ve B) fotokimyasal olmayan kullanım ( $qN$ ).....	59
Şekil 4.12.	Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki toplam SOD enzim aktivitesine etkisi (A) ve etkinin kontrole göre değişimi (B).....	61
Şekil 4.13.	Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki toplam APX enzim aktivitesine etkisi (A) ve etkinin kontrole göre değişimi (B).....	62
Şekil 4.14.	Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki toplam GR enzim aktivitesine etkisi (A) ve etkinin kontrole göre değişimi (B).....	63
Şekil 4.15.	Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki toplam POD enzim aktivitesine etkisi (A) ve etkinin kontrole göre değişimi (B).....	64
Şekil 4.16.	Pb ağır metali uygulanmış mısır çeşitlerinin yapraklarındaki Pb birikimi.....	66
Şekil 4.17.	Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki iyon sızıntısı üzerine etkisi.....	66
Şekil 4.18.	Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki MDA içeriği üzerine etkisi (A), MDA içeriğindeki değişimin kontrole göre yüzdesi (B).....	67
Şekil 4.19.	Pb ağır metalinin karanlığa adapte edilmiş mısır çeşitlerinin yapraklarındaki A) minimum fluoresans ( $F_o$ ), B) maksimum fluoresans ( $F_M$ ) ve C) PSII'nin potansiyel fotokimyasal etkinliği ( $F_v/F_M$ ).....	69
Şekil 4.20.	Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin ışığa adapte edilmiş yapraklarındaki A) PSII'nin gerçek fotokimyasal etkinliği, ( $\Phi PS II$ ), B) , PSII'nin eksitasyon enerjisini yakalama etkinliği ( $F_v'/F_M'$ ) ve C) elektron transport hızı (ETH) .....	70
Şekil 4.21.	Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin ışığa adapte edilmiş yapraklarındaki A) fotokimyasal kullanım ( $qP$ ) ve B) fotokimyasal olmayan kullanım ( $qN$ ).....	71

- Şekil 4.22. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki toplam SOD enzim aktivitesine etkisi (A) ve etkinin kontrole göre değişimi (B).....73
- Şekil 4.23. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki toplam APX enzim aktivitesine etkisi (A) ve etkinin kontrole göre değişimi (B).....74
- Şekil 4.24. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki toplam GR enzim aktivitesine etkisi (A) ve etkinin kontrole göre değişimi (B).....75
- Şekil 4.25. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki toplam POD enzim aktivitesine etkisi (A) ve etkinin kontrole göre değişimi (B).....76

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Çizelge 2.1. Dünyada mısır üretimi.....	7
Çizelge 2.2. Türkiye’de mısır üretimi.....	8
Çizelge 2.3. Ağır metal stresine maruz kalan bitkilerde inhibisyona uğrayan bazı enzimler.....	16
Çizelge 2.4. Fitokelatinlerin terminolojisi.....	30
Çizelge 4.1. Erken fide evresinde Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin kök gerçek ve nispi büyüme hızı üzerine etkisi.....	47
Çizelge 4.2. Erken fide evresinde Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin kök gerçek ve nispi büyüme hızı üzerine etkisi.....	48
Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlardaki Cd ve Pb uygulamalarında, mısır çeşitlerinin kök uzunluklarında görülen kontrole göre % inhibisyonun puanlama tablosu.....	52
Çizelge 4.4. Erken fide evresinde Cd ve Pb ağır metale maruz kalan mısır çeşitlerinin Çizelge 4.3’te aldıkları toplam puanlara göre sıralanışı.....	52
Çizelge 4.5. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin kök ve gövde uzaması üzerine etkisi.....	53
Çizelge 4.6. Cd uygulamalarının mısır çeşitlerinin yapraklarındaki pigment içeriği üzerine etkisi.....	60
Çizelge 4.7. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin kök ve gövde uzaması üzerine etkisi.....	65
Çizelge 4.8. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki pigment içeriği üzerine etkisi.....	72

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AOT	: Aktif oksijen türleri
AÖF	: Anlamlı önemli fark
APX	: Askorbat peroksidaz
CAT	: Katalaz
Cd	: Kadmiyum
Cu	: Bakır
DHA	: Dehidroaskorbat
DHAR	: Dehidroaskorbat redüktaz
ETH	: Elektron taşıma hızı
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
Fe	: Demir
F <sub>o</sub>	: Karanlığa adapte olmuş yapraklardaki minimum fluoresans
F <sub>M</sub>	: Karanlığa adapte olmuş yapraklardaki maksimum fluoresans
F <sub>v</sub>	: Karanlığa adapte olmuş yapraklardaki değişken fluoresans
F <sub>v</sub> /F <sub>M</sub>	: FSII'nin potansiyel fotokimyasal etkinliği
F <sub>o</sub> '	: Işık ile doygun durumdaki minimum fluoresans
F <sub>M</sub> '	: Işık ile doygun durumda maksimum fluoresans
F <sub>s</sub>	: Işığa adapte edilmiş yapraklardaki dinamik denge durumundaki fluoresansı
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
GSSG	: Yükseltgenmiş glutasyon
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen peroksit

K	: Potasyum
KA	: Kuru ağırlık
kl	: Klorofil
LPG	: Liquified petroleum gas (Sıvılaştırılmış petrol gazı)
MDA	: Malondialdehit
MDHA	: Monodehidroaskorbat
MDHAR	: Monodehidroaskorbat redüktaz
Mn	: Manganez
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH	: İndirgenmiş Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NBT	: Nitrobluetetrazolyum
Ni	: Nikel
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	: Singlet oksijen
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: Süperoksit radikali
OH <sup>·</sup>	: Hidroksil radikali
Pb	: Kurşun
POD	: Peroksidaz
PSI	: Fotosistem I
PSII	: Fotosistem II
qP	: Fotokimyasal kullanım
qN	: Fotokimyasal olmayan kullanım
Rubisco	: Ribuloz 1-5 bifosfat karboksilaz/oksijenaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
TA	: Taze ağırlık
Zn	: Çinko
ΦPS II	: PSII'nin gerçek fotokimyasal etkinliği



## 1. GİRİŞ

Canlılar, yaşamları boyunca birçok olumsuz çevre koşulları ile mücadele etmek durumundadırlar. Canlı gelişimini etkileyen bu olumsuz koşullara karşı yaşama şansını arttıran kalıtsal değişiklikleri gerçekleştirebilmiş canlılar, bu özelliklerini dölden döle aktararak türlerinin devamını sağlamışlardır. Doğanın kendi dinamikleri içinde kabul edebileceğimiz bu faktörler çoğunlukla canlıların adaptasyon geçirmelerine fırsat verecek ölçüde olup, evrimsel sürecin işleyişinin birer parçası olarak görülmelidirler. Doğal stres faktörleri olarak adlandırdığımız sıcaklık (yüksek ve düşük sıcaklık), kuraklık, mineral eksikliği gibi faktörlerin yanı sıra, insanların neden olduğu ve özellikle son yüzyılda etkisini giderek arttıran, evrimsel işleyişte de diğer tüm faktörlerin önüne geçen, insan kaynaklı olarak adlandırdığımız stres faktörleri de bulunmaktadır. Çok hızlı biçimde etkisini arttıran bu faktörler, adaptasyon için gerekli olan zaman süresini de kısıtladıkları için şimdiden birçok canlı türünü yok olma tehlikesi ile karşı karşıya bırakmaktadırlar.

İnsan kaynaklı stres faktörlerinin neden olduğu çevre kirliliği, son yıllarda artan endüstriyel faaliyetler sonucu birçok ülke için ciddi boyutlarda tehlike oluşturmaktadır. Özellikle yiyecek ve içecek üretimi, tekstil, dericilik, kimya ve petrokimya, döküm, kaplama, madencilik gibi endüstriyel kuruluşlar, kentsel, tarımsal ve ticari atıklar, çevre kirliliğine neden olan kaynaklar olarak gösterilmektedir (Nellesen and Fletcher, 1993; Guo and Marschner, 1995; Salt et al., 1995; Robinson et al., 2001).

Ağır metaller, ekolojik dengeyi bozan, canlı büyüme ve gelişmesini önemli oranda etkileyen, çevreyi kirleten temel kaynaklardan biridir (Ruis-Jiménez et al., 2003). Bakır (Cu), çinko (Zn), demir (Fe), manganez (Mn), molibden (Mo), nikel (Ni), kobalt (Co) gibi bazı ağır metaller bitki ve hayvanların gelişmesi için gerekli mikro besin elementleridir. Arsenik (As), civa (Hg), Cd ve Pb gibi bazı ağır metaller ise bitki ve hayvan gelişimi için gerekli olmayan elementlerdir (Niess, 1999). Mikro besin elementi olsun ya da olmasın ağır metallerin, atmosferde, suda ve topraktaki konsantrasyonunun belli bir seviyenin üzerine çıkması, tüm canlılar için ciddi problemlere neden olmaktadır (Benavides et al., 2005). Birçok kirlenmede olduğu gibi ağır metal kirlenmesinde de öncelikle etkilenen grup primer üreticiler olan

bitkilerdir. Bitkiler toprak çözeltilisinde iyon halinde bulunan ağır metalleri genellikle kökleri ile alırlar. Ancak bazı araştırmalarda az da olsa atmosferde bulunan ağır metallerin yapraklar aracılığı ile alınabildiği de gösterilmiştir (Harrison and Chirgawi, 1989; Lindberg et al., 1992; Marschner, 1995).

Ağır metallere dayanıklı bitki türlerinin belirlenmesi, dayanıklılık mekanizmalarının aydınlatılması, ağır metal biriktiren bitkiler kullanarak doğanın temizlenmesi ve ağır metallerin geri kazanımı yönündeki araştırmalar; özellikle insanların neden olduğu, henüz tehlikeli boyutlara ulaşmamış ağır metal kirlenmesinin, ilerde tüm canlılar için büyük bir sorun haline gelmesini önlemede önemli rol oynayacaktır

Kadmiyum ve Pb, canlı yaşamını olumsuz etkileyen ağır metallerdir. Doğal kaynaklarda bulunan ve belirli düzeylerde açığa çıkan bu ağır metaller, özellikle bu yüzyılın başından itibaren artan endüstriyel faaliyetler, tarımsal faaliyetler ve taşıt kullanımı gibi insan aktiviteleri sonucunda, yaygın ve tehlikeli hale gelmiştir (Eick et al., 1999; Paivoke, 2002; Sharma and Dubey, 2005).

Toprakta bulunan Cd ve Pb yüksek konsantrasyonlarda tarla bitkilerinin büyüme ve gelişmesini etkileyerek, ürün veriminin ve tüketilebilir olma özelliğinin (sağlık açısından) azalmasına neden olmaktadır (Alloway, 1990; Kabata-Pendias and Pendias, 1991; Zheljaskov et. al. 2005; Wang et al., 2006). Bitkiler, gelişimleri için gerekli olmamasına rağmen, aldıkları Cd ve Pb'ü organlarında çeşitli konsantrasyonlarda biriktirmektedirler. Dokularda biriken bu ağır metaller, besin zinciri yolu ile -besin zincirinin her basamağında miktarı daha da artarak- diğer canlılara geçmekte ve insan sağlığını tehdit edecek toksik düzeye ulaşmaktadır. İnsan beslenmesinde önemli rolü olan bitkilerin, bu ağır metalleri ne kadar biriktirdikleri ve ne ölçüde zarar gördüklerinin tespiti insan sağlığı açısından oldukça önemlidir. Bitki türüne göre değişmekle birlikte, belli bir konsantrasyondan sonra Cd ve Pb alınımı, bitkilerde çeşitli zararlara yol açmaktadır. Yapılan bir çok araştırmada Cd ve Pb toksisitesinin bitkilerde; tohum çimlenmesinde inhibisyon, kök-gövde uzamalarında ve ağırlıklarında azalma (Lagriffoul et al., 1998; Mishra and Choudhari, 1998; Obroucheva et al., 1998; Çatak vd., 2000; Munzuroğlu and Geçkil, 2002; Verma and Dubey, 2003; Dunbar et al., 2003; Kıran ve Munzuroğlu,

2004; Kiran and Şahin, 2005; Peng et al., 2005), pigment miktarında azalma (Stobart et al., 1985; Burzynski, 1987; Sinha et al., 1993; Sengar and Pandey, 1996; Lagriffoul et al., 1998; Chugh and Sawhney, 1999; Öncel et al.; 2000; Macfarlane and Burchett, 2001), fotosentetik birimlerde zarar ve fotokimyasal aktivitede azalma (Ahmed and Tajmir-Riahi, 1993; De Flillppis and Ziegler, 1993; Rashid et al., 1994; Poskuta et al., 1996; Nathalie and Carpentier, 1999; Sanità di Toppi and Gabrielli, 1999; Chugh, and Sawhney, 1999; Sarvari et al., 2002), enzim aktivitelerinde değişiklik (Stiborova et al., 1986; Vojtechova and Leblova, 1991; De Flillppis and Ziegler, 1993; Verma and Dubey, 2003; Zacchini et al., 2003), membran yapısında ve geçirgenliğinde değişiklik (Przymusinski et al.,1991; Stefanov et al., 1993; Fodor et al., 1995; Stefanov et al., 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999; Kocheva et al., 2004), hücre bölünmesinde inhibisyon (Wierzbicka, 1994; Eun et al., 2000; Yang et al., 2000; Kiran and Şahin 2005), mineral madde alınımı ve kullanımındaki değişimler (Walker et al., 1977; Burzynski, 1987; Haussling et al., 1988; Alcantara, 1994; Hernández et al., 1996; Das et al., 1997; Lagriffoul et al., 1998; Paivoke, 2002), aktif oksijen türlerinin artması (Chaitanya and Naithani, 1994; Stohs and Bagchi, 1995; Verma and Dubey, 2003; Cho and Seo, 2004) gibi olumsuzluklara neden olduğu bildirilmiştir.

Bitkiler, ağır metallerin alınmalarını engelleyecek ya da alınan ağır metale tolerans (dayanıklılık) göstermelerini sağlayabilecek; organik asitler ve karbonhidratların rizofere salınıp ağır metal alınımının azaltılması, alınan ağır metallerin aminoasit, ferritin, ağır metalotiyenin ve fitokelatin gibi moleküllerle kompleks yaparak hücre duvarları ve vakuol gibi metabolik yollardan uzak bölgelerde biriktirilmesi, antioksidan enzim aktivitelerinin ve antioksidan moleküllerinin miktarlarının artırılması, hücre membranlarının onarılması gibi savunma mekanizmalarına sahiptirler (Greger and Lindberg, 1986; Jackson et al., 1990; Verklaij and Schat, 1990; Krämer et al., 1996; Sanità di Toppi and Gabrielli 1999; Prasad et al., 2001; Hall, 2002; Verma and Dubey, 2003; Zacchini et al., 2003; Benavides et al., 2005).

Son yıllarda artan endüstriyel faaliyetler ve taşıt kullanımının neden olduğu Cd ve Pb kirlenmesi, Türkiye içinde önemli bir sorun haline gelmektedir. Özellikle tarım için ayrılmış topraklarda bu ağır metallerin birikimi, insan beslenmesinde önemli yeri olan buğday, arpa ve mısır gibi tarım bitkilerinde önemli ürün kayıplarına yol

açabilecektir. Bitkilerin aşırı ağır metale maruz kaldıklarında, bu metalleri dokularında biriktirdikleri göz önüne alınırsa, ürün kaybı yanında tarım bitkilerinin tüketilebilir sağlıklı besin olma özellikleri de azalacaktır. Mısır, Türkiye’de buğday ve arpadan sonra en geniş ekim alanına sahip bir tarla bitkisidir (Şahin, 2001). Türkiye’de toplam ekilebilir alanlarının %39.5’i tahıl tarımına ayrılmıştır ve bunun %3.9’unu mısır teşkil etmektedir. 2005 yılında 800 bin hektar alana mısır ekilmiş, 3,5 milyon ton üretim sağlanmış ve verim 4375kg/ha olmuştur (FAOSTAT İstatistikleri Özeti, 2005). Ülkemizde mısır, özellikle Güney Doğu Anadolu Projesi (GAP) kapsamındaki bölgelerde (Şanlı Urfa, Adıyaman, Siirt, Gaziantep, Diyarbakır ve Mardin) ikinci ürün olarakta ekilmekte ve üretimde verimin artırılması yönünde çalışmalar devam etmektedir.

Tez kapsamında, mısır bitkisinin seçilmesinde; hem mısırın önemli bir besin kaynağı olması hem de Türkiye’de yetişen mısır çeşitleri üzerinde ağır metallerin etkisini araştıran çalışmaların az olması etkili olmuştur. Bu araştırmada, Cd ve Pb ağır metallerinin mısır çeşitleri üzerindeki etkisi ve çeşitlerin gördüğü zararlar tespit edilip, dayanıklılığı oluşturan içsel savunma mekanizmalarının açıklanması amaçlanmıştır. Bu amaçla; tezin birinci aşamasında Türkiye’de yetiştirilen bazı mısır (*Zea mays* L.) çeşitlerine ait tohumlar çimlendirilerek erken fide evresinde çeşitlerin Cd ve Pb ağır metallerine karşı dayanıklılık dereceleri belirlenmiştir. İkinci aşamada ise saptanan bu çeşitlerden elde edilen fideler, plastik saksılara transfer edilerek, perlit kültür ortamında, 25°C sıcaklıkta, 16 saat gün uzunluğunda ve  $250 \mu\text{mol.m}^{-1}\text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde, %50 nemde kontrollü iklim odasında, Hewitt besin çözeltilisiyle sulanarak belirli bir gelişim evresine gelinceye kadar (4-5 yaprak) 14 gün süre ile yetiştirilmiştir. Daha sonra bitkilere Cd ve Pb ağır metallerinin farklı konsantrasyonları 8 gün süre ile uygulanmıştır. Deneme sonunda Cd ve Pb stresinin, mısır çeşitleri üzerindeki etkileri [kök ve gövde uzunluğu, ağır metal birikimi, iyon sızıntısı, malondialdehit (MDA) içeriği, pigment içeriği ve fotokimyasal aktivitedeki değişiklikler] ve bu streslere karşı oluşturulan yanıtlar (antioksidan enzim sistemleri) bazı fizyolojik ve biyokimyasal parametreler kullanılarak incelenmiştir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Mısır Bitkisinin Sınıflandırılması, Kökeni, Morfolojisi, Uyumu, Toprak ve İklim İsteği**

#### **2.1.1 Mısırın kökeni ve sistematik sınıflandırılması**

Mısır (*Zea mays* L.), kapalı tohumlular bölümünün (Angiospermeae), tek çenekliler sınıfına (Monocotyledonae) giren, buğdaygiller (Poaceae) familyasına ait  $2n=20$  kromozoma sahip tek yıllık otsu bir bitkidir.

Değişik görüşler öne sürülmekle beraber, son araştırmalar mısır bitkisinin orijininin ve gen merkezinin Amerika olduğunu göstermektedir. Güney Amerika'da binlerce yıldır kültürünün yapıldığını gösteren arkeolojik ve paleobotanik kanıtlar bulunmuştur (Benson and Pearce, 1987; Brenner, 1991).

#### **2.1.2. Mısırın morfolojisi**

Gelişmiş bir kök sistemine sahip mısır bitkisinde embriyonal kökler, genellikle bitkinin yaşamı boyunca görevlerini sürdürmelerine rağmen, asıl kök sistemi, erken fide evresinde ilk yaprağın çıkışından sonra, gövdenin toprak yüzeyinin 3-5cm altındaki boğumlarından çıkan ek köklerden ve toprak yüzeyinin hemen üstündeki 1-3. boğumdan çıkan destek köklerden oluşur. Ek kökler 60-80 cm yanlara, 2-2.5m derinlere yayılabilir. Kök derinliği, toprağın yapısı, sıcaklığı, nemi ve havasına bağlı olarak değişebilir (Elçi vd., 1987; Kün, 1997).

Mısır bitkisinde gövde, genelde sayıları 8-9 olan boğum ve boğum aralarından oluşur. Sap olarak adlandırılan ve içi öz denilen sıvı ile dolu olan mısır gövdesinin boyu, çeşitlerine ve yetiştirilmesine bağlı olarak 1,5-3 metre arasında değişir. En üst boğum arasının ucunda, erkek çiçek topluluğu olan tepe püskülü bulunur. Saptaki diğer boğumlarda birer yaprak bulunur ve bu boğumlardan sap ortasındaki bir ya da birkaç tanesi koçanı oluşturacak birer çiçek durumu (infloresans) taşırlar. Mısır koçanı, sapa bağlandığı boğumun, hemen üstünde bulunan oluk şeklinde bir çukur bölgede gelişir (Elçi vd., 1987; Kün, 1997).

Mısır, tahıllar içerisinde en büyük yapraklara sahip bitkidir. Çeşitlere ve çevre koşullarına bağlı olarak değişmekle birlikte genel olarak yaprak boyu 60-80

cm arasında, genişliği ise 5-15 cm arasında değişir. Sapın her boğumunda bir yaprak çıkar ve bir bitkide ortalama yaprak sayısı 12-18 arasındadır. Yapraklar, uzunluğuna paralel damarlı yaprak kını ve uzun bir yaprak ayasından oluşur. Kulakçık belirsizdir, bazı çeşitlerde kulakçık yerine uzun tüyler görülür. Yakacık varsa da belirgin değildir. Stomalar yaprak ayasının alt yüzeyinde daha fazladır (Elçi vd., 1987; Kün, 1997).

### **2.1.3. Mısırın uyumu, iklim ve toprak isteği**

Mısır ılıman ve tropik bölgelerde tarımı yapılan bir bitkidir. Sahip olduğu uyum yeteneği sayesinde farklı iklim ve toprak koşullarında yetişebilmektedir. Bu özellikleri ile dünyada en geniş yayılıma (Kuzey yarım kürede, Kanada'da 58° kuzey enlemlerinden, Güney Afrika'da 35-40° güney enlemlerine kadar uzanır) sahip tahıl bitkisidir. Deniz seviyesinden daha alçak yerlerde ve dört bin metre yüksekliklere kadar olan yerlerde tarımı yapılabilen mısır bitkisi 10-11 °C 'de çimlenmeye başlayabilir. Toprak sıcaklığı 5-10 cm derinlikte 15 °C'ye ulaştığı zaman çimlenme hızlanır. Optimum çimlenme sıcaklığı 18 °C'nin üzerindedir. En uygun büyüme sıcaklığı ise 25-30 °C arasındadır. 15 °C' nin altındaki sıcaklıklarda ilk büyüme yavaşladığı için verim düşer. Sıcak iklim bitkisi olmasına rağmen 38 °C' nin üzerinde birkaç gün devam eden sıcaklıklar bitkiye zarar verir. Aşırı sıcak olmaması koşulu ile güneşli günler mısır için idealdir. Yoğun bulutlu gün sayısının fazla olduğu subtropikal iklimlerde, ışığın ve fotosentezin azalmasından dolayı, mısır verimi tropikal bölgelere oranla düşer. Mısır bitkisinin su isteği fazladır ama suyu oldukça ekonomik kullanır. Bitkinin gelişmesi için optimum ve minimum bağıl nem değerleri sıcaklık ve alınabilen su miktarına bağlı olmakla birlikte genel olarak %50 ve altına inen bağıl nem koşullarında bitki olumsuz etkilenir. Ülkemizin iklim verileri dikkate alındığında düşük sıcaklık, yüksek sıcaklık ve düşük bağıl nem koşullarının hakim olduğu yöreler dışında kalan bölgelerde uygun çeşit ve sulamayla rahatlıkla mısır üretimi yapılabilir. Mısır bitkisi için en uygun toprak tipi su tutma kapasitesi ve alınabilir besin maddesi içeriği yüksek, drenajı ve havalandırması iyi olan siltli-killi topraktır. Toprak pH'ı 5-8 arasında olmalıdır (Benson and Pearce, 1987; Elçi vd.,1987; Brenner, 1991; Kün, 1997; Kırtok, 1998).

#### 2.1.4. Dünyada ve Türkiye'de mısır üretimi

Mısır dünyada buğday ve çeltikten sonra en çok ekimi yapılan ve en çok üretilen üçüncü tahıl bitkisidir. 2005 yılında mısırın ekim alanı, yaklaşık 131 milyon hektara ve bu alanda üretilen mısır miktarı 694 milyon tona ulaşmıştır. 1990 yılında hektar başına verim 36,812 hektogram iken, bu oran 2005 yılında 47,195 hektograma yükselmiştir (Çizelge 2.1). 2005 yılında dünyada mısır üretiminde 256,904,506 ton ile Amerika Birleşik Devletleri en büyük paya sahiptir. Amerika'yı sırası ile Çin, Brezilya, Meksika, Arjantin, Fransa ve Hindistan izlemektedir. Türkiye üretimde 22. sırada yer almaktadır (FAOSTAT, 2005).

Çizelge 2.1. Dünyada mısır üretimi (Ha: Hektar; Hg/Ha: Hektogram/Hektar; T: Ton) (FAOSTAT, 2006).

Yıllar	Ekim Alanı (Ha)	Verim (Hg/Ha)	Üretim (T)	Tohum (T)
1990	131,299,94	36,812	483,336,300	7,080,336
1995	136,496,356	37,887	517,139,731	5,421,125
2000	138,443,143	42,805	592,606,728	5,612,765
2001	139,119,075	44,118	614,735,171	5,795,767
2002	138,610,011	43,515	603,163,668	5,874,851
2003	144,320,774	44,534	642,711,958	5,892,474
2004	147,145,702	49,238	724,515,133	6,089,796
2005	147,170,849	47,195	694,575,552	6,050,996

Mısır (*Zea mays* L.) Türkiye'de buğday ve arpadan sonra en geniş ekim alanına sahip tahıldır (Şahin, 2001). Son 15 yılda Türkiye'deki mısır üretiminde 1.4 milyon tonluk bir artış kaydedilmiştir. 2005 yılında Türkiye'deki 800,000 hektar ekim alanından, 3.5 milyon ton düzeyinde mısır üretilmiştir. 1990 yılında hektar başına ürün verimi 40,803 hektogram iken bu oran 2003 yılında 50,000 hektograma yükselerek dünya ortalamalarının üstüne çıkmış ancak 2005 yılında tekrar 43,750 hektograma düşerek, dünya ortalamasının altına inmiştir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Türkiye'de mısır üretimi (Ha: Hektar; Hg/Ha: Hektogram/hektar; T: ton) (FAOSTAT,2006).

Yıllar	Ekim Alanı (Ha)	Verim (Hg/Ha)	Üretim (T)	Tohum (T)
1990	514,665	40,803	2,100,000	42,000
1995	515,000	36,893	1,900,000	15,450
2000	555,000	41,441	2,300,000	44,000
2001	550,000	40,009	2,200,000	40,000
2002	500,000	42,000	2,100,000	45,000
2003	560,000	50,000	2,800,000	56,000
2004	700,000	42,857	3,00,000	64,000
2005	800,000	43,750	3,500,000	64,000

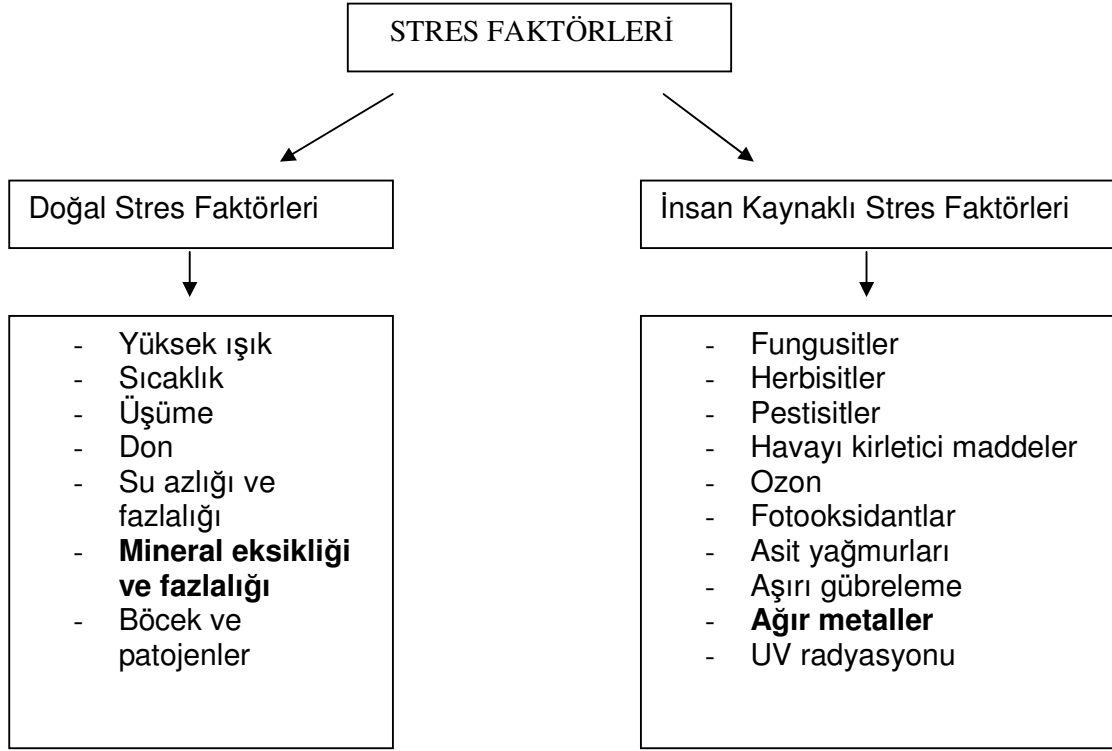
## 2.2. Stres Faktörleri ve Ağır Metal Stresi

Bir çevrede devamlı olarak ya da arada sırada meydana gelen çok sayıdaki olumsuz fakat hemen öldürücü olmayan koşullar stres olarak tanımlanmaktadır. Bir başka yaklaşımla; bitkide metabolizmayı, büyüme ve gelişmeyi etkileyen veya engelleyen, uygun olmayan herhangi bir durum yada madde stres olarak kabul edilir. (Lichtenhaler,1998; Kadioğlu, 1999; Gürel ve Avcıoğlu, 2001).

Tüm canlılar yaşamlarının belirli bir döneminde çeşitli streslere maruz kalabilirler. Hatta stres faktörleri tek başlarına değil çoğunlukla eş zamanlı olarak etkilerini göstermektedirler. Bu faktörler değişik şekillerde sınıflandırılmaktadırlar. Lichenthaler (1996)'e göre sınıflandırmada belirleyici olan insandır ve stres kaynakları insan kaynaklı olanlar ve doğal olanlar (insan kaynaklı olmayanlar) olarak ikiye ayrılır. Ağır metal stresi hem doğal kaynaklı (mineral madde eksikliği) hem de insan kaynaklı stres faktörleri içinde bulunmaktadır.

Yapay olarak elde edilenlerle beraber sayıları 109'u bulan elementler, metaller ve ametaller olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Metallerle ametaller arasındaki temel fark, tepkimelerdeki elektron alma-verme istekleridir. Elementlerin büyük çoğunluğunu oluşturan metaller, tepkimelerde elektron verme eğilimindedirler.





Şekil 2.1. Bitkileri etkileyen stres faktörleri (Lichtenthaler, 1996; Gürel ve Avcioğlu, 2001'tan değiştirilerek).

Genel olarak yoğunluğu 5 gramın üzerinde olan Zn ( $7.1g/cm^3$ ), krom [Cr ( $7.2g/cm^3$ )], Cd ( $8.6g/cm^3$ ), Ni ( $8.7g/cm^3$ ), Cu ( $8.9g/cm^3$ ), Pb ( $11.4g/cm^3$ ), Hg ( $13.5g/cm^3$ ) gibi metaller ağır metal olarak tanımlanmaktadır (Petrucci and Harwood, 1993a). Ancak "ağır metal" deyiminin üzerinde anlaşılması bir bilimsel tanımı oluşturulamadığından bilim dalları arasında farklı tanımlamalar yapılmaktadır. Örneğin X ışını ile çalışan araştırmacılar atom numarası 13'den büyük olan elementler için bu tanımı kullanırken, jeologlar ve kimyacılar atom numarası 13'ten büyük olan Fe, Co ve Cu gibi metalleri ağır metal olarak kabul etmemektedirler (Ergün ve Öncel, 2005). Kimya da bile tanım birliği bulunmayan "ağır metal" deyimi tıp ve biyolojide çok daha esnek kullanılmaktadır.

Metallerin bazıları (Cu, Zn, Fe, Mn, Mo, Ni, Co gibi) bitki ve hayvanların gelişmesi için gerekli mikro besin elementleridir. Mikro besin elementi olsun yada olmasın bütün metaller belli bir konsantrasyonun üzerinde, canlılar için zararlıdır.

### **2.2.1. Ağır metallerin bulaşma kaynakları**

Ağır metal toksisitesi, hem doğal hem de insan kaynaklı stres faktörleri sonucunda oluşur. Kalamın ve serpentin tipi topraklar; Zn, Pb, Cd (kalamın) ve Ni, Cr, Co (serpentin) ağır metallerini yüksek konsantrasyonlarda içerirler (Greger, 1999). Evrimsel gelişimleri süresince bu topraklarda yüksek konsantrasyonlarda ağır metale maruz kalmış bitkiler ağır metallere dayanıklılık mekanizmaları geliştirerek yaşamlarını sürdürebilmişlerdir. Esas tehlikeli olan ve stres yaratan insan kaynaklı ağır metal kirlenmesidir. Bu tip kirlenmede ağır metaller çeşitli yollarla bulunduğu bölgenin çok daha uzağına yayılabilmekte ve canlı yaşamını olumsuz etkilemektedir.

Maden ocaklarının işletilmesi, endüstriyel kuruluşların atıkları, taşıt kullanımı, deniz taşımacılığı, gübreleme ve ilaçlama gibi tarımsal faaliyetler, kentsel ve ticari atıklar geniş ölçüde ağır metal yayılımına neden olmaktadır (Eick et al., 1999; Macfarlane and Burchett, 2002; Sharma and Dubey, 2005).

### **2.2.2. Ağır metal kirlenmesinin engellenme yöntemleri**

Ağır metaller ile kirlenmiş toprağın ve suların temizlenme işlemlerinin oldukça zor olması nedeni ile kirlenmenin temizlenmesinden çok, kirlenmenin engellenmesi yöntemleri üzerinde durulmalıdır.

Ağır metal kirlenmesini engellemek için, endüstriyel kuruluşların atık suları fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler olmak üzere üç şekilde arıtılmaktadır. Ancak bu yöntemlerin maliyetinin yüksek olması arıtımın düzenli olarak yapılmasını engellemektedir. Maliyeti düşürmek için ekonomik değeri olmayan bazı bitki atıklarının [soğan kabuğu (Kumar et al., 1982), elma posası (Maranón and Sastre, 1991), pirinç kabuğu (Tang et al., 2003), atık çay yaprakları (Tee and Khan, 1998), mısır koçanları (Ünalın, 2006), vb.] arıtma işlemlerinde kullanılmasına yönelik araştırmalar yapılmaktadır.

Endüstri kuruluşlarının atık sularının temizlenmesi kadar, bacalarından çıkan kirleticilerin kontrolünde ağır metal bulaşmasını engellemekte önemlidir. Bacalara takılacak uygun konverterler, düzenli bakımları yapıldığı takdirde ağır metal bulaşmasını engellemektedir.

Motorlu taşıt kökenli ağır metal kirlenmesine (özellikle Pb) karşı alınabilecek önlemlerin en önemlisi kurşunsuz benzin kullanımına geçilmesi ve egzoz emisyonlarının istenen değerlere çekilebilmesi için katalitik konverter kullanımının teşvik edilmesidir. Bunun dışında, sıvılaştırılmış petrol gazı (LPG) gibi alternatif yakıt ve elektrik enerjisinin taşıtlarda kullanımının yaygınlaştırılması, toplu taşımacılığın geliştirilmesi ağır metal kirliliğinin azaltılmasına katkıda bulunacaktır.

### **2.2.3. Ağır metal kirliliğinin giderilme yöntemleri ve fitoremediasyon**

Aritma sisteminin kurulması ve kullanılması, konverter takılması gibi ağır metal kirliliğini önleyici yöntemlere rağmen toprak ve su kirliliği engellenememektedir. Ayrıca kentsel atıklar, ilaçlama ve gübreleme yolu ile de ağır metaller doğrudan doğaya verilmektedir.

Geniş alanlara yayılmış ağır metal kirliliğinin temizlenmesi, imkansız olarak görünse de günümüzde geniş alanlara uygulanabilen ve maliyeti düşük bir yöntem olan fitoremediasyon üzerine yapılan araştırmalar, toprağın ve suyun ağır metallere temizlenmesi için umut ışığı olmuştur.

Bazı bitkiler metalleri yüksek oranda biriktirebilirler. Diğer bitkilerden en az yüz kat daha fazla miktarda bir ya da birden fazla metali, hiçbir zarar görmeden biriktirebilen bu tip bitkilere hiperakümülatör (metalbiriktirici) bitkiler denilmektedir. Günümüzde ağır metalleri yüksek oranda biriktirebilmelerinden dolayı metalbiriktiricilerin yüksek düzeyde ağır metal içeren toprak ve suların iyileştirilmesinde kullanılmasına yönelik çalışmalar giderek önem kazanmaktadır. Bu tür iyileştirme işlemine yani doğayı yine doğadan faydalanarak (bitki kullanarak) temizleme yöntemine fitoremediasyon denir. Fitoremediasyonun diğer temizleme yöntemlerine göre; geniş alanlara uygulanabilmesi, çevreyle dost olması, ve maliyetinin daha az oluşu (Saxena et al., 1999; Clemens et al., 2002; Pulford and Watson, 2003; Torresdey et al., 2005) gibi bir çok avantajı vardır. Fitoremediasyonda kullanılan bitkiler daha çok kalamın ve serpentin tipi topraklarda yetişmektedirler. Bu topraklardan kalamın; Zn, Pb, Cd ve serpentin; Ni, Cr, Co ağır metallerini yüksek konsantrasyonlarda içermektedir (Greger, 1999). Günümüzde 400'e yakın metalbiriktirici bitki türü saptanmıştır (Barazani et al.,

2004; Deng et al., 2004; Filho et al., 2004; García et al., 2004; Matthews et al., 2004; Pawlak et al., 2005; Wójcik et al., 2005). Metalbiriktirici bitkiler içinde özellikle *Thlaspi* ve *Alyssum* cinslerine ait bazı türler (Abou Auda et al., 2002; Kidd and Monterroso, 2005), kütlelerine oranla oldukça yüksek miktarlarda ağır metal biriktirebilmektedirler. Örneğin *Thlaspi caerulescens* çinko ve kadmiyum biriktirebilen bir metalbiriktiricidir. Tipik bir bitki 100 ppm çinko ve 1 ppm kadmiyum biriktirebilirken, *Thlaspi caerulescens* 30000 ppm çinko ve 1000 ppm kadmiyumu hiç zarar görmeden biriktirebilir (Brown et al., 1995).

### **2.3. Bitkilerde Ağır Metal Stresi**

Ağır metal iyonlarını toprak çözeltisinden kökleri aracılığı ile alan bitkiler topraktaki kirlenmeden ilk etkilenen canlılardır.

#### **2.3.1. Bitkilerde ağır metal alınımı**

Yapılan araştırmalarda bitkilerin, az miktarda da olsa atmosferde bulunan ağır metalleri yaprakları aracılığı ile alabildikleri gösterilmesine rağmen (Harrison and Chirgawi, 1989; Lindberg et al., 1992; Godzik, 1993; Marschner, 1995) ağır metal alınımı büyük oranda kökler aracılığı ile olmaktadır. Ağır metaller topraklarda, kolloidlere tutunmuş halde, organik maddelere bağlı halde ve toprak çözeltisi içinde iyon halinde bulunurlar. Bitkiler ancak toprak çözeltisinde iyon halinde bulunan ağır metalleri kökleri aracılığıyla alabilirler. Koşulların değişmesi (pH, sıcaklık, organik madde miktarı, diğer metallerin varlığı, mikroorganizmalar vb.) toprak çözeltisi içindeki ağır metal konsantrasyonunu değiştireceğinden ağır metal alınımını da etkileyecektir. Örneğin pH'ın düşmesi ortamdaki H<sup>+</sup> iyonlarının artmasına neden olmaktadır, artan H<sup>+</sup> katyonları, ağır metal katyonları (molibdenin anyon formu da bulunduğu için istisnadır) ile rekabete girmekte, kolloidlere tutunmasını engellemekte ve böylece ağır metallerin toprak çözeltisindeki konsantrasyonunun artmasına neden olmaktadır (Marschner, 1995; Greger, 1999).

Ağır metal alınımı, bitki türüne bağlı olarak da değişiklik göstermektedir. Kök katyon değişim kapasitesi, kök yüzey alanı gibi özellikler ağır metal alınımını etkilemektedir (Davies, 1995). Ayrıca bitkiler rizosfer pH'sını değiştirerek (Jackson et al., 1990; Muranyi et al., 1994), ya da rizosfere malat, sitrat, musilaj gibi

maddeler salgılayarak (Greger and Lindberg, 1986; Morel et al., 1986; Jackson et al., 1990; Puthotá et al., 1991) aldıkları ağır metal miktarını değiştirebilmektedirler. Topraktaki mikroorganizmalarda, ağır metalleri absorbe ederek ve/veya biriktirerek, alınabilir ağır metal miktarını değiştirebilmektedirler. Örneğin Marschner vd. (1996), *Ektomycorrhiza* mikroorganizmasının *Picea abies* L. bitkisinde, Pb ağır metalinin alınımını, iletimini ve toksisitesini değiştirdiğini bildirmişlerdir.

Bazı durumlarda bir ağır metal diğer bir ağır metalin alımını arttırabilmekte ya da azaltabilmektedir (He et al., 2005; Lombardi and Sebastiani, 2005). Pb ve Cd ağır metallerinin topraktaki ve bitkideki konsantrasyonun artmasının, potasyum (K), Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn gibi besin elementlerinin alınmasını ve kullanılmasını etkilediği birçok araştırmada tespit edilmiştir (Walker et al., 1977; Hausling et al., 1988; Clarkson and Luttge, 1989; Godbold and Kettner, 1991; Rivetta et al., 1997; Sharma and Dubey, 2005)

Kuvvetli metal bağlayıcı sentetik kimyasallar [Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) ve Etilen diamin disuksinik asit (EDDS) gibi] da metallerin çözünürlüğünü arttırmakta ve metallerin bitkiler tarafından alınımını kolaylaştırmaktadırlar (Jarvis and Leung, 2001; Luo et al., 2005).

### **2.3.2. Bitkilerde ağır metal taşınımı**

Köklerden alınan ağır metaller ksilem aracılığı ile gövde ve yapraklara iletilmektedir. Kök içine alınan ağır metaller apoplastik ve/veya simplastik yolla ksileme ulaşırlar. Endodermal hücre tabakası, ksileme apoplastik yoldan ağır metal ulaşımını engelleyen bir bariyer görevi yapmaktadır (Seregin and Ivanov, 1997; Tester and Leigh, 2001). Bu nedenle genellikle ağır metaller simplastik yoldan bu tabakayı aşıp ksileme ulaşmak zorundadırlar (Tester and Leigh, 2001). Ksilem ile ağır metal iletimi bitki türüne ve metal çeşidine bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Ni, bazı bitkilerin ksileminde Ni-peptit kompleksi şeklinde taşınırken (Cataldo et al., 1978), metalbiriktirici (hiperakümülatör) bitkilerde nikelin histidin aminoasiti ile kompleks oluşturularak taşındığı bildirilmiştir (Krämer et al., 1996). Bazı metaller ise (örneğin Cd) iyon halinde ksilemde taşınabilmektedir

(Mench et al., 1988). Bunun yanı sıra organik asitlerin de taşınmada rol oynadığı bildirilmiştir (Greger, 1999). Floem aracılığı ile de ağır metal iletimin olup olmadığının tespitine yönelik araştırmalarda, Cd uygulanmış yapraklarda kısmi bir taşınım söz konusu olsa da (Greger et al., 1993), Cd, Cu ve Zn ile yapılan diğer araştırmalarda, bu ağır metallerin yapraklardan köklere uzanan bir iletiminin olmadığı saptanmıştır. Floemin, muhtemelen ağır metalleri bağlayabilen iyon ve moleküllere sahip protoplazma içermesi ağır metallerin taşınmasını zorlaştırmaktadır (Greger, 1999).

### **2.3.3. Ağır metale maruz kalmanın bitkilerde yol açtığı zararlar**

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

#### **2.3.3.1. Kök, gövde ve yapraklardaki değişiklikler**

Ağır metal zararının ilk ve en belirgin etkisi köklerde görülür (Tester and Leigh, 2001; Verma and Dubey, 2003). Yüksek metal konsantrasyonuna maruz kalmış bitkilerde kökler, normal bitki köklerine göre oldukça kısa kalmakta ve saçak kök sayısında azalma, yan köklerde artma ya da azalma görülebilmektedir. Bunların dışında köklerde lignifikasyon ile epidermis ve hipodermiste bazı yapısal değişiklikler de saptanmıştır. Ağır metal alınımları devam ettikçe etkisi gövde de gözükmemekte ve gövde uzaması da etkilenmektedir. Gerek kök ve gerekse gövdenin taze ve kuru ağırlıklarında azalma meydana gelmekte ve bitki büyümesi yavaşlamaktadır (Barceló and Poschenrieder, 1990; Punz and Sieghardt, 1993; Hagemeyer and Breckle, 1996; Peralta et al., 2001; Munzuroğlu and Geçkil, 2002; Stolt et al., 2003; Köleli et al., 2004; Sharma et al., 2004; Chaoui and Ferjani, 2005; Lombardi and Sebastiani, 2005).

Maruz kalınan ağır metal çeşidine ve konsantrasyonuna bağlı olarak bitki yapraklarında; şekil değişikliği, alan küçülmesi, sararma ve nekrotik leke oluşumu görülebilmektedir (Krupa and Moniak, 1998; Lagriffoul et al., 1998; Benavides et al., 2005; Köleli et al., 2004; Lombardi and Sebastiani, 2005). Benavides vd. (2005)'ne göre, Cd toksisitesinin en kolay biçimde saptanan etkisi, yaprak

büyümesinin inhibisyonu, yapraklarda yuvarlanma ve sararmadır. Ayrıca aynı araştırmacılar, yapraklardaki sararmanın (klorosiz), Fe yetersizliği (Haghiri, 1973), P yetersizliği ya da Mn taşınımının engellenmesi (Godbold and Hutterman, 1985) nedeniyle olabileceğini de bildirmişlerdir.

### **2.3.3.2. Ağır metallerin enzim aktivitesi üzerine etkisi**

Enzimlerin aktif bölgelerde bulunan sülfidril grupları, enzim aktivitesinde çok önemli rol oynarlar. Pozitif yüklü ağır metaller, bu bölgelere bağlanarak enzimlerin aktivitelerinde inhibisyona neden olurlar. Ros vd. (1990), *in-vitro* koşullarda yaptıkları çalışmalarında, Pb ve Cd'un belli konsantrasyonlarının, Ribuloz 1-5 bifosfat karboksilaz/oksijenaz (Rubisco) ve fosforibulokinaz enzimlerini inhibe ettiğini belirlemişler ve tam inhibisyon için Pb ve Cd'un milimolar düzeyinde olması gerektiğini bildirmişlerdir. Hernández vd., (1996), yüksek Cd konsantrasyonunun, Nitrat redüktaz enziminin aktivitesini inhibe ederek, nitratın absorpsiyonunu ve köklerden gövdeye taşınımını azalttığını saptamışlardır. Cu, Zn, Cd, Pb, Ni, Mn gibi ağır metallerle yapılan diğer araştırmalarda, bu metallerin farklı konsantrasyonlarının, rubisco, PEP-karboksilaz, 3-Fosfoglisirik asit kinaz, Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) bağımlı gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz, Fruktoz-1,6-bifosfataz, Adenozin-difosfat glukoz pirofosforilaz, Fruktoz 6-fosfat, 2 kinaz, gibi bir çok enzimin inaktivasyonuna neden olduğu saptanmıştır (Çizelge 2.3).

Ağır metallerin bazıları enzimlerin çalışabilmesi için gerekli kofaktörlerdir. Ancak yüksek konsantrasyonlardaki başka metaller, kofaktör metallerin yerlerine geçebilir ve enzim aktivitesinde azalmaya neden olabilirler. Van Assche ve Clijters (1986), yaptıkları araştırmada; yüksek konsantrasyonlarda bulunan Zn'un, Rubisco enziminin kofaktörü olan Mg'un yerine geçtiğini ve buna bağlı olarak enzim aktivitesinin azaldığını saptamışlardır. Benzer bir durum süperoksit dismutaz (SOD) enziminde de görölmektedir. Mg bu enzimde Fe yerine geçebilmektedir (Vance and Miller, 1998). Pb'unda yüksek konsantrasyonlarda, SOD enziminin aktivitesi için gerekli olan Cu, Fe ve Mn ağır metallerinin yerine geçebildiği (Sharma and Dubey, 2005) veya bu metallerin alınımını engellediği bildirilmiştir (Walker et al., 1977; Hausling et al., 1988).

Bazı durumlarda ise, ağır metaller enzimlerin aktivitelerini arttırabilmektedir. Drażkiewicz (1994), yaptığı bir çalışmada; Hg, Zn, Cu gibi bazı ağır metallerin belli konsantrasyonlarının pirinç yapraklarında klorofilaz enziminin aktivitesini arttırdığını saptamıştır. Cd ve Pb'unda yüksek konsantrasyonlarda, fosfotaz,  $\alpha$ -amilaz, proteaz ve ribonükleaz enzimlerinin aktivitelerini arttırdığı bildirilmiştir (Lee et al, 1976; Jana and Choudhari, 1982).

Çizelge 2.3. Ağır metal stresine maruz kalan bitki türlerinde inhibisyona uğrayan bazı enzimler (Prasad and Strzalka, 1999).

Bitki türleri	Enzim	Metal	Kaynak
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Ribuloz 1-5 bifosfat karboksilaz/oksijenaz, PEP-karboksilaz, 3-fosfogliseric asid kinaz, NADP bağımlı gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz, Peroksimal enzimler	Zn	Van Assche and Clijters, 1986
<i>Hordeum vulgare</i>	Ribuloz 1-5 bifosfat karboksilaz/oksijenaz	Cd, Cu, Pb	Stiborova et al., 1986
<i>Nicotiana tabacum</i>	Ribuloz 1-5 bifosfat karboksilaz/oksijenaz	Mn	Houtz et al., 1988
<i>Cajanus cajan</i>	Ribuloz 1-5 bifosfat karboksilaz/oksijenaz PEP-karboksilaz, 3-fosfogliseric asid kinaz, NADP bağımlı gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz Fruktoz-1,6-bifosfataz, Aldolaz	Cd, Ni	Sheoran et al., 1990
<i>Pisum sativum</i>	Ribuloz 1-5 bifosfat karboksilaz/oksijenaz	Cu	Angelov et al., 1993
<i>Triticum aestivum</i>	Ribuloz 1-5 bifosfat karboksilaz/oksijenaz, Fruktoz-1,6-bifosfataz, Adenozin-difosfat glukoz pirofosforilaz, Fruktoz 6-fosfat, 2 kinaz	Cd	Malik et al., 1992
<i>Zea mays</i>	PEP-karboksilaz, 3-fosfogliseric asit kinaz	Cd, Cu, Pb, Zn	Stiborova et al., 1986

### 2.3.3.3. Ağır metallerin membranlar üzerine etkisi

Ağır metaller, lipitlere bağlanarak ve/veya aktif oksijen türlerinin (AOT) oluşumunu arttırıp lipit peroksidasyonuna neden olarak (Stefanov et al., 1993; Halliwell and Gutteridge, 1999; Romanowska et al., 2002; Wu et al., 2003; Smeets et al, 2005) membranların (hücre, kloroplast, mitokondri, tilakoid membranları vb.) yapılarının



ve işlevlerinin değişmesine sebep olurlar. Verma ve Dubey (2003), 0.5 ve 1mM Pb uygulamasının, *Oryza sativa* L. bitkisinin iki çeşidin de lipid peroksidasyonunu arttırdığını tespit etmişler ve bunun aktif oksijen türlerinin artışının bir göstergesi olduğunu bildirmişlerdir. Zarsı yapıların kompozisyonunda meydana gelen değişiklikler hücre membran akışkanlığının değişmesinin yanında, membrana bağlı enzimlerin yapısının ve aktivitelerinin de değişmesine neden olmaktadır. Cu, Ni, Pb ve Cd'un belirli konsantrasyonlarının, bitkilerin hücre membranlarında bulunan Adenin tri fosfataz (ATPaz) enziminin aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (Kennedy and Gonsalves, 1987; Ros et al., 1990, 1992; De Vos et al., 1991; Fodor et al., 1995).

#### **2.3.3.4. Ağır metallerin fotosentez üzerine etkisi**

Ağır metal stresi; kloroplast yapısının bozulması, klorofil ve karotenoid biyosentezinin inhibe olması, elektron akımının aksaması, Calvin döngüsü enzimlerinin aktivitelerinin inhibe olması, stoma sayısında ve işlevindeki değişikliklere bağlı CO<sub>2</sub> yetersizliği gibi olumsuz durumlara yol açarak fotokimyasal aktivitenin inhibisyonuna neden olmaktadır (Barceló et al., 1986a,b; De Filippis and Ziegler, 1993; Rashid et al., 1994; Baucher and Carpentier, 1999; Chugh and Sawhney, 1999; Macfarlane and Burchett, 2001; Prasad et al, 2001; Kosobrukhov et al., 2004)

Baszyński vd. (1980) yaptıkları çalışmada, Cd uygulanmış bitkilerin kloroplastlarında yapısal bozukluklar (büyük plastoglobuli oluşumu), lamellerin yapısal organizasyonunda değişiklikler) saptamışlardır. Stefanov vd. (1993), Pb ağır metalinin, *Zea mays* ve *Phaseolus vulgaris* bitkilerinin kloroplast zarlarında bulunan glikolipid (özellikle monogalaktosil diaçilgliserol) miktarlarında önemli değişikliklere neden olduğunu bildirmişlerdir. Kloroplast yapısındaki bu olumsuz değişikliklerin yanında pigment miktarlarındaki azalmalar da fotosentetik aktivitenin inhibe olmasının diğer bir nedenidir. Ağır metallerin; δ-amino levulinik asit dehidrogenaz ve protoklorofilid redüktaz gibi enzimlerinin aktivitelerinin etkileyerek, fotosentetik pigmentlerin miktarlarının azalmasına neden oldukları bilinmektedir (Gadallah, 1995; Ouzounidou, 1995; Van Assche and Clijsters, 1990). Cd ve Pb'un konsantrasyonunun artması, bitkilerin K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn gibi besin elementlerinden yararlanmasını engellemektedir (Walker et al., 1977; Haussling et

al., 1988; Stobart et al., 1988; Clarkson and Luttge, 1989; Godbold and Kettner, 1991; Rivetta et al., 1997; Lagriffoul et al., 1998; Sharma and Dubey, 2005). Bu elementlerden Mg ve Fe klorofil sentezi için gereklidirler ve eksikliği klorofil miktarının azalmasına neden olmaktadır (Burzynski, 1987).

Fotosentetik organelin en önemli birleşeni olan, 25 alt ünitelerden oluşmuş fotosistem II (PS II) metal stresinden en çok etkilenen birimlerin başında gelmektedir. *Vigna unguiculata* bitkisine çeşitli konsantrasyonlarda Cd uygulamasının PSII'de bulunan 17, 23, 33 ve 43 kilodaltonluk polipeptitlerin yapısının bozulmasına neden olduğu bildirilmiştir (Nedunchezian and Kulandaivelu, 1995). 17, 23 ve 33 kilodaltonluk polipeptitlerin iki önemli görevi vardır; PSII'nin stabilizasyonunu sağlarlar ve suyun parçalanması (Hill reaksiyonu) ile elektronun klorofil pigmentine aktarılmasında görev alırlar. Ayrıca ağır metal stresinin, PSII'de bulunan D<sub>1</sub> protein yapısının bozulmasına neden olduğunu gösteren çalışmalar vardır (Hideg et al., 1994). Cd, Co, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn ile yapılan çalışmalarda (Clijster and Van Assche, 1985; Baszyński, 1986; De Filippis and Ziegler, 1993; Drażkiewicz, 1994; Rashid et al., 1994; Sigfridsson et al., 2004) bu ağır metallerin belirli konsantrasyonlarının PSII üzerinde inhibisyona neden olduğu saptanmıştır. Özellikle Cd, PSII'nin hem alıcı (akseptör) hem de verici (donör) bölgelerini etkilemektedir. Verici bölgede Cd'un oksijen çıkaran sistemde (OEC) O<sub>2</sub>'nin çıkışını ve alıcı bölgede Q<sub>A</sub> ve Q<sub>B</sub> arasındaki elektron taşınımını inhibe ettiği bildirilmiştir (Krupa and Moniak, 1993; Krupa, 1999; Sigfriddson et al., 2004; Faller et al., 2005).

Ağır metallerin yüksek konsantrasyonlarda Fotosistem I (PS I) üzerinde de olumsuz etkilerini gösteren çalışmalar vardır (Miles et al., 1972; Radmer and Kok, 1974; Sersen et al., 1998). Ancak PSII'nin, PS I'e oranla çok daha hassas olduğu bildirilmiştir (Mohanty et al., 1989; Sersen et al., 1998).

Fotosentez mekanizmasının ağır metal stresinden etkilenen diğer bir işlevi de Calvin döngüsüdür. Çeşitli bitkiler üzerinde yapılan araştırmalarda ağır metal stresinin, Ribuloz 1-5 bifosfat karboksilaz, fosfonenol piruvat karboksilaz, Gliseraldehit 3-fosfat dihidrogenaz ve Ribuloz 5-fosfat kinaz gibi Calvin döngüsünde rol alan enzimlerin aktivitelerinde önemli ölçüde inhibisyona neden

olduğu tespit edilmiştir (Vallee and Ulmer, 1972; Vojtechova and Leblova, 1991; De Filippis and Ziegler, 1993; Prasad and Strzalka, 1999).

### **2.3.3.5. Ağır metallerin serbest radikal oluşumu üzerine etkisi**

Ağır metaller hücre içinde serbest radikal oluşumunu indüklerler ve dolaylı yoldan lipit peroksidasyonuna, nükleik asitlerin zarar görmesine, klorofil parçalanmasına ve fotosentezin inhibisyonuna neden olurlar. Bazı ağır metaller (Fe, Cu vb.) doğrudan serbest radikal oluşumuna neden olurken, Cd, Pb ve Hg gibi redoks kapasitesi olmayan ağır metaller, glutasyon miktarını azaltarak, Ca bağımlı sistemleri aktive ederek ve demir bağımlı uygulamaları etkileyerek oksidatif oluşuma öncülük ederler (Pinto et al, 2003).

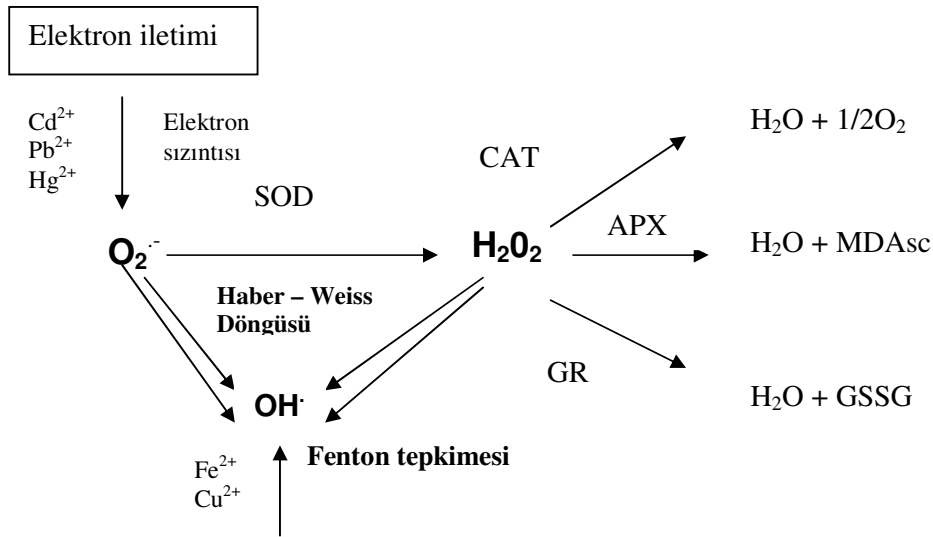
Biyolojik sistemlerde hidroksil-, lipoksi-, tiyol-, fenil-, ve nitroksit- radikalleri gibi oksijen, sülfür, nitrojen ve karbon merkezli serbest radikaller oluşabilir (Kalyanaram, 1996; Dietz et al., 1999). Serbest radikallerin canlılarda en yaygın bulunan formu aktif oksijen türleri (AOT)'dir. AOT'ler redoks tepkimeler sırasında moleküler oksijenden oluşabildiği gibi oksijenin tamamlanmamış indirgenmesi sırasında, mitokondride suyun yükseltgenmesi ya da kloroplastlarda elektron aktarımı sırasında da oluşabilir (Ashraf, 1994; Fridovich, 1995).

Yüksek metal konsantrasyonu ve yüksek ışık gibi uygun olmayan (stres) koşulları, mitokondri ve kloroplastların elektron taşıma sisteminde elektron iletimini engeller ve elektron sızıntısına neden olurlar. Elektron ortamda bulunan oksijen tarafından alınır ve sonuçta oksijen indirgenmesinin ilk ürünü olan süperoksit ( $O_2^-$ ) radikali oluşur. Bu tepkime ilk kez Mehler adlı araştırmacı tarafından tanımlandığı için Mehler tepkimesi olarak adlandırılmaktadır. Süperoksitin hem indirgeyici hem de yükseltgeyici özelliği vardır. İki molekül süperoksit radikali pH'a bağlı olarak kendiliğinden veya süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile katalizlenerek hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve  $O_2$  'ye dönüşür.

Mehler reaksiyonu sonucu oluşan  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$  gibi hem indirgeyici hem de yükseltgeyici olarak davranır. Eğer ortamda metal katalizörler veya enzimler yoksa organik moleküllere doğru düşük bir afinite gösterirler. Optimal durumlarda bile hücrede çok yüksek seviyede sentezlenen  $H_2O_2$ 'in hücre zarlarından geçebilme özelliği vardır. Bitki hücrelerindeki  $H_2O_2$ 'in büyük bölümü  $O_2^-$  radikalinin SOD

enzimi ile katalizlenmesi yoluyla oluşmaktadır. Katalaz (CAT), Askorbat peroksidaz (APX) ve bazı genel peroksidazlar,  $H_2O_2$ 'in parçalanmasını katalizlemektedir. Askorbat ve  $H_2O_2$ 'in APX katalizörlüğündeki reaksiyonu sonucunda monodehidroaskorbat (MDHA) ve su oluşmaktadır (Şekil 2.2.). Bu reaksiyonun tamamında Monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), glutatyon redüktaz (GR) önemli yer tutmaktadır ve ortak çalışmayla hidrojen peroksitin zararlı etkisi ortadan kaldırılmaktadır (Asada, 1999; Bray et al.,2000; Garratt et al., 2002).

Tüm bu reaksiyonlar olurken ortamda hem  $O_2^-$  hem de  $H_2O_2$  radikalleri bulunmaktadır. Bu radikaller birbirleriyle tepkimeye girerek çok daha tehlikeli bir radikal olan hidroksil radikalini ( $OH\cdot$ ) meydana getirirler (Haber-Weiss tepkimesi). Normal şartlarda bu reaksiyon çok yavaş yürüdüğünden hücreye fazla zararı olmamaktadır (Şekil 2.2.). Ancak Fe, Cu gibi ağır metallerin yüksek konsantrasyonlarında bu reaksiyonun hızlandığı (Fenton tepkimesi) saptanmıştır (Hausladen and Alscher, 1993; Nikookar et al., 2005).



Şekil 2.2. Ağır metallerin neden olduğu AOT oluşumu.

Diğer bir aktif oksijen türü ise singlet oksijen ( $^1O_2$ )'dir. Klorofil tarafından ışık enerjisinin absorbe edilmesiyle 'aktif triplet klorofil molekülü' ( $^3Klo^*$ ) oluşmaktadır. Aktive olmuş klorofil molekülünün, absorbe ettiği enerjiyi moleküler oksijene aktarması sonucunda üretilen  $^1O_2$  oksijenin fizyolojik olarak elektron

eklenmemiş enerjilendirilmiş formudur. Oldukça aktif olan bu molekül iki elektronun transfer edildiği tepkimelere katılabilir. Bununla birlikte, ışık altındaki kloroplastlarda singlet oksijene doğrudan rastlanmamıştır. Asada ve Takahashi (1987), singlet oksijenin üretilse bile sulu ortamlarda çok kısa ömrünün olduğunu, çevresindeki moleküllerle yüksek oranda tepkimeye girdiğini ve üretildiği yerde tilakoid membranlardaki karotenoidler tarafından yok edildiğini bildirmişlerdir.

#### **2.3.4. Bitkilerin ağır metal zararından korunma mekanizmaları**

Bitkilerin strese yanıtı, kaçınma (sakınma) ve tolerans (dayanma) olmak üzere iki şekilde olur (Lewitt, 1980; Bray et al., 2000). Kaçınma, stres faktörlerinin bitkiye girişinin önlenmesi veya azaltılması olup, bitki morfolojisinde ve metabolizmasında değişiklikler meydana getirir. Tolerans, stres faktörlerinin etkilerinin giderilmesi, azaltılması ve ortadan kaldırılması gibi etkin mekanizmaları kapsamaktadır.

##### **2.3.4.1. Ağır metal alınımından sakınma**

Bazı bitkiler rizosferdeki pH'sını artırarak, ağır metal alınımını azaltacak yöntemler geliştirmişlerdir. pH artınca metallerin hareketliliği (mobilitesi) azalmaktadır (Jackson et al., 1990). Bazı organik asitlerin rizosfere verilmesi ve burada ağır metallere bağlanması (kelatlaşma), metal alınımının azalmasına neden olabilmektedir. Cd'un kelat (metal+elektron verici moleküller) formunda kökler tarafından alınmadığı gösterilmiştir (Greger and Lindberg, 1986) Çeşitli karbonhidratları içeren ve köklerin apikal bölgesinden salgılanan musilaj da ağır metallerle yüksek oranda bağlanma kapasitesine sahiptir (Puthota et al., 1991). Musilaj ve kalloz gibi karbonhidratların salınımının, Cd stresini engellemeye yönelik bir savunma olduğu bildirilmiştir (Verkleij and Schat, 1990; Wagner, 1993).

##### **2.3.4.2. Antioksidan savunma sistemi**

Ağır metaller doğrudan etkileri yanında, serbest radikal oluşumunu teşvik ederek dolaylı yoldan da bir çok zarara (oksidatif stres) neden olurlar. Serbest radikaller içinde özellikle aktif oksijen türleri olan OH<sup>·</sup>, O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> radikalleri ağır metal stresine maruz kalan bitkilerde bitkiye zarar verecek

düzeyle çıkabilmektedir (Shah et al., 2001). Bitkiler serbest radikallerin zararlarından korunmak için kompleks bir antioksidan savunma sistemine sahiptir. Antioksidan terimi, aktif oksijen türlerini, kendisi bir yıkıcı radikale dönüşmeden, baskılayan bir molekül olarak tanımlanabilir. Antioksidan savunma sistemi, enzimleri ve bazı indirgen molekülleri içeren bir sistemdir.

### **Antioksidan Enzimler**

Antioksidan enzimler [süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1), katalaz (CAT; EC 1.11.1.6), peroksidaz (POD; EC 1.11.1.7), askorbat peroksidaz (APX; EC 1.1.1.11), glutatyon redüktaz (GR; EC 1.6.4.2) ve diğer askorbat-glutatyon çevrimi enzimleri (monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR; EC 1.6.5.4) ve dehidroaskorbat redüktaz (DHAR; EC 1.8.5.1)] ağır metaller üzerinde doğrudan etkili değildir, oluşan serbest radikalleri çeşitli dönüşümler yaparak etkisiz hale getirirler ya da antioksidan moleküllerin çevrimini, degradasyonunu ve sentezini katalizler.

SOD enzimi iki tane  $O_2^{\cdot-}$  radikalinin reaksiyonunu katalizlemekte ve sonuçta ürün olarak  $H_2O_2$  ve  $H_2O$  oluşmaktadır (Eş. 2.1).



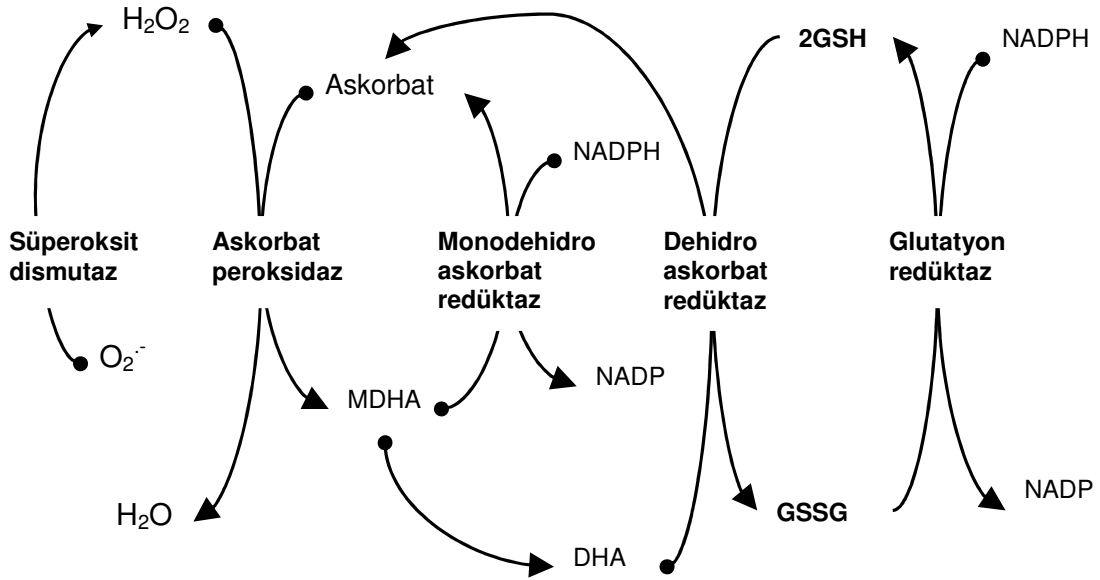
Tüm aerobik organizmaların AOT üreten bölgelerinde bulunan SOD enziminin aktivite gösterebilmek için çeşitli metallere ihtiyaç duyan üç izoenzimi saptanmıştır (Mn-SOD, Cu/Zn-SOD ve Fe-SOD). Mn-SOD mitokondri matriksinde, Fe-SOD kloroplast stromasında, Cu/Zn-SOD enzimi ise hem kloroplast stromasında hem de stoplazmada bulunmaktadır. Ayrıca; Mn-SOD'un çeşitli bitki türlerinde glioksizomal ve peroksizomal izoenzimlerinin olduğuna dair bulgulara vardır (Bowler et al., 1994). SOD aktivitesi sonucu ortamda  $H_2O_2$  konsantrasyonu devamlı artmaktadır ve bu molekül  $O_2^{\cdot-}$  radikali ile tepkimeye girip çok daha tehlikeli olan  $OH^{\cdot-}$  radikalini oluşturabilir (Fenton tepkimesi). Hidrojen peroksidin etkisizleştirilmesinde, daha çok peroksizomlarda yerleşmiş olan katalaz enzimi görev almakla birlikte bu enzimin sitozolde, mitokondride ve kloroplastta aktivitesi aşırı düşüktür ya da ölçülemez (Halliwell, 1981). Bu nedenle bitki hücrelerinde  $H_2O_2$ 'e karşı hem kloroplast hem de sitozolde bulunan ve indirgenmiş düzeydeki

askorbat ve glutatyon havuzlarının devamlılığını da sağlayan askorbat-glutatyon (Halliwell-Asada) döngüsü olarak adlandırılan daha etkili ve alternatif bir detoksifikasyon mekanizması vardır (Foyer and Halliwell, 1976; Asada and Takahashi, 1987). Bu döngünün ilk enzimi,  $H_2O_2$ 'in suya indirgenmesini katalizleyen ve indirgeyici olarak askorbata büyük bir affinite ve özgülük gösteren APX' tir (Alsher et al., 1997; Asada, 1999). APX'in kloroplast, sitozol, mitokondri, peroksizomlar ve glioksizomlarda bulunan farklı izoenzimleri vardır (Jimenez et al., 1997; Leonardis et al., 2000). APX'in katalizlediği reaksiyon sırasında askorbik asitin oksidasyonu sonucu oluşan monodehidroaskorbat (MDHA) ya indirgenmiş Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)-bağlı monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) aktivitesi ile tekrar askorbata indirgenir ya da kendiliğinden dehidroaskorbat (DHA)'a dönüşür. DHA uygun pH'da indirgenmiş glutatyonu (GSH) kullanarak çok az miktarda da olsa kendiliğinde askorbata indirgenebilirse de bu reaksiyon büyük oranda DHAR enzimi tarafından katalizlenir. Reaksiyon sırasında oluşan yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) bu metabolik yolun diğer bir enzimi olan GR, tarafından tekrar indirgenir (Şekil 2.3.). Böylece Askorbat-glutatyon döngüsü sırasında, askorbat ve glutatyon düzeyi sabit bir seviyede kalırken  $H_2O_2$  etkili bir şekilde ortadan kaldırılır.  $H_2O_2$ 'i ortadan kaldıran diğer bir enzim grubu da lignin biyosentezinde ve İndol asetik asit (IAA) degradasyonunda da rol alan POD'dur (Foyer et al., 1997).

Birçok araştırma, antioksidan enzim aktivitelerindeki artışın, bitkinin ağır metal zararından korunma yollarından biri olduğunu göstermektedir. Shah vd. (2001), yaptıkları çalışmada, *Oryza sativa L.* bitkisinin iki kültür çeşidini belirli konsantrasyonlarda Cd'a maruz bıraktıklarında,  $O_2^-$  oluşumunun arttığı, buna bağlı olarak SOD enziminin aktivitesinde kontrole göre artış olduğunu bildirmişlerdir. Zacchini vd. (2003), ise mısır bitkisinin kallus kültürü üzerinde Pb ağır metalinin etkilerine bakmışlar ve 0.5 mM konsantrasyonunda Pb uygulamasının, kültürde APX ve GR aktivitelerini arttığını tespit etmişlerdir.

Antioksidan enzimler, ağır metal alınımının belirli bir seviyenin üzerine çıkması durumunda, metal zararının üstesinden gelinmesi için yeterli olmayabilir. Ağır metaller, hem gen düzeyinde hem de yapısal ve işlevsel düzeyde zarar verip antioksidan enzimlerin aktivitelerini azaltabilirler. Diğer taraftan öldürücü olmayan

fakat zarar verebilen düzeylerdeki ağır metal alınımının, bitkinin türüne ve gelişim evresine, metalin çeşidine, konsantrasyonuna ve metale maruz kalma süresine bağlı olarak, her metale özgün belirli bir konsantrasyon aralığında, antioksidan savunma sistemini teşvik ettiği ve bu sistem içerisindeki enzimlerin aktivitelerinde artışa neden olduğu yapılan araştırmalarla saptanmıştır (Hegedüs et al., 2001; Landberg and Greger, 2002; Mascher et al., 2002; Schützendübel et al., 2002; Tewari et al.,



Şekil 2.3. Askorbat-glutasyon döngüsü (Alsher and Hess, 1993). Monodehidroaskorbat (MDHA), dehidroaskorbat (DHA), indirgenmiş glutasyon (GSH), yükseltgenmiş glutasyon (GSSG).

2002; Verma ve Dubey, 2003; Zacchini et al., 2003; Qadir et al., 2004; Fatima and Ahmad, 2005; Sharma et al., 2005).

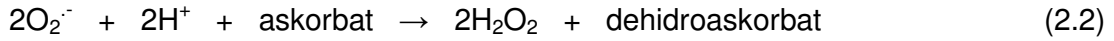
### **Enzim olmayan antioksidanlar**

Enzimler sadece serbest radikalleri etkisiz hale getirirler oysa antioksidan savunma sisteminin diğer bir parçası olan indirgen moleküller (glutasyon, askorbat, vitamin E, fenolik bileşikler, flavonoidler, ligninler, taninler vb.) hem serbest radikalleri etkisiz hale getirirler hem de bazıları metallere bağlanıp metal konsantrasyonunu azaltarak da metal zararının azalmasında rol oynarlar (Ayhan vd., 2006)



Glutasyon (GSH) düşük moleküler ağırlığa sahip bir tripeptittir (γ-Glu-Cys-Gly) ve yüksek yapılı bitkilerin birçok doku ve hücrelerinde bulunmuştur. -340 mV redoks potansiyeline sahip olan GSH, dehidroaskorbatın askorbata indirgenmesi ya da proteinlerin disülfid bağının indirgenmesi tepkimelerinde okside glutatyona (GSSG) dönüşür. GSSG'nin tekrar GSG'ye indirgenmesi GR enzimi tarafından katalizlenir. GSH, OH<sup>•</sup>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ve <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ile direkt olarak kimyasal tepkimeye girerek serbest radikalleri uzaklaştırıcı bir görev yüklenir. Bunun yanısıra lipid peroksidasyon reaksiyonları tarafından oluşturulan alkol peroksitleri uzaklaştırarak membran yapısının kararlı kalmasına da yardımcı olur (Price et al, 1990; Hausladen and Alscher, 1993; McKersie, 1996).

Serbest radikalleri indirgeyerek oksidatif stresin neden olduğu hasarı azaltan diğer bir önemli antioksidan olan askorbat, OH<sup>•</sup> radikallerini difüzyon-kontrollü oranlarda uzaklaştırır (McKersie, 1996). SOD enziminin tepkimesine benzer bir şekilde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ile tepkimeye girebilir ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> açığa çıkarabilir (Eş. 2.2).



Askorbat, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile de non-enzimatik olarak tepkimeye girebilir ürün olarak su ve monodehidroaskorbat oluşur. Bu reaksiyon, yüksek bitkilerin sitozol ve kloroplastında APX tarafından katalizlenir. Fotosentez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in düşük konsantrasyonlarına bile çok duyarlıdır ve bu yüzden, kloroplastlardaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoksifikasyonu çok önemlidir. Kloroplastlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i parçalayan CAT enzimi olmadığı için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i elimine etmede askorbat çok önemli role sahiptir. Askorbat serbest radikalleri indirgeyici görevi yanında, α-tokoferol ve zeaksantin gibi membran-bağlı antioksidanları rejenere etmede kullanılan bir antioksidan olma özelliğine de sahiptir (Foyer, 1993).

Karotenoidler; hem fotosentetik hem de fotosentetik olmayan bitki dokularındaki plastidlerde yerleşmiş bulunan tetraterpenlerdir. Antioksidan özellikleriyle karotenoidler, fotosistemleri dört farklı yoldan korurlar:

1-Lipit peroksidasyon ürünleri ile tepkiyerek zincir reaksiyonlarını bitirme (Burton and Ingold, 1984)

2-Singlet oksijeni uzaklaştırma ve fazla enerjiyi ısı olarak dağıtma (Mathis and Kleo, 1973)

3-Singlet oksijenin oluşmasını önlemek için triplet ve uyarılmış klorofil molekülleri ile tepkime

4-Fazla eksitasyon enerjisinin ksantofil döngüsüne doğru dağıtma (McKersie, 1996).

$\alpha$ -Tokoferol, tüm yüksek bitkilerin hem fotosentetik hem de fotosentetik olmayan dokularında bulunan başka bir antioksidan ailesidir. Hidrofobik yapısı nedeni ile her zaman hücre membranlarında yerleşen  $\alpha$ -tokoferol (Vit E) bir membran-sağlamlaştırıcı ajan olmasıyla tanınır. Membran lipit organizasyonundaki etkisinin yanı sıra, membranlarda füzyona neden olarak kararlılığı (stabilite) bozan serbest yağ asitleriyle kompleks oluşturarak etkisizleştirir (McKersie, 1996). Vitamin E, hem singlet oksijen hem de alkol peroksitleri için etkili bir giderici ajan olarak tanımlanır.

#### **2.3.4.3. Ağır metalleri ligandlara bağlama ve zarar veremeyecekleri bölgelerde biriktirme**

Bitkiler ağır metal iyonlarını, duyarlı metabolik aktivitelerin olmadığı hücre yapılarında ve organellerinde biriktirebilirler (Verklaij and Schat, 1990). Bu bölgelerden biri hücre çeperidir. Hücre çeperi matriksi, katyon değişim bölgesidir, ayrıca ağır metalleri çeşitli oranlarda biriktirebilirler ve bazı ağır metallerin dışarı verilmesini sağlarlar (Rauser, 1999). Araştırmalarda bitkilerin, yüksek konsantrasyonlarda ağır metaller (Cr, Co, Ni, Zn, Cu, Mo, Cd ve Pb) maruz kaldıklarında bu ağır metalleri hücre çeperinde, ekstrasellular karbonhidratların bulunduğu bölgelerde ve orta lamelde biriktirdikleri gösterilmiştir (Barceló and Poschenrieder, 1990; Verklaij and Schat, 1990; Wagner, 1993; Wang et al., 2003).

Ağır metallerin biriktirildiği diğer önemli bölge ise hücre vakuolleridir. Bitkilerde metalleri taşıma ve biriktirmede ligandların rol aldığı saptanmıştır.

#### **Ligandlara bağlama**

Ligand, bağlanmak anlamını taşıyan ligare sözcüğünden gelmektedir. Merkez metal atomuna ve iyonuna elektron çifti verebilen moleküller ligand olarak adlandırılırlar. Metaller, iki ya da daha fazla liganda bağlanarak kelat dediğimiz

yapıları oluştururlar ve bu yüzden her zaman merkez atom konumundadırlar. Eğer ligandlar tek elektron çifti sunabiliyorlarsa tek dişli, iki veya daha fazla elektron çifti sunabiliyorlarsa çok dişli ligandlar olarak adlandırılırlar. Metaller çok dişli ligandlarla bağlanma eğilimindedirler ve oluşturdukları birliktelikler daha kuvvetlidir (Petrucci and Harwood, 1993b; Gerloch and Constable, 1994; Pohlmeier, 1999).

Canlılarda da ligand rolü oynayan bir çok molekül vardır ve bu moleküllerin ağır metallerle kelatlaşması ağır metal konsantrasyonunu dolayısıyla da ağır metal zararını azaltmaktadır. Bu yüzden ligandlar ağır metal toleransında çok önemli rol oynamaktadırlar. Baker vd. (2000), ligandları elektron verici merkezlerine göre birkaç kategoride gruplandırmışlardır.

### **Oksijen verici ligandlar**

Düşük molekül ağırlıklı organik asitlerin, bitkilerde ağır metal zararının önlenmesinde yer aldığı uzun zamandan beri bilinmektedir. Karasal bitkilerde bolca bulunun bu tip organik asitlerin sahip oldukları karboksilik asit grupları ağır metal iyonları ile kararlı kompleksler oluşturmaktadır. Rauser (1999), ağır metal toleranslı bitki yapraklarında yaptığı araştırmada, ağır metal uygulamasının, malat, akoninat, malonat, okzalit ve sitrat gibi organik asitlerin konsantrasyonunu değiştirdiğini saptamış ve bunların kelatör gibi rol aldığını ileri sürmüştür. Bitki hücrelerinde, Zn'un malata bağlanarak oluşturduğu kompleksin vakuole geçtiği, burada Zn'un oksalata bağlanarak vakuolde biriktirildiği ve serbest kalan malik asitin tekrar stoplazmaya geçtiği bildirilmiştir (Mathys, 1977; Harmens et al., 1994). Ni biriktiren bitkiler üzerinde yapılan çalışmalar, Ni'in sitrata bağlandığını ve üretilen sitrat miktarının da Ni birikimi ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (Brooks, 1998). Bu bulgular esas alındığında organik asitlerin metallerin taşınmasında ve biriktirilmesinde rol aldıklarına dair hipotezler ileri sürülmüştür.

### **Azot verici ligandlar**

Bitkilerde başlıca azot verici ligandlar aminoasitler ve onların türevleridir. Teorik olarak aminoasitler, hem amino grubunda bulunan azot hem de karboksilik grubunda bulunan oksijen aracılığı ile ağır metallerle bağlanabilirler. Bu nedenle aminoasitler aynı zamanda oksijen verici ligandlar olarak da adlandırılabilir. Ayrıca bazı aminoasitler yan gruplarında da elektron verici merkezler taşımaktadırlar

(sistein yan grubunda sülfür, histidin ise yan grubunda bulunan halka yapısında elektron verici olarak azot taşımaktadır).

Aminoasitlerin ağır metallere olan ilgileri, onların fizyolojik şartlarda (pH ~ 7) iyonlaşabilme yüzdeleriyle de ilişkilidir. Histidinin fizyolojik şartlarda iyonlaşma yüzdesi diğer amino asitlere göre yüksektir ve bu yüzden araştırmalar daha çok histidin üzerine yoğunlaşmıştır. Krämer vd. (1996), *Allyssum* türleri üzerinde yaptıkları çalışmada, Ni'in serbest histidine bağlanabildiğini göstermişlerdir. Ni, üç bölgeden histidine bağlanabilmektedir. *Allyssum thaliana* ve *Allyssum lesbiacum* türlerinde de serbest histidin miktarının artışına paralel olarak Ni'e toleransın arttığı saptanmıştır (Wycisk et al., 2004).

Bitkilerde aminoasitlerin ağır metal bağlama, taşıma ve biriktirmedeki rolleri ile ilgili araştırmalar çok sınırlı olmakla beraber bazı ağır metallere aminoasitlerle oluşturdukları kompleksler (örneğin Ni-histidin), organik asitlerle yaptıkları komplekslere oranla daha fazla kararlılık göstermektedir (Pohlmeier, 1999).

### **Sülfür Verici Ligandlar**

Yapılarında bulunan sülfür grupları ile ağır metallere bağlanabilen moleküllerdir. Metalotiyoninler ile fitokelatinler (farklı yoldan sentezlenmelerine ve bazı yapısal farklılıklarına rağmen bir çok kaynak tarafından metalotiyoninlerin bir sınıfı olarak kabul edilirler) bitkilerde ağır metal zararlarının giderilmesinde rol oynayan en önemli sülfür verici ligandlardır. Aminoasitler gibi azot verici ligandlar ile malat, sitrat gibi oksijen verici ligandların esas görevi ağır metal zararlarını gidermek değildir. Bu moleküller farklı amaçlarla sentezlenirler. Yapılarında buldukları elektron verici merkezleri nedeniyle ağır metallere bağlanabilmeleri, onların ağır metal zararlarının giderilmesinde yardımcı bir rol üstlenmelerine neden olmaktadır. Oysa metalotiyoninler ve fitokelatinler hücre içinde başka amaçlar için üretilmezler, diğer ligandlardan farklı olarak, ağır metal bağlayarak ağır metal zararlarını azaltmak bu ligandların birincil görevleridir (Ayhan vd. 2006).

### **Metalotiyoninler**

Metalotiyoninler ilk defa memeli dokularında (at böbreği) keşfedilmiş ve yüksek oranda Cd bağlayan proteinler olarak tanımlanmışlardır. Daha sonra

bir çok hayvan ve bitki türünde çeşitli ağır metalleri bağlayan çok sayıda benzer protein bulunmuştur. 1985 yılında alınan bir karar ile metalotiyoninlerin özellikleri şöyle tanımlanmıştır: Aromatik aminoasitleri ve histidin aminoasitini içermeyen, sistein-X-sistein yapısına sahip, yüksek oranda sistein içeren, düşük molekül ağırlıklı proteinlerdir (Rauser, 1990). Ağır metaller, metalotiyoninlerin yapısında bulunan sistein aminoasitlerinin sülfür gruplarına bağlanırlar ve kelatları oluştururlar. Böylece ağır metal konsantrasyonu ve buna bağlı olarak ağır metal zararı azalmaktadır.

Günümüzde metalotiyoninler üç sınıfta toplanmaktadır (Rauser, 1990) :

i. Sınıf I Metalotiyoninler : İlk olarak bulunan (at böbreğinden izole edilen) metalotiyonine benzer özellikler gösteren proteinlerdir. Bu proteinler gen ürünleridir ve ribozomlarda sentezlenirler.

ii. Sınıf II Metalotiyoninler : Sınıf I Metalotiyoninlere benzerler ve onlar gibi gen ürünleridir. Sadece sistein aminoasitinin yerleşimindeki farklılıkla sınıf I'den ayrılırlar.

iii. Sınıf III Metalotiyoninler : Fitokelatinlerin oluşturduğu gruptur. Gen ürünleri değildir yani ribozomlarda sentezlenmezler. Enzim reaksiyonları sonucu oluşurlar (Rauser, 1990).

### **Fitokelatinler**

Aminoasitlerden oluşan protein yapısındaki bu polipeptidler, değişik şekillerde isimlendirilmiştir (Çizelge 2.4.). *Candida glabrata* ve *Schizosaccharomyces pombe* gibi bir çok mantar türünde de fitokelatinler saptanmış (Murasugi et al., 1981; Mehra et al., 1988) olmasına rağmen çoğunlukla, bitkileri ve algleri içeren bitkiler alemi içerisinde bulunan canlılar tarafından üretildikleri için fitokelatin olarak adlandırılmaktadırlar.

İlk analizler fitokelatinlerin sadece glutamat (Glu), sistein (Cys) ve glisin (Gly) aminoasitlerinden oluştuğunu göstermiştir.  $\gamma$ -Glu-Cys dipeptidleri 2 ile 11 arasında değişen sayılarda tekrar ederken (bitkilerde çoğunlukla 2-5 arasında değişir) terminal uçta bulunan glisin aminoasiti sadece bir tanedir. Günümüzde, terminal

uçta glisin aminoasiti yerine  $\beta$ -Alanin (Ala), serin (Ser) veya glutamat aminoasiti içeren fitokelatin varyantları saptanmıştır (Zenk, 1996; Rauser, 1995, 1999; Cobbett, 2000). Yeni keşfedildikleri dönemlerde fitokelatinlerin (Eş. 2.3) glutasyonlarla (Eş. 2.4.) olan benzerliği sentezlerinin glutasyon metabolizması ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

Çizelge 2.4. Fitokelatinlerin terminolojisi (Prasad, 1999).

İsim	Kaynak
Kaditsin	Murasugi et al., 1981
Poli( $\gamma$ -glutamil-sisteinil) glisin	Robinson and Jackson, 1986
Fitometalotiyoneinler	Tripathi et al., 1996
$\gamma$ -glutamil-sisteinil izopeptitler	Stilmann, 1995
Metalopeptitler	Ernst et al., 1992
Fitokelatinler	Grill and Zenk, 1985; Rauser, 1990; Reddy and Prasad, 1990; Steffens, 1990

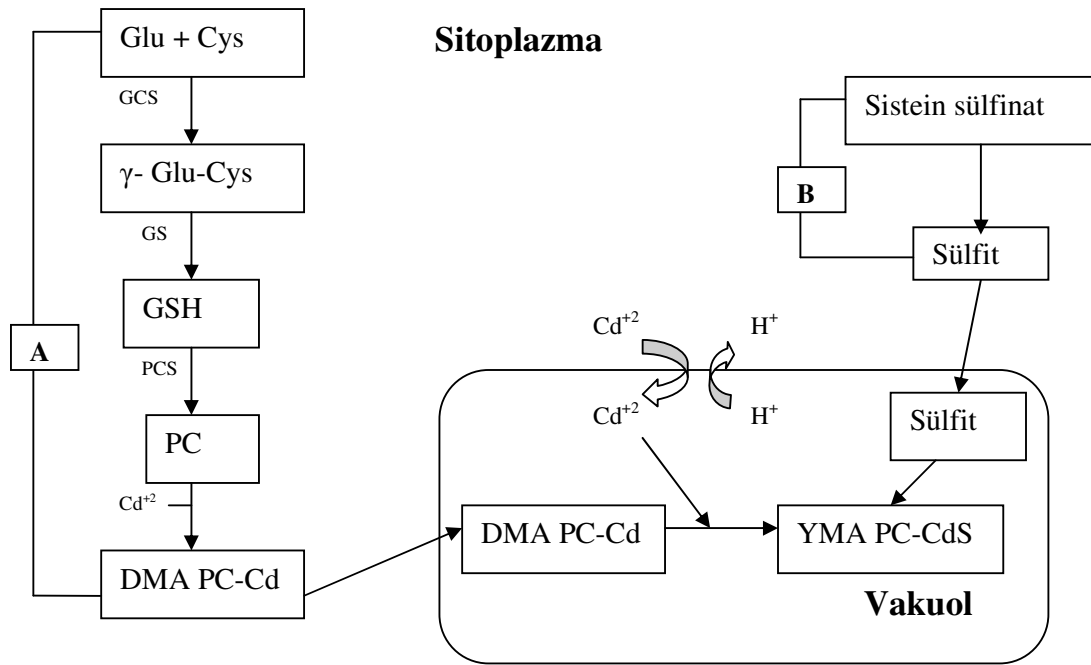
( $\gamma$ -Glu-Cys)<sub>n</sub>-Gly (2.3)

$\gamma$ -Glu-Cys-Gly (2.4)

Daha sonra yapılan fizyolojik, biyokimyasal ve genetik araştırmalar glutasyonun (bazı durumlarda ilişkili bileşikler) fitokelatin sentezinin substratı olduğunu kesin olarak kanıtlamıştır (Zenk, 1996; Rauser, 1995,1999). Bu araştırmalarda ya bitkinin kendisi ya da hücre kültürü kullanılmıştır. Hücre kültürü ile yapılan çalışmalarda Cd varlığında fitokelatinlerin artmasına paralel olarak glutasyon miktarının azaldığı saptanmıştır. Üstelik gerek bitkilerle yapılan araştırmalarda gerekse hücre kültürü çalışmalarında, glutasyon biyosentezinin inhibitörlerine (butiyonin sulfoksimin) maruz bırakılan kültürlerde, fitokelatin sentezinin inhibisyonuna bağlı olarak Cd'a hassasiyet olduğu belirlenmiştir. Bu hassasiyet ortama glutasyon ilavesi ile ortadan kaldırılmıştır. Başka bir araştırmada ise belirli derişimde Cd uygulamasının, *Triticum aestivum* L. bitkisinin gövde ve köklerinde hem glutasyon miktarının hem de fitokelatin miktarının artmasına neden olduğu saptanmıştır (Ranieri et al., 2005).

Fitokelatinlerde bulunan karboksilamid bağları bu proteinlerin bir gen ürünü olmadığını gösterir, çünkü bu bağlar ribozomlarda oluşturulmazlar, bir enzimatik reaksiyon sonucu oluşurlar. Fitokelatinler, yüksek oranda ağır metal konsantrasyonlarına maruz kalan bitkilerde, glutatyondan sistein dipeptitil transpeptidaz (fitokelatin sentetaz) enzimi katalizörlüğünde sentezlenmektedirler (Grill et al., 1989; Cobbett, 2000).

Ağır metaller, enzimlerin ve yapısal proteinlerin sülfüdril gibi elektron verici bölgeleriyle etkileşerek hücre ölümlerine neden olurlar (Van Assche and Clijters, 1990; Kneer and Zenk, 1992). Fitokelatinler ağır metallere bağlanarak ağır metallerin konsantrasyonlarının ve buna bağlı olarak da zararlarının azalmasına neden olurlar. Cobbett, (2000)'e göre, Cd ağır metalinin fitokelatine bağlanması, vakuole taşınması ve orada biriktirilmesi Şekil 2.4.'de görülmektedir.



Şekil 2.4. Bitkilerde (A) ve funguslarda (B) kadmiyum zararının giderilmesi ile ilgili metabolik yollar (Cobbett 2000). GS: Glutasyon sentetaz; GSH: İndirgenmiş glutasyon; PCS: Fitokelatin sentetaz; PC: Fitokelatin; DMA PC-Cd: Düşük moleküler ağırlıklı fitokelatin kadmiyum kompleksi; YMA PC-CdS: Yüksek moleküler ağırlıklı fitokelatin kadmiyum sülfid kompleksi

### **3. MATERYAL VE METODLAR**

Bu araştırmada, bazı mısır (*Zea mays L.*) eşitleri (Vero, Luce, Doge, DK626, DK743, 31G98, 3223 ve 32D99) zerine Cd ve Pb ağır metallerinin etkisi iki aşamada incelenmiştir.

#### **3.1. Mısır eşitlerinin çimlenme ve Erken Fide Evresinde Cd ve Pb Ağır Metallerine Karşı Dayanıklılıklarının Belirlenmesi**

##### **3.1.1. Bitki Materyalleri**

Araştırmanın bu aşamasında; mısır (*Zea mays L.*)'ın Vero, Luce, Doge, DK626, DK743, 31G98, 3223 ve 32D99 çeşitlerine ait tohumlar kullanılmıştır. Türkiye'de yetiştirilen bu tohumlar, farklı bölgelerdeki özel firmalardan sağlanmıştır.

##### **3.1.2. Yöntemler**

###### **3.1.2.1. Tohum kabuk sterilizasyonu**

Tohumlar, kabuk sterilizasyonunu sağlamak için %30'luk ticari sodyum hipoklorit (NaOCl) zltisi ile 20 dakika muamele edilmiş ve daha sonra distile su ile en az 5 kere yıkanmıştır.

###### **3.1.2.2. imlendirme yöntemi**

Mısır eşitleri, her ağır metal için beş farklı uygulamaya (kontrol ve dört farklı konsantrasyondaki ağır metal zltisi) maruz bırakılmıştır. Uygulanacak ağır metal konsantrasyonları yapılan n çalışmalarla belirlenmiştir. Bu çalışmalarda, sekiz farklı mısır çeşidinin tümü dikkate alınarak, bitkinin zarar (kök ve koleoptil uzunluklarında azalma) görmeye başladığı konsantrasyon en düşük konsantrasyon, bitkinin en büyük zararı gördüğü konsantrasyon ise en yüksek konsantrasyon olarak saptanmış, diğer iki konsantrasyon bu sınırlar içinde kalacak şekilde tespit edilmiştir. Bu n denemeler sonucunda mısır çeşitlerine uygulanacak ağır metal tuzları ve konsantrasyonları; kadmiyum için  $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  zltisinin 0 (kontrol), 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4 mM ile kurşun için  $Pb(NO_3)_2$  zltisinin 0 (kontrol), 1.0, 2.0, 4.0 ve 6.0 mM olacak şekilde belirlenmiştir.

Tohum kabuk sterilizasyonu işleminden sonra, her bir uygulama için 20 tane mısır tohumu seçilmiş, kontrol grubu distile su içerisinde, diğer tohumlar ise tespit edilen



uygun ağır metal çözeltilerinde 24 saat şişirilmişlerdir. Şişirme işleminden sonra tohumlar çimlendirme kaplarına alınmıştır. Çimlendirme için boyutları 20 x 13.5 x 8 cm olan plastik kaplar kullanılmıştır. Her uygulama için her biri 6 tohum içeren 3 kap kullanılmıştır. Ekim sırasında çimlendirme kaplarına ilk olarak çimlendirme kağıdı yerleştirilmiş, üzerine filtre kağıdı konmuş ve kağıtlara 20ml ağır metal çözeltisi (kontrol için distile su) homojen şekilde emdirilmiştir. Daha sonra birbirlerine eşit uzaklıkta yerleştirilen tohumların üzerleri tekrar bir filtre kağıdı ile örtülmüş ve bu filtre kağıdı da 10ml çözelti (kontrol için distile su) ile ıslatılmıştır.

Bu işlemlerin ardından çimlendirme kapları kapatılarak tohumlar 23°C'de, karanlık koşullarda 96 saat (4 gün) çimlenmeye bırakılmıştır. 4. gün bitiminde tohumların üstündeki filtre kağıdı alınarak, kontrollere sadece distile su, diğer gruplara ise her ağır metal için farklı konsantrasyondaki çözeltileri yeniden uygulanmış ve fideler 23°C'de 16 saat gün uzunluğu ve 250  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ışık şiddetinde 4 gün daha büyümeye bırakılmıştır. Büyümenin 8. gününde deneme sonlandırılmıştır.

### **3.1.3. Ölçüm ve analizler**

Erken fide evresinde, ağır metal stresinin mısır çeşitleri üzerine etkilerini ve dayanıklı çeşitleri belirlemek amacıyla, büyüme parametrelerinden, kök uzunluğu ( $\text{cm.fide}^{-1}$ ), koleoptil uzunluğu ( $\text{cm.fide}^{-1}$ ), taze ve kuru ağırlık ( $\text{g.fide}^{-1}$ ) ölçümleri yapılmış ve bu parametrelere bağlı olarak kök ve koleoptil su içeriği ile kök gerçek ve nispi büyüme hızları (sırasıyla,  $\text{cm.gün}^{-1}$  ve  $\text{gün}^{-1}$  olarak) saptanmıştır.

#### **3.1.3.1. Fide kök ve koleoptil uzunluğu**

Her uygulama için üç tekrardan 5 bitki olmak üzere toplam 15 bitki ( $n=15$ )nin, kök boğazından koleoptil ucuna ve kök boğazından kök ucuna kadar olan uzunlukları ölçülerek sırası ile koleoptil uzunluğu ( $\text{cm.fide}^{-1}$ ) ve kök uzunluğu ( $\text{cm.fide}^{-1}$ ), belirlenmiştir.

Ayrıca büyümenin 4. ve 8. günlerinde ölçülen kök uzunluklarından, gerçek (mutlak) ve nispi büyüme hızları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Costa França et al., 2000 dan değiştirilmiştir):

$$\text{Gerçek (Mutlak) büyüme hızı} = (ku_2 - ku_1) / t_2 - t_1 \quad (3.1)$$

$$\text{Nispi büyüme hızı} = (\ln ku_2 - \ln ku_1) / t_2 - t_1 \quad (3.2)$$

Bu eşitliklerde;

$ku_1$  : 4. günde ölçülen kök veya koleoptil uzunlukları (cm)

$ku_2$  : 8. günde ölçülen kök veya koleoptil uzunlukları (cm)

$t_1$  : 4 (gün)

$t_2$  : 8 (gün)

$\ln$  : e tabanına göre logaritma değerlerini ifade etmektedir.

Dayanıklı mısır çeşitlerinin belirlenmesi amacı ile her bir ağır metal konsantrasyonu için çeşitlerin kök uzunluklarındaki azalmanın kendi kontrollerine göre % değerleri belirlenmiştir. Daha sonra çeşitler kök uzunluklarının farklı ağır metal konsantrasyonlarındaki % azalma miktarına göre puanlandırılmıştır. Uygulamada en az inhibisyona uğrayan genotipe 8 puan, en çok inhibisyona uğrayan genotipe 1 puan verilmiştir. Diğer genotiplerde gördükleri zarara göre 2-7 arasında puan verilerek değerlendirme yapılmıştır (Bkz. Çizelge 4.3. ve 4.4.). Çeşitlerin her bir uygulamadan aldıkları puanlar toplanmış ve bu toplam puana göre çeşitler % dayanıklılık derecesine göre sınıflandırılmıştır.

### **3.1.3.2. Fide kök ve koleoptil su içeriği**

Çeşitlerin kök ve koleoptilleri kesilerek parçalara ayrılmış ve her uygulama için taze ağırlıkları (TA), g/bitki olarak tespit edildikten sonra bu kısımlar, 80°C'ye ayarlanmış etüvde 48 saat tutularak kurutulmuş ve kuru ağırlıkları (KA), g/bitki olarak belirlenmiştir.

Bitkilerin kök ve koleoptil su içerikleri aşağıdaki formülle % olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Su içeriği (\%)} = [(Taze ağırlık - Kuru ağırlık) / Taze ağırlık] \times 100 \quad (3.3)$$

### **3.1.4. İstatistiksel analizler**

Denemeler, rasgele deneme deseninde 3 tekrarlı olacak şekilde düzenlenmiş, her tekrardan alınan 5 fide ile toplam 15 ( $n = 3 \times 5$ ) fideden elde edilen verilerin istatistiksel varyans analizleri SPSS paket programı kullanılarak test edilmiştir. Her bir bağımsız değişken için uygulama ve çeşitler arasındaki farkın önem kontrolü Anlamlı Önemli Fark (AÖF) %5 düzeyinde hesaplanmıştır (Yurtsever, 1984).

### 3.2. Cd ve Pb Ağır Metallerinin Büyüme Evresindeki Mısır Çeşitleri Üzerine Etkileri ve Bu Etkiye Karşı Oluşturulan Yanıtın Saptanması

Araştırmanın bu aşamasında, erken fide evresinde yapılan deneyler sonucunda belirlenen; Pb ağır metali için dayanıklı Vero ve az dayanıklı 3223 mısır çeşitleri ile Cd ağır metali için 32D99 (dayanıklı) ve 3223 (az dayanıklı) mısır çeşitlerinin ağır metal stresine karşı gösterdikler tepkiler belirlenerek, metal zararına karşı geliştirilen içsel savunma mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmıştır.

#### 3.2.1. Bitki materyalleri

Büyüme evresinde mısır (*Zea mays* L.) çeşitlerinden 32D99, Vero ve 3223 çeşitlerine ait tohumlar kullanılmıştır.

#### 3.2.2. Yöntemler

Çalışmanın bu aşamasında, erken fide evresinde yapılan deneyler sonucunda belirlenen çeşitlere ait tohumlar çimlendirildikten sonra, elde edilen 6 günlük fideler, 14 x 13 cm ebatlarındaki plastik saksılara transfer edilerek, perlit kültür ortamında 25°C sıcaklıkta, 16 saat ışık/ 8 saat karanlık fotoperiyotta, %50 nem ve 250  $\mu\text{mol.m}^{-1}\text{s}^{-1}$  ışık yoğunluğunda, kontrollü iklim odalarında 8 gün büyütülmüşlerdir (Şekil 3.1.). Daha sonra, bitkiler 8 gün süre ile daha önce yapılan ön çalışmalarla belirlenen farklı ağır metal konsantrasyonundaki çözeltilere maruz bırakılmıştır.



Şekil 3.1. Yetiştirilen 20 günlük mısır çeşitlerinin kontrollü iklim odasındaki genel görünüşleri

Yapılan ön denemelerle erken fide evresinde belirlenen ağır metal konsantrasyonlarının büyüme evresindeki mısır çeşitleri üzerine etkisinin az olduğu tespit edilmiş ve bu gelişim evresi için uygulanan ağır metal tuzları ve konsantrasyonları; kurşun için  $Pb(NO_3)_2$  çözeltisinin 0 (kontrol), 2.0, 5.0 ve 8.0 mM ve kadmiyum için  $Cd(NO_3)_4 \cdot 4H_2O$  çözeltisinin 0 (kontrol), 0.3, 0.6 ve 0.9 mM olacak şekilde yeniden belirlenmiştir.

### **3.2.3. Ölçüm ve analizler**

#### **3.2.3.1. Kök ve gövde uzunluğu tayini**

Kontrol grubundan ve ağır metal uygulanan mısır fidelerinden, her bir uygulama için 3 tekrarlı ve her bir tekrardan da 5 bitki olmak üzere 15 tane ( $n=15$ ) bitki seçilerek, her bitkinin kök boğazından sürgün ucuna olan gövde uzunluğu ( $cm.bitki^{-1}$ ) ve kök boğazından kök ucuna kadar olan kök uzunluğu ( $cm.bitki^{-1}$ ) ölçülmüştür.

#### **3.2.3.2. Yaprak dokularında metal iyon (Pb, Cd) analizleri**

Kontrol ve ağır metal stresi uygulamalarına ait kurutulmuş yaprak materyali, yüzey alanını arttırabilmek için olabildiğince ince şekilde öğütülmüştür. Numuneler, porselen krezelerde  $550^\circ C$ 'lik kül fırınında 4 saat yakılmıştır. Fırından alınan numunelere, soğutulduktan sonra 1 ml derişik  $HNO_3$  ilave edilmiştir. Bidistile su ile seyreltmeler yapıp Pb ve Cd içerikleri Atomik Absorpsiyon Spektrofotometresi (Unicam, 929 AAS) kullanılarak analiz edilmiştir.

#### **3.2.3.3. Yaprak dokularındaki iyon sızıntısı**

Kontrol ve stres grubuna ait bitkilerin yaprak dokularının iyon (elektrolit) sızıntısı Sairam vd., (1987)'nin metodun göre (bazı küçük değişikliklerle) belirlenmiştir. Ölçüm için yapraktan alınan 1cm uzunluğundaki segmentler distile su ile yıkandıktan sonra içlerinde 5 ml distile su içeren tüblere alınmış ve oda sıcaklığında 24 saat 100 rpm de yavaşca çalkalanmıştır. Inkübasyonda sonra Mettler-Toledo Mpc 227 model konduktivite metre kullanarak iletkenlik (C1) ölçülmüştür. Bunu takiben örnekler dokuları tamamen öldürmek için 20 dakika sıvı azotta inkübe edildikten sonra tekrar oda sıcaklığında 24 saat çalkalanmıştır. Daha sonra ikinci iletkenlik (C2) ölçülüp membranların % zararı aşağıdaki formülden hesaplanmıştır:

$$EL (\%) = (C1/C2) \times 100$$

(3.4)

### **3.2.3.4. Yaprak dokularında Malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi**

Yaprak dokularındaki lipid peroksidasyonunu belirlemek için Malondialdehyde (MDA) miktarı Ohkawa vd. (1979)'nin metodu kullanılarak saptanmıştır. Kontrol ve ağır metal stresine maruz bırakılmış bitki yapraklarından alınan 0.1g taze yaprak örneği küçük parçalara ayrıldıktan sonra 1,5mL-2mL %5 Trikloroasetik asit (TCA) ile havanlarda dövülerek homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sırasında ve sonrasında numunelerin soğuk tutulmasına dikkat edilmiştir. Bu karışım +4°C'de 12000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatandan eşit hacimler alınarak yeni tüplere, içinde % 0.5 Tiobarbütirik Asit (TBA) olan %20'lik TCA çözeltisi eklenmiş, daha sonra 95°C'de 30 dakika su banyosunda tutulmuştur. Su banyosundan çıkarılan tüplerdeki reaksiyonları durdurmak için tüpler buz banyosuna konulmuştur. Sonrasında ise 5 dakika 1000 rpm'de santrifüjlenip spektrofotometrede (Shimadzu Mini-1240 UV-Vis) 532 ve 600 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. Kör olarak içinde % 0.5 TBA bulunan %20'lik TCA çözeltisi kullanılmıştır. Yaprak dokularındaki MDA miktarı aşağıdaki formüle göre nmol.g TA<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır;

$$\text{MDA içeriği} = [(A_{532} - A_{600}) \times \text{ekstraksiyon hacmi}] / [155 \times \text{örnek miktarı}] \quad (3.5)$$

### **3.2.3.5. Klorofil a floresans ölçümü**

Klorofil a floresans ölçümleri için, taşınabilir, Modüle Floresans Ölçüm Sistemi (FMS-2, Hansatech Ltd.) kullanılmıştır. Kontrol ve stres grubuna ait mısır çeşitlerine ait fidelerden 3 tekrarlı ve her bir tekrardan 2 bitki olmak üzere 6 adet bitki (n=6) seçilerek, 2 ve 3. yaprakları özel yaprak klipsleri ile üstten tutturularak oda sıcaklığında 30 dakika karanlık ile adapte edilmiştir. 30 dakika karanlık adaptasyonundan sonra, 0.2µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> ışık şiddetinde çok düşük ışık pulsu kullanılarak minimum floresans (F<sub>0</sub>) belirlenmiştir (Şekil 3.2.). Daha sonra doymuş ışık pulsu ( 7500µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) verilerek karanlıkta adapte olunmuş durumdaki maksimum floresans (F<sub>M</sub>) değeri belirlenmiştir. Karanlıkla adapte edilmiş, PSII reaksiyon merkezi açık olan yaprakların, potansiyel fotokimyasal etkinliği (ΦP<sub>0</sub>), değişken floresansın (F<sub>V</sub>), maksimum floresansa oranı olarak ifade edilir ve [F<sub>V</sub>/F<sub>M</sub> = (F<sub>M</sub>-F<sub>0</sub>)/F<sub>M</sub>] formülünden hesaplanır (Schreiber et al., 1994). Karanlıkta adapte edilmiş yaprak ölçümünden sonra, arktinik ışık (300 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) aydınlatılmasını takiben klorofil a floresansındaki ışık ile teşvik edilen değişiklikler F<sub>0</sub>' (ışık ile doymuş durumdaki minimum klorofil a floresans) ve F<sub>M</sub>' (ışık ile doymuş durumda maksimum floresans) belirlenmiştir.

Işık ile adapte edilmiş durumdaki yaprakların PSII reaksiyon merkezi açık durumdaki gerçek (actual) fotokimyasal etkinliği  $\Phi_{PS II} = (F_M' - F_S / F_M')$  formülünden Genty vd. (1989)'ne göre hesaplanmıştır. Buradaki  $F_S$  ışıkla adapte edilmiş yapraklardaki dinamik denge durumdaki flouresansını ifade etmektedir. Bunun yanı sıra, PSII'nin eksitasyon enerjisini yakalama etkinliği  $\Phi_{exc} [F_V' / F_M' = (F_M' - F_o') / F_M']$  de Genty vd. (1989)'ne göre hesaplanmıştır. Arktinik ışık kapatılıp, kırmızı ötesi ışık ( $7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) açıldığında elektron taşıma hızı (ETH),  $[(F_M' - F_S / F_M') \times \text{PAR} \times 0.84 \times 0.5]$  formülünden hesaplanır. Burada PAR (fotosentetik aktif radyasyon), 0.84 (yaprak absorpsiyonu için ortalama faktör) ve 0.5 katsayısı ise iki fotosistem (PSI ve PSII) arasındaki absorbe edilen fotonların eşit paylaşıldığının düşünüldüğü 2 faktördür. Tüm sistemdeki, fotokimyasal kullanım  $[qP = (F_M' - F_S / F_M' - F_o')]$  ve fotokimyasal olmayan kullanım  $[qN = (F_M - F_M') / F_M]$  da Genty vd. (1989)'ne göre hesaplanmıştır.

### **3.2.3.6. Yaprak dokularında pigment miktarının belirlenmesi**

Kontrol ve ağır metal uygulanmış gruplara ait bitkilerin yaprak dokularındaki klorofil a ve b, toplam klorofil (a+b) ve karotenoid (ksantofil+β-karoten) miktarları (mg.ml.g.TA<sup>-1</sup>.) Lichtenthaler (1987)'e göre belirlenmiştir. 2 ve 3. yaprakların orta bölgesinden, kalın damar içermeyen 1cm boyunda ve 3mm eninde dikdörtgenler çıkarılarak küçük parçalara ayrıldıktan sonra ependorf tüplere alınmış ve klorofil a ve b, toplam klorofil (a+b) ve karotenoid içeriğini belirlemek için tüplere 500 µl %100'lük aseton eklenerek yapraklar ependorf tüp içinde iyice ezilmiştir. Daha sonra tekrar 500 µl aseton eklenerek doku tamamen beyazlaşmaya kadar (yaklaşık 1 hafta) buzdolabında (+ 4°C) tutulmuştur. Pigmentlerin çözeltiye geçtiğinden emin olunduktan sonra spektrofotometrede (Shimadzu Mini-1240 UV-Vis) 470, 644.8 ve 661.6 nm dalga boylarında absorpsanslar okunmuştur.

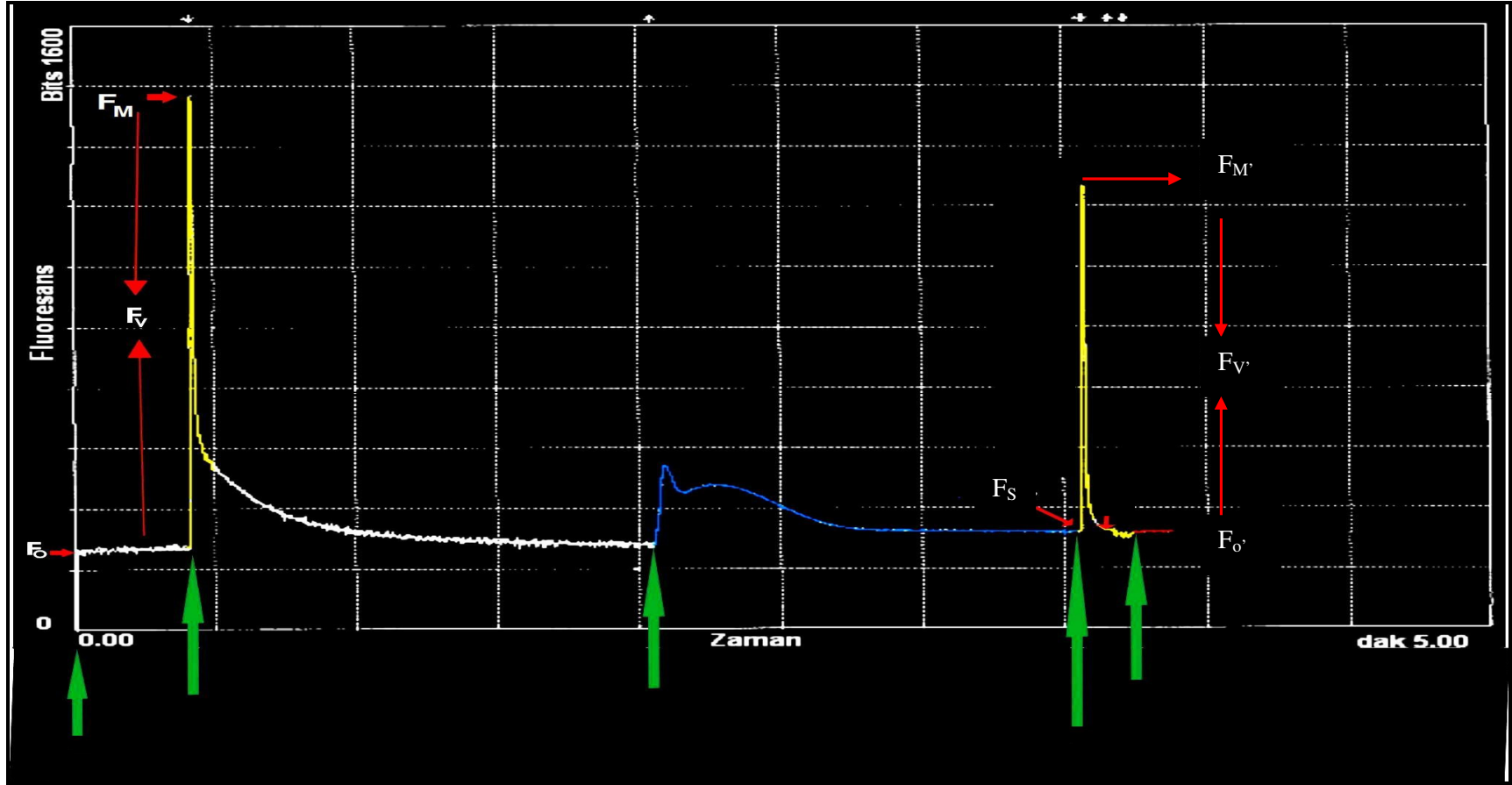
Pigment miktarları aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır;

$$\text{Klorofil a (kl.a)} = (11.24 \times A_{661.6}) - (2.04 \times A_{644.8}) \quad (3.6)$$

$$\text{Klorofil b (kl.b)} = (20.13 \times A_{644.8}) - (4.19 \times A_{661.6}) \quad (3.7)$$

$$\text{Toplam klorofil (kl a+b)} = (7.05 \times A_{661.6}) - (18.09 \times A_{644.8}) \quad (3.8)$$

$$\text{Karotenoid (x+c)} = [(1000 \times A_{470}) - (1.9 \times \text{kl.a}) - (63.14 \times \text{kl.b})] / 214 \quad (3.9)$$



Şekil 3.2. Modüle fluoresans ölçüm sisteminden alınan klorofil a fluoresans sinyalleri (Farklı renkler farklı ışık uygulamalarını göstermektedir. Beyaz,  $0.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  değerinde çok düşük bir ışık pulsunu; Sarı,  $7500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  değerinde doymuş bir ışık pulsunu; mavi,  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  değerinde arktinik ışığı; kırmızı,  $7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  değerinde kızıl ötesi ışığı belirtmektedir).

### **3.2.3.7. Enzim aktivitesinin belirlenmesi**

#### **Protein içeriğinin belirlenmesi**

Kontrol ve uygulama bitkilerinden alınan yaprak örneklerinin protein miktarları, Bradford yöntemine (Bradford, 1976) göre belirlenmiştir. Bu yöntemde; uygun tüplere, sırasıyla 400 µl deiyonize su, 100 µl örnek çözelti ve 5 ml Bradford çözeltisi konulmuştur. Bu karışım vorteks ile 10 saniye karıştırıldıktan sonra 10 dakika beklenmiş ve absorbans değerleri 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Shimadzu Mini-1240 UV-Vis) iki tekrarlı şekilde okunmuştur.

#### **Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin belirlenmesi**

Toplam süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) enzim aktivitesi, Nitrobluetetrazolyum (NBT)'un fotokimyasal indirgenmesini esas alan yöntemde 560 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Beauchamp and Fridovich, 1971). Kontrol ve stres grubuna ait bitkilerden alınan taze yapraklar (0.5 g) sıvı azotta havanda ezildikten sonra 9 mM Tris-HCl tamponu (pH 6.8) ve %13.6 gliserol içeren 1 ml'lik homojenize tampon çözeltiye koyulmuştur (Burke and Oliver, 1992). Bu karışım +4°C'de 14000 rpm'de 20 dakika santrifüjlenmiş ve ekstraksiyon sıvısı, enzim aktivitesini belirlemek için ayrılmıştır. 50 mM fosfat tamponu (pH 7.8), 9.9 mM L-Metiyonin, 57 µM NBT ve %1 Triton X-100 karıştırılmış ve bu karışımdan alınan 1 mL'ye, eklenen örnek üzerine 10 µL riboflavin ilave edilmiştir. Karıştırma işleminden sonra tüpler 15 dakika ışığa ( $375 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sn}^{-1}$ ) maruz bırakılmış ve absorbans değerleri köre karşı spektrofotometrede (Shimadzu Mini-1240 UV-Vis) 560 nm dalga boyunda okunmuştur. Toplam SOD aktivitesi ( $\text{ünits}\cdot\text{mg}\cdot\text{protein}^{-1}$ ) olarak hesaplanmıştır. Bir enzim ünitesinin aktivitesi, NBT redüksiyonunda %50'lik bir inhibisyon yaratmak için gereken SOD miktarı olarak tanımlanmıştır

#### **Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinin belirlenmesi**

Toplam askorbat peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) enzim aktivitesi Wang vd. (1991)'nin metoduna göre belirlenmiştir. Kontrol ve stres gruplarına ait bitkilerden alınan 0.5 g taze yaprak materyali havanda sıvı azot kullanılarak toz haline getirilip ependorf tüplerine alınmış ve üzerlerine 50 mM Tris-HCl (pH 7.2), %2'li ç 2 k Polivinilpirolidon (PVP), 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA ve 2 mM askorbat içeren 1.5 ml'lik



süspansiyon çözeltisi eklenmiştir. Bu karışım +4°C'de 12000rpm 20 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant ependorflara alınmıştır. Bu ependorflar ilerde enzim aktivitelerinde kullanılmak üzere -80 derecede derin dondurucuda saklanmıştır.

APX aktivitesini bulmak için ependorf içindeki enzim özütü, 100µg protein içerecek hacimde çekilerek, kuvarz küvetlere alınmış üzerine 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 6.6), 2.5 mM askorbat ve 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile son hacim 1 ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Reaksiyon H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin ilavesi ile başlatılmıştır. Askorbat konsantrasyonundaki azalma spektrofotometrik olarak 290nm dalga boyunda okunan absorpsiyon değerleri enzim özütü içermeyen reaksiyon çözeltisine karşılık kaydedilmiştir. Toplam APX enzim aktivitesi, askorbatın ekstinksiyon katsayısı (2.8 mM.cm<sup>-1</sup>) kullanılarak başlangıç hızından (nmol.askorbat.dak<sup>-1</sup>.mg protein<sup>-1</sup>) hesaplanmıştır.

#### **Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin belirlenmesi**

Toplam glutasyon redüktaz (GR; EC 1.6.4.2) enzim aktivitesi Sgherri vd. (1994)'nin metodu ile belirlenmiştir. Kontrol ve uygulama bitkilerinden yaklaşık 0.5g taze yaprak örneği sıvı azotta ezildikten sonra 100mM potasyum fosfat (pH 7.0), 1mM Na<sub>2</sub>EDTA ve %2 PVP içeren 1.5ml'lik süspansiyon çözeltiye eklenmiştir. Bu karışım 18000g ve +4°C'de 20 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant enzim ölçümü için ependorflara konulmuş ve -80 derecede saklanmıştır.

100 µg protein içeren enzim ekstraktı kuvetlere alınarak üzerine, 200mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.5), 0.2mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5mM GSSG, 50µM NADPH eklenerek son hacim 1ml'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon, ortama NADPH'nin eklenmesiyle başlatılmıştır. Örneklerin absorbansı spektrofotometrede 340nm'de okunmuştur. NADPH'nin enzimatik olmayan oksidasyonu için 340nm dalga boyunda GSSG eklenmeyerek kaydedilen azalışla düzeltme yapılmıştır. Toplam GR enzim aktivitesi, NADPH'nin ekstinksiyon katsayısı (6.2mM.cm<sup>-1</sup>, 340nm) kullanılarak enzimatik olmayan oksidasyon çıkarıldıktan sonra reaksiyonun başlangıç hızından (nmolNADPH.dak<sup>-1</sup>.mg protein<sup>-1</sup>) hesaplanmıştır (Rao et al., 1995).

### **Peroksidaz (POD) aktivitesinin belirlenmesi**

Toplam peroksidaz (POD; EC 1.11.1.7) enzim aktivitesi Bergmeyer (1974)'e göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 3ml olup 100 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0), 20.1 mM guaiakol, 12.3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve enzim ekstaktı içermektedir. Reaksiyon enzim ekstraktının ilavesiyle başlatılmış ve 10 dakikalık süre içinde izlenmiştir. Toplam POD enzim aktivitesi, guaiakolun ekstinksiyon katsayısı (26.6mM.cm<sup>-1</sup>, 470 nm) kullanılarak reaksiyon başlangıç hızından (nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. dak<sup>-1</sup>.mg protein<sup>-1</sup>) hesaplanmıştır.

### **3.2.3.8. İstatistiksel analizler**

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

## 4. BULGULAR

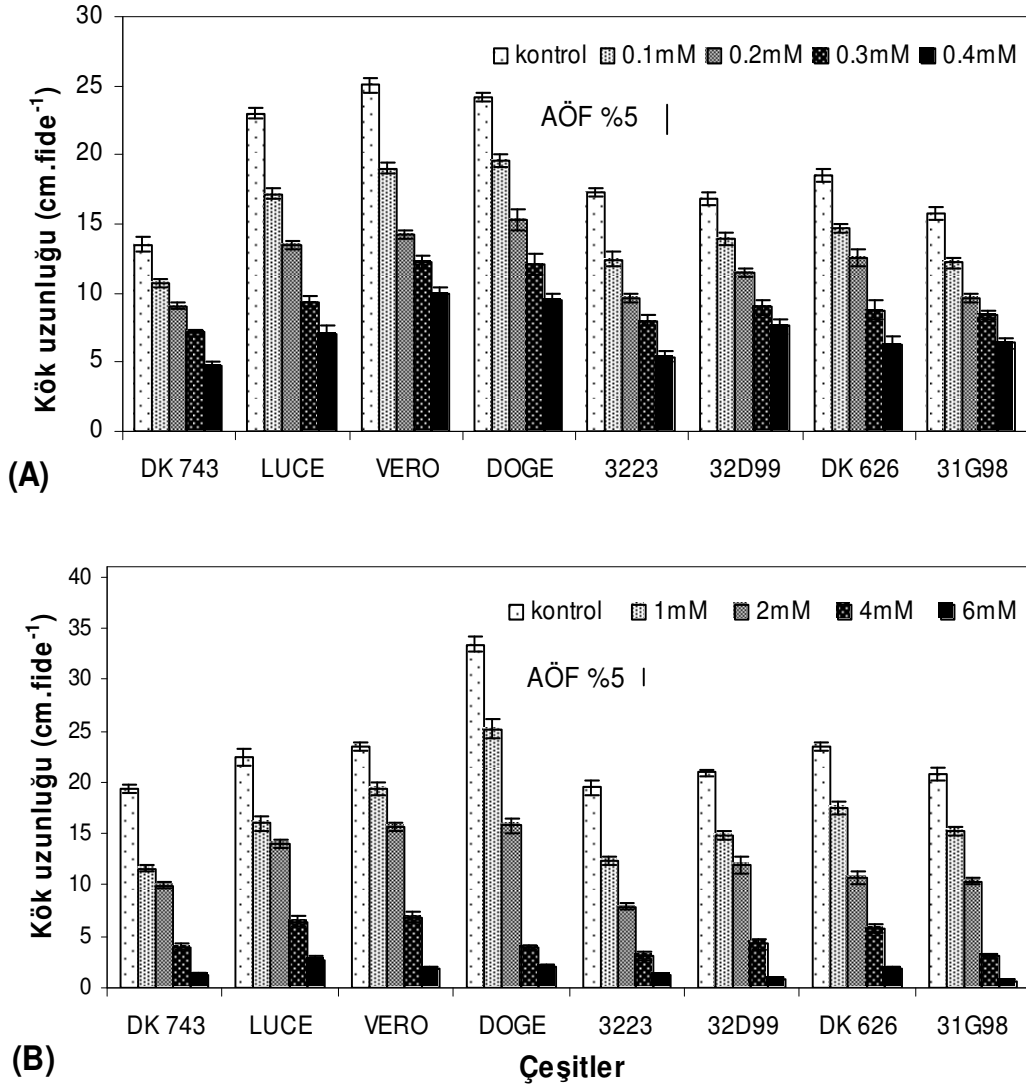
### 4.1. Cd ve Pb Ağır Metallerinin Çimlenme ve Erken Fide Gelişim Evresindeki Mısır Çeşitleri Üzerine Etkisi

Bu araştırmanın birinci aşamasında uygulanan Cd ve Pb konsantrasyonlarının, mısır çeşitleri üzerindeki etkisi ve dayanıklı çeşit ve/veya çeşitlerin belirlenmesi amacı ile tohumlar farklı konsantrasyonlarda Cd ve Pb çözeltilerinde şişirilmiş ve çimlendirilmiştir. Cd ve Pb konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak çeşitlerin çimlenme yüzdesinde 4. gün sonunda önemli bir değişim olmadığı görülmüştür (%80-90 çimlenme). Çimlenmeden sonraki erken gelişim evresinde ise artan Cd ve Pb konsantrasyonlarına bağlı olarak çeşitlerin koleoptil ve kök büyümelerinde önemli inhibisyonlar tespit edilmiştir. Ağır metal konsantrasyonunun artışına bağlı olarak köklerdeki inhibisyonun, koleoptildeki inhibisyona oranla daha belirgin ve düzgün bir şekilde arttığı saptanarak çeşitler arasında önemli farklar olduğu bulunmuştur.

#### 4.1.1. Cd ve Pb ağır metallerinin erken fide gelişim evresinde mısır çeşitlerinin kök büyümesi üzerine etkisi

Farklı konsantrasyonlarda uygulanan Cd ve Pb stresinin, 8 günlük mısır çeşitlerinin kök uzunluklarına etkisi incelendiğinde; konsantrasyon artışına bağlı olarak tüm çeşitlerin kök uzunluğunun önemli derecede azaldığı görülmüştür (Şekil 4.1. A ve B). Erken fide evresinde tüm mısır çeşitlerinin kök uzunluklarının kontrole göre %50 ve üzeri inhibisyona uğradığı konsantrasyon aralığı; Cd için 0,2-0-4mM, Pb için ise 1-4mM olmuş ve Cd'un Pb'a göre çok daha toksik olduğu tespit edilmiştir.

Uygulanan yüksek Cd konsantrasyonunda (0.4mM), kök büyümesinin en az etkilendiği 32D99, Vero ve 31G98 çeşitlerinin kök uzunluklarındaki inhibisyon kontrole göre sırası ile yaklaşık %55, %60 ve %60 olurken, kök büyümesinin en fazla etkilendiği 3223 ve Luce çeşitlerinde ise sırası ile %70 ve %71'e ulaşan inhibisyon görülmüştür. Yüksek Pb konsantrasyonunda (6mM) ise Luce, Vero ve DK626 çeşitlerinin kök uzunlukları kontrole göre yaklaşık %88, %92 ve %92 oranında inhibe olurken, 32D99 ve 31G98 çeşitlerinin kök uzunluklarında sırası ile %96 ve %97 inhibisyon tespit edilmiştir.

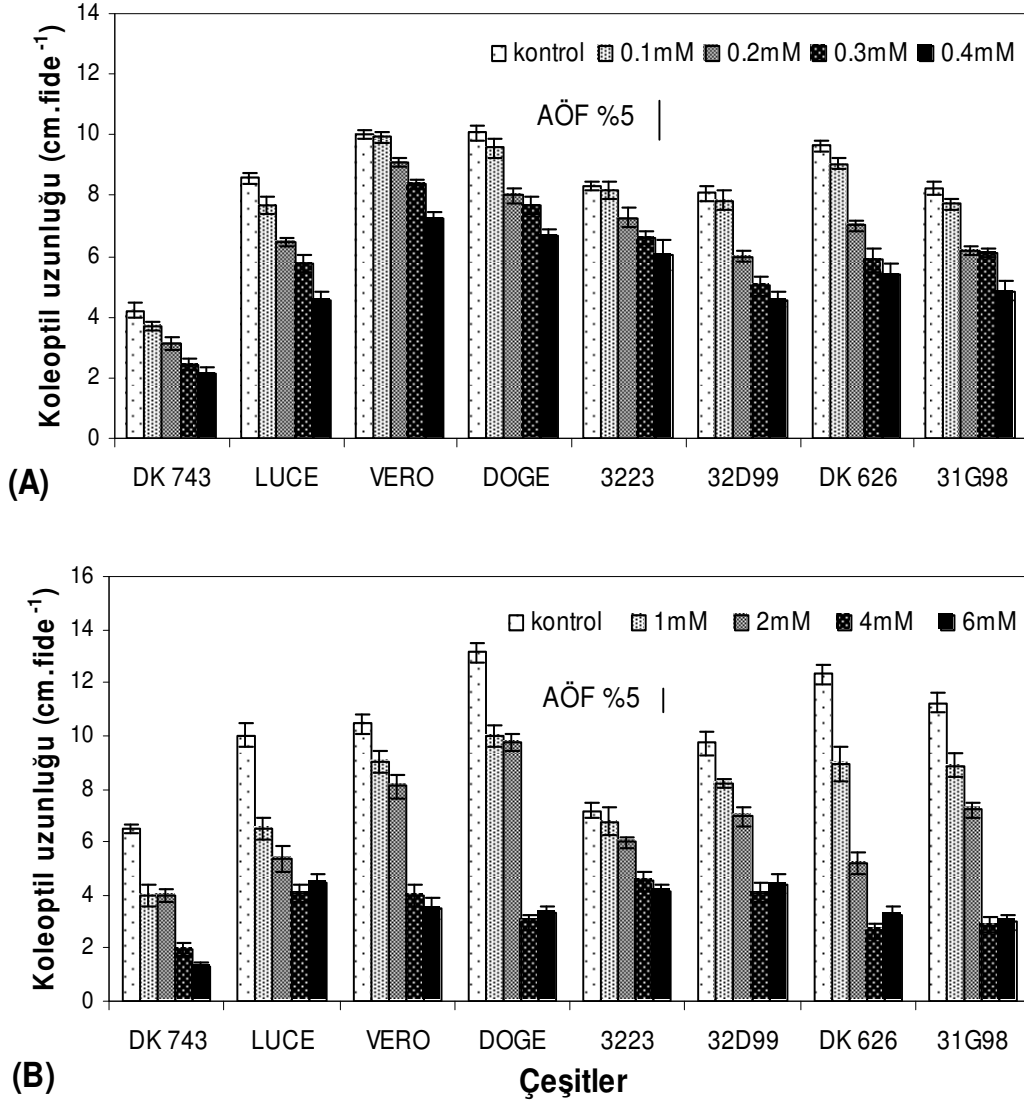


Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan Cd (A) ve Pb (B) ağır metallerinin erken fide evresindeki mısır çeşitlerinin kök uzunlukları üzerine etkisi.

#### 4.1.2. Cd ve Pb ağır metallerinin erken fide gelişim evresinde mısır çeşitlerinin koleoptil büyümesi üzerine etkisi

Koleoptil uzunluklarında da kontrole göre önemli derecede azalma görülmüştür ancak bu azalmanın köklerdeki inhibisyona oranla daha az olduğu saptanmıştır. Düşük Cd konsantrasyonu hariç, diğer Cd konsantrasyonlarında çeşitlerin koleoptil uzunluklarında kontrole göre önemli derecede inhibisyon görülürken, Pb uygulamalarının tümünde artan ağır metal konsantrasyonuna bağlı olarak çeşitlerin koleoptil uzunluklarında, kontrole göre önemli derecede azalma

meydana gelmiştir. Ancak yüksek Pb konsantrasyonunda (6mM) çeşitlerin koleoptil uzunluklarının kontrole göre önemli oranda azalmış olmasına rağmen, bir önceki uygulama ile kıyaslandığında (4mM) azalmanın durduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2. A ve B).



Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan Cd (A) ve Pb (B) ağır metallerinin, erken fide evresindeki mısır çeşitlerinin koleoptil uzunlukları üzerine etkisi.

Uygulanan yüksek Cd konsantrasyonunda (0.4mM); Vero ve 3223 çeşidinin koleoptil uzunluğu kontrole göre yaklaşık %28-29 azalırken, 32D99, Luce ve DK743 çeşitlerinde azalma sırasıyla %43, %47, %49 olmuştur. Buna karşın

uygulanan yüksek Pb konsantrasyonunda (6mM), 3223 çeşidinin koleoptil uzunluğu kontrole göre yaklaşık %43 azalırken, bu oran DOGE çeşidinde %75'e, DK743 çeşidinde %80'e ulaşmıştır.

#### **4.1.3 Cd ve Pb ağır metallerinin, erken fide gelişim evresinde mısır çeşitlerinin kök büyüme hızı (gerçek ve nispi) üzerine etkisi**

Tüm mısır çeşitlerinde, uygulanan Cd ve Pb konsantrasyonlarında gerçek ve nispi kök büyümesi, zamana bağlı olarak da incelenmiştir (Çizelge 4.1. ve 4.2). Büyümenin 4. ve 8. gününde ölçülen kök uzunlukları ile hesaplanan bu değerlerle, Cd ve Pb ağır metallerine bağlı olarak tüm mısır çeşitlerinin kök gerçek büyüme hızının, artan metal konsantrasyonuna bağlı olarak kontrole göre önemli derecede azaldığı saptanmıştır.

Nispi büyüme hızındaki azalma bitkilerin fizyolojik performansları hakkında bilgi vermektedir. Uygulanan ağır metal konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak, çimlenmenin 4 ve 8. günleri arasındaki tüm çeşitlerin kendi içlerindeki büyüme hızı nispi büyüme hızı ile açıklanabilir. Artan Pb konsantrasyonuna bağlı olarak kök nispi büyüme hızının tüm çeşitlerde kontrole göre önemli derecede etkilendiği tespit edilmiştir. Buna karşın Cd uygulamalarının, DOGE çeşidi hariç, mısır çeşitlerinin nispi kök büyüme hızında önemli bir etkisi olmadığı saptanmıştır. Cd stresinde, çeşitlerin kök nispi büyüme hızındaki değişimin önemli derecede olmaması; bu çeşitlerde kök büyümesindeki inhibisyon etkisinin ilk dört gün içinde görüldüğünü ve zamana bağlı olarak (4 ve 8.gün arasında) her bir uygulama için benzer bir büyüme cevabı sergilemiş olabileceğini düşündürmektedir.

Çizelge 4.1. Erken fide evresinde Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin kök gerçek ve nispi büyüme hızı üzerine etkisi

Çeşitler	Gerçek Büyüme Hızı (mm.gün <sup>-1</sup> )					Nispi Büyüme Hızı (gün <sup>-1</sup> )				
	Cd Konsantrasyonları (mM)									
	0 (kontrol)	0.1	0.2	0.3	0.4	0 (kontrol)	0.1	0.2	0.3	0.4
DK 743	29.8±1.49	23.65±0.88	19.98±0.66	15.5±0.62	10.33±0.58	0.545±0.0271	0.565±0.038	0.546±0.028	0.545±0.047	0.540±0.045
Luce	43.0±0.94	30.6±1.05	23.60±0.81	16.52±0.11	12.28±1.46	0.344±0.0059	0.313±0.0097	0.302±0.010	0.306±0.02	0.325±0.043
Vero	44.13±0.14	32.98±0.98	24.48±1.04	21.03±1.09	16.43±0.86	0.305±0.0078	0.295±0.067	0.294±0.015	0.289±0.011	0.270±0.014
Doge	45.42±0.92	34.35±1.00	25.52±1.84	18.83±1.89	14.37±1.42	0.349±0.0077	0.304±0.013	0.274±0.014	0.243±0.021	0.232±0.018
3223	34.18±0.94	24.9±1.54	18.33±0.76	15.42±0.90	10.3±1.12	0.396±0.016	0.403±0.019	0.367±0.017	0.393±0.031	0.410±0.067
32D99	32.6±1.31	27.43±1.19	22.23±1.23	16.58±1.77	14.28±1.56	0.380±0.018	0.397±0.017	0.383±0.028	0.367±0.049	0.351±0.037
DK 626	35.43±1.52	28.13±0.92	24.30±1.42	16.60±1.79	11.95±1.13	0.366±0.017	0.363±0.012	0.381±0.025	0.428±0.074	0.399±0.049
31G98	31.73±1.16	24.53±1.06	19.03±0.80	16.68±1.15	12.18±1.12	0.416±0.018	0.417±0.019	0.399±0.021	0.413±0.037	0.389±0.041
AÖF %5	3.48					AÖF %5	0.09			

\*Her bir değer üç tekrarlı 5 fidenin (n=15) ortalaması ve bunların standart hatalarıdır ((SH ±).

Çizelge 4.2. Erken fide evresinde uygulanan Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin kök gerçek ve nispi büyüme hızı üzerine etkisi.

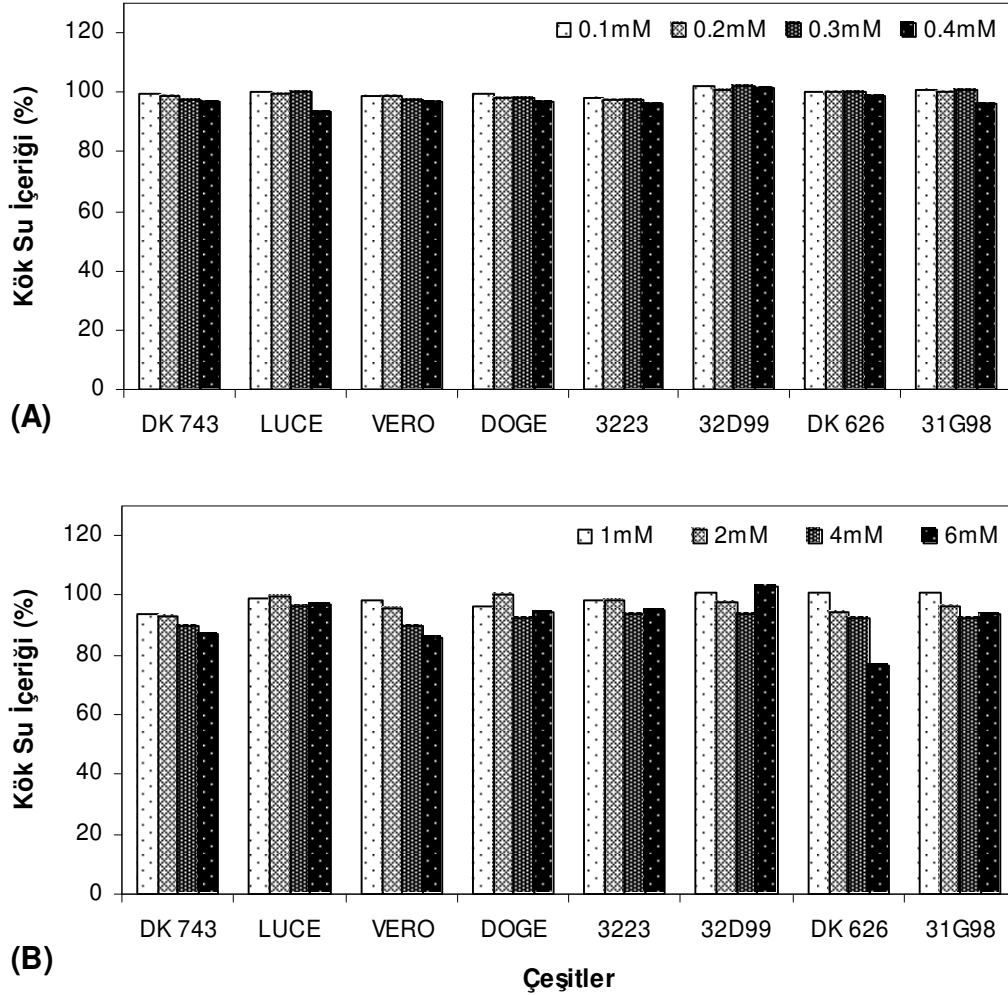
Çeşitler	Gerçek Büyüme Hızı (mm.gün <sup>-1</sup> )					Nispi Büyüme Hızı (gün <sup>-1</sup> )				
	Pb Konsantrasyonları (mM)									
	0 (kontrol)	1	2	4	6	0 (kontrol)	1	2	4	6
DK 743	42.42±1.34	23.03±0.99	20.60±0.71	7.36±0.83	2.18±0.33	0.542±0.025	0.405±0.022	0.450±0.020	0.349±0.041	0.284±0.033
Luce	44.57±1.64	31.05±1.93	27.05±0.96	10.82±1.23	3.92±1.05	0.396±0.007	0.373±0.017	0.369±0.089	0.275±0.024	0.223±0.059
Vero	47.53±1.18	38.83±1.59	31.13±1.14	13.20±1.26	2.90±0.35	0.413±0.099	0.407±0.017	0.403±0.013	0.396±0.045	0.293±0.043
Doge	67.57±2.06	51.17±2.42	30.05±1.55	4.31±0.57	2.20±0.55	0.412±0.096	0.419±0.016	0.359±0.012	0.149±0.019	0.144±0.031
3223	40.60±1.78	25.43±1.08	17.10±0.72	6.17±1.08	2.05±0.21	0.452±0.012	0.44±0.025	0.513±0.020	0.371±0.050	0.307±0.031
32D99	44.05±1.18	31.18±1.24	24.53±1.91	8.02±1.25	1.30±0.18	0.464±0.014	0.468±0.021	0.435±0.022	0.376±0.055	0.235±0.035
DK 626	50.38±1.16	37.75±1.60	21.03±1.54	9.63±1.05	2.21±0.46	0.491±0.013	0.494±0.018	0.384±0.021	0.272±0.021	0.174±0.037
31G98	44.37±1.70	33.05±1.05	20.43±0.79	4.88±0.62	0.87±0.17	0.485±0.022	0.507±0.009	0.391±0.013	0.266±0.031	0.178±0.026
AÖF %5	3.57					AÖF %5	0.08			

\*Her bir değer üç tekrarlı 5 fidenin (n=15) ortalaması ve bunların standart hatalarıdır (SH ±).

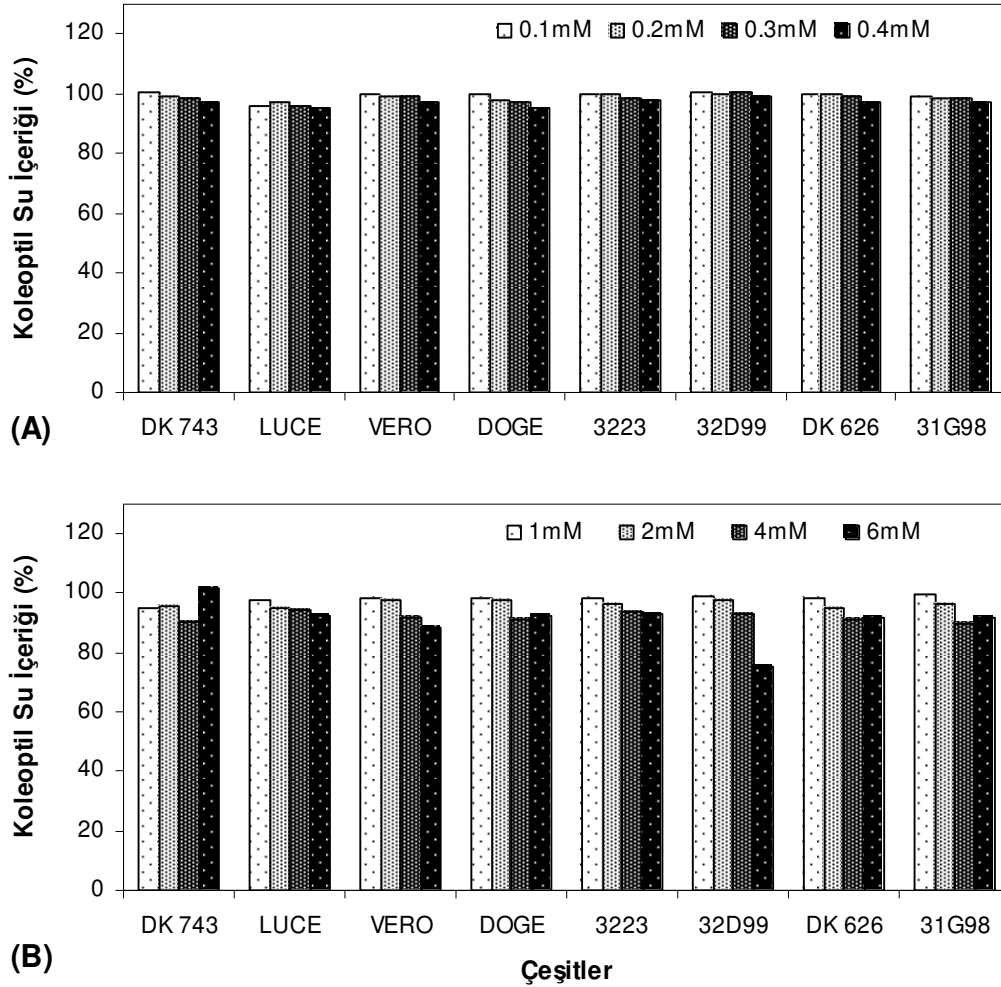


#### 4.1.4. Cd ve Pb ağır metallerinin erken fide evresinde mısır çeşitlerinin kök ve koleoptil su içeriği üzerine etkisi

Farklı konsantrasyonlarda uygulanan Cd ağır metalinin, mısır çeşitlerinin kök ve koleoptil su içerikleri üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır (Şekil 4.3. A ve Şekil 4.4. A). Pb ağır metalinin de genel olarak mısır çeşitlerinin su içeriklerinde önemli derecede bir etkisi gözlemlenmezken sadece yüksek Pb (6mM) konsantrasyonunda DK626 ve Vero çeşitlerinin kök su içeriğinde kontrole göre sırası ile %24 ve %14, 32D99 ve Vero çeşitlerinin ise koleoptil su içeriğinde kontrole göre sırası ile %25 ve %12 azalış tespit edilmiştir (Şekil 4.3. B ve 4.4. B).



Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan Cd (A) ve Pb (B) ağır metallerinin erken fide evresindeki mısır çeşitlerinin kök su içeriği üzerine etkisi.



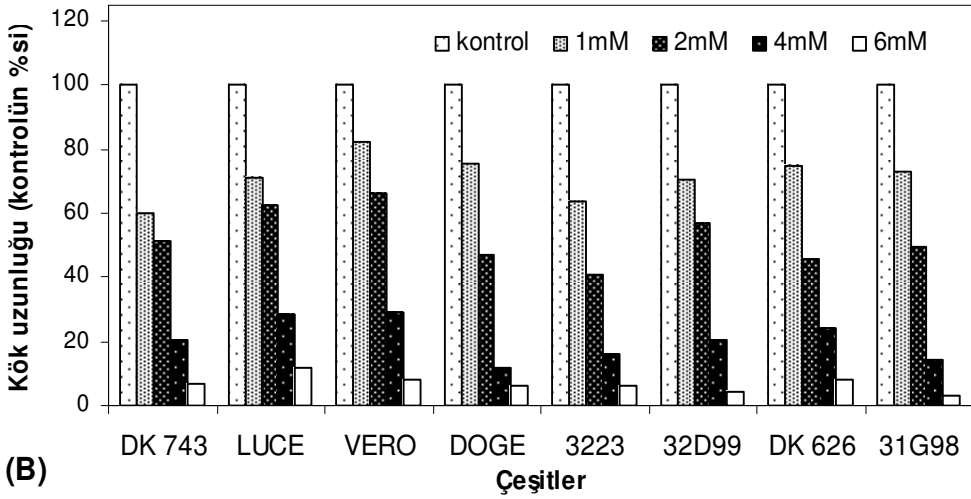
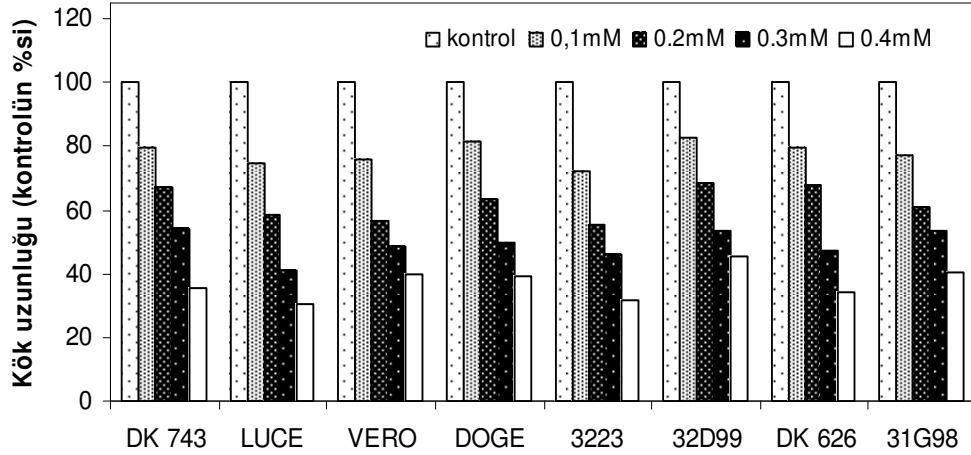
Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan Cd (A) ve Pb (B) ağır metallerinin erken fide evresindeki mısır çeşitlerinin koleoptil su içeriğine etkisi.

#### 4.1.5. Cd ve Pb ağır metallerine dayanıklı mısır çeşidinin belirlenmesi

Araştırmada kullanılacak ağır metal stresine dayanıklı çeşit ve/veya çeşitler, erken fide evresindeki stresten en fazla etkilenen kök uzunluklarındaki değişime bağlı olarak belirlenmiştir.

Dayanıklı çeşit ve/veya çeşitlerin belirlenmesi amacı ile, çeşitlerin kontrole göre kök uzunluklarındaki inhibisyon (azalma) uygulanan ağır metal konsantrasyonuna bağlı olarak puanlandırılmıştır. Uygulamalarda kök uzunluklarında en az inhibisyon gören çeşide 8 puan, en çok inhibisyon görülen çeşide 1 puan verilmiş ve diğer çeşitlere de gördükleri zarara göre 2-7 arasında puan verilerek değerlendirme yapılmıştır: (Çizelge 4.3). Çeşitlerin uygulanan farklı ağır metal

konsantrasyonlarında aldıkları puanlar toplanmış ve bu toplam puanlara göre çeşitler dayanıklılık derecelerine göre sıralanmıştır (Çizelge 4.4). Artan ağır metal konsantrasyonlarına bağlı olarak kontrole göre kök uzunluğunun en fazla etkilendiği çeşit her iki ağır metal için 3223 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3). En az etkilenen çeşit olarak ise Cd stresi için 32D99, Pb stresi için ise Vero olarak saptanmıştır (Çizelge 4.4).



Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan Cd (A) ve Pb (B) ağır metallerinin erken fide evresindeki mısır çeşitlerinin kök uzunlukları üzerine etkisinin kontrole göre yüzdesi.

Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlardaki Cd ve Pb uygulamalarında, mısır çeşitlerinin kök uzunluklarında görülen kontrole göre % inhibisyonun puanlama tablosu.

		Cd					Pb				
		Konsantrasyon ve puanlar					Konsantrasyon ve puanlar				
		0,1mM	0,2mM	0,3mM	0,4mM	Toplam puan	1mM	2mM	4mM	6mM	Toplam puan
<b>Çeşitler</b>	DK743	6	6	6	4	22	1	5	5	5	16
	LUCE	2	3	1	1	7	4	7	7	8	26
	VERO	3	2	4	6	15	8	8	8	7	31
	DOGE	7	5	5	5	22	7	3	2	3	15
	3223	1	1	2	2	6	2	1	3	4	10
	32D99	8	8	7	8	31	3	6	4	2	15
	DK626	5	7	3	3	18	6	2	6	6	20
	31G98	4	4	8	7	23	5	4	1	1	11

Çizelge 4.4. Erken fide evresinde Cd ve Pb ağır metallerine maruz kalan mısır çeşitlerinin Çizelge 4.3'te aldıkları toplam puanlara göre sıralanışı.

	Cd	Toplam puan	Pb	Toplam puan
	Çeşitler		Çeşitler	
Dayanıklılık derecesi ↑	32D99	31	VERO	31
	31G98	23	LUCE	26
	DOGE	22	DK626	20
	DK743	22	DK743	16
	DK626	18	DOGE	15
	VERO	15	32D99	15
	LUCE	7	31G98	11
	3223	6	3223	10

## 4.2. Cd ve Pb Ağır Metallerinin Büyüme Evresindeki Mısır Çeşitleri Üzerindeki Etkisi

### 4.2.1. Cd ağır metalinin büyüme evresindeki mısır çeşitleri üzerine etkisi

#### 4.2.1.1. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin kök ve gövde uzaması üzerine etkisi

32D99 ve 3223 çeşitlerinde kök uzunluğu, artan Cd konsantrasyonuna bağlı olarak önemli derecede azalmıştır (Çizelge 4.5). 32D99 çeşidinin kök uzunluğunda yüksek Cd konsantrasyonunda (0.9mM) yaklaşık % 23 inhibisyon görülürken, 3223 çeşidinde %26 oranında bir azalma olmuştur (Çizelge4.5). Uygulanan Cd konsantrasyonlarının artışa bağlı olarak gövde uzunluklarında da önemli derecede azalma meydana gelmiştir. 32D99 çeşidinde yüksek Cd konsantrasyonunda gövde uzunluğundaki inhibisyon % 31 olurken, bu oran 3223 çeşidinde yaklaşık %25 olmuştur.

Çizelge 4.5. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin kök ve gövde uzaması üzerine etkisi.

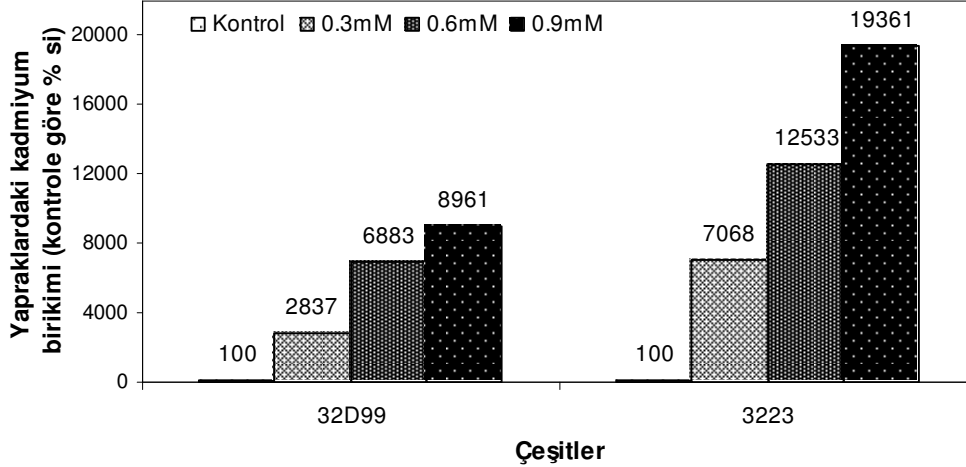
Çeşitler	Cd konsantrasyonu (mM)	Kök uzunluğu (cm.bitki <sup>-1</sup> )	Kök uzamasının kontrole göre yüzdesi	Gövde uzunluğu (cm.bitki <sup>-1</sup> )	Gövde uzamasının kontrole göre yüzdesi
32D99	0(kontrol)	32.93±0.86	100	28.63±0.36*	100
	0.3	30.06±0.78	91.29	23.73±0.5	82.91
	0.6	27.83±0.48	84.54	21.56±0.53	75.31
	0.9	25.30±0.28	76.82	19.75±0.23	69.00
3223	0(kontrol)	34.43±0.35	100	33.94±0.40	100
	0.3	32.1±0.44	93.22	27.75±0.33	81.78
	0.6	28.27±0.37	82.09	26.9±0.40	79.25
	0.9	25.47±0.70	73.96	25.51±0.40	75.15
AÖF		1.38		0.98	

\* Her bir değer 3 tekrarlı 4 bitkinin (n=12) ortalaması ve bunların standart hatalarıdır (SH ±).

#### 4.2.1.2. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki Cd birikimi üzerine etkisi

Uygulanan Cd konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak mısır çeşitlerinin yapraklarında önemli miktarda Cd biriktirildiği tespit edilmiştir (Şekil 4.6.). Yüksek

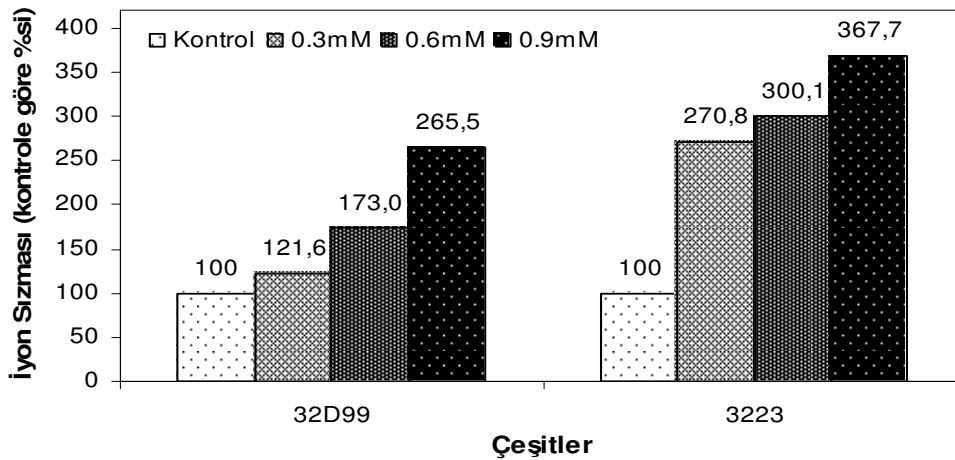
Cd konsantrasyonunda (0.9mM) 32D99 çeşidinin yapraklarında Cd miktarı kontrole göre yaklaşık 90 kat artış gösterirken, 3223 çeşidinde bu artış yaklaşık 194 kat olmuştur.



Şekil 4. 6. Cd ağır metali uygulanmış mısır çeşitlerinin yapraklarındaki Cd birikimi

#### 4.2.1.3. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki iyon sızıntısı üzerine etkisi

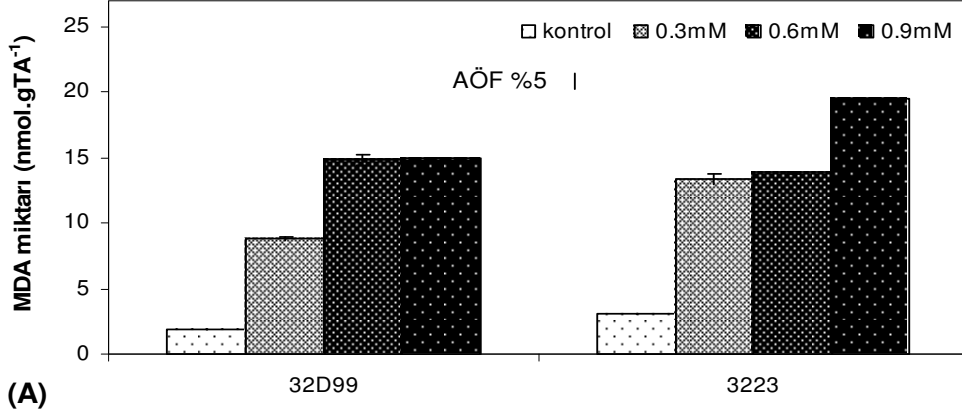
Kadmiyum stresi, konsantrasyon artışına bağlı olarak her iki mısır çeşidinin yapraklarında iyon sızıntısını artırmıştır. Yüksek Cd konsantrasyonunda, 32D99 çeşidinin yapraklarındaki iyon sızıntısı, kontrole göre yaklaşık 2.7 kat artarken, strese daha az dayanıklı olan 3223 çeşidinde bu artış yaklaşık 3.7 kat olmuştur (Şekil 4.7.).



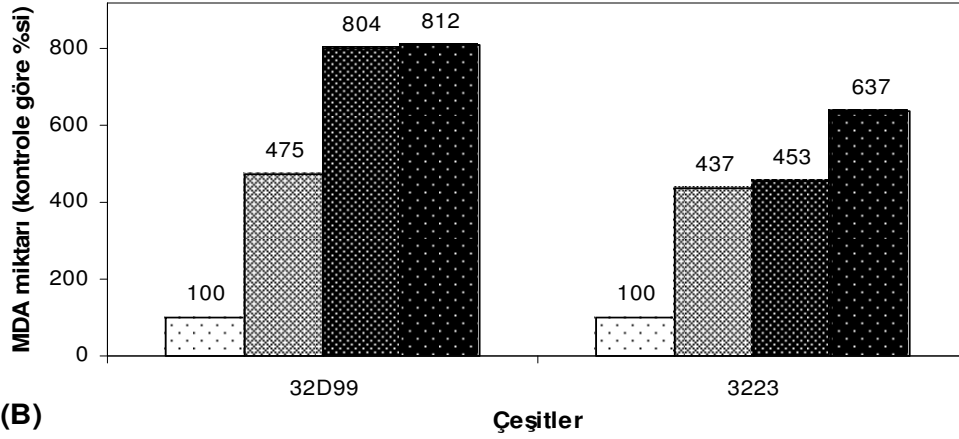
Şekil 4.7. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki iyon sızıntısı üzerine etkisi

#### 4.2.1.4. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki MDA içeriği üzerine etkisi

Kadmium stresi, her iki çeşidin yapraklarındaki MDA içeriğini arttırmıştır (Şekil 4.8. A). Yüksek Cd konsantrasyonunda (0.9mM) 32D99 çeşidinin yapraklarındaki MDA içeriği kontrole göre 8.12 kat artarken, strese daha az dayanıklı olan 3223 çeşidinde bu artış kontrole göre 6.37 kat olmuştur (Şekil 4.8. B).



(A)



(B)

Şekil 4.8. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yaprak dokularındaki MDA içeriği üzerine etkisi(A) ve MDA içeriğindeki değişimin kontrole göre yüzdesi (B).

#### 4.2.1.5. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki fotokimyasal aktivite üzerine etkisi

Klorofil floresans ölçümleri Cd stres uygulamalarının sonunda yapılmıştır. Farklı konsantrasyonda Cd stresine maruz kalmış çeşitler ile kontrollerinin yaprakları, 30 dakika karanlığa adapte olduktan sonra düşük ışık şiddetinde ( $0.2 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) ışık uyarımı ile PS II reaksiyon merkezi açılarak minimum floresans ( $F_0$ ) verileri elde

edilmiştir. Cd ağır metalinin, 32D99 çeşidinin yapraklarındaki minimum fluoresans ( $F_0$ ) üzerinde önemli bir etkisi gözlenmezken, yüksek Cd konsantrasyonunda (0.9 mM), 3223 çeşidinin yapraklarında minimum fluoresans değerlerinde, önemli derecede artış belirlenmiştir (Şekil 4.9. A).

Karanlığa adapte olmuş ve PSII reaksiyon merkezi açık olan mısır çeşitlerinin yapraklarındaki maksimum fluoresans ( $F_M$ ) verileri incelendiğinde; Cd konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak mısır çeşitlerinin  $F_M$  değerlerinin azaldığı ve bu azalışın; kontrole göre, 32D99 çeşidinde 0.6mM ve 0.9mM Cd konsantrasyonlarında, 3223 çeşidinde ise tüm Cd konsantrasyonlarda önemli düzeyde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9. B).

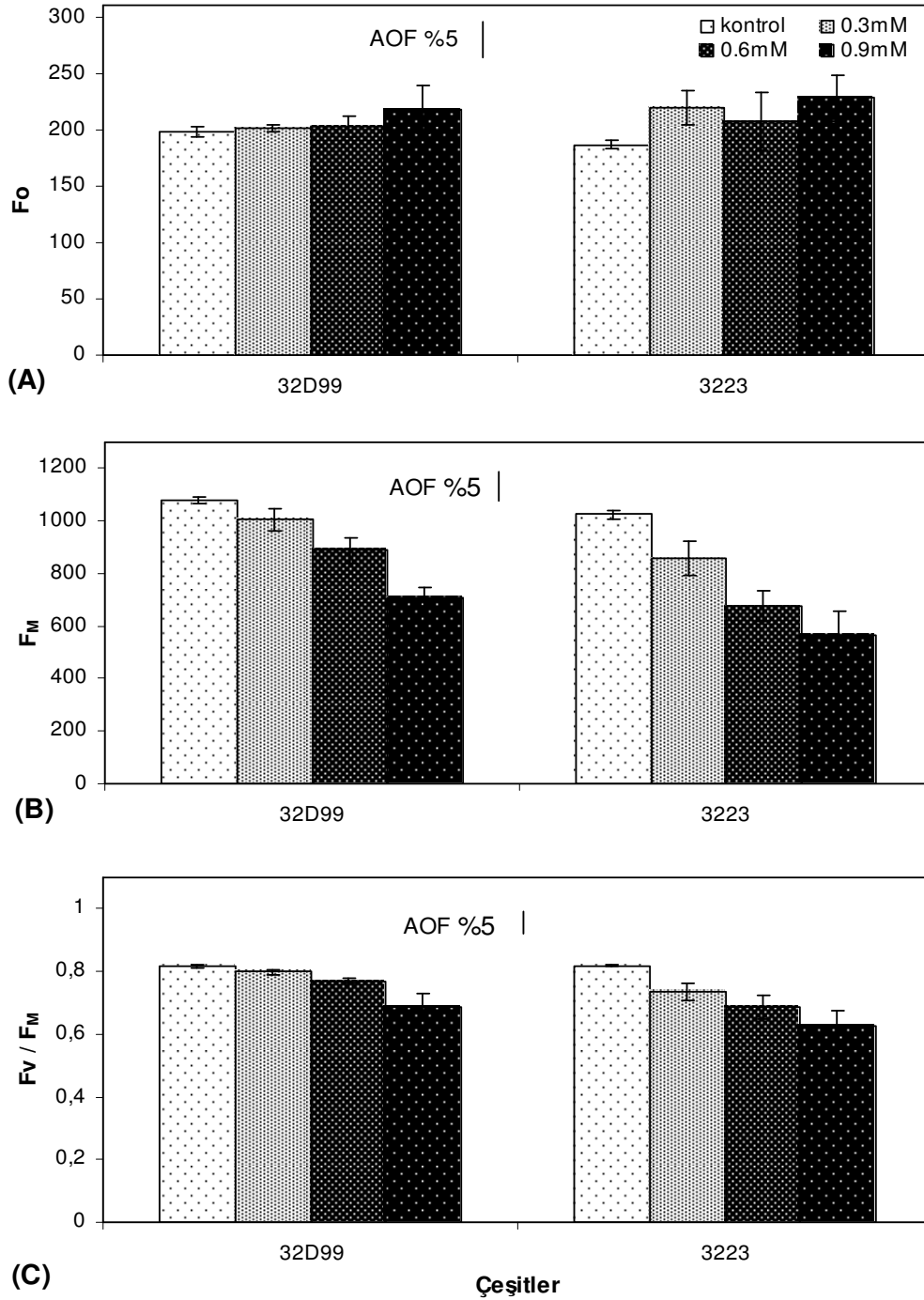
Farklı konsantrasyonlardaki Cd uygulamalarından sonra, karanlığa adapte edilmiş olan mısır çeşitlerinin yapraklarındaki PSII'nin potansiyel fotokimyasal etkinliği ( $F_V/F_M$ ) incelenmiştir. Kontrol yapraklarında  $F_V/F_M$  değeri yaklaşık olarak 0.83'tür. Her iki çeşitte de Cd konsantrasyonunun artışına bağlı olarak  $F_V/F_M$  değeri azalmıştır. Bu azalma, 32D99 çeşidinde sadece yüksek Cd konsantrasyonunda önemli bulunurken, 3223 çeşidinde tüm ağır metal konsantrasyonları için önemli bulunmuştur (Şekil 4.9. C ). 32D99 ve 3223 çeşitlerinin potansiyel fotokimyasal etkinliği, yüksek Cd konsantrasyonunda kontrole göre sırası ile %16 ve %24 azalmıştır.

Cd ağır metalinin, ışıkla adapte edilmiş durumdaki mısır çeşitlerinin yapraklarındaki, PSII'nin gerçek (actual) fotokimyasal etkinliği ( $\Phi_{PSII}$ ), enerji yakalama etkinliği ( $F_V'/F_M'$ ) ve elektron transport hızı (ETH) üzerine etkisi incelendiğinde (Şekil 4.10. A, B ve C);  $\Phi_{PSII}$ ,  $F_V'/F_M'$  ve ETH değerlerinin tüm Cd konsantrasyonlarında, her iki çeşitte de azaldığı tespit edilmiştir. Ancak bu azalma, kontrole göre 3223 de tüm konsantrasyonlarda önemli iken, 32D99 da sadece yüksek Cd konsantrasyonunda önemli bulunmuştur. Floresans parametrelerinden  $\Phi_{PSII}$  ve  $F_V'/F_M'$  ile  $F_V/F_M$  arasında bir korelasyon olup, mısır çeşitlerinin yapraklarında benzer tepki elde edilmiştir. Her iki çeşitte de floresans parametreleri kontroller ile karşılaştırıldığında yüksek Cd konsantrasyonu (0.9mM) maksimum azalmaya neden olmuştur.

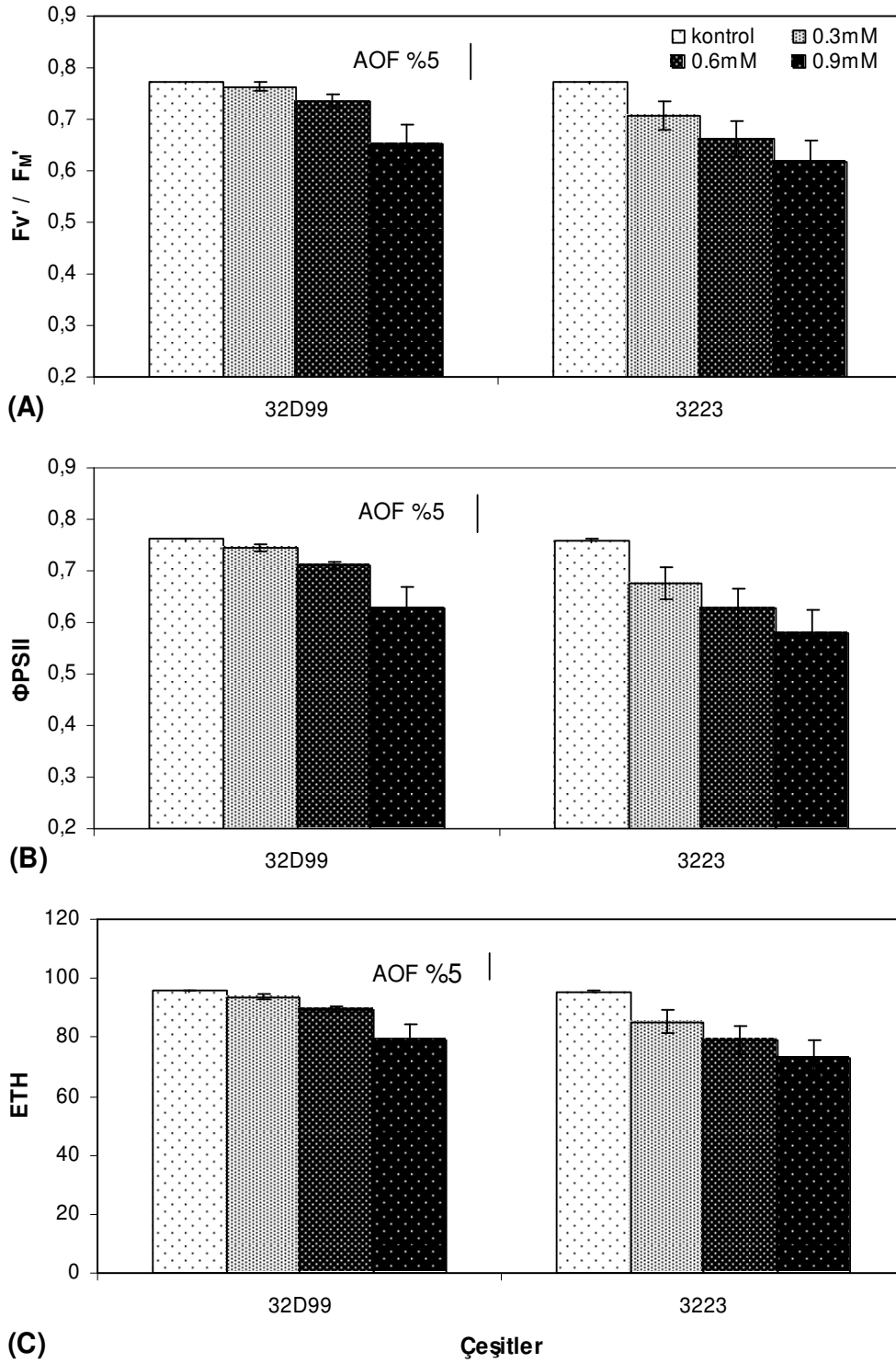
Cd ağır metalinin, mısır çeşitlerinin yapraklarındaki fotokimyasal (qP) ve fotokimyasal olmayan kullanım (qN) değerleri üzerine etkisi Şekil 4.11. A ve B' de verilmiştir. Artan Cd konsantrasyonuna bağlı olarak 3223 çeşidinin yapraklarındaki qP, her



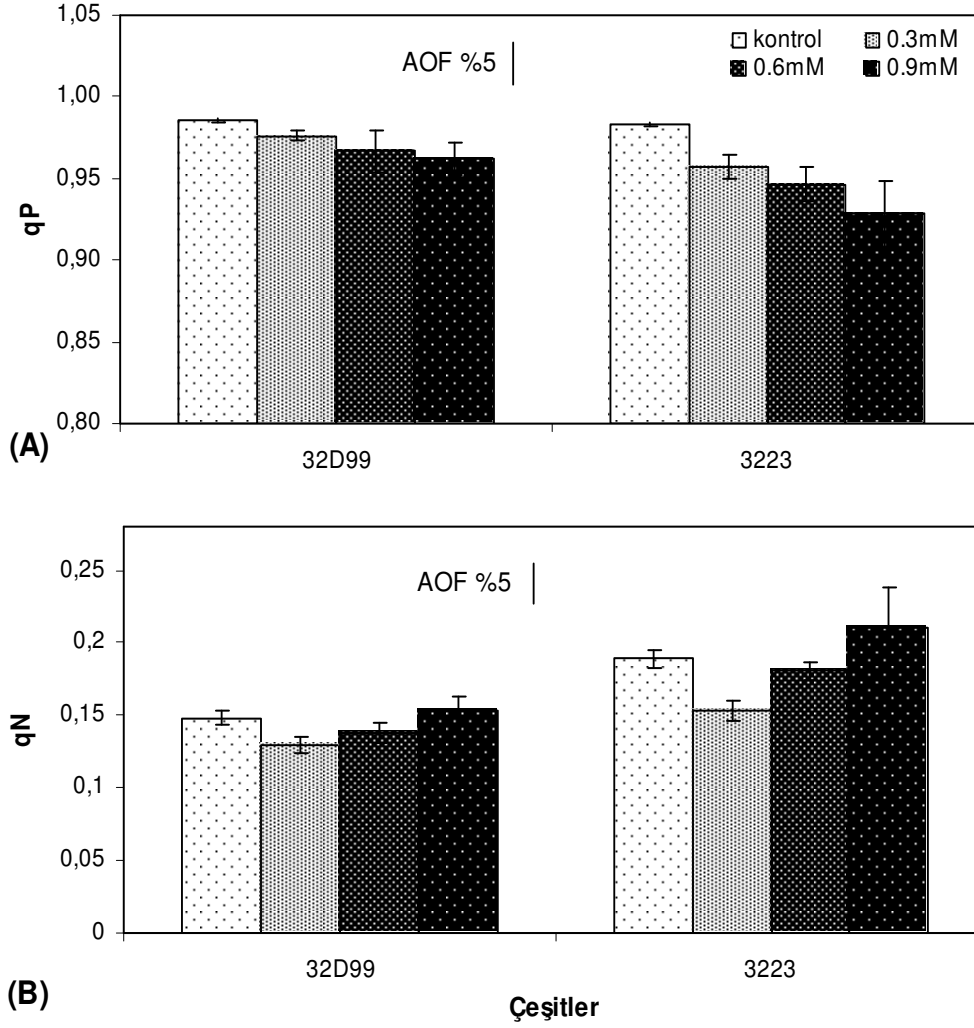
uygulamada kontrole göre önemli derecede azalırken; qN değerleri son konsantrasyonda artış gösterse de önemli düzeye ulaşamamıştır. 32D99 çeşidindeki değişiklikler ise istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Şekil 4.11. A ve B).



Şekil 4.9. Cd ağır metalinin karanlığa adapte edilmiş mısır çeşitlerinin yapraklarındaki A) minimum fluoresans ( $F_0$ ) ; B) maksimum fluoresans ( $F_M$ ) ve C) PSII' nin potansiyel fotokimyasal etkinliği ( $F_v/F_M$ ).



Şekil 4.10. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin ışığa adapte edilmiş yapraklarındaki A) PSII'nin gerçek fotokimyasal etkinliği, ( $\Phi_{PS II}$ ), B) , PSII'nin eksitasyon enerjisini yakalama etkinliği ( $F_v'/F_m'$ ) ve C) elektron transport hızı (ETH).



Şekil 4.11. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin ışığa adapte edilmiş yapraklarındaki A) fotokimyasal kullanım (qP) ve B) fotokimyasal olmayan kullanım (qN).

#### 4.2.1.6. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki pigment içeriği üzerine etkisi

Uygulanan Cd konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak, mısır çeşitlerinin pigment içerikleri önemli derecede değişiklik göstermektedir (Çizelge 4.6). 32D99 çeşidinde; klorofil a ve klorofil a+b miktarlarında Cd konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak kontrole göre önemli derecede azalma görülürken, klorofil b miktarında 0.6 mM ve 0.9mM uygulamalarındaki azalış kontrole göre önemli bulunmuştur. 3223 çeşidinde klorofil a, b ve klorofil a+b miktarları, tüm konsantrasyonda kontrole göre önemli derecede azalmıştır. Yüksek Cd konsantrasyonunda (0.9mM), toplam klorofil miktarlarındaki inhibisyon 32D99 çeşidinde yaklaşık %83 olurken, 3223 çeşidinde %76 inhibisyon görülmüştür.

32D99 ve 3223 çeşitlerinin yapraklarındaki karotenoid miktarının ise tüm Cd uygulamalarında kontrole göre önemli oranda azaldığı saptanmıştır. Yüksek Cd konsantrasyonunda her iki çeşitte de karotenoid miktarı kontrole göre yaklaşık %60 azalmıştır.

Çizelge 4.6. Cd uygulamalarının mısır çeşitlerinin yapraklarındaki pigment içeriği üzerine etkisi.

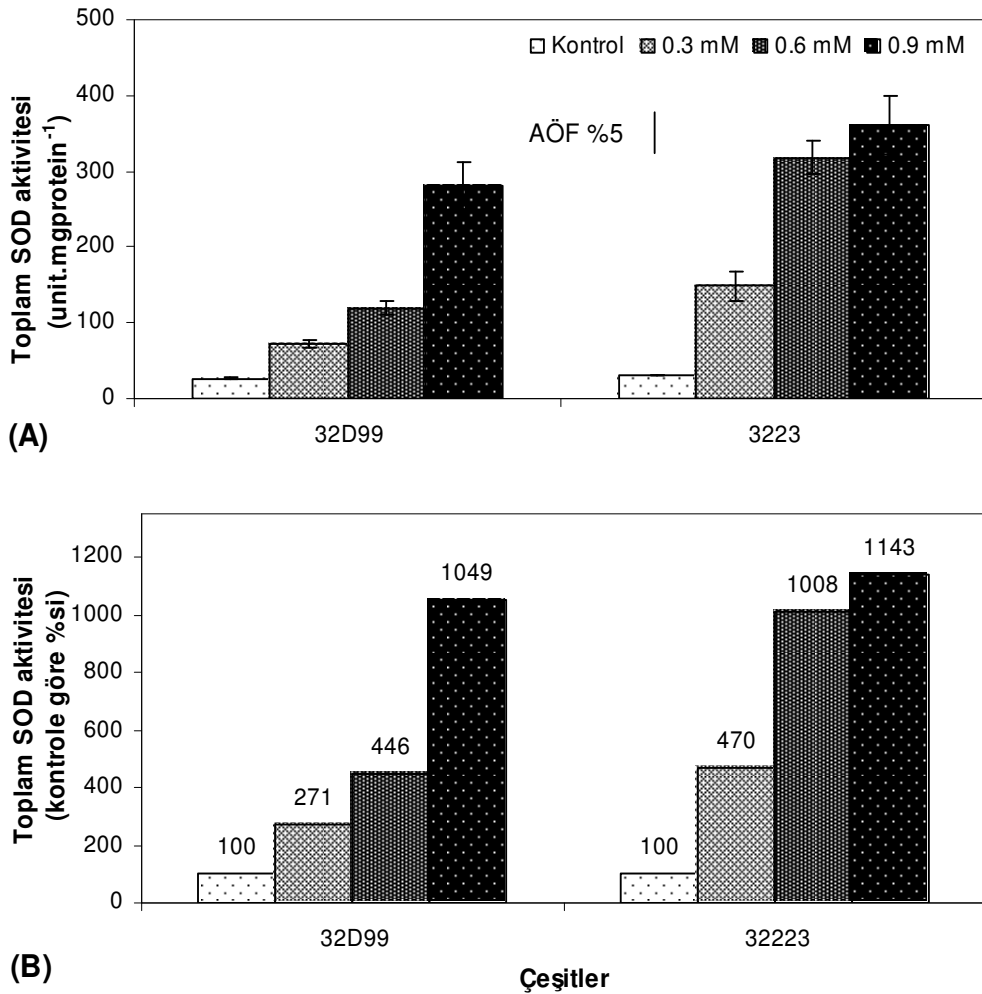
Çeşitler	Cd konsantrasyonu (mM)	kl a miktarı (mg.gTA. <sup>-1</sup> )	kl b miktarı (mg.gTA. <sup>-1</sup> )	kl a+b miktarı (mg.gTA. <sup>-1</sup> )	karotenoid miktarı (mg.gTA. <sup>-1</sup> )
32D99	0(kontrol)	2.77±0.27*	0.58±0.057	3.35±0.323	0.77±0.110
	0.3	1.11±0.043	0.58±0.167	1.68±0.196	0.29±0.022
	0.6	0.64±0.039	0.08±0.013	0.72±0.035	0.26±0.015
	0.9	0.48±0.06	0.07±0.019	0.56±0.044	0.31±0.028
3223	0(kontrol)	2.83±0.194	0.58±0.095	3.42±0.284	0.67±0.04
	0.3	1.21±0.133	0.29±0.047	1.5±0.177	0.41±0.022
	0.6	0.89±0.02	0.22±0.01	1.1±0.024	0.32±0.012
	0.9	0.66±0.052	0.15±0.021	0.81±0.072	0.27±0.024
AÖF %5		0.338	0.19	0.466	0.113

\*Her bir değer 3 tekrarlı 2 bitkinin (n=6) ortalaması ve bunların standart hatalarıdır (SH±).

#### 4.2.1.7. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki antioksidan enzimlerin aktiviteleri üzerine etkisi

##### Cd ağır metalinin SOD enzim aktivitesi üzerine etkisi

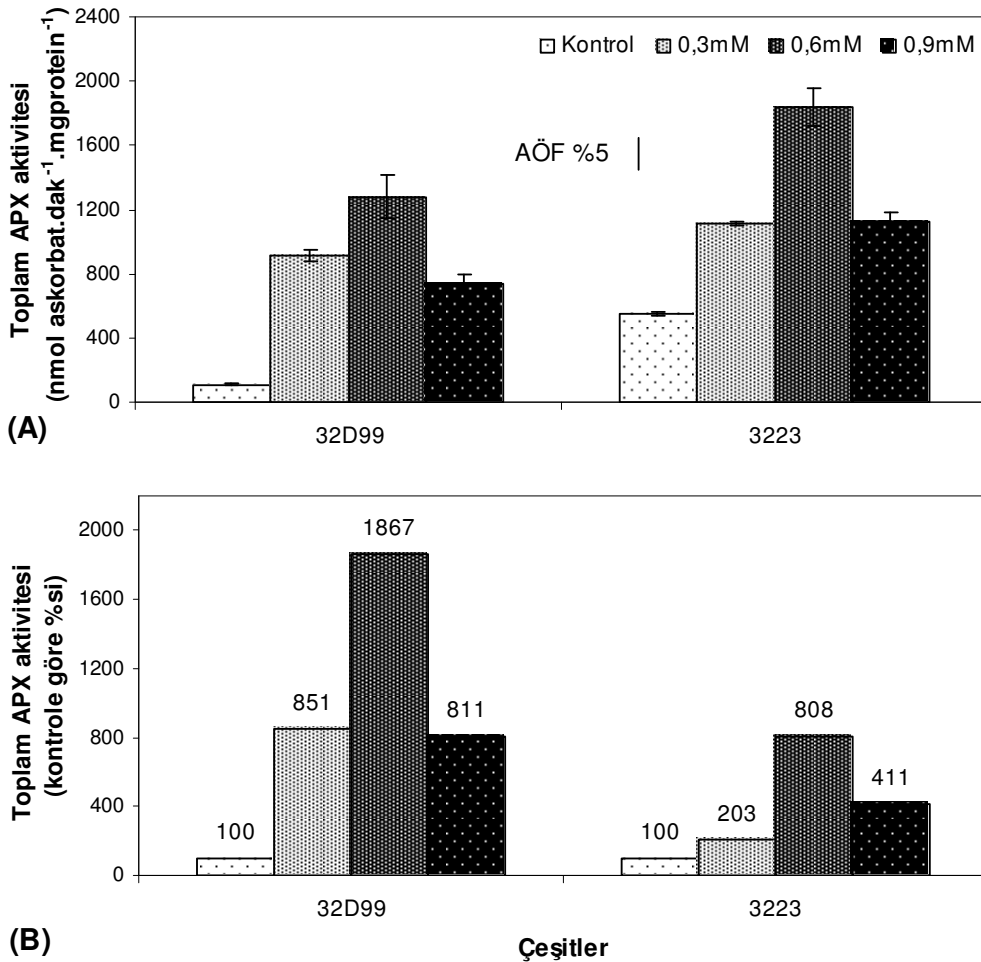
Cd uygulamaları, konsantrasyon artışına bağlı olarak her iki çeşidin yapraklarındaki toplam SOD enzim aktivitesini kontrole göre önemli derecede arttırmıştır (Şekil 4.12. A). Yüksek Cd konsantrasyonunda (0.9mM); 32D99 çeşidinin toplam SOD enzim aktivitesi kontrole göre yaklaşık 10 kat artarken, bu artış 3223 çeşidinde 11 kat olmuştur (Şekil 4.12. B).



Şekil 4.12. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki toplam SOD enzim aktivitesine etkisi (A) ve etkinin kontrole göre değişimi (B).

### **Cd ağır metalinin APX enzim aktivitesi üzerine etkisi**

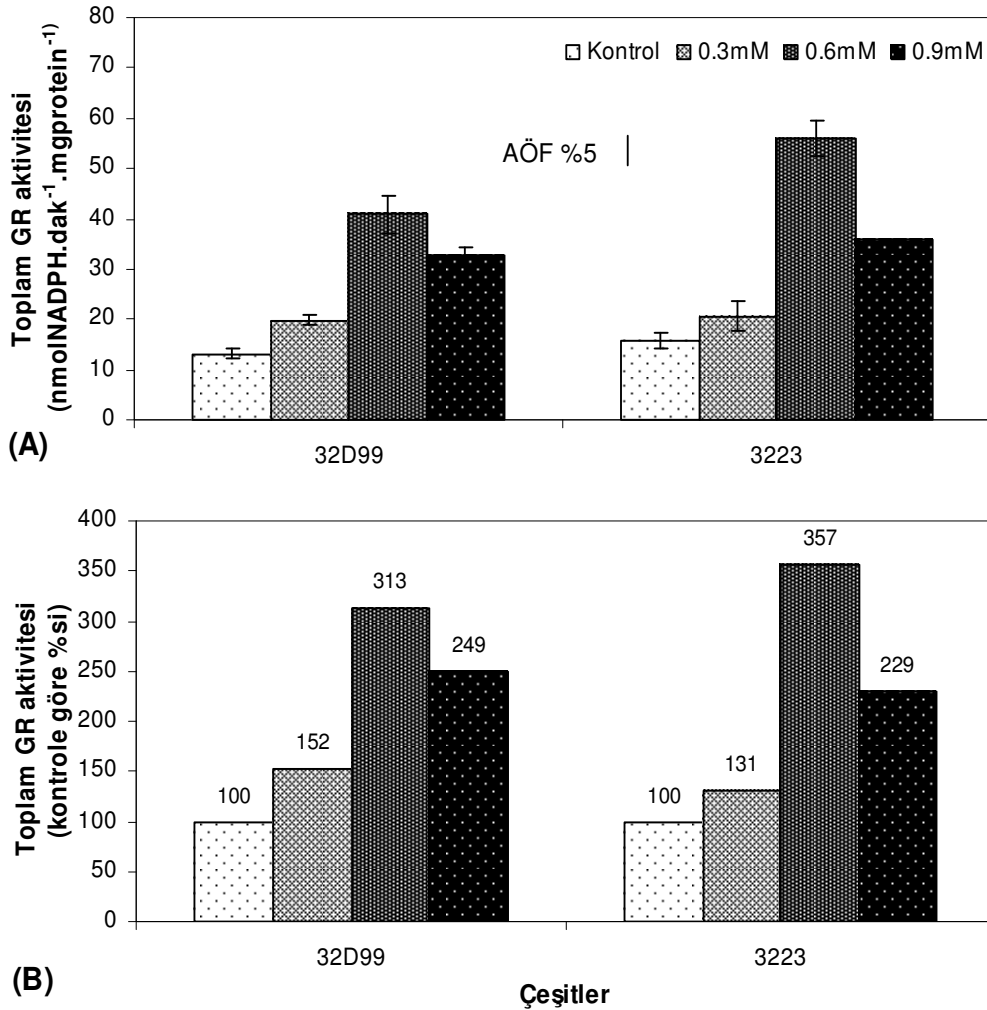
Kadmiyum uygulamaları, konsantrasyondaki artışa bağlı olarak her iki çeşitte de toplam APX enziminin aktivitesinde önemli değişikliklere neden olmuştur. 0.3mM ve 0.6mM Cd uygulamalarında çeşitlerin toplam APX enzim aktivitesinde kontrole göre önemli derecede artış saptanmıştır. Ancak yüksek Cd konsantrasyonunda (0.9mM) enzim aktivitesi; her iki çeşitte de kontrole göre önemli derecede artmış olsa da, bir önceki uygulamaya oranla önemli oranda azalmıştır (Şekil 4.13. A). Maksimum enzim aktivitesi her iki mısır çeşidinde de, 0.6 mM uygulamasında belirlenmiş ve aktivite kontrole göre 32D99 çeşidinde yaklaşık 19 kat, 3223 çeşidinde ise 8 kat artmıştır (Şekil 4.13. B).



Şekil 4.13. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki toplam APX enzim aktivitesine etkisi (A) ve etkinin kontrole göre değişimi (B).

### **Cd ağır metalinin GR enzim aktivitesi üzerine etkisi**

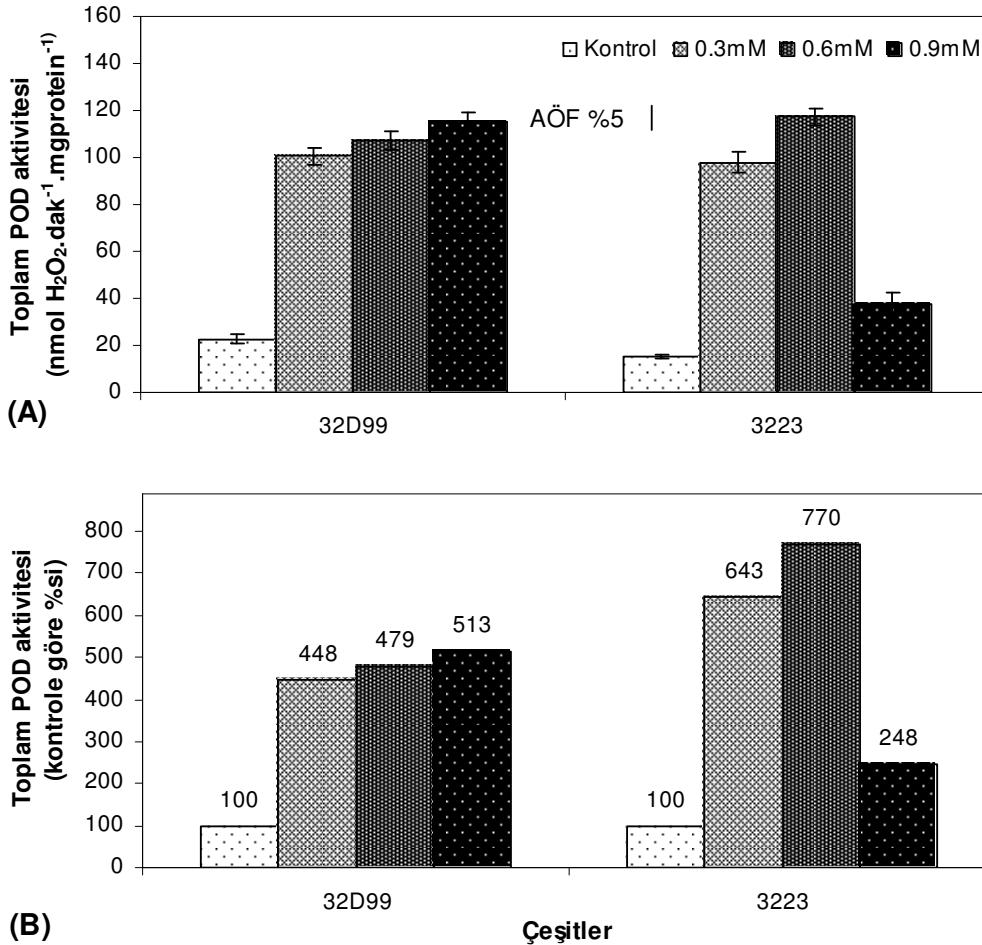
Her iki çeşitte de, 0.6mM ve 0.9mM Cd konsantrasyonlarında, toplam GR enzim aktivitesinde, kontrole göre önemli derecede artış olmuştur. Ancak yüksek Cd konsantrasyonunda (0.9mM) aktivite kontrole göre önemli derecede artmış olmasına rağmen, bir önceki uygulamayla (0.6mM) karşılaştırıldığında toplam GR aktivitesinin önemli derecede düştüğü saptanmıştır (Şekil 4.14. A). Maksimum GR aktivitesi her iki çeşitte de 0.6 mM Cd konsantrasyonunda görülmüştür. Bu uygulamada toplam GR aktivitesi, 32D99 çeşidinde, kontrole göre 3.13 kat, 3223 çeşidinde ise 3.57 kat artmıştır (Şekil 4.14. B).



Şekil 4.14. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki toplam GR enzim aktivitesine etkisi (A) ve etkinin kontrole göre değişimi (B).

### **Cd ağır metalinin POD enzim aktivitesi üzerine etkisi**

32D99 çeşidinde toplam POD aktivitesi, konsantrasyona bağlı olarak önemli derecede artmış ve yüksek Cd konsantrasyonunda maksimum seviyeye ulaşmıştır. 3223 çeşidinde ise toplam POD aktivitesi, konsantrasyon artışına bağlı olarak önemli derecede artmış ve 0.6mM da maksimum seviyeye ulaşmıştır. Ancak yüksek Cd konsantrasyonunda (0.9mM) toplam POD enzim aktivitesi kontrole göre önemli oranda artmış olsa da 0.3 ve 0.6mM Cd uygulamalarına göre önemli derecede azalma saptanmıştır (Şekil 4.15. A). Maksimum enzim aktivitesi, 32D99 çeşidinde 0.9 mM, 3223 çeşidinde 0.6 mM uygulamalarında görülmüş, sırası ile kontrole göre 5.13 ve 7.7 kat aktivite artışları saptanmıştır (Şekil 4.15. B).



Şekil 4.15. Cd ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki toplam POD enzim aktivitesine etkisi (A) ve etkinin kontrole göre değişimi (B).



#### 4.2.2. Pb ağır metalinin büyüme evresindeki mısır çeşitleri üzerindeki etkisi

##### 4.2.2.1. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin kök ve gövde uzamasına etkisi

Vero ve 3223 çeşitlerinde kök uzunluğu, tüm uygulamalarda kontrole göre önemli derecede azalmıştır. Yüksek Pb konsantrasyonunda Vero ve 3223 çeşitlerinin kök büyümesindeki inhibisyon, sırası ile yaklaşık % 25 ve %33 olmuştur (Çizelge 4.7). Vero çeşidinin gövde uzunluğunda; uygulanan Pb konsantrasyonlarına bağlı olarak önemli derecede azalma meydana gelirken, 3223 çeşidinde 5mM ve 8mM Pb konsantrasyonlarında gövde uzunluğunda önemli derecede azalma gözlemlenmiştir. Yüksek Cd konsantrasyonunda gövde uzunluğundaki inhibisyon Vero çeşidinde % 27 olurken, bu oran 3223 çeşidinde yaklaşık %18 olmuştur (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin kök ve gövde uzaması üzerine etkisi.

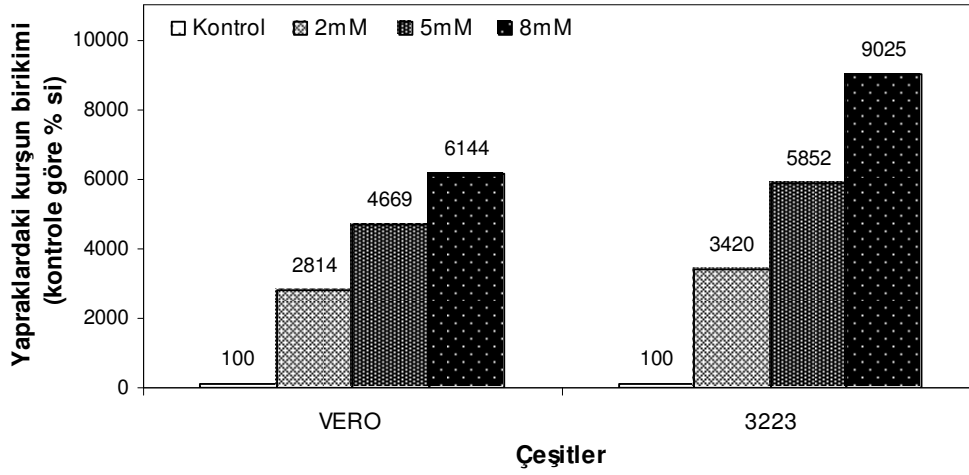
Çeşitler	Pb Konsantrasyonu	Kök uzunluğu (cm.bitki <sup>-1</sup> )	Kök uzamasının kontrole göre yüzdesi	Gövde uzunluğu (cm.bitki <sup>-1</sup> )	Gövde uzamasının kontrole göre yüzdesi
VERO	0(kontrol)	35.74±0.63	100	34.98±0.32*	100
	2	29.94±0.328	83.77	31.08±0.36	88.90
	5	29.01±0.31	81.16	29.2±0.62	83.49
	8	26.66±0.99	74.59	25.67±0.51	73.39
3223	0(kontrol)	35.31±0.31	100	34±0.70	100
	2	26.18±0.48	74.13	33.745±0.58	99.26
	5	24.38±0.42	69.03	30.31±0.86	89.16
	8	23.64±0.36	66.96	27.58±0.89	81.61
AÖF %5		1.28		1.57	

\* Her bir değer 12 tekrarın (n=12) ortalaması ve bunların standart hatalarıdır (SH ±).

##### 4.2.2.2. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki kurşun birikimi üzerine etkisi

Uygulanan Pb konsantrasyonuna bağlı olarak mısır çeşitlerinin yapraklarında önemli miktarda Pb biriktirdiği tespit edilmiştir. Yüksek Pb konsantrasyonunda

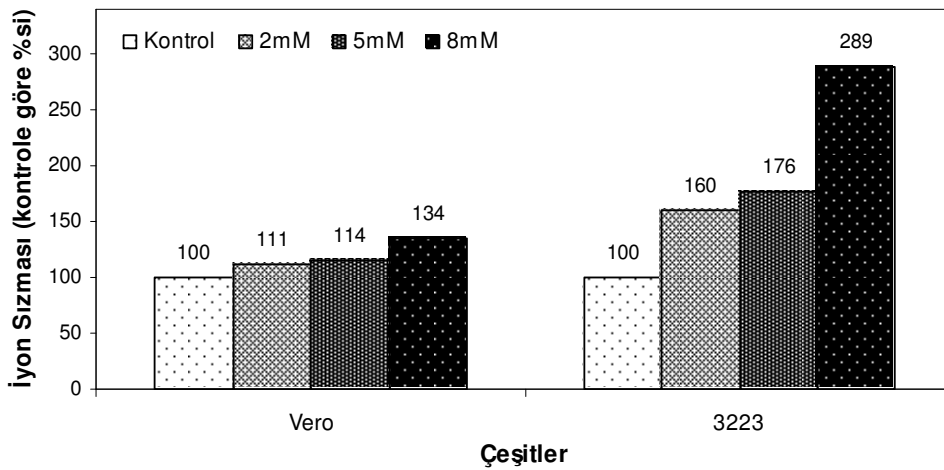
(8mM) Vero çeşidinin yapraklarındaki Pb miktarı kontrole göre yaklaşık 61 kat artış gösterirken, 3223 çeşidinde bu artış yaklaşık 90 kat olmuştur (Şekil 4.16.).



Şekil 4.16. Pb ağır metali uygulanmış mısır çeşitlerinin yapraklarındaki Pb birikimi.

#### 4.2.2.3. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki iyon sızıntısı üzerine etkisi

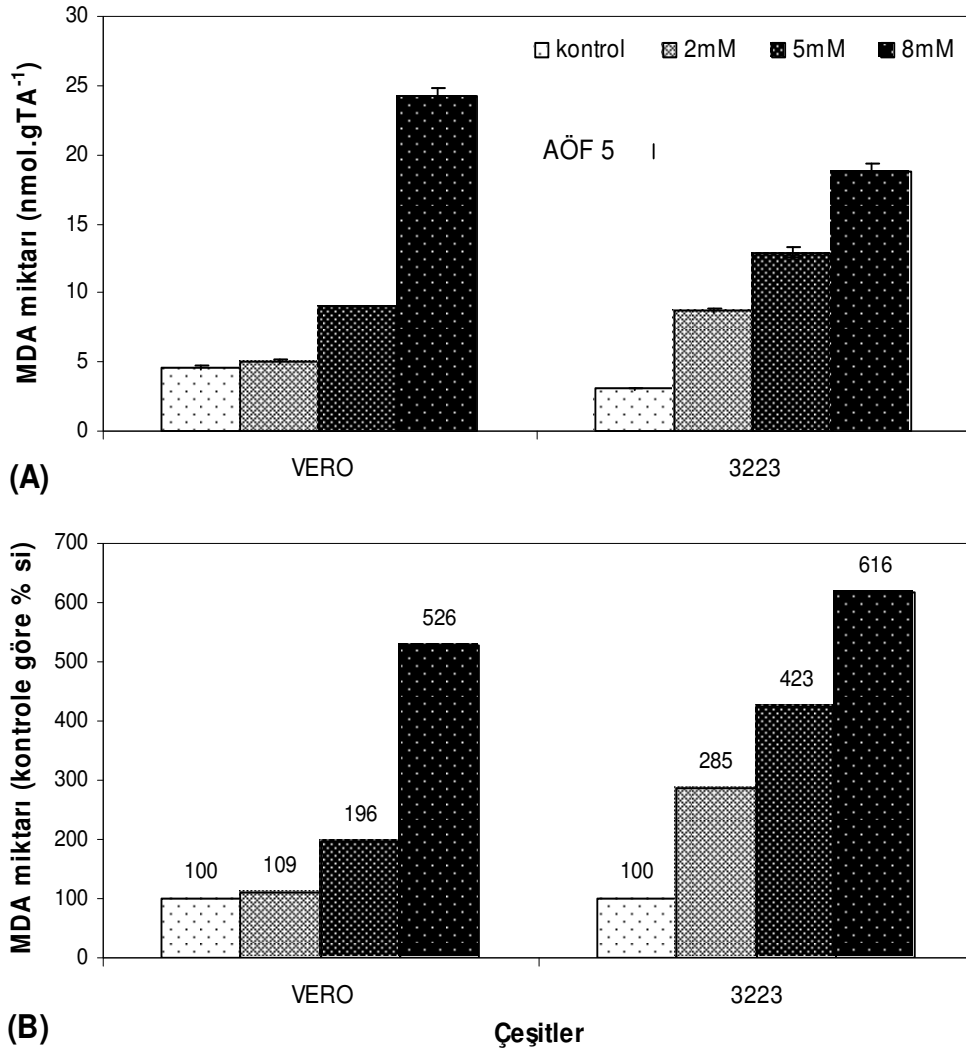
Kurşun stresi, 3223 çeşidinde, iyon sızıntısını, kontrole ve bir önceki konsantrasyona göre önemli derecede artırırken, Vero çeşidinde bu artış yüksek Pb konsantrasyonunda (8mM) daha belirgin hale gelmiştir. Vero çeşidinde yüksek Pb konsantrasyondaki iyon sızıntısı, kontrole göre 1.34 kat artarken, Pb stresine daha az dayanıklı olan 3223 çeşidinde bu artış 2.89 kat olmuştur (Şekil 4.17.).



Şekil 4.17. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki iyon sızıntısı üzerine etkisi.

#### 4.2.2.4. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki MDA içeriği üzerine etkisi

Kurşun stresi, MDA içeriğini 3223 çeşidinde konsantrasyon artışına bağlı olarak, kontrole ve bir önceki konsantrasyona göre önemli derecede arttırmıştır. Vero çeşidinde ise, bu artış 5mM ve 8mM Pb konsantrasyonlarında önemli bulunmuştur Şekil 4.18. A). Yüksek Pb konsantrasyonunda (8mM) Vero çeşidinin MDA içeriği kontrole oranla 5.26 kat artarken, bu artış 3223 çeşidinde 6.16 kat olmuştur(Şekil 4.18. B).



Şekil 4.18. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yaprak dokularındaki MDA içeriği üzerine etkisi(A) ve MDA içeriğindeki değişimin kontrole göre yüzdesi (B).

#### **4.2.2.5. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki fotokimyasal aktivite üzerine etkisi**

Kontrol ve farklı konsantrasyonda Pb stresine maruz kalmış mısır çeşitlerinin yaprakları, 30 dakika karanlığa adapte olduktan sonra düşük ışık şiddetinde ( $0.2 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) ışık uyarımı ile PS II reaksiyon merkezi açılarak elde edilen minimum floresans ( $F_o$ ) verileri Şekil 4.19. A'da verilmiştir. Pb ağır metalinin, Vero çeşidinin minimum floresansı ( $F_o$ ) değerleri üzerinde önemli bir etkisi gözlenmezken, 3223 çeşidinin minimum floresansında, yüksek Pb konsantrasyonunda (8mM) önemli bir azalma olmuştur.

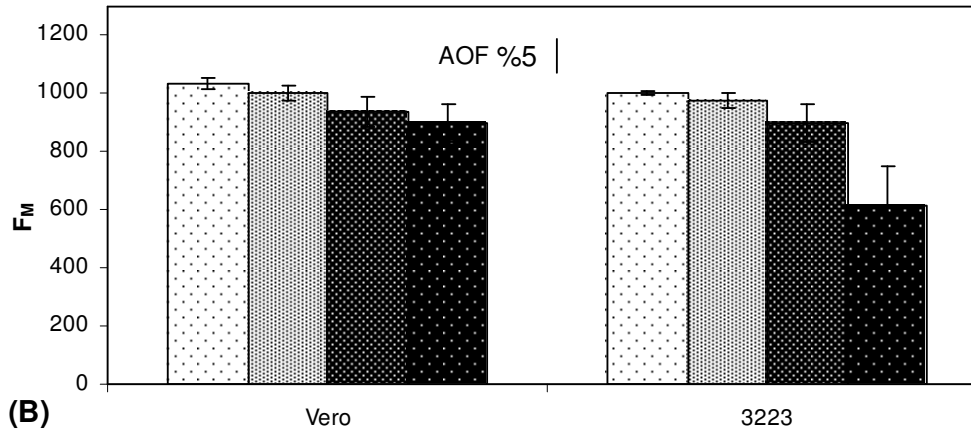
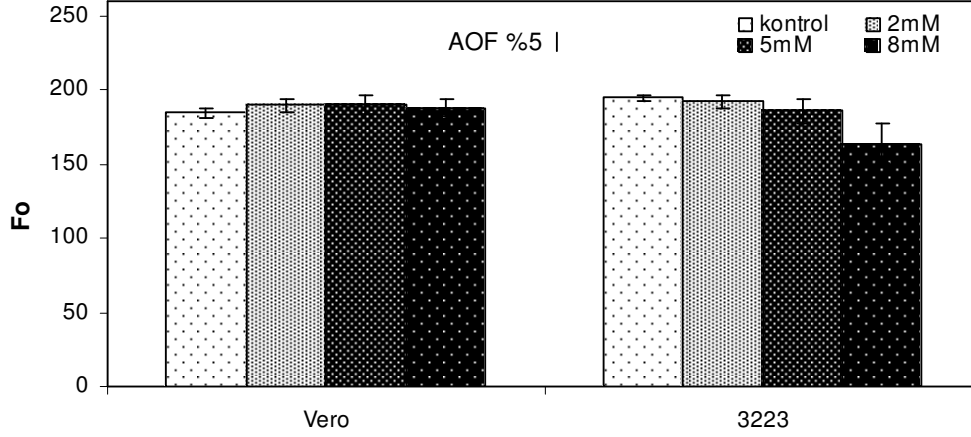
Her iki mısır çeşidinde Pb konsantrasyonunun artışına bağlı olarak maksimum floresans ( $F_M$ ) değerleri azalmıştır ancak bu etki, sadece yüksek Pb konsantrasyonda (8mM) önemli bulunmuştur. Bunun yanı sıra 3223 çeşidindeki  $F_M$  değerindeki azalışın, Vero çeşidine göre daha fazla olduğu saptanmıştır (Şekil 4.19. B).

Farklı konsantrasyonlardaki Pb uygulamalarından sonra, karanlığa adapte edilmiş olan mısır çeşitlerinin yapraklarındaki PSII'nin potansiyel fotokimyasal etkinliği ( $F_V/F_M$ ) incelendiğinde, Pb ağır metalinin Vero çeşidinin yapraklarındaki potansiyel fotokimyasal (quantum) etkinliğini önemli derecede etkilemediği görülmektedir. 3223 çeşidinin potansiyel fotokimyasal etkinliği ise, sadece yüksek Pb konsantrasyonunda (8mM) kontrole göre önemli derecede azalmıştır (Şekil 4.19. C)

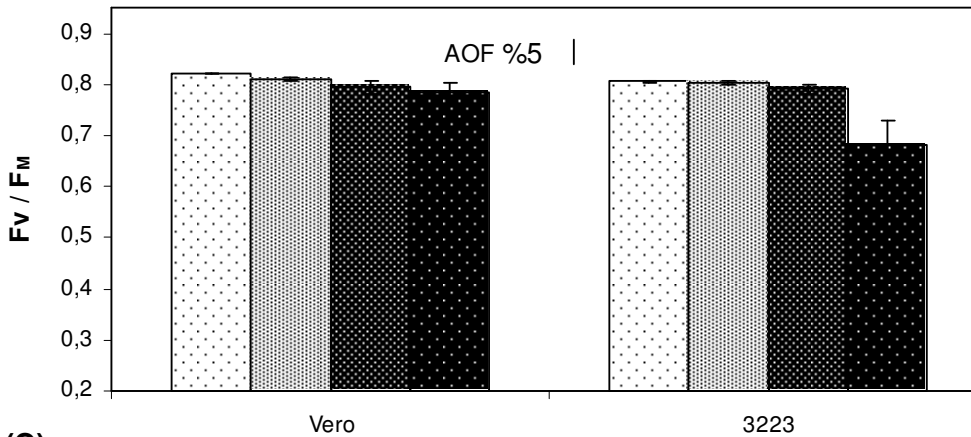
Işığa adapte edilmiş durumdaki mısır çeşitlerinin yapraklarındaki PSII'nin gerçek fotokimyasal etkinliği ( $\Phi\text{PSII}$ ), PSII'nin enerji yakalama etkinliği ( $F_V'/F_M'$ ) ve ETH üzerine Pb ağır metalinin etkisi incelendiğinde (Şekil 4.20. A, B ve C); Pb konsantrasyonunun artışına bağlı olarak bu parametrelerdeki değişim sadece 3223 çeşidinde yüksek Pb konsantrasyonunda (8mM) önemli bulunmuştur.

Enerjinin fotokimyasal kullanım oranı ( $qP$ ); Vero çeşidinin yapraklarında, Pb stresinden önemli derecede etkilenmezken, 3223 çeşidinin yapraklarında yüksek Pb konsantrasyonunda (8mM) önemli oranda azalmıştır (Şekil 4.21. A). Buna karşın, fotokimyasal olmayan enerji oranı olan  $qN$ , Vero çeşidinde önemli bir

değişiklik göstermezken, 3223 çeşidinde, yüksek Pb konsantrasyonunda (8mM) bu değerde önemli bir artış saptanmıştır (Şekil 4.21. B).



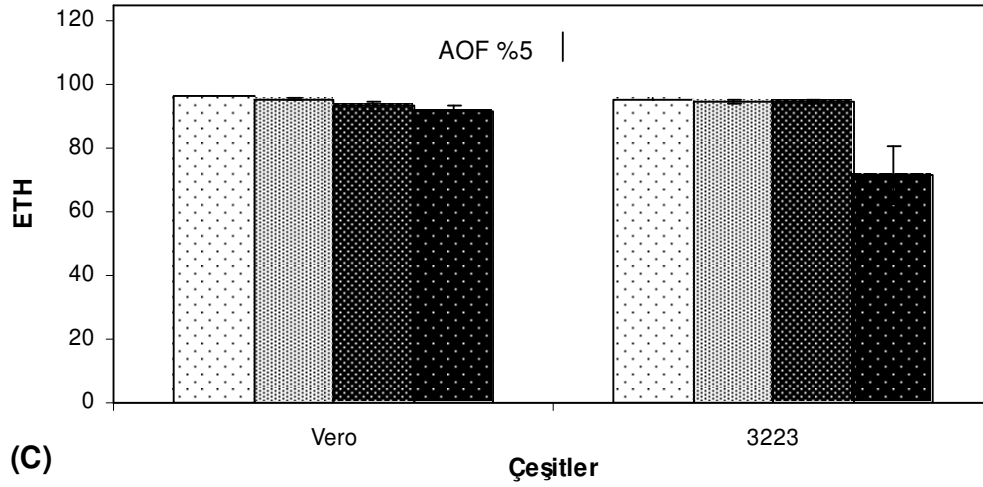
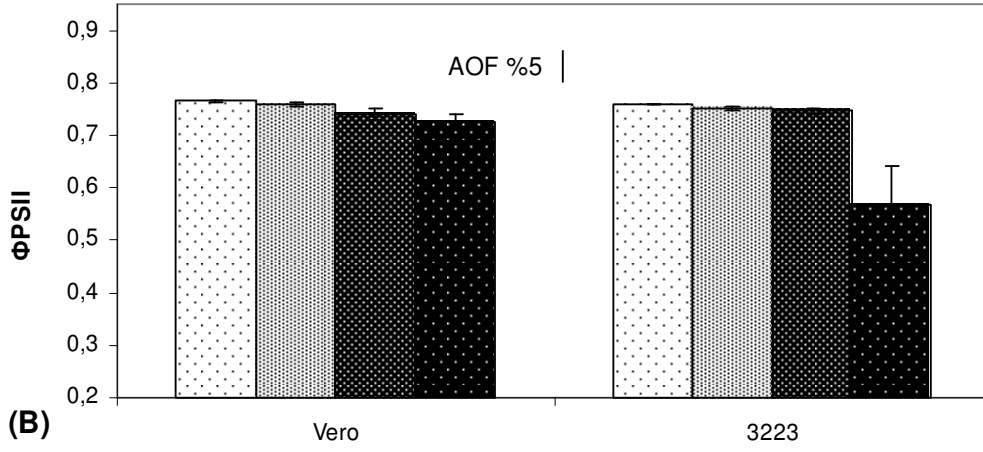
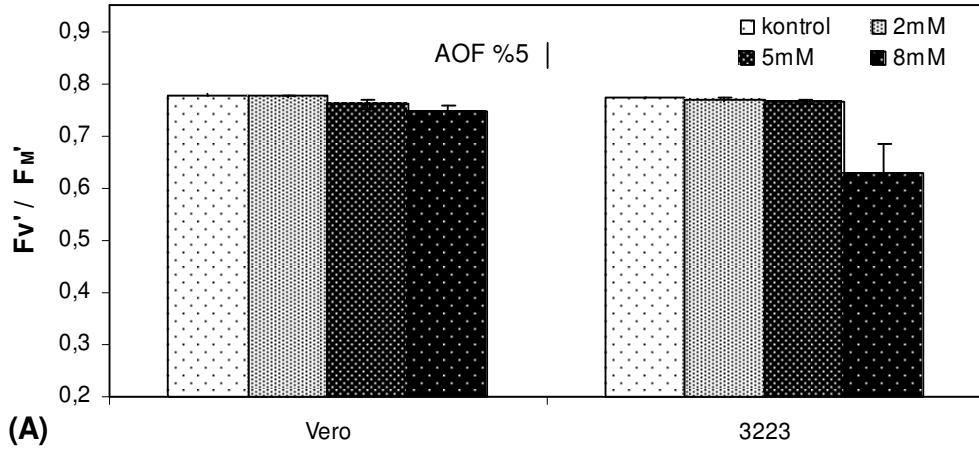
(B)



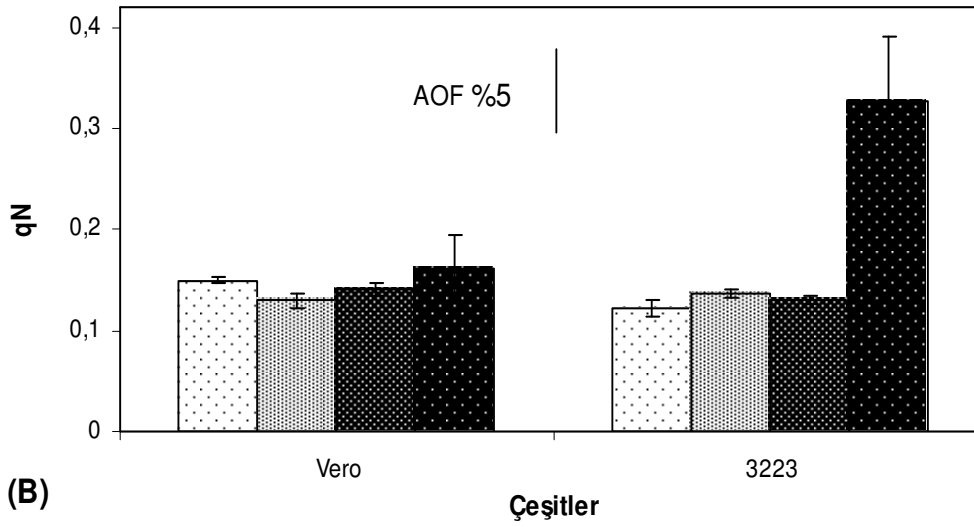
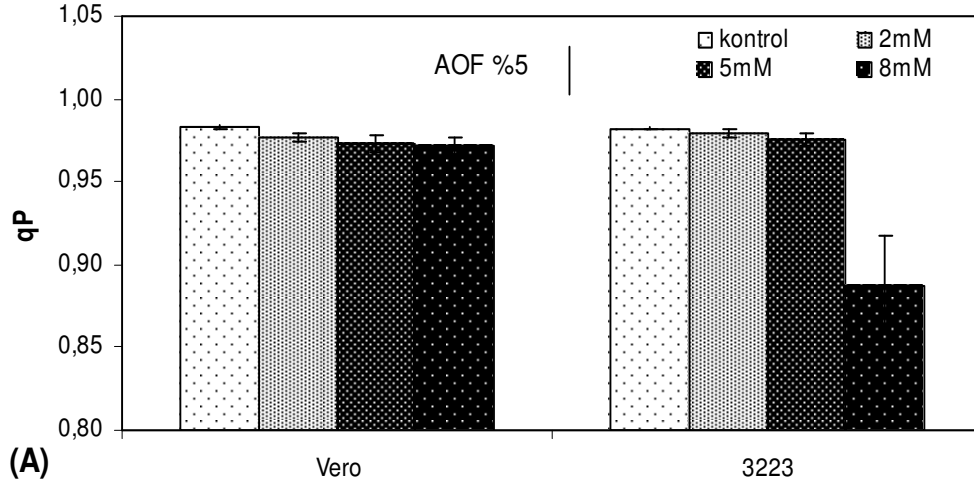
(C)

Çeşitler

Şekil 4.19. Pb ağır metalinin karanlığa adapte edilmiş mısır çeşitlerinin yapraklarındaki A) minimum fluoresans ( $F_o$ ) ; B) maksimum fluoresans ( $F_M$ ) ve C) PSII' nin potansiyel fotokimyasal etkinliği ( $F_v / F_M$ ).



Şekil 4.20. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin ışığa adapte edilmiş yapraklarındaki A) PSII gerçek fotokimyasal etkinliği, ( $\Phi_{PSII}$ ), B) PSII'nin eksitasyon enerjisini yakalama etkinliği ( $F_v'/F_m'$ ) ve C) elektron transport hızı (ETH).



Şekil 4.21. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin ışığa adapte edilmiş yapraklarındaki A) fotokimyasal kullanım (qP) ve B) fotokimyasal olmayan kullanım(qN).

#### 4.2.2.6. Kurşun uygulamasının pigment içeriği üzerine etkisi

Mısır çeşitlerinin yapraklarındaki pigment içeriği, ağır metal konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak önemli derecede azalmıştır. Her iki çeşitte de klorofil a, ve klorofil a+b miktarları, tüm konsantrasyonlarda kontrole göre önemli derecede azalırken, klorofil b miktarı 5 ve 8mM Pb konsantrasyonlarında kontrole göre önemli derecede azalmıştır (Çizelge 4.8). Yüksek Pb konsantrasyonunda (8mM), toplam klorofil miktarının kontrole göre; Vero çeşidinde yaklaşık %58, strese daha az dayanıklı çeşit 3223'te ise yaklaşık %88 arasında azaldığı tespit edilmiştir.

Konsantrasyon artışına bağlı olarak her iki mısır çeşidinin yapraklarındaki karotenoid miktarı, kontrole göre önemli derecede azalmıştır. (Çizelge 4.8). Yüksek Pb konsantrasyonunda (8mM), Vero çeşidinin yapraklarındaki karotenoid miktarı kontrole göre %48 azalırken, 3223 çeşidinde yaklaşık %57 azalış saptanmıştır.

Çizelge 4.8. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki pigment içeriği üzerine etkisi.

Çeşitler	Pb konsantrasyonu (mM)	kl a miktarı (mg.gTA. <sup>-1</sup> )	kl b miktarı (mg.gTA. <sup>-1</sup> )	kl a+b miktarı (mg.gTA. <sup>-1</sup> )	karotenoid miktarı (mg.gTA. <sup>-1</sup> )
VERO	0(kontrol)	3.65±0.17*	1.01±0.0088	4.651±0.19	0.82±0.05
	2	2,92±0.10	0.88±0.046	3.8±0.14	0.68±0.025
	5	1.69±0.15	0.56±0.057	2.25±0.21	0.44±0.057
	8	1.46±0.10	0.5±0.055	1.96±0.15	0.43±0.036
3223	0(kontrol)	3.00±0.11	0.89±0.033	3.89±0.13	0.72±0.027
	2	2.35±0.13	0.76±0.042	3.11±0.17	0.58±0.034
	5	1.68±0.05	0.66±0.062	2.34±0.10	0.43±0.015
	8	0.26±0.07	0.22±0.035	0.48±0.10	0.31±0.0637
AÖF %5		0.425	0.139	0.530	0.241

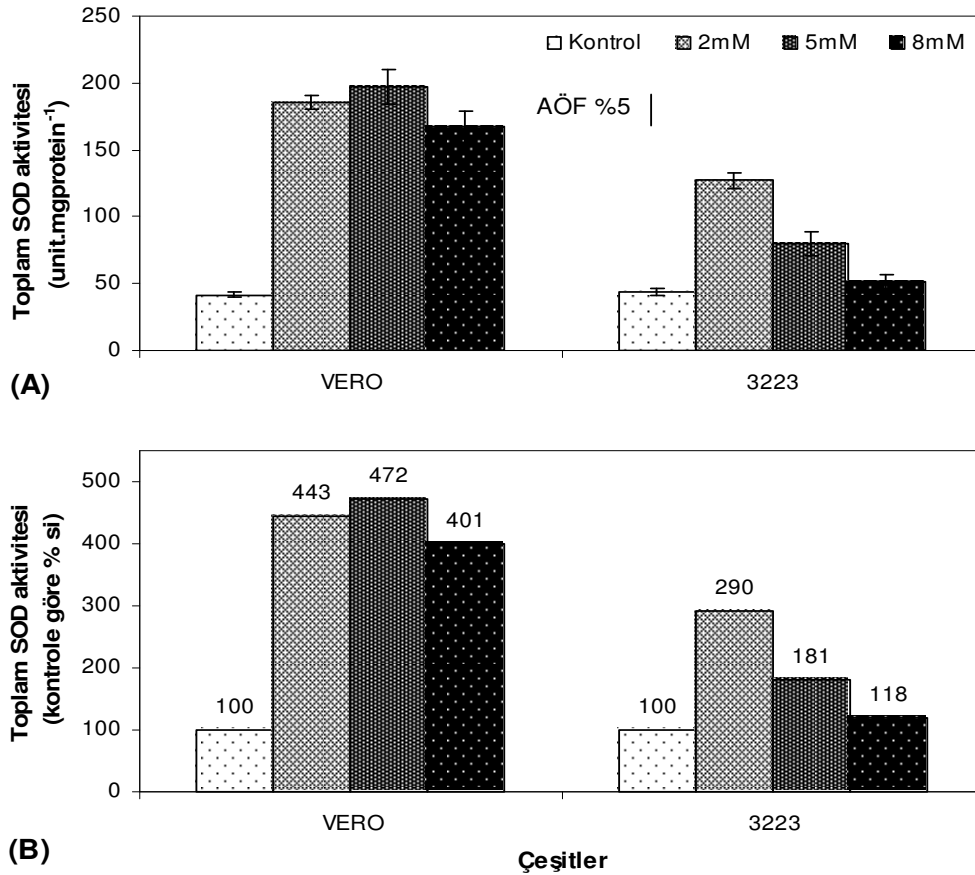
\*Her bir değer 3 tekrarlı 2 bitkinin (n=6) ortalaması ve bunların standart hatalarıdır (SH±).



#### 4.2.2.7. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerindeki antioksidan enzimlerin aktiviteleri üzerine etkisi

##### Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki toplam SOD aktivitesi üzerine etkisi

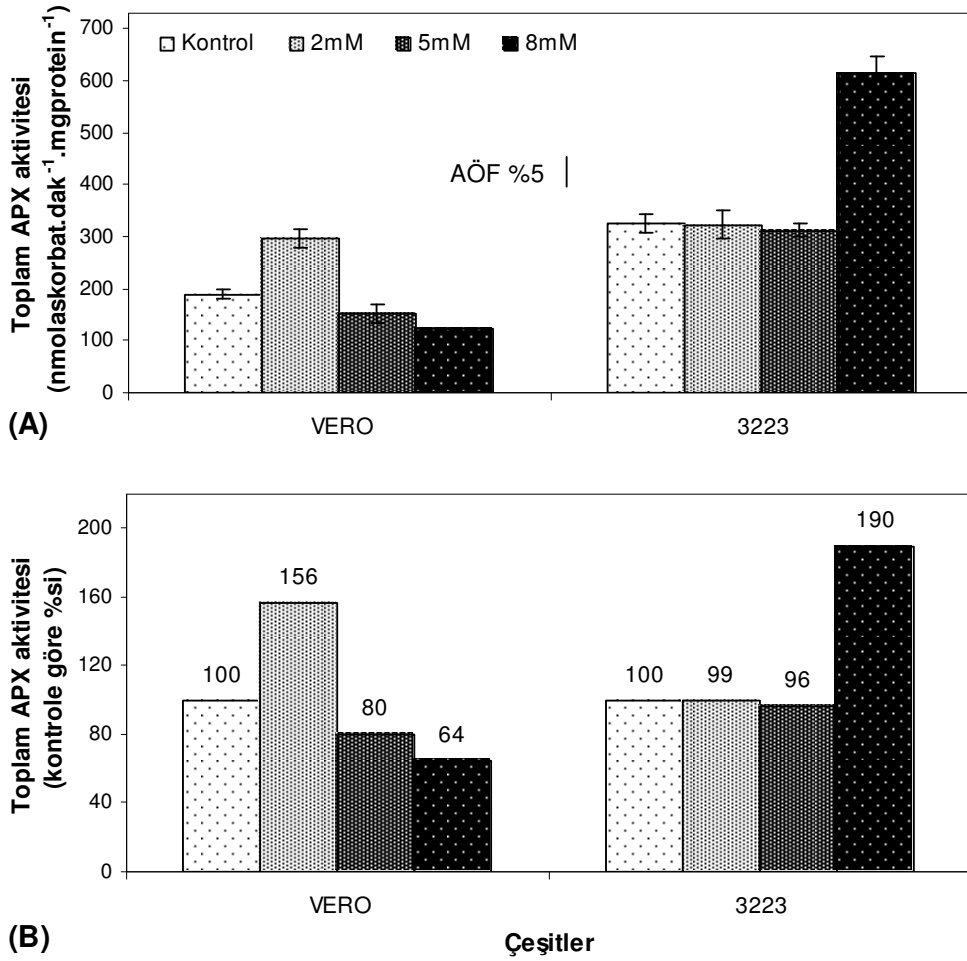
2mM ve 5mM Pb uygulamaları, Vero çeşidinde toplam SOD enziminin aktivitesini kontrole göre önemli derecede artırmıştır. Yüksek Pb konsantrasyonunda (8mM) ise enzim aktivitesi kontrole göre önemli derecede artarken, bir önceki konsantrasyona (5mM) göre önemli derecede azalmıştır. 3223 çeşidinin yapraklarında toplam SOD enzim aktivitesi; 2mM Pb konsantrasyonunda kontrole göre önemli düzeyde artarken, 5mM Pb uygulamasında aktivite azalmaya başlamış ve yüksek Pb konsantrasyonunda (8mM) kontrol seviyesine gerilemiştir (Şekil 4.22. A). Vero çeşidinde maksimum SOD enzim aktivitesi 5mM Pb konsantrasyonunda ulaşılmış ve kontrole göre 4.72 kat artış tespit edilmiştir. 3223 çeşidinde ise maksimum SOD enzim aktivitesi 2mM Pb konsantrasyonda görülmüş ve kontrole göre 2.9 kat artış saptanmıştır (Şekil 4.22. B).



Şekil 4.22. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki toplam SOD enzim aktivitesine etkisi (A) ve etkinin kontrole göre değişimi (B).

## **Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki toplam APX enzim aktivitesi üzerine etkisi**

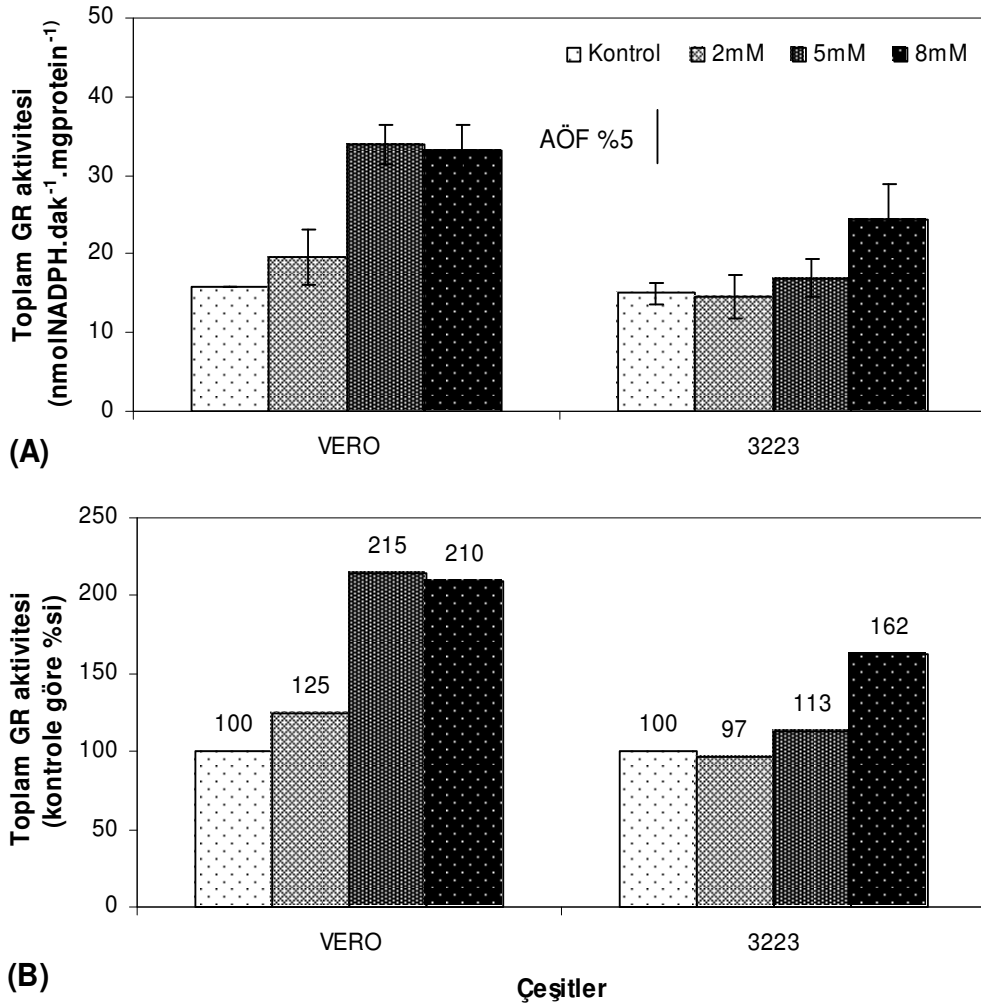
Vero çeşidinin yapraklarındaki toplam APX enzim aktivitesi; 2mM Pb konsantrasyonunda kontrole göre önemli derecede artarken, sonraki konsantrasyonlarda, aktivite önemli ölçüde düşerek yüksek Pb konsantrasyonunda (8mM) kontrol seviyesinin altına inmiştir. Diğer taraftan, 2 ve 5mM Pb konsantrasyonlarında 3223 çeşidinin toplam APX aktivitesinde önemli bir değişiklik görülmezken, yüksek Pb konsantrasyonunda (8mM) önemli derecede aktivite artışı belirlenmiştir (Şekil 4.23. A). Maksimum toplam APX enzim aktivitesi Vero çeşidinde 2mM, 3223 çeşidinde ise 8mM Pb konsantrasyonlarında görülmüştür. Bu konsantrasyonlarda toplam APX enzim aktivitesi kontrole göre, Vero çeşidinde 1.56 kat, 3223 çeşidinde 1.9 kat artmıştır (Şekil 4.23. B).



Şekil 4.23 Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki toplam APX enzim aktivitesine etkisi (A) ve etkinin kontrole göre değişimi (B).

## **Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki toplam GR aktivitesi üzerine etkisi**

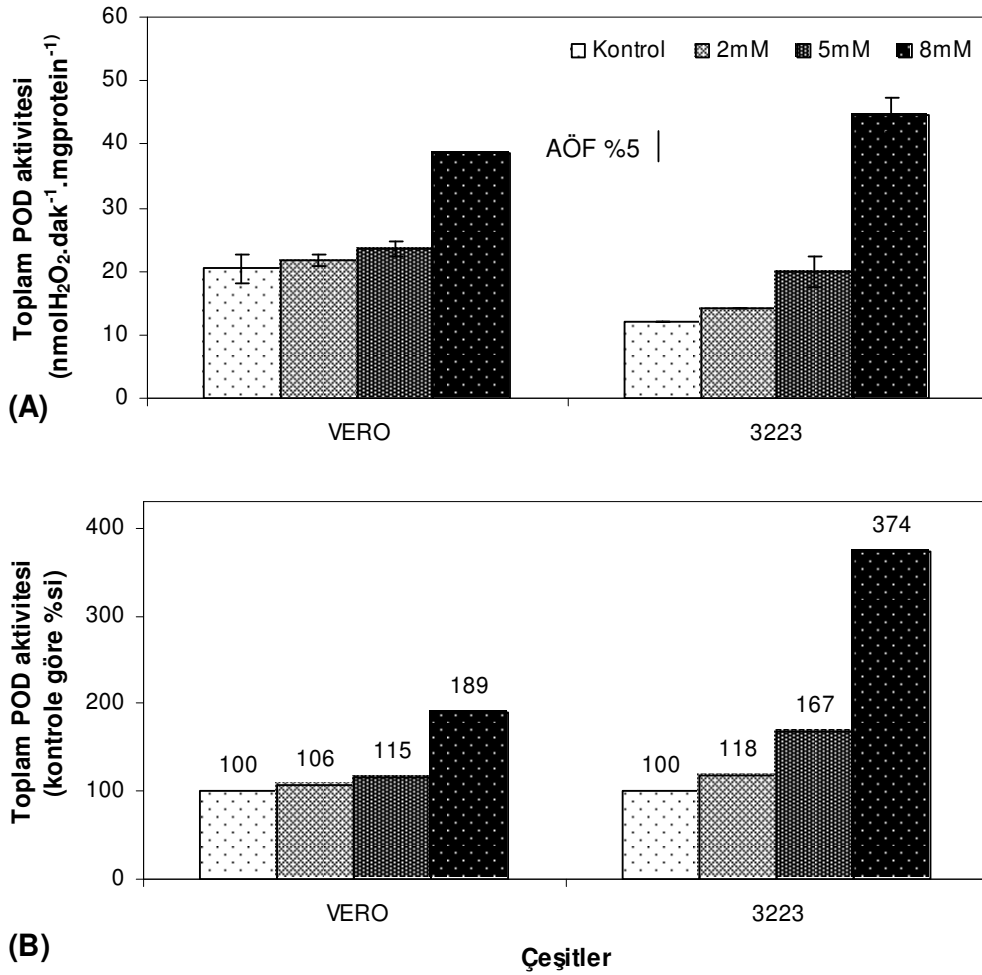
Toplam GR aktivitesi, Vero çeşidinde 5mM ve 8mM Pb konsantrasyonlarında kontrole göre önemli derecede artış gösterirken, 3223 çeşidinde yüksek Pb konsantrasyonunda (8mM) kontrole göre önemli bir artış belirlenmiştir (Şekil 24. A). Vero çeşidinde 5mM Pb uygulamasında, 3223 çeşidinde ise 8mM Pb uygulamasında maksimum toplam GR enzim aktivitesi görülmüş ve aktivitede sırası ile kontrole göre 2.15 ve 1.62 kat artış belirlenmiştir (Şekil 24. B).



Şekil 4.24 Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki toplam GR enzim aktivitesine etkisi (A) etkinin kontrole göre değişimi.

## **Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki toplam POD aktivitesi üzerine etkisi**

Kurşun stresi, Vero çeşidinde yüksek Pb konsantrasyonunda, 3223 çeşidinde ise 5mM ve 8mM Pb konsantrasyonunda toplam POD enzim aktivitesini önemli derecede arttırmıştır (Şekil 4.25. A). Maksimum aktivitenin görüldüğü yüksek Pb uygulamasında (8mM) toplam POD aktivitesi kontrole göre, Vero çeşidinde 1.89 kat, 3223 çeşidinde ise 3.74 kat artmıştır (Şekil 4.25. B).



Şekil 4.25. Pb ağır metalinin mısır çeşitlerinin yapraklarındaki toplam POD aktivitesine etkisi (A) ve etkinin kontrole göre değişimi (B).

## 5. TARTIŞMA

### 5.1. Cd ve Pb Ağır Metallerinin Çimlenme ve Erken Fide Gelişim Evresindeki Mısır Çeşitleri Üzerine Etkisi

Kadmiyum ve Pb bitki büyüme ve gelişmesi için gerekli elementler olmayıp, doğal kaynaklardan belirli düzeylerde yayılmakla beraber, özellikle son yüzyılda, taşıt kullanımı, endüstriyel ve tarımsal faaliyetler gibi artan insan aktiviteleri sonucu biyosferde ortaya çıkan çok tehlikeli çevresel kirlenmelerdir (Sanitá di Toppi and Gabbrielli, 1999; Pinto et al., 2004; Benavides et al., 2005; Sharma and Dubey, 2005; Wang et al., 2006). Cd ile kirlenmemiş toprakların 0.04 – 0.32 mM arasında Cd içerdiği ancak, kirlenmiş topraklarda bu konsantrasyonun 0.32 – 1mM arasında değiştiği bildirilmiştir (Wagner, 1993; Sanitá di Toppi and Gabbrielli, 1999). Buna karşın, Pb ile kirlenmiş toprakların 1.9 - 3.9 mM arasında Pb içerdiği ve endüstriyel alanlarda bu konsantrasyonun 4.8 mM a ulaştığı bildirilmiştir (Angelone and Bini, 1992).

Kadmiyum ve Pb toksisitesi bitkilerde genel olarak benzer zararlara yol açmasına rağmen bu zararların dereceleri arasında büyük fark vardır. Stohs ve Bagchi (1995)'e göre, metallerin farklı toksisite göstermeleri; su içindeki çözünürlükleri, absorblanabilmeleri, iletimleri ve kimyasal reaksiyonlara girme yatkınlıklarındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Birçok araştırmacı, ağır metallerin tohum çimlenmesi ve fidelerin erken büyümesi üzerinde etkili olduğunu göstermiştir (Obroucheva et al., 1998; Munzuroğlu and Geçgil, 2002; Lin et al., 2003; Chatterjee and Chatterjee, 2003; Prasad et al., 2001; An, 2006). Bu araştırmada uygulanan ağır metal stresine dayanıklı mısır çeşitlerinin belirlenmesi için tohumlar farklı konsantrasyonlarda Cd ve Pb çözeltilerinde şişirilmiş ve çimlendirilmiştir. Cd ve Pb ağır metalleri uygulanmış tüm çeşitler ve kontrol grupları 4 gün içerisinde (%80-90) çimlenmişlerdir. Artan ağır metal konsantrasyonlarına bağlı olarak çeşitlerin çimlenme davranışlarında önemli bir fark görülmediği için sonuçlar tez kapsamında verilmemiştir. An, (2004)'ün yaptığı araştırmada uygulanan yüksek Cd konsantrasyonun, mısır tohumlarının çimlenme yüzdesi üzerine etkili olmadığı bildirilmiştir. Bunun yanısıra Wierzbicka ve Obidzińska (1998), Pb ile şişirilen mısır tohumlarını histokimyasal yöntemler ile inceleyerek, tohumlardaki Pb dağılımını tesbit etmişlerdir. Pb<sup>+2</sup> iyonlarının tohum kabuğunda tutunarak, embriyoya

ulaşmadığını ve tohum çimlenmesi üzerinde inhibisyona neden olmadığını bildirmişlerdir. Uygulanan Pb ağır metalinin çimlenme davranışı üzerindeki etkisi, tohum kabuklarının anatomik özelliklerinin bitki türlerine göre farklılık göstermesinden kaynaklanmış olabilir.

Çimlenmeden sonraki erken gelişim evresinde artan Cd ve Pb konsantrasyonlarına bağlı olarak çeşitlerin koleoptil ve kök büyümelerinde, kontrole göre önemli farklılıklar saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.1. ve 4.2. A, B). Gerek erken fide gerekse büyüme evresinde kök uzunluklarındaki inhibisyonlar karşılaştırıldığında Cd'un Pb'a göre çok daha toksik olduğu tespit edilmiştir. Erken fide evresinde tüm mısır çeşitlerinin kök uzunluklarının kontrole göre %50 ve üzeri inhibisyona uğradığı konsantrasyon aralığı; Cd için 0.2-0.4mM, Pb içinse 1-4mM olmuştur (Bkz. Şekil 4.1. A, B ve Çizelge 4.5., 4.7.) Munzuroğlu ve Geçkil (2002) yaptıkları araştırmada, *Triticum aestivum* ve *Cucumis sativus* bitkilerine ait çeşitleri erken fide evresinde farklı konsantrasyonlarda Hg, Cd, Co, Cu, Pb ve Zn stresine maruz bırakmışlar ve her iki bitkide de Cd'un Pb'a oranla kök uzunluklarında daha fazla inhibisyona neden olduğunu tespit etmişlerdir.

Schützendübel vd. (2001), Cd stresine karşı bitkilerde görülen en hassas ve en hızlı fizyolojik tepkinin, kök uzunluğundaki inhibisyon olduğunu bildirmişlerdir. Bitkiler diğer elementler gibi Cd ve Pb'u da genelde kökleri aracılığı ile alırlar. Kökler, ağır metal stresine ilk maruz kalan bölgeler olması nedeniyle, en hızlı yanıtın verildiği ve en fazla zararın görüldüğü bitki kısmıdır (Tester and Leigh, 2001; Verma and Dubey, 2003). Köklerin en hassas bitki kısımları olması ve en hızlı fizyolojik yanıtı vermeleri nedeniyle, araştırmada dayanıklı çeşidin belirlenmesinde parametre olarak kök uzunluğundaki değişim esas alınmıştır. Kök uzunluğu inhibisyonunun en az olduğu mısır çeşidinin Pb stresi için Vero, Cd için ise 32D99 çeşidi olduğu belirlenirken, her iki ağır metal içinde en fazla kök inhibisyonuna uğrayan çeşidin 3223 olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.3 ve 4.4.). Pb stresinde, Vero çeşidinin kök uzunluğundaki inhibisyon artan Pb konsantrasyonuna bağlı olarak kontrole göre sırası ile %18, %34, %71, %92 olurken, 3223 çeşidinde kök uzunluğu inhibisyonu %36, %59, %84, %96 olarak bulunmuştur. Cd stresinde, 32D99 çeşidindeki kök uzunluğundaki azalma artan Cd konsantrasyonuna bağlı olarak kontrole göre sırası

ile, %17, %32, %47, %55 olurken 3223 çeşidindeki azalma %28, %44, %54, %69 olarak tespit edilmiştir.

Kadmiyum ve Pb'un, bitki gelişimi için gerekli olan bazı elementlerin alınımını ve/veya kullanımını etkilediği bilinmektedir. Toprakta ve bitkide bulunan Cd ve Pb konsantrasyonunun artması, bitkinin K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn gibi besin elementlerini almasını ve/veya kullanmasını olumsuz yönde etkilemektedir (Walker et al., 1977; Haussling et al., 1988; Clarkson and Luttge, 1989; Godbold and Kettner, 1991; Rivetta et al., 1997; Sharma and Dubey, 2005). Ağır metallerin bitkilerde özellikle Ca kullanımını engellemesi üzerine bir çok araştırma yapılmıştır. Pb ve Cd'un hücre içine iletim yollarından biri, başta Ca kanalı olmak üzere hücre zarında bulunan katyon kanallarıdır (Marshall et al., 1994; Huang et al., 1994; Rivetta et al., 1997). Pb'un, hücre zarından hücre içine geçişinde Ca kanallarını kullanması bu kanalların aktivitelerini olumsuz etkilemektedir (Huang and Cunnigham, 1996). Haussling vd. (1988), köklerde Ca konsantrasyonunun azalmasının hücre bölünmesi ve uzamasının inhibisyonuna neden olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca Pb'un kök büyüme bölgelerine ulaşabildiği (Malkowski and et al., 2002), burada meristem hücrelerinde mikrotübül organizasyonunun bozulmasına neden olduğu ve buna bağlı olarak hücre bölünmesini inhibe ettiği saptanmıştır (Wierzbicka, 1994; Eun et al., 2000; Yang et al., 2000). Ağır metallerin meristem bölgesini ulaşması ve bölünmeyi doğrudan inhibe etmesi kök uzamasındaki azalmanın ve köklerin hassasiyetinin temel nedeni olabilir. Diğer taraftan kök uzunluğundaki inhibisyon, Cd ve Pb konsantrasyonuna bağlı olarak, hücre içi potasyum (K) miktarının değişmesi nedeniyle de olabilmektedir. Çünkü genel olarak, K'un hücre uzaması ve gelişmesi için gerekli bir element olduğu kabul edilmektedir (Claussen et al., 1997; Elumalai et al., 2002). Kochian (1995), kök uzunluğundaki inhibisyonu, kök hücrelerinin bölünmesinin aksamasından çok, bölünen yeni hücrelerin gelişmesinin inhibe olmasına bağlamaktadır. Bu çalışmada, erken fide evresinde ağır metal stresine maruz kalmış mısır çeşitlerinin kök uzunluğundaki inhibisyonunun, koleoptil uzunluğundaki inhibisyona oranla daha fazla olduğu da saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.1. A, B ve Şekil 4.2. A, B). 6mM Pb uygulamasında, kök uzunluğundaki inhibisyon, tüm mısır çeşitlerinde %88-97 aralığında olurken, koleoptil uzunluğundaki inhibisyon %43-80 aralığında tespit edilmiştir. 0.4mM Cd uygulamasında ise, kök uzunluğundaki inhibisyon; %55-69 arasında değişirken,

koleoptil uzunluğundaki inhibisyon %28-49 arasında bulunmuştur. Cd ve Pb stresinin mısır bitkisi üzerindeki etkisini araştıran diğer çalışmalarda köklerin, toprak üstü organlara göre daha fazla inhibisyona uğradığı tespit edilmiştir (Marschner, 1995; Malkowski et al., 2002; An, 2004). Koleoptilin Cd ve Pb stresinden köke oranla daha az etkilenmesi muhtemelen bu ağır metallerin kökte birikmesi ve koleoptile daha az miktarda taşınmasından kaynaklanmış olabilir. Araştırmada, tüm mısır çeşitlerinde, Cd ve Pb konsantrasyonunun artışına bağlı olarak gerçek ve nispi kök büyümesi zamana bağlı olarak da incelenmiştir (Bkz. Çizelge 4.1 ve 4.2). Uygulanan Cd ve Pb stresine bağlı olarak, çimlenmenin 4. ve 8. günü arasında tüm çeşitlerin kendi içlerindeki büyüme hızları nispi büyüme hızı ile açıklanabilir. İnkübasyonun 4. ve 8. gününde ölçülen kök uzunlukları ile hesaplanan nispi büyüme hızının, artan Pb konsantrasyonuna bağlı olarak tüm çeşitlerde önemli derecede azaldığı, Cd uygulamasında ise Doge çeşidi dışında nispi büyüme hızında bir değişim olmadığı belirlenmiştir. Tüm çeşitler için gerçek ve nispi büyüme hızları hesaplanırken ağır metal uygulamasının 4. ve 8. gününde ölçülen kök uzunlukları esas alınmıştır. Cd ağır metalinin nispi büyüme hızını etkilememesi, ilk ölçümün 4. gün yapılmasına bağlı olabilir. Nispi büyüme hızındaki yavaşlamanın ölçüm yapılmayan ilk 4 gün içinde belirgin olduğu ve sonraki günlerde bu etkinin gözlenemediği düşünülmektedir.

Farklı konsantrasyonlarda uygulanan Cd ağır metalinin, mısır çeşitlerinin kök ve koleoptil su içerikleri üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır (Bkz. Şekil 4.3. A ve Şekil 4.4. A). Pb ağır metalinin de genel olarak mısır çeşitlerinin su içeriklerinde önemli derecede bir etkisi gözlemlenmezken sadece yüksek Pb (6mM) konsantrasyonunda DK626 ve Vero çeşitlerinin kök su içeriğinde kontrole göre sırası ile %24 ve %14, 32D99 ve Vero çeşitlerinin ise koleoptil su içeriğinde kontrole göre sırası ile %25 ve %12 azalış tespit edilmiştir (Şekil 4.3. B ve 4.4. B).

Genel olarak Cd ve Pb stresinde her iki dokudaki (kök ve koleoptil) su içeriği % 85-90 arasında olup, bu durum bitki köklerinden suyun alınımının önemli ölçüde engellenmediğini göstermektedir. Su normal olarak alınsa bile içindeki çözünmüş ağır metal konsantrasyonlarına bağlı olarak gerek kök gerekse koleoptil büyümesinde suyun kullanımı sınırlandırılmış olabilir.



Erken fide gelişim evresinde ağır metal stresine dayanıklı çeşitlerin belirlenmesinde; mısır bitkisi köklerindeki (% kontrole göre) inhibisyona bağlı olarak belirlenen dayanıklılık dereceleri esas alınmıştır. Dayanıklı çeşidin uygulanan Pb stresi için Vero, Cd için ise 32D99 çeşidi olduğu belirlenirken, her iki ağır metal içinde en fazla kök inhibisyonuna uğrayan çeşidin 3223 olduğu tespit edilmiş ve daha az dayanıklı çeşit olarak büyüme deneylerinde kullanılmıştır.

## **5.2. Cd ve Pb Ağır Metallerinin Büyüme Evresindeki Mısır Çeşitleri Üzerindeki Etkisi**

Büyüme evresinde Cd ve Pb ağır metallerine maruz kalmış mısır çeşitlerinin kök ve gövde uzunluklarında konsantrasyona bağlı önemli derecede inhibisyonlar saptanmıştır. Ancak uzunluklardaki inhibisyonlar erken büyüme evresindeki inhibisyonlara oranla daha düşük düzeylerde kalmıştır. Yüksek Cd (0.9mM) ve Pb (8mM) konsantrasyonlarında, dayanıklı çeşit olarak belirlenen 32D99 ve Vero'nun kök uzunluklarındaki inhibisyon sırası ile %23 ve %25 bulunurken daha az dayanıklı 3223 çeşidinde bu inhibisyon her iki ağır metal için sırası ile %26 ve %33 olmuştur (Bkz. Çizelge 4.5 ve 4.7). Gövdedeki inhibisyonlara bakıldığında ise, yüksek Cd (0.9mM) ve Pb (8mM) konsantrasyonlarında, dayanıklı çeşitler 32D99 ve Vero'nun gövde uzunluklarındaki inhibisyon sırası ile %31 ve %27 olurken, daha az dayanıklı 3223 çeşidinde bu inhibisyon sırası ile %25 ve %18 olarak tespit edilmiştir. Erken fide evresindeki aksine, büyüme deneylerinde genellikle mısır çeşitlerinin gövde uzunluklarının da -özellikle Cd stresinde- en az kök uzunlukları kadar etkilendiği saptanmıştır (Bkz. Çizelge 4.5 ve 4.7).

Bir çok araştırmacı, mobilite (hareket) leri farklı olsa da ağır metallerin genellikle köklerde, toprak üstü organlara göre daha fazla biriktirildiğini bildirmişler ve bu nedenini; kök hücrelerine geçen ağır metallerin (Pb ve Cd), merkezi silindire ulaşmasının, bariyer gibi davranan endodermis hücreleri tarafından büyük oranda engellenmesi ve bitkinin diğer kısımlarına taşınmasının kısıtlanması (Seregin and Ivanov, 1997; Tester and Leigh, 2001; Ramos et al., 2002; Verma and Dubey, 2003) ile açıklamışlardır. Ancak Seregin vd. (2004), Pb konsantrasyonun yüksek düzeylere çıkması durumunda, mısır kök hücrelerinde, hücre ve vakuol zarının seçici geçirgen özelliğinin bozulduğunu ve zarın bariyer görevi işlevini yitirdiğini bildirmişlerdir. İki ağır metal karşılaştırıldığında, Cd'un topraktan bitkiye geçişi ve bitkinin diğer

kısımlarına iletiminin, Pb'a göre daha fazla olduğu bilinmektedir (Zheljzkov et al. 2005; Wang et al., 2006). Fritiof ve Greger (2006), *Potomategon natans* bitkisini çeşitli konsantrasyonlarda ağır metal stresine maruz bırakarak, değişik bitki kısımlarındaki ağır metal konsantrasyonlarına bakmışlar ve köklerde Pb konsantrasyonunun, yaprak ve gövdelerine oranla daha fazla olduğunu, ancak Cd'un tüm bitkinin farklı bölümlerinde aynı konsantrasyonda bulunduğunu tespit etmişlerdir. Bu durum, Pb'un immobil (hareketsiz) (Welsh and Denny, 1979), Cd'un ise mobil (hareketli) bir element (Wolterbeek and van der Meer, 2002) olması ile açıklanabilir. Araştırma sonuçları Cd'un mısır çeşitlerinin yapraklarında, Pb'a oranla daha fazla biriktiğini göstermektedir (Bkz. Şekil 4.6. ve 4.16.). Bitki dokularındaki metaller negatif yüklü hücre çeperinde tutunur (Rudakova et al., 1988; Carrier et al., 2003) ve/veya hücre sitoplazmasına (Salt et al., 1999) alınır. Metallerin iyonik çapları ve elektronegativitelerindeki farklılık, negatif yüklü hücre çeperinde tutunma kapasitelerini etkiler. Cd ve Pb'un değerliklerinin aynı olmasına rağmen iyonik çapları ve elektronegatiflikleri sırası ile  $0.97\text{\AA}$  ve  $1.2\text{\AA}$  ile 1.7 ve 1.8 dir. İyonik çapı ve elektronegatifliği büyük olan metalin hücre çeperine bağlanma kapasitesi daha fazladır (Gomes et al., 2001; Saeed et al., 2005). Aynı mısır çeşidinin (3223) yapraklarındaki ağır metal birikimine baktığımızda, 0.9mM Cd uygulamasında yapraklardaki Cd miktarı kontrole göre 194 kat artış gösterirken, çok daha yüksek Pb konsantrasyonunda (8mM), yapraklardaki Pb birikimi kontrole göre ancak 90 kat artış göstermiştir (Bkz. Şekil 4.6. ve 4.16.). Bu sonuç, ağır metal stresine maruz kalan çeşitlerde Cd'un Pb'a oranla yapraklara daha çok taşındığını göstermektedir. Bir çok araştırmacı Cd'un kolaylıkla köklerden yapraklara taşındığını buna karşın Pb'unun çoğunlukla köklerde biriktiğini ve çok az miktarının gövde ve yapraklara taşındığını bildirmişlerdir (Alloway, 1990; Kabata-Pendias ve Pendias, 1991; Fritioff and Greger, 2006). Diğer taraftan Antosiewicz (1993)'e göre, bitkilerin biriktirdiği Pb miktarı ile, bitkinin toleransı arasında doğrudan bir bağlantı yoktur ancak yapılan çalışmalar çoğunlukla, toleranslı bitkilerin toprak üstü organlarında daha az kurşun biriktirdiklerini göstermiştir (Barry and Clark, 1978; Symeonides et al., 1985; Sudhakar et al., 1992; Liu et al., 2004). Bu araştırmada da her iki ağır metal içinde dayanıklı çeşitlerin yapraklarında (Vero, 32D99), az dayanıklı çeşide (3223) oranla daha az ağır metal biriktirdikleri saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.6. ve 4.16.).

Cd ve Pb ağır metallere en çok etkilenen bitki işlevlerinden biride fotosentezdir. Bu ağır metallere; pigment sentezini engellemesi, elektron taşınmasını aksatması, Calvin döngüsü enzim aktivitelerini inhibe etmesi, Ca, Fe, Mn gibi gerekli metallere rekabet gibi olumsuz etkileri nedeniyle, fotosentez hızını azalttığını gösteren bir çok araştırma yapılmıştır (Stobard et al., 1985; Weigel, 1985; Burzynski, 1987; Padmaja et al., 1990; Drazkiewicz, 1994; Rashid et al., 1994; Sengar and Pandey 1996; Kastori et al., 1998; Sigfridsson et al., 2004; Faller et al., 2005).

Ağır metallere pigment miktarını azaltması, fotosentez hızını doğrudan etkilemektedir. Van Assche ve Clijsters (1990)'e göre, ağır metallere;  $\delta$ -amino levulinik asit dehidrogenaz ve protoklorofilid redüktaz gibi enzimlerinin aktivitelerinin etkileyerek, fotosentetik pigmentlerin miktarlarının azalmasına neden olmaktadır. Cd ve Pb'un konsantrasyonunun artmasının, bitkilerin K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn gibi besin elementlerinden yararlanmasını engellediği bilinmektedir (Walker et al., 1977; Haussling et al., 1988; Clarkson and Luttge, 1989; Godbold and Kettner, 1991; Rivetta et al., 1997; Sharma and Dubey, 2005). Bu elementlerden Mg ve Fe klorofil sentezi için gereklidirler ve eksikliği klorofil miktarının azalmasına neden olmaktadır (Burzynski, 1987).

Araştırmada, Pb ve Cd konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak, mısır çeşitlerinin yapraklarındaki pigment miktarının önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. 0.9mM Cd uygulamasında klorofil a+b miktarı kontrole göre; 32D99 çeşidinde %83, 3223 çeşidinde %74 azalırken, 8mM Pb uygulamasında, Vero çeşidinde %60, 3223 çeşidinde %88 azalmıştır (Bkz. Çizelge 4.6 ve 4.8). Karotenoid miktarı da klorofile oranla daha az olsa da önemli miktarda inhibisyona uğramıştır. Karotenoidler ışık toplayıcı pigmentler olarak görev yapmalarının yanısıra eksite klorofil-oksijen kompleksinden oksijeni uzaklaştırarak ve triplet klorofil moleküllerinin oluşumunu engelleyerek klorofil ve membranları yıkımdan korumaktadırlar (Young, 1991). Yüksek Cd konsantrasyonunda (0.9mM), 32D99 ve 3223 çeşidinin yapraklarındaki karotenoid miktarının inhibisyonu, kontrole göre %60 olurken, yüksek Pb konsantrasyonunda (8mM), Vero çeşidinde %48, 3223 çeşidinde ise %57 inhibisyon görülmüştür. Her iki ağır metal konsantrasyonunun artışına bağlı olarak çeşitlerin karotenoid içeriğinin azalması, ağır metal stresinin neden olduğu toksik oksijen radikallerinin detoksifikasyonunda yeterli olunamadığının bir göstergesi olabilir.

Pigment analiz sonuçlarına göre klorofil pigmentinin, karotenoid pigmentine oranla ağır metallere daha çok etkilendiği, ve Cd'un Pb'a oranla pigmentler üzerinde çok daha toksik etkisi olduğu saptanmıştır. 0.9mM Cd uygulamasında, 3223 çeşidinde toplam klorofil miktarı kontrole göre % 74, karotenoid miktarı %60 azalırken, 5mM gibi çok daha yüksek bir konsantrasyonda uygulanan Pb stresinde, aynı çeşidin toplam klorofil ve karotenoid miktarı %40 inhiye olmuştur.

Mutlak gerekli besin maddesi olmayan Cd ve Pb, bitkiler tarafından alındığında, farklı hücre komponentlerinde özellikle de kloroplastlarda metabolik aktiviteleri engellemektedir. Ağır metal iyonları fotosentetik elektron transfer sisteminde yer alan proteinlerin sülfidril gruplarına bağlanarak, bu proteinlerin yapısında bulunan mutlak gerekli iyonların yerini alarak, klorofil biyosentezini inhiye ederek ve Calvin döngüsü enzimlerinin aktivitelerini engelleyerek fotosentezin inhibisyonuna neden olurlar (Baucher and Carpentier, 1999; Chugh and Sawhney, 1999; Macfarlane and Burchett; 2001; Prasad et. al., 2001; Drażkiewicz and Baszyński, 2005).

Yapılan araştırmalarda; Cd ve Pb ağır metallerine maruz kalan bitkilerde, PSII'nin PSI'e göre çok daha fazla etkilendiği ve fotokimyasal aktivitesinin inhiye olduğu, özellikle Cd'un PSII'nin hem alıcı (akseptör) hem de verici (Donör) bölgelerini etkilediğini ve verici bölgede Cd'un oksijen çıkaran sistemde (OEC) O<sub>2</sub>'nin çıkışını, alıcı bölgede Q<sub>A</sub> ve Q<sub>B</sub> arasındaki elektron transferini inhiye ettiği bildirilmiştir (Krupa and Moniak, 1998; Krupa, 1999; Sigfriddsson et al., 2004, Faller et al., 2005).

Günümüzde PSII'nin fotokimyasal aktivitesi, bitki yapraklarındaki klorofil a fluoresansı ölçülerek tespit edilebilmektedir. Bu yöntem oldukça pratik bir yöntem olmasının yanında hızlı ve güvenilir sonuçlar vermektedir (Schreiber et al., 1994; Rizza et al., 2001).

Bu araştırmada klorofil fluoresans sonuçları Cd ve Pb stresinin, mısır çeşitlerinin yapraklarında Cd ve Pb konsantrasyonun artışına bağlı olarak PSII'nin fotoaktivasyonunu inhiye ettiğini göstermektedir (Bkz. Şekil 4.9., 10, 11 ve Şekil 4.19., 20, 21). Karanlığa adapte edilmiş yapraklarda minimum fluoresans olarak ifade edilen F<sub>0</sub> değeri anten bölgesinde bulunan eksite olmuş klorofillerin enerjilerini

reaksiyon merkezlerine iletmeden önce yaydıkları fluoresanstır (Ralph and Burchet, 1998; Mallick and Mohn, 2003).  $F_0$ , Cd ve Pb uygulamalarında dayanıklı çeşitlerin karanlık adaptasyonlu yapraklarında (32D99 ve Vero) önemli bir değişiklik göstermezken; daha az dayanıklı çeşit olarak kabul edilen 3223'ün karanlığa adapte edilmiş yapraklarında, yüksek Cd konsantrasyonunda önemli derecede artmış, yüksek Pb konsantrasyonda ise önemli derecede azalmıştır (Bkz. Şekil 4.9. A ve 4.19. A). Mallick ve Mohn (2003)'a göre, stres faktörlerinin, anten klorofillerinden, PSII reaksiyon merkezlerine etkili bir şekilde enerji aktarımının azalmasına ve/veya reaksiyon merkezlerinin inaktivasyonlarına yol açarak  $F_0$ 'ın artmasına neden olmaktadır.  $F_0$  değerindeki artışın elektronların  $Q_A$ 'dan  $Q_B$  'ye geçişinin inhibisyonundan (Bilger et al., 1984; Ducruet and Lemoine, 1985; Bukhov et. al., 1990) ve PSII'nin enerji yakalama etkinliğinin azalmasından da (Havaux, 1993) kaynaklanabileceği bildirilmiştir.

Maksimum fluoresans olarak ifade edilen  $F_M$  değeri, PSII'nin alıcı bölgesindeki tüm  $Q_A$  moleküllerinin indirgenmiş olduğu andaki yayılan fluoresans olarak kabul edilir (Mallick and Mohn, 2003).  $F_M$ , yüksek Cd ve Pb konsantrasyonlarında tüm mısır çeşitlerinde önemli derecede azalma göstermiştir (Bkz. Şekil 4.9. B ve 4.19. B).  $F_M$  da ki azalma, Cd stresine göre Pb stresinde ve 3223 çeşidinde dayanıklı çeşitlere oranla çok daha belirgin olmuştur. Bu sonuç, her iki streste artan ağır metal konsantrasyonuna bağlı olarak 3223 çeşidinin PSII alıcı bölgesinin stabil kalamadığını ve bu bölgede elektron transferinde aksaklıklar olduğunu göstermektedir. Stres uygulamalarında  $F_v/F_M$  oranındaki azalmaya  $F_0$  değerindeki artma ve/veya  $F_M$  değerindeki azalma neden olmaktadır. Karanlıkla adapte edilmiş bitkilerin yapraklarındaki PSII'nin fotokimyasal etkinliği veya maksimum quantum verimi gösteren ve stres algılamada indikatör olan  $F_v/F_M$  oranı, normal koşullarda 0.80-0.83 arasında bulunmuştur (Bjoerkman and Demming, 1987). Araştırmada kullanılan mısır çeşitlerinde, normal koşullarda bu değer yaklaşık 0.82 bulunmuştur. Pb' a maruz bırakılmış karanlık adaptasyonlu mısır çeşitleri yapraklarında  $F_v/F_M$ ; konsantrasyona bağlı genel bir azalış gösterse de, Vero çeşidinde bu azalış önemli düzeye ulaşmamışken, daha az dayanıklı olan 3223 çeşidinde yüksek konsantrasyonda (8mM), kontrole göre %16 azalarak 0.68'e inmiştir (Bkz. Şekil 4.9. C). Diğer taraftan Cd uygulamaları, mısır çeşitlerinin yapraklarındaki PSII'nin fotokimyasal etkinliğini ( $F_v/F_M$ ), Pb'a oranla daha çok inhibe etmiştir. Cd stresinde,

32D99 çeşidinin karanlık adaptasyonlu yapraklarında,  $F_v/F_M$ ; konsantrasyona bağlı genel bir azalış göstermiş ve yüksek konsantrasyonda (0.9mM), kontrole göre %16 inhibisyona uğrayarak 0.68'e gerilemişken, 3223'ün karanlığa adapte edilmiş yapraklarında  $F_v/F_M$  değerinin, yüksek konsantrasyonda, %23'lük bir inhibisyonla 0.63'e gerilediği saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.19. C). Bununla birlikte, farklı bitkiler üzerinde yapılan çalışmalar; genel olarak Cd ve Pb stresinin  $F_v/F_M$ 'i azalttığını göstermiştir (Krupa and Moniak, 1998; Ralph and Burchett, 1998; Boucher and Carpentier, 1999; Chugh and Sawhney, 1999; Mallick and Mohn, 2003; Faller et al., 2005). Mallick ve Mohn (2003), herhangi bir stres faktörü yüzünden indirgenmiş  $Q_A$  moleküllerinin tekrar okside hale gelememesinin ve/veya PS II'den PS I'e elektron iletiminin aksamasının, stres belirleyicisi olarak tanımlanan ve stresi belirlemede sıklıkla kullanılan (Bjoerkman and Demmig,1987) potansiyel fotokimyasal etkinlikteki ( $F_v/F_M$ ) azalışın nedeni olabileceğini bildirmişlerdir. Bu araştırmada her iki ağır metal stresinin neden olduğu  $F_v/F_M$  'teki azalmaya; klorofil molekülleri tarafından reaksiyon merkezlerine etkili bir enerji transferinin yapılmaması ve/veya elektron aksamasına bağlı olarak, PSII'nin alıcı bölgesindeki  $Q_A$ 'nın yeterince okside olamaması neden olabilir. Cd ve Pb'un, suyu parçalayan sistemde, Ca'un bağlanma bölgelerinde Ca yerine geçerek, sistemin işleyişini bozması ve elektron üretiminin durması da (Rashid and Popoviç, 1990; Rashid et al., 1994; Faller et al., 2005) fotokimyasal etkinliğin azalmasının diğer bir nedeni olabilir

Fluoresans parametrelerinden PSII' nin gerçek (actual) fotokimyasal etkinliği ( $\Phi_{PSII}$ ) ve enerji yakalama etkinliği ( $F_v'/F_M'$ ) ile  $F_v/F_M$  arasında bir korelasyon olup, mısır çeşitlerinin yapraklarında benzer tepki elde edilmiştir. Işığa adapte edilmiş durumdaki mısır çeşitlerinin yapraklarındaki  $\Phi_{PSII}$  ve  $F_v'/F_M'$  değerleri; Cd konsantrasyonlarına bağlı olarak her iki çeşitte de azalmıştır (Bkz. Şekil 4.10. A,B ve 4.20. A,B). Ancak bu azalma, kontrole göre 3223 de tüm konsantrasyonlarda önemli iken, 32D99 da sadece yüksek Cd konsantrasyonunda önemli bulunmuştur. Pb uygulamalarında ise; dayanıklı çeşit Vero'da bu parametrelerde ( $\Phi_{PSII}$ ,  $F_v'/F_M'$ ), önemli derecede etkilenme görülmezken, 3223 çeşidinde yüksek Pb konsantrasyonunda önemli derecede azalma saptanmıştır. Ayrıca her iki ağır metal stresinin, mısır yapraklarındaki elektron transport hızı (ETH) üzerinde,  $\Phi_{PSII}$  ve  $F_v'/F_M'$  parametrelerinde ki değişime benzer bir etki yaptığı da saptanmıştır (Şekil 4.10. C ve 4.20. C).

qP, fotokimyasal enerjiye çevrilen eksitasyon enerjisinin kullanımını ifade eder, qN ise fotokimyasal olmayan enerji kullanımını gösterir. Cd uygulamalarında, 32D99 çeşidinin yapraklarındaki qP ve qN önemli derecede etkilenmezken, az dayanıklı 3223 çeşidinin yapraklarındaki qP, her uygulamada kontrole göre önemli derecede azalırken, qN değeri son konsantrasyonda artış gösterse de bu artış önemli derecede bulunmamıştır (Bkz. Şekil 4.11. A ve B). Pb uygulamalarında ise; Vero çeşidinde fotokimyasal kullanım, (qP) ve fotokimyasal olmayan kullanım (qN) önemli derecede etkilenmezken, 3223 çeşidinde, 8mM Pb konsantrasyonunda, qP, kontrole göre %10 azalmış, qN ise %67 artmıştır (Bkz. Şekil 4.21. A ve B). Sisteme giren ve fotosentezde kullanılan enerji miktarı arasında dengenin bozulması sonucu indüklenen qN'in ksantofil döngüsü ile beraber PSII'nin fotoinhibisyonundan korunmasını sağlayan temel mekanizma olarak kabul edilmektedir (Demmig et al., 1987; Demmig-Adams, 1990; Demmig-Adams, 1992; Horton et al., 1996; Gilmore,1997). Elektron transferinin aksaması ( $F_v/F_M$  değerindeki azalmanın da nedeni) ve buna bağlı olarak NADPH ve Adenin tri fosfat (ATP) sentezinin azalması sonucu aşırı miktardaki eksitasyon enerjisi ısı olarak ortama verilerek PSII'nin fotoinhibisyonu önlenmektedir (Jannssen et al.,1992; Allen and Ort, 2001; Ort, 2002). Araştırma sonuçları her iki streste de 3223 çeşidinin yüksek ağır metal konsantrasyonlarında aşırı eksitasyon enerjisini fotokimyasal olmayan kullanım ile uzaklaştırmış olabileceğini, ancak sadece bu korunma mekanizmasının çeşidin ağır metal stresinin neden olduğu zararın üstesinden gelmesi için yeterli olmadığını göstermektedir.

Araştırma sonuçları, her iki ağır metal stresinin de, mısır bitkisi yapraklarındaki fotokimyasal etkinliği azalttığını göstermektedir. Ancak diğer fizyolojik parametrelerle karşılaştırıldığında (kök uzunluğu, antioksidan enzim aktivasyonu, iyon sızıntısı vb.) fotosentezdeki inhibisyon çok sınırlı düzeyde kalmıştır. Özellikle Pb'un stres belirleyici parametre olarak kabul edilen  $F_v/F_M$  üzerinde etkisi, sadece yüksek konsantrasyonda (8mM), daha az dayanıklı olan 3223 çeşidinde görülmüştür. Cd ve Pb ağır metalinin *Halophila ovalis* bitkisinin, potansiyel fotokimyasal etkinliğini, Zn ve Cu'a göre çok daha sınırlı düzeyde azalttığını tespit eden Ralph ve Burchett (1998), bunun nedeninin Cd ve Pb'un metabolik yollardan uzak bölgelerde depolanması olabileceğini bildirmişlerdir.

Ağır metallere maruz kalmanın meydana getirdiği diğer bir büyük zarar ise; aktif oksijen türleri (AOT)'nin artışına bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif strestir. Membrana bağlı elektron iletim aktiviteleri dahil birkaç metabolik yolda açığa çıkan  $O_2^-$ ,  $OH^-$  ve  $H_2O_2$  gibi AOT'nin miktarlarındaki artışa bağlı olarak membran lipitleri, proteinler, klorofil pigmentleri, enzimler, nükleik asitler gibi biyomoleküller zarar görebilir (Alia et al, 1995; Gille and Singler, 1995). Değişik bitkilerle yapılan bir çok çalışmada Pb ve Cd'un oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir (Hendry et al., 1992; Malecka et al., 2001; Verma and Dubey, 2003; Zacchini et al., 2003; Chaoui and Ferjani, 2005; Smeets et. al., 2005). Oksitleyici ya da indirgeyici özelliği olmayan ağır metaller (örn., Cd ve Pb); kalsiyum ve demir bağımlı işlevleri etkileyip indirgenmiş glutatyon miktarını azaltarak hücrenin pro-oksidant durumunu artırıp dolaylı yollardan AOT oluşumuna neden olurlar (Pinto et al., 2003; Sharma and Dubey, 2005; Benavides et al., 2005). Asada ve Takahashi (1987), bu ağır metallerin fotosentezdeki elektron akımını bozarak, elektronun ara basamaklarda zinciri terk etmesine ve süperoksit ( $O_2^-$ ) radikalinin oluşmasına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Kurşun ve Cd stresinin arttırdığı aktif oksijen türevlerinin neden olduğu lipid peroksidasyonu, membran doymamış yağ asitlerinin kompozisyonunun bozulmasına ve zar geçirgenliğinin değişmesine sebep olur (Girroti, 1990; Halliwell and Gutteridge, 1999; Dixit et al., 2001; Wu et al., 2003; Metwally et al., 2004). Lipid peroksidasyonunun en önemli ürünü malondialdehid (MDA)'dir. Üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonundan MDA meydana gelir. Oluşan MDA, hücre membranlarında iyon alış-verişine etki eder ve membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açarak iyon geçirgenliğini ve membran enzim aktivitelerini olumsuz etkiler (Porter, 1984; Placer et al., 1990; Mercan, 2004). Bu araştırmada, her iki ağır metal stresinde artan konsantrasyona bağlı olarak mısır çeşitlerinin yapraklarında iyon sızıntısı ve MDA miktarının önemli ölçüde arttığı saptanmıştır. Dayanıklı çeşit Vero'nun yapraklarındaki iyon sızıntısı, 8mM Pb konsantrasyonunda, kontrole göre 1.34, MDA miktarı ise 5.26 kat artarken, daha az dayanıklı olan 3223 çeşidinde bu artış kontrole göre sırası ile 2.89 ve 6.16 kat olmuştur (Bkz. Şekil 4.17. ve 4.18. B). Cd stresinde ise; dayanıklı çeşit 32D99'un yapraklarındaki iyon sızıntısı ve



MDA artışı kontrole göre sırası ile, 2.65 ve 8.1 kat iken, daha az dayanıklı çeşit 3223'te bu artış 3.68 ve 6.37 kat olmuştur (Bkz. Şekil 4.7. ve 4.8. B). İyon sızıntısı ve MDA içeriğindeki bu artış, uygulanan Cd ve Pb stresinin çeşitlerin yapraklarında lipid peroksidasyonuna neden olarak membran hasarına ve membran bütünlüğünün bozulmasına yol açtığını göstermektedir.

Bitkiler aktif oksijen türlerinin yıkıcı etkilerini önleyebilecek kompleks bir antioksidan savunma sistemine sahiptirler. Bu mekanizma; glutatyon, askorbat,  $\alpha$ -tokoferol, karotenoid ve benzeri indirgeyici molekülleri içeren enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemi ile SOD, APX, MDHAR, GR gibi enzimleri içeren enzimatik antioksidan savunma sistemi olmak üzere iki gruba ayrılır (Verma and Dubey, 2003). Oksidatif stres altında, bu moleküllerin ve enzimlerin konsantrasyon ve aktivitelerindeki artışlar bitkilerin gösterdiği direncin simgesidir.

Farklı bitkiler ile yapılan çalışmalarda; Pb ve Cd stresinin, SOD, APX, GR ve POD enzim aktivitelerinde önemli artışlara neden olduğu bildirilmiştir (Baisak et al., 1994; Shaw, 1995; Shah et al., 2001; Verma and Dubey, 2003; Zacchini et al., 2003; Sharma and Dubey, 2004; Reddy et al., 2005). Bir çok stres faktörü gibi Cd ve Pb stresi de, yapraklarda membrana bağlı elektron taşıma sisteminde elektron iletimini aksatıp, elektron sızıntısını arttırarak (Asada ve Takahashi, 1987; Pinto at al., 2003)  $O_2$  radikalinin oluşmasına neden olurlar (Mehler reaksiyonu). Oluşan  $O_2$ , SOD enzimi tarafından  $H_2O_2$ 'e,  $H_2O_2$ 'de APX ve POD enzimleri ile  $H_2O$ 'ya çevrilerek zararsız hale getirilir.

Bu araştırmada, artan Cd ve Pb konsantrasyona bağlı olarak, her iki mısır çeşidinin yapraklarında toplam SOD, APX, GR ve POD enzimlerinin aktivitelerinde genellikle artış şeklinde önemli değişiklikler saptanmıştır. Uygulanan Pb stresinde, Vero çeşidinin yapraklarında 5mM Pb konsantrasyonunda maksimum SOD aktivitesi gözlenmiş (kontrolün 4.72 katı), yüksek Pb konsantrasyonunda (8mM) bir önceki uygulamaya göre önemli derecede azalma saptanmasına rağmen, bu azalma kontrol düzeyine inmemiştir (Bkz. Şekil 4.22.). Daha az dayanıklı olan 3223 çeşidinin yapraklarında ise, 2mM Pb konsantrasyonunda maksimum SOD aktivitesi (kontrolün 2.9 katı) tespit edilmiş, daha sonraki Pb konsantrasyonlarında (5 ve 8mM) önemli düşüşler belirlenmiş ve yüksek Pb (8mM) konsantrasyonunda toplam SOD aktivitesi kontrol düzeyine inmiştir (Bkz. Şekil 4.22.). Ökaryotik organizmalarda,

Cu, Fe, Mn metallerine gereksinim duyan, MnSOD, Cu/Zn SOD ve Fe SOD olmak üzere SOD enziminin farklı organellerde (mitokondri, sitozol ve kloroplast) yer alan üç farklı izoformu bulunmaktadır (Scandalios, 1993). Yüksek Pb konsantrasyonlarda, Pb'un Cu, Fe ve Mn metallerinin yerine geçebildiği (Sharma and Dubey, 2005) veya bu metallerin alınımını engelleyebildiği bildirilmiştir (Walker et al., 1977; Hausling et al., 1988). Bu araştırmada da yapraklarında Vero'ya göre daha fazla Pb biriktiren (Şekil 4.16.) 3223 çeşidinin, toplam SOD aktivitesindeki düşüş, Cu, Fe ve Mn metallerinin alınımı ve kullanımının Pb tarafından engellenmesine bağlı bir durum olabilir. Cd uygulamalarında ise her iki çeşitte de, SOD aktivitelerinde konsantrasyon artışına bağlı olarak önemli derecede artışlar tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.12.). Ancak yüksek Cd konsantrasyonunda bir önceki uygulamaya göre olan artış, yapraklarında daha fazla Cd biriktiren 3223 (Şekil 4.6.) çeşidinde 32D99'a göre daha az olmuştur.

Değişik bitkiler üzerinde Cd etkisini araştıran diğer çalışmalarda da SOD aktivitesinin önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (Schützendubel et al., 2001; Shah et al., 2001; Vitoria et al., 2001; Iannelli et al., 2002; Wu et al., 2003; Qadir et al., 2004; Liu et al., 2004; Maksymiec and Krupa, 2006). SOD aktivitesi sonucu ortamda  $H_2O_2$  konsantrasyonu devamlı artmaktadır ve bu molekül  $O_2^-$  radikali ile tepkimeye girip çok daha tehlikeli olan  $OH^-$  radikalini oluşturur (Fenton tepkimesi).  $H_2O_2$ 'nin etkisizleştirilmesinde, daha çok peroksizomlarda yerleşmiş olan katalaz enzimi görev almakla birlikte bu enzimin sitozolde, mitokondride ve kloroplastta aktivitesi aşırı düşüktür ya da ölçülemez (Halliwell, 1981). Bu nedenle bitki hücrelerinde  $H_2O_2$ 'e karşı hem kloroplast hem de sitozolde bulunan ve indirgenmiş düzeydeki askorbat ve glutatyon havuzlarının devamlılığını da sağlayan askorbat-glutatyon (Halliwell-Asada) döngüsü olarak adlandırılan daha etkili ve alternatif bir detoksifikasyon mekanizması vardır (Foyer and Halliwell, 1976; Asada and Takahashi, 1987). Bu döngünün ilk enzimi,  $H_2O_2$ 'in suya indirgenmesini katalizleyen ve indirgeyici olarak askorbata büyük bir afinite ve özgülük gösteren APX'dir (Asada, 1999). APX'in kloroplast, sitozol, mitokondri, peroksizomlar ve glioksizomlarda bulunan farklı izoformları vardır (Jimenez et al., 1997; Leonardis et al., 2000). Bu metabolik yolun diğer bir enzimi olan GR, okside olmuş glutatyonun indirgenmesinde ve APX enziminin çalışması için gerekli olan askorbatın regenerasyonunda görev alır. Böylece Askorbat-glutatyon döngüsü sırasında, askorbat düzeyi sabit bir seviyede kalırken  $H_2O_2$  etkili bir şekilde ortadan kaldırılır. Hidrojen peroksiti ortadan kaldıran diğer bir enzim grubu da lignin biyosentezinde ve IAA degradasyonunda da rol alan POD'dur (Foyer et al., 1997).

Cd ve Pb stresine karşı gösterilen antioksidan enzim yanıtı ilgili yapılan çalışmalarda SOD, APX, GR ve POD enzim aktivitelerinin; ağır metalin çeşidine, bitkilerin türüne, bitki kısmına ve büyüme evresine bağlı olarak belirli konsantrasyon aralığında artış gösterdiği tespit edilmiştir (Dixit et. al., 2001; Malecka et al., 2001; Schützendübel et al., 2001; Verma and Dubey, 2003; Zacchini et al., 2003; Chaoui and Ferjani, 2005; Reddy et al., 2005).

Bu araştırmada her iki ağır metal stresinde mısır çeşitlerinin yapraklarında, ağır metal konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak APX, GR ve POD enzim aktivitelerinde kontrole göre önemli oranda artış tespit edilmiştir. Bu durum bu üç enzimin, SOD aktivitesi sonucu ortaya çıkan  $H_2O_2$ 'i etkisiz hale getirmeye çalıştığını göstermektedir. Cd uygulamalarında her iki mısır çeşidinin yapraklarında genel olarak konsantrasyon artışına bağlı olarak APX, GR ve POD enzim aktivitelerinde kontrole göre önemli artışlar belirlenmiştir. Ancak yüksek Cd konsantrasyonunda kontrole göre önemli bir artış olsa da bir önceki uygulama ile (5mM Cd) karşılaştırıldığında bu enzimlerin aktivitelerini azalmaya başladığı saptanmıştır (Bzk. Şekil 4.13.,14 ve 15). Pb uygulamalarında ise Vero çeşidinin yapraklarındaki APX enzimi 2mM Pb uygulamasında maksimum seviye çıktıktan sonra, 5mM ve 8mM Pb konsantrasyonlarında tekrar kontrol seviyesine inmiştir. Bu durum hariç her iki mısır çeşidinin yapraklarında Pb konsantrasyonunun artışına bağlı olarak APX, GR ve POD enzim aktiviteleri kontrole göre önemli artışlar göstermiştir (Bkz. Şekil 4.23., 24 ve 25).

Özellikle yüksek Cd konsantrasyonlarında görülen enzim aktivitelerindeki azalış enzim yapısında yeralan disüfit bağlarının kopması ve enzimin inaktive olması ile açıklanabilir (Creissen et al, 1992; Lee et al., 1998). Bunun yanısıra POD aktivitesindeki artış, stres altındaki bitki yapraklarının hücre membranlarının bütünlüğün korunmaya çalışıldığını ve hücre çeperinin mekaniksel özelliklerinin düzenlendiğini göstermektedir (Ekmekçi and Terzioğlu, 2005). Dayanıklı çeşit 32D99' da uygulanan Cd stresinde artan konsantrasyona bağlı olarak POD enzim aktivitesi kontrole göre artış gösterirken daha az dayanıklı çeşit olan 3223'de yüksek Cd konsantrasyonunda bir önceki uygulamaya göre önemli derecede azalış gözlenmiştir. Bu sonuç, 3223' un yüksek Cd konsantrasyonunda (0.9mM) yaprak hücre membran bütünlüğünün bozulduğunu göstermektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Giderek artan endüstriyel faaliyetler ve taşıt kullanımı gibi insan aktiviteleri sonucunda önemli miktarda Cd ve Pb doğaya salınmaktadır. Bu ağır metallerin topraktaki konsantrasyonunun artması bitkileri olumsuz etkilemektedir. Özellikle tarım için ayrılmış topraklarda, bu metallerin birikimi, insan beslenmesinde önemli yeri olan buğday, arpa ve mısır gibi tarım bitkilerinde önemli ürün kayıplarına yol açacaktır. Bitkilerin ağır metale maruz kaldıklarında, bu ağır metalleri dokularında biriktirdikleri göz önüne alınırsa, ürün kaybı yanında tarım bitkilerinin tüketilebilir sağlıklı besin olma özellikleri de azalacaktır.

Bu araştırmada oldukça yaygın biçimde doğaya bırakılan ve canlılar üzerinde sadece toksik etkisi olan Pb ve Cd'un, dünya tahıl ekimi ve üretiminde, buğday ve pirinçten sonra üçüncü sırayı alan mısır bitkisi üzerindeki olumsuz etkileri araştırılmıştır. Araştırma erken fide evresi ve büyüme evresi olmak üzere iki aşamada yapılmıştır. Her iki aşamada da Pb ve Cd ağır metalleri artan konsantrasyonlarına bağlı olarak mısır çeşitlerinin büyüme ve gelişmesini önemli ölçüde inhibe etmiştir. Kökler ağır metallere ilk ve en yoğun şekilde maruz kalan ve doğal olarak en hızlı yanıtın verildiği bitki kısımlarıdır. Bu nedenle mısır çeşitlerindeki dayanıklılık dereceleri kök uzunluklarındaki inhibisyona bakılarak tespit edilmiştir. Pb stresine dayanıklı çeşit olarak Vero, Cd stresine dayanıklı çeşit olarak 32D99 çeşidi seçilirken, her iki ağır metal stresinden de en çok etkilenen mısır çeşidi 3223 olarak belirlenmiştir ancak uygulanan ağır metal konsantrasyonlarının yüksekliği göz önüne alınarak 3223 çeşidi için hassas çeşit yerine daha az dayanıklı çeşit ifadesi kullanılmıştır. Dayanıklılığı belirleme de, kök uzunluğundaki değişim kadar kök çapında ve yoğunluğunda meydana gelen değişikliklerde önemlidir. Bu nedenle, dayanıklılığı belirlemekle ilgili yapılacak çalışmalarda, uzunluk, çap ve yoğunluktaki değişimlerin bir göstergesi olan ağırlık parametresinin de kullanılması önerilmektedir.

Araştırmada kök uzunluğundaki inhibisyonun derecesini anlayabilmek için 4. ve 8. günler arasında ki kök gerçek ve nispi büyüme hızları da incelenmiştir. Gerçek büyüme hızları kök uzunluğundaki inhibisyona bağlı olarak önemli oranda azalmıştır. Nispi büyüme hızında ise Pb ağır metalinin konsantrasyonuna bağlı

önemli bir azalış görülürken, Cd ağır metalinde nispi büyüme hızında önemli bir değişiklik saptanmamıştır. Cd'un çok toksik bir ağır metal olması, nispi büyüme hızındaki azaltıcı etkisini, ölçümün yapılmadığı ilk 4 gün içerisinde göstermiş olabileceğini akla getirmektedir. Bu nedenle nispi büyüme hızının, uygulamanın 1-2. günü ile son gününde ölçülen değerlerle hesaplanmasının daha doğru olacağı kanısındayız.

Kadmiyum ve Pb ağır metalleri bitkilerde AOT oluşumunu da arttırmaktadır. Aktif oksijen türlerinin hücre zarında meydana getirdiği zarar, mısır çeşitlerinin yaprak hücrelerindeki iyon sızıntısı ve MDA miktarındaki artışa bakılarak tespit edilmeye çalışılmıştır. Her iki ağır metal stresinde de konsantrasyon artışına bağlı olarak mısır çeşitlerinin yapraklarındaki iyon sızıntısı ve MDA miktarı önemli ölçüde artmıştır. Çeşitler karşılaştırıldığında daha az dayanıklı kabul edilen 3223 çeşidinde iyon sızıntısının her iki ağır metal stresinde de dayanıklı çeşitlere oranla daha fazla olduğu belirlenmiştir. MDA miktarındaki artışında iyon sızıntısına paralel davranması beklenirken Cd uygulamalarında, iyon sızıntısının aksine, kontrole göre MDA miktarındaki artış dayanıklı kabul edilen 32D99 çeşidinde daha fazla bulunmuştur. Bu çalışmada MDA miktarını belirlemede Okhawa vd. (1979)'nin metodu kullanılmıştır. Bu metotta 532 ve 600nm dalga boylarında belirlenen absorbans değerleri ile MDA miktarı tayin edilmiştir. Hodges vd., (1999) 532nm de yapılan ölçümlerde antosiyanin ve şeker gibi maddelerinde kısmen ölçüldüğünü bildirmişlerdir. Bu nedenle MDA miktarını belirlemede bu metot yerine, antosiyanin ve şeker gibi maddelerin etkisini ortadan kaldıracak yeni yöntemlerin bulunması ve kullanılması daha doğru sonuçların alınmasına olanak sağlayacaktır.

Hücre membranlarında meydana gelen değişikliklerden büyük oranda aktif oksijen türleri sorumludur. Bu radikallerin zararsız hale getirilmesinde SOD, APX, POD ve GR gibi antioksidan enzimler görev almaktadır. Bu araştırmada; enzim davranışları, mısırın çeşidine, uygulanan ağır metalin konsantrasyonuna ve çeşidine bağlı olarak farklılıklar gösterse de, Cd ve Pb stresinin mısır çeşitlerinde genel olarak bu enzimlerin toplam aktivitelerini arttırdığı spektrofotometrik yöntemler kullanarak tespit edilmiştir. Ancak çeşitlerin toplam enzim aktivitelerinin yanı sıra antioksidan enzimlerin izoenzim dağılımlarının da (Poliakrilamit jel

elektroforez) PAGE tekniği kullanılarak belirlenmesi, Cd ve Pb stresinin indüklediği oksidatif zararın organel seviyesinde açıklanabilmesi için daha kapsamlı verilerin elde edilmesine olanak sağlayacaktır.

Strese karşı hassas işlevlerden biri de fotosentezdir. Fotosentezdeki inhibisyonu belirlemede klorofil a fluoresans tekniği kullanılmıştır. Bu yöntem oldukça pratik olmasının yanı sıra diğer fotosentez ölçme yöntemlerine oranla çok kısa zamanda çok güvenilir sonuçlar vermektedir. Fluoresans sonuçları Cd ve Pb stresine maruz kalmış mısır bitkisi yapraklarında fotosistemlerin, diğer bitki kısımlarına göre çok daha az etkilendiğini ortaya çıkarmıştır. Fluoresans parametre sonuçları; Cd ve Pb stresine dayanıklı çeşitler olan 32D99 ve Vero'nun yapraklarındaki fotokimyasal aktivitenin önemli derecede etkilenmediğini göstermektedir. Her iki ağır metal stresine de daha az dayanıklı olarak kabul ettiğimiz 3223 çeşidinin yapraklarında yapılan ölçüm sonuçları ise sadece yüksek Cd ve Pb konsantrasyonunda, fotokimyasal aktivitenin önemli derecede azaldığını göstermiştir. Mısır çeşitlerinin Cd ve Pb ağır metallerini hücre çeperi ve vakuol gibi metabolik yollardan uzak bölgelerde biriktirdiği ve bu nedenle fotosentez gibi önemli metabolik işlevlerin olduğu bölgelere ağır metal ulaşımının kısıtlandığı düşünölmektedir.

Kökler ağır metal stresinden ilk etkilenen ve en hızlı yanıtı veren bitki kısımlarıdır. Bu nedenle köklerdeki inhibisyon dayanıklı çeşidin belirlenmesinde kullanılan önemli bir parametredir. Bunun yanı sıra deneysel bulgularımız, kök uzunluğundaki inhibisyonla paralel sonuçlar veren klorofil a fluoresansının, dayanıklı çeşitlerin belirlenmesinde kullanılabilecek önemli bir parametre olabileceğini göstermektedir.

Dayanıklılık mekanizmasının açıklanmasında kullanılabilecek diğer bir parametre ise kök, gövde ve yaprak gibi kısımlarında biriken ağır metal miktarının saptanmasıdır. Bu amaçla, araştırmada mısır çeşitlerinin yapraklarındaki Cd ve Pb birikimi de tespit edilmiştir. Büyüme evresinde kullanılan mısır çeşitlerinin yapraklarındaki Cd ve Pb ağır metali konsantrasyona bağlı olarak kontrole göre önemli oranlarda artmıştır. Araştırma sonuçları Cd'un mısır çeşitlerinin yapraklarında, Pb'a oranla daha fazla biriktiğini göstermektedir. Az dayanıklı kabul ettiğimiz çeşidinin (3223), dayanıklı çeşitlere oranla yapraklarında daha fazla Cd

ve Pb ağır metali biriktirdiği de tespit edilen diğer bir noktadır. Ancak mısır bitkilerinin köklerindeki ağır metal miktarının tespit edilmemesi, sadece yapraklardaki ağır metal birikimine bakılarak dayanıklılığı açıklamayı zorlaştırmaktadır. Ayrıca yapraklarda biriken ağır metallerin birikim yerlerinin tespiti de (hücre çeperi, vakuol vb.) dayanıklılık mekanizmasının açıklanmasında önemli rol oynayacaktır. Bu yüzden bu konuda yapılacak araştırmalarda her iki bitki organındaki (kök ve yaprak) ağır metal birikimine bakılmasının ve ayrıca ağır metal birikim bölgelerinin (hücre çeperi, vakuol vb.) saptanmasının, dayanıklılığı açıklamalarında araştırmacılara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak bu araştırmada mısır bitkilerinin yapraklarında önemli miktarlarda Cd ve Pb ağır metali biriktirdiği saptanmıştır. Mısır bitkisinin yüksek oranda bu metalleri biriktirmesi, tarıma ayrılan topraklarda Cd ve Pb ağır metallerinin temizlenmesinde akümülatör bitki olarak kullanılma olasılığını düşündürmektedir. Böyle bir durumda dayanıklı çeşit ve hatların yetiştirme ve ıslah programlarına alınması ile ilgili çalışmalar gündeme gelebilecektir. Ancak mısır bitkilerinin ağır metallere dayanıklı olması onların tüketilebilir olma özelliğini arttırmamaktadır, aksine dokulardaki ağır metal birikiminin artması insan sağlığı açısından tehlikeli bir durum oluşturmaktadır. Bu nedenle birikime dayalı dayanıklılığın tespiti bu mısır çeşitlerinin üretime yönelik kullanılıp kullanılmayacağı yönündeki çalışmalara da ışık tutacaktır.

## KAYNAKLAR

- Abou Auda M.M., Symeonidis, L., Hatzistavrou, E., and Yupsanis, T., 2002, Nucleolytic activities and appearance of a new DNase in relation to nickel and manganese accumulation in *Alyssum murale*, J. Plant Physiol., 159, 1087-1095.
- Ahmed, A., and Tajmir-Riahi, H.A., 1993, Interaction of toxic metal ions Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> with light-harvesting proteins of chloroplast thylakoid membranes, An FTIR spectroscopic study, J. Inorg. Biochem., 40, 235-243.
- Alia, K.V., Prasad, S.K., and Pardha Saradhi, P., 1995, Effect of zinc on free radical and proline in *Brassica juncea* and *Cajanus cajan*, Phytochemistry, 39, 45-47
- Alcantara, E., Romera, F.J., Cañete, M., and De La Guardia, M.D., 1994, Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe(III) reductase in Fe-deficient cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants, J. Exp. Bot., 45, 1893-1898.
- Allen, D.J., Ort, D.R., 2001, Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm climate plants, Trends Plant Sci., 6, 36-42.
- Alloway, B.J., 1990, Heavy Metals in Soils. Alloway, B.J. (ed.), Blackie, Glasgow, 321p.
- Alscher, R.G., Donahue, J.L., and Cramer, C.L., 1997, Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells, Physiol. Plant., 100, 224-233.
- Alscher, R.G., and Hess, J.L., 1993, Antioxidants in Higher Plants, , CRC Press, Boca Raton, 36p.
- An, Y., 2006, Assessment of comparative toxicities of lead and copper using plant assay, Chemosphere, 62, 1359-1365.
- An, Y., 2004, Soil ecotoxicity assesment using cadmium sensitive plants, Environ. Pollut., 127, 21-26.
- Angelone, M., and Bini, C., 1992, Trace elements concentrations in soils and plants of western Europe. Biogeochemistry of Trace Metals. Adriano, D.C., (ed), Lewis Publishers, Boca Raton, London. pp. 19-60
- Angelov, M., Tsonev, T., Uzunova, A., and Gaidardjieva, K., 1993, Cu<sup>+2</sup> effect upon photosynthesis, the copper-inhibitory binding site, Fluorescence and polarographic studies, Photosynth. Res., 45, 127-134.
- Antosiewicz, D.M., 1993, Mineral status of dicotyledonous crop plants in relation to their constitutional tolerance to lead, Environ. Exp. Bot., 33, 575-589.



- Asada, K., 1999, The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons, *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.*, 85, 235-241.
- Asada, K., and Takahashi, M., 1987, Production and scavenging of active oxygen radicals in photosynthesis. *Photoinhibition*. Kyle D.J., et al. (eds.), Elsevier, 227-297.
- Ashraf, M., 1994, Breeding for salinity tolerance in plants, *Crit. Rev. Plant Sci.*, 13 (1), 17-42.
- Ayhan, B., Ekmekçi Y., Tanyolaç, D., 2006, Bitkilerde Metal Zararları ve Metal Zararlarından Korunma Mekanizmaları, *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, Baskıda.
- Baisak, R., Rana, D., Acharya, P., and Kar, M., 1994, Alterations in the activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress, *Plant Cell Physiol.*, 35, 489-495.
- Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Reeves, R.D., and Smith, J.A.C., 2000, *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Terry, N., and Banuelos, G., (eds.), Lewis, Boca Raton. pp. 85-107
- Barazani, O., Sathiyamoorthy, P., Manandhar, U., Vulkan, R., and Goldhirsh, A.G., 2004, Heavy metal accumulation by *Nicotiana glauca* Graham in a solid waste disposal site, *Chemosphere*, 54, 867-877.
- Barceló, J., Cobot, C., and Poschenrieder, C., 1986a, Cadmium-induced decrease of water stress resistance in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. Cv. Contender). II. Effects of Cd on endogenous abscisic acid level, *J. Plant Physiol.*, 125, 27-34.
- Barceló, J. and Poschenrieder, C., 1990, Plant water relations as affected by heavy metal stress: A review, *J. Plant Nutr.*, 13, 1-37.
- Barceló, J., Poschenrieder, C., Andreu, I., and Gunse, B., 1986b, Cadmium-induced decrease of water stress resistance in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender). I. Effects of Cd on water potential, relative water content and cell wall elasticity, *J. Plant Physiol.*, 125, 17-25.
- Bary, S.A.S., and Clark, S.C., 1978, Problems of interpreting the relationship between the amounts of lead and zinc in plants and soil on metalliferous wastes, *New Phytol.*, 81, 773-783.
- Baszyński, T., 1986, Interference of Cd<sup>2+</sup> in functioning of the photosynthetic apparatus of higher plants, *Acta Soc. Bot. Pol.*, 55, 291-304.
- Baszyński, T., Wajda, L., Król, M., Wolińska, D., Krupa, Z., and Tukendorf, A., 1980, Photosynthetic activities of cadmium treated tomato plants, *Physiol. Plant.*, 48, 365-370.

- Benavides, M.P., Gallego, S.M., and Tomaro, M.L., 2005, Cadmium toxicity in plants, *Braz. J. Plant Physiol.*, 17(1), 21-34.
- Benson, G.O., and Pearce, R.B., 1987, *Corn Perspective and Culture. Corn Chemistry and Technology*. Watson, S.A. and Ramstad, P.E., (eds.), American Association of Cereal Chemistry, St. Paul, Minnesota, USA, 605p.
- Bergmeyer, H.U., 1974, *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. II, Section C: Methods for Determination of Enzyme activity, 2<sup>nd</sup> Edition, pp. 685-690.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I., 1971, Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Anal. Biochem.*, 44, 151-155.
- Bjoerkmann, O., and Demmig, B., 1987, Proton yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence at 77K among vascular plants of diverse origins, *Planta*, 170, 489-504.
- Bilger, H.W., Schreiber, U., and Lange, O.L., 1984, Determination of leaf heat resistance: Comparative investigation of chlorophyll fluorescence changes and tissue necrosis methods, *Oecologia*, 63, 256-262.
- Boucher, N., and Carpentier, R., 1999, Hg<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, and Pb<sup>+2</sup> –induced changes in Photosystem II photochemical yield and energy storage in isolated thylakoid membranes; A study using simultaneous fluorescence and photoacoustic measurements, *Photosynth. Res.*, 59, 167-174.
- Bowler, C., Camp, W.V., Montagu, M.V., Inze, D., 1994, Superoxide dismutase in plants, *Critical Reviews in Plant Sci.*, 13(3), pp. 199-218.
- 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, 248-254.
- Brenner, C., 1991, *Biotechnology and Developing Country Agriculture: The Case of Maize*, OECD Publications, Paris, 102 p.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., and Weretilnyk, E., 2000, Responses to abiotic stresses. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Buchanan, B.B. Gruissem, W.y and Jones, R.L. (eds.), American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland. pp.1158-1203.
- Brooks, R.R., 1998, *Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals*, University Press, Cambridge, pp.1-53,
- Brown, S.L., Chaney, R.L., Angle, J.S., and Baker, A.J.M., 1995, Zinc and cadmium uptake by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* grown in nutrient solution, *Soil Sci. Soc. Am. J.* , 59, 125-132.

- Bukhov, N.H., Sabat, S.C., Mohanty, P., 1990, Analysis of chlorophyll a changes in weak light in heat treated *Amaranthus* chloroplasts, *Photosynth. Res.*, 23, 81-87.
- Burke, J.J., and Oliver, M.J., 1992, Differential temperature sensitivity of pea superoxide dismutase, *Plant Physiol.*, 100, 1595-1598.
- Burton, G.W., and Ingold, K.U., 1984,  $\beta$ -carotene: an unusual type of lipid antioxidant, *Science*, 224, 569-573.
- Burzynski, M., 1987, The influence of lead and cadmium on the absorption and distribution of potassium, calcium, magnesium and iron in cucumber seedlings, *Acta Physiol. Plant*, 9, 229-238.
- Carrier, P., Baryla, A., and Havaux, M., 2003, Cadmium distribution and microlocalization in oilseed rape (*Brassica napus*) after long-term growth on cadmium-contaminated soil, *Planta*, 216, 939-950.
- Cataldo, D.A., Garland, T.R., and Wildung, R.E., 1978, Nickel in plants; II: Distribution and chemical form in soybean plants, *Plant Physiol.*, 62, 566-570.
- Chaitanya, K.S.K., and Naithani, S.C., 1994, Role of superoxide, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss in viability of seeds of *Shorea robusta* Gaertn, *New Phytol.*, 126, 623-627.
- Chatterjee, J., and Chatterjee, C., 2000, Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower, *Environ., Pollut.*, 109, 69-74
- Chaoui, A. And, Ferjani, E., 2005, Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings, *CR. Biol.*, 328, 23-31.
- Cho, U., and Seo, N., 2004, Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation, *Plant Sci.*, 168, 113-120.
- Chugh, L.K., and Sawhney, S.K., 1999, Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium, *Plant Physiol. Bioch.*, 37(4), 297-303.
- Clarkson, D.T., and Luttge, U., 1989, Mineral nutrition. Divalent cations, transport and compartmentalization, *Prog. Bot.* 51, 93-112.
- Claussen, M., Lüthen, H., Blatt, M., and Böttger, M., 1997. Auxin-induced growth and its linkage to potassium channels, *Planta*, 201, 227-234.
- Clemens, S., Palmgren, M.G. and Krämer U., 2002, Along way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation, *Trends Plant Sci.*, 7, 309-315

- Clijster, H. and Van Assche, F., 1985, Inhibition of photosynthesis, *Photosynth. Res.*, 7, 41-40.
- Cobbett, C.S., 2000, Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification, *Plant Physiol.*, 123, 825-832.
- Costa França, M.G., Pham-Thi, C.A.T., Pimentel, R.O.P., Rossiello, Y., Fodil, Z., and Laffray, D., 2000, Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress, *Environ. Exp. Bot.*, 43, 227–237.
- Creissen, G., Edwards, E.A., and Enard C., 1992, Molecular Characterization of Glutathione-Reductase cDNAs from Pea (*Pisum sativum* L.), *Plant J.*, 2, 129-131.
- Çatak, E., Çolak, G., Tokur, S., ve Bilgiç, O., 2000, Bazı domates ve tütün genotiplerinde kadmiyum etkilerini inceleyen istatistiksel bir çalışma, *B.A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2(1).
- Das, P., Samantaray, S., and Rout, G.R., 1997, Studies on cadmium toxicity in plants: a review, *Environ. Pollut.*, 98, 29-36.
- Davies, B.E., 1995, Lead and other heavy metals in urban areas and consequences for the health of their inhabitants. *Environmental Contaminants, Ecosystems and Human Health*. Majumdar, S.K., Miller, E.W., and Brenner, F.J., (eds), The Pennsylvania Academy of Science, Easton P.A., USA. pp.287-307.
- De Filippis, L.F., and Ziegler, H., 1993, Effect of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on the photosynthetic carbon reduction cycle of *Euglena*, *J. Plant Physiol.*, 142, 167-172.
- Demmig-Adams, B., 1990, Carotenoids and photoprotection: a role for the xanthophyll zeaxanthin, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1020, 1-24.
- Demmig-Adams, B., and Adams, W.W., 1992, Photoprotection and other responses of plants to high light stress, *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, 43, 599-626.
- Demmig, B., Winter, K., Krüger, A., and Czygan, F.C., 1987, Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves: a possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light, *Plant Physiol.*, 84, 218-224.
- Deng, H., Ye, Z.H., and Wong, M.H., 2004, Accumulation of lead, zinc, copper and cadmium by 12 wetland plant species thriving in metal-contaminated sites in China, *Environ. Pollut.*, 132, 29-40.

- De Vos, C.H.R., Schat, H., De Wall M.A.M., Vooijs, R., and Ernst W.H.O., 1991, Increased resistance to copper – induced damage of the root cell plasmalemma in copper tolerant *Silene cucubalus*, *Physiol. Plantarum*, 82, 523-528.
- Dietz, K.J., Baier, M., and Krämer, U., 1999, Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. *Heavy Metal Stress in Plants: from molecules to ecosystems*. Prasad, M.N.V., and Hagemeyer, J. (eds.), Springer-Verlag, Berlin. pp. 73-98
- Dixit, V. Pandey V., and Shyam, R., 2001, Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. Cv. Azad), *J. Exp. Bot.*, 52, 1101-1109
- Drażkiewicz M., 1994, Chlorophyllase: Occurrence, functions, mechanism of action, effects of external and internal factors, *Photosynthetica*, 30, 321-331.
- Drażkiewicz M., and Baszyński, T., 2005, Growth parameters and photosynthetic pigments in leaf segments of *Zea mays* exposed to cadmium, as related to protection mechanisms, *J. Plant Physiol.*, 162, 1013-1021.
- Ducruet, J.M., and Lemoine, Y., 1985, Increased heat sensitivity of the photosynthetic apparatus in triazine-resistant biotypes from different plant species, *Plant Cell Physiol.*, 26, 419-429.
- Dunbar, K.R., McLaughlin, M.J., and Reid, R.J., 2003, The uptake and partitioning of cadmium in two cultivars of potato (*Solanum tuberosum* L.), *J. Exp. Bot.*, 54, 349-354.
- Eick, M.J., Peak, J.D., Brady, P.V., and Pesek, J.D., 1999. Kinetics of lead adsorption and desorption on goethite: Residence time effect, *Soil. Sci.*, 164, 28-39.
- Elçi, Ş., Kolsarıcı, Ö., ve Geçit, H.H., 1987, *Tarla Bitkileri*, A.Ü. Ziraat Fak. Yay., 1008, Ofset Basım, 30, 238.
- Elumalai, R.P., Nagpal, P., and Reed, J.W., 2002, A Mutation in the Arabidopsis *KT2/KUP2* Potassium Transporter Gene Affects Shoot Cell Expansion, *Plant Cell*, 14, 119-131.
- Ergün, N., ve Öncel I., 2005, Bitkilerde Ağır Metal Bağlayan Peptidler, *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 1, 15-25.
- Ernst, W.H.O., Verkleij, J.A.C. and Schat, H., 1992, Metal tolerance in plants, *Acta. Bot. Neerl.*, 41, 229-248.
- Eun, S.O., Youn, H.S., and Lee, Y., 2000, Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*, *Physiol. Plant.*, 110, 357-365.

- Faller, P., Kienzler, K., and Anja Krieger-Liszkay, A., 2005, Mechanism of Cd<sup>2+</sup> toxicity: Cd<sup>2+</sup> inhibits photoactivation of Photosystem II by competitive binding to the essential Ca<sup>2+</sup> site, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1706, 158-164.
- FAOSTAT istatistikleri özeti, 2005, Food and Agriculture Organization, FAOstat homepage, <http://faostat.fao.org>.
- Fatima, R.A., and Ahmad, M, 2005, Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater, *Sci. Total Environ.*, 346, 256-273.
- Filho, G.M.A., Creed, J.C., Andrade, L.R. and Pfeiffer, W.C., 2004, Metal accumulation by *Halodule wrightii* populations, *Aquat. Bot.*, 80, 241-251.
- Fodor, A., Szabó-Nagy, A., and Erdei, L., 1995, The effects of cadmium on the fluidity and H<sup>+</sup>-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots, *J. Plant Physiol.*, 14, 787-792.
- Foyer, C.H., 1993, Ascorbate. Antioxidants in higher plants. Alscher, R.G., and Hess, J.L. (eds.), CRC Press, Boca, Raton, pp. 31-52.
- Foyer, C.H., and Halliwell, B., 1976, The presence of glutathione, glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic metabolism, *Planta*, 133, 21-25.
- Foyer, C.H., Lopez-Oelgado, H., Dat, J.F., and Scott, J.M., 1997, Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling, *Physiol. Plant*, 100, 241-254.
- Fridovich, I., 1995, Superoxide radical and superoxide dismutases, *Ann. Rev. Biochem.*, 64, 97-112
- Fritioff, Å and Greger, M., 2006, Uptake and distribution of Zn, Cu, Cd, and Pb in an aquatic plant *Potamogeton natans*, *Chemosphere*, 63, 220-227.
- Gadallah, M.A.A., 1995, Interactive effect of heavy metals and temperature on the growth and chlorophyll, saccharides and soluble nitrogen in *Phaseolus* plants, *Biol. Plant.*, 36, 373-382.
- García, G., Faz, Á., and Cunha, M., 2004, Performance of *Piptatherum miliaceum* (Smilo grass) in edaphic Pb and Zn phytoremediation over a short growth period, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 54, 245-250.
- Garratt, L.C., Janagoudar, B.S., Lowe, K.C., Anthony, P. Power, J.B. and Davey, M.R., 2002, Salinity tolerance and antioxidant status in cotton cultures, *Free Radical Bio. Med.*, 33 (4), 502-511.
- Gerloch, M. and Constable, E.C., 1994, *Transition Metal Chemistry*, Wiley, New York.

- Genty, B., Briantais J. M., and Baker, N., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence, *Biochim. Biophys. Acta.*, 990: 87-92.
- Gille, G., and Singler, K., 1995, Oxidative stress in living cells, *Folia microbiol*, 2, 131-152.
- Gilmore, A.M., 1997, Mechanistic aspect of xanthophyll cycle dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves, *Physiologiae Plantarum*, 99, 197-209.
- Girroti, A.W., 1990, Photodynamic lipid peroxidation in biological systems, *Photochem. Photobiol.*, 51, 497-509.
- Godbold, D.L., and Hutterman, A., 1985, Effect of zinc, cadmium and mercury on root elongation on *Picea abies* (Karst.) seedlings and the significance of these metals to forest die-back, *Environ. Pollut.*, 38, 365-381.
- Godbold, D.L., and Kettner, C., 1991, Lead influences root growth and mineral nutrition of *Picea abies* seedlings, *J. Plant Physiol.*, 139, 95-99.
- Godzik, B., 1993, Heavy metal contents in plants from zinc dumps and reference area, *Pol. Bot. Stud.*, 5, 113-132.
- Gomes, P.C., Fonter, M.P.F., da Silva, A.G., Mendonça, E.S., and Netto, A.R., 2001, Selectivity Sequence and Competitive Adsorption of Heavy Metals by Brazilian Solis., *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 65, 1115-1121.
- Greger, M., 1999, Metal availability and bioconcentration in plants. Heavy Metal Stress in Plants: from molecules to ecosystem. Prasad, M.N.V., and Hagemeyer, J., (eds.), Springer-Verlag, Berlin. pp. 1-27.
- Greger, M., Johansson, M., Stihl, A., and Hazma, K., 1993, Foliar uptake of Cd by pea (*Pisum sativum*) and sugar beet (*Beta vulgaris*), *Physiol. Plantarum*, 88, 563-570.
- Greger, M., and Lindberg, S., 1986, Effects of Cd<sup>+2</sup> and EDTA on young sugar beets (*Beta vulgaris*), I. Cd<sup>+2</sup> uptake and sugar accumulation, *Physiol. Plant.*, 66, 69-74.
- Grill, E., Löffler, S., Winnacker E.L., and Zenk, M.H., 1989, Phytochelatins, the heavy-metal binding peptides of plants, are synthesised from glutathione by a specific  $\gamma$ -glytmyl-cysteine dipeptidyl tanspeptidase phytochelatin synthase, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86, 6838-6842.
- Grill, E. and Zenk, M.H., 1985, Induction of heavy metal sequestering phytochelatin by cadmium in cell cultures of *Rauvolfia serpentina*, *Naturwissenschaften*, 72, 432-433.
- Guo, Y., and Marschner, H., 1995, Uptake, distribution and binding of cadmium and nickel in different plant species, *J. Plant Nutr.*, 18, 2691-2706.

- Gürel, A., ve Avcıoğlu, R., 2001, Bitkilerde Strese Dayanıklılık Fizyolojisi. Bitki Biyoteknolojisi, Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. Özcan, S., Gürel E., ve Babaoğlu, M., (eds.), S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya. ss. 288-289.
- Hagemeyer, J., and Breckle, S.W., 1996, Growth under trace element stress. Plant Roots; the hidden half. 2nd edition. Waisel, Y., Eshel, A., and Kafkafi, U., (eds.), Dekker, New York. pp.415-433.
- Haghiri, F., 1973, Plant uptake of cadmium as influenced by cation exchange capacity, organic matter, zinc and soil temperature, J. Environ. Qual., 2, 93-96.
- Hall, J.L., 2002, Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance, J. Exp. Bot., 53, 1-11.
- Halliwell, B., 1981, Free radicals, oxygen toxicity and aging. Age Pigments. Sohal R.S., (ed.), Elsevier, Amsterdam. pp. 1-62.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C., 1999, Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd. Ed., Oxford University Press, New York.
- Harmens, H., Koevoets, P.L.M., Verkleij, J.A.C., and Ernst, W.H.O., 1994, The role of low molecular weight organic acids in mechanisms of increased zinc tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke, New Phytol., 126, 615-621.
- Harrison, R.M., and Chirgawi, M.B., 1989, The assessment of air and soil as contributors of some trace metals to vegetable plants I. Use of a filtered air growth cabinet, Sci. Total Environ., 83, 13-34.
- Hausladen, A., and Alscher, R.G., 1993, Glutathione. Antioxidants in higher plants. Alscher, R.G., and Hess, J.L. (eds.), CRC Press, Boca, Raton. pp.1-23.
- Hausling, M., Jorns, C.A., Lehmbecker, G., Hecht-Buchholz, C., and Marschner, H., 1988, Ion and water uptake in relation to root development of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst), J. Plant Physiol, 133, 486-491.
- Havaux, M., 1993, Characterization of thermal damage to the photosynthetic electron transport system in potato leaves, Plant Sci., 94, 19-33.
- He, Z., Li, J., Zhang, H., and Ma, M., 2005, Different effects of calcium and lanthanum on the expression of phytochelatin synthase gene and cadmium absorption in *Lactuca sativa*, Plant Sci., 168, 309-318.
- Hegedüs A., Erdei, S., and Horváth, G., 2001. Comparative studies of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress, Plant Sci., 160, 1085-1093.
- Hendry, G.A.F., Baker, A.J.M., and Ewart, C.F., 1992, Cadmium tolerance and toxicity, oxygen radical processes and molecular damage in cadmium-tolerant and cadmium-sensitive clones of *Hocus lanatus*, Acta Bot. Neerl., 41, 271-281.



- Hernández, L.E., Cárpene-Ruiz, R., and Garate, A., 1996, Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium, *J. Plant Nutr.*, 19, 1581-1598.
- Hideg, E., Spetea, C., and Vass, I., 1994, Singlet oxygen and free radical production during acceptor and donor side induced photoinhibition: studies with spin trapping EPR spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, 1186, 143-152.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., and Prange, R.K., 1999, Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds, *Planta*, 207, 604-611.
- Horton, P., Ruban, A.V., and Walters, R.G., 1996, Regulation of light harvesting in green plants, *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, 47, 655-684.
- Houtz, R.L., Nable, R.O., and Cheniae, G.M., 1988, Evidence for the effects on the in vivo activity of rubulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase during development of Mn toxicity in tobacco, *Plant Physiol.*, 86, 1143-1149.
- Huang, J.W., and Cunningham, S.D., 1996, Lead Phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytol.* 134, 75-84.
- Huang, J.W., Grunes, D.L., and Kochian, L.V., 1994, Voltage dependent  $\text{Ca}^{2+}$  influx into right-side-out plasma membrane vesicles isolated from wheat roots: characteristic of a putative  $\text{Ca}^{2+}$  channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 3473-3477.
- Jackson, P.J., Unkefer, P.J., Delhaize, E., and Robinson, N.J., 1990, Mechanisms of trace metal tolerance in plants. *Environmental Injury to Plants*. Katterman, F., (ed.), Academic Press, San Diego. pp. 231-258.
- Jana, S., and Choudhari, M.A., 1982, Senescence in submerged aquatic angiosperms: effects of heavy metals, *New Phytol.*, 90, 477-484.
- Jannssen, L.H.J., Warm, H.W., and Van Hasselt, P.R., 1992, Temperature dependence of chlorophyll fluorescence induction and photosynthesis in tomato as affected by temperature and light conditions during growth, *J. Plant Physiol*, 139, 549-554.
- Jarvis, M.D., and Leung, D.W.M., 2002, Chelated lead transport in *Pinus radiata*: an ultrastructural study, *Environ. Exp. Bot.*, 48, 21-32.
- Jimenez, A., Hernandez, J.A., del Rio, L.A., and Sevilla, F., 1997, Evidence for the presence of ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves, *Plant Physiol.*, 114, 275-284.

- Iannelli, M. A., Pietrini, F., Fiore, L., Petrilli, L., and Massacci, A., 2002. Antioxidant response to cadmium in *Pragmites australis* plants, *Plant Physiol. Biochem.*, 40: 977-982.
- Kabata-Pendias, A., and Pendias, H., 1991, *Trace Elements in Soils and Plants*, 2<sup>nd</sup> ed., CRC Press, 365p.
- Kadioğlu, A., 1999, *Bitki Fizyolojisi*, Eser Ofset, Trabzon, 377s.
- Kalyanaram, B., 1996, Thiol radicals in biological systems: significant or trivial?, *Biochem. Soc. Symp.*, 61, 55-63.
- Kastori, R., Plesnicar, M., Sakac, D., Pankovic, D., and Arsenihjevic-Maksimovic, I., 1998, Effect of excess Lead on Sunflower growth and photosynthesis, *J. Plant Nut.*, 21(1), 75-85.
- Kennedy, C.D., and Gonsalves, E.A.N., 1987, The action of Zn, cadmium, mercury, copper and lead on transroot potential and H<sup>+</sup> efflux of excised roots., *J. Exp. Bot.*, 38, 800-817.
- Kiran, Y., ve Munzuroğlu, Ö., 2004, Mercimek (*Lens culinaris* Medik.) Tohumlarının Çimlenmesi ve Fide Büyümesi Üzerine Kurşunun Etkileri, *F.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16, 1-9, 2004.
- Kiran, Y., and Şahin, A., 2005, The effects of the lead on the seed germination, root growth, and root tip cell mitotic divisions of *Lens culinaris* medik, *G.U. Journal of Science*, 18, 17-25.
- Kırtok, Y., 1998, *Mısır Üretimi ve Kullanımı*, Kocaelik Basım ve Yayınevi, İstanbul.
- Kidd, P.S., and Monterroso, C., 2005, Metal extraction by *Alyssum serpyllifolium* ssp. *lusitanicum* on mine-spoil soils from Spain, *Sci. Total Environ.*, 336, 1-11.
- Kneer, R., and Zenk, M.H., 1992, Phytochelatin protect plant enzymes from heavy-metal poisoning, *Phytochemistry*, 31, 2663-2667.
- Kocheva, K., Lambrev, P., Georgiev, G., Goltsev, V., and Karabaliev, M., 2004, Evaluation of chlorophyll fluorescence and membrane injury in the leaves of barley cultivars under osmotic stress, *Bioelectrochemistry*, 63, 121-124.
- Kochian, L.V., 1995, Cellular mechanisms of aluminium toxicity and resistance in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46, 237-260.
- Kosobrukhov, A., Knyazeva, I., and Mudrik, V., 2004, *Plantago major* plants responses to increase content of lead in soil: growth and photosynthesis, *Plant Growth Regul.*, 42, 145-151.
- Köleli, N., Eker, S., and Cakmak, I., 2004. Effect of zinc fertilization on cadmium toxicity in durum and bread wheat grown in zinc-deficient soil, *Environ. Pollut.*, 131, 453-459.

- Krämer, U., Cotter-Howells, J.M., Charnock, J.M., Baker, A.J.M., and Smith, A.C., 1996, Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel, *Nature*, 379, 635-638.
- Krupa, Z., and Moniak, M., 1998, The stage of leaf maturity implicates the response of the photosynthetic apparatus to cadmium toxicity, *Plant Sci.*, 138, 149-156.
- Krupa, Z., 1999, Cadmium against higher plant photosynthesis - a variety of effects and where do they possibly come from?, *Z. Naturforsch. C*, 54, 723-729.
- Kumar, P., and Dara, S.S., 1982, Utilisation of agricultural wastes for decontaminating industrial/domestic wastewaters from toxic metals, *Agric. Wastes*, 4 (3), 213-223.
- Kün, E., 1997, Sıcak İklim Tahılları, IV. Basım, A.Ü. Ziraat Fak. Yayın No: 1452, Ders Kitabı:432, Ankara.
- Lagriffoul, A., Mocquot, B. Mench, M., and Vangronsveld, J., 1998, Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.), *Plant Soil*, 200, 241-250.
- Landberg, T., and Greger, M., 2002, Differences in oxidative stress in heavy metal resistant and sensitive clones of *Salix viminalis*., *J. Plant Physiol*, 159, 69-75.
- Lee, K.C., Cunningham, B.A., Poulsen, G.M., Liang, J.M., and Moore, R.B., 1976, Effects of cadmium on respiration rate and activities of several enzymes in soybean seedlings, *Physiol. Plant*, 36, 4-6.
- Leonardis, D.S., Dipierro, N, Dipierro, S., 2000, Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria, *Plant Physiol. Bioch.*, 38, 773-779.
- Lewitt, J., 1980, Responses of plants to environmental stresses, Vol, II, 2<sup>nd</sup> ed., Academic Press. New York, 607p.
- Lichtenthaler, H.K., 1987, Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes, *Method Enzymol.*, 148, 350-382
- Lichtenthaler, H.K., 1996, Vegetation Stress: An introduction to the stress concept in plants, *J. Plant Physiol.*, 148, 4-14.
- Lichtenthaler, H.K., 1998, The stress concept in plants: An introduction, *Ann. NY. Acad. Sci.*, 851, 187-198.
- Lin, J., Jiang, W., and Liu, D., 2003, Accumulation of copper by roots, hypocotyls, cotyledons and leaves of sunflower (*Helianthus annuus* L.), *Bioresource Technol.*, 86, 151-155

- Lindberg, S., Meyers, T.P., Taylor G.E.J., Turner, R.R., and Schroeder, W.H., 1992, Atmosphere–surface exchange of mercury in a forest: results of modeling and gradient approaches, *J. Geophys. Res.*, 97, 2519-2528.
- Liu, J., Li, K., Xu, J., Zhang, Z., Ma, T., Lu, X., Yang, J., and Zhur, Q., 2004, Lead toxicity, uptake and translocation in different rice cultivars, *Plant Sci.*, 165, 793-802.
- Lombardi, L. and Sebastiani L., 2005, Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants, *Plant Sci.*, 168, 797-802.
- Luo, C., Shen, Z., and Li, X., 2005, Enhanced phytoextraction of Cu, Pb, Zn and Cd with EDTA and EDDS, *Chemosphere*, 59, 1-11.
- Macfarlane, G.R., and Burchett, M.D., 2001, Photosynthetic Pigments and Peroxidase Activity as Indicators of Heavy Metal Stress in the Grey Mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh., *Mar. Pollut. Bull.*, 42, 233-240.
- Maksymiec, W, and Krupa Z., 2006, The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana*, *Environ. Exp. Bot.*, 57, 187-194.
- Malecka, A., Jarmuszkiewicz, W., and Tomaszewska, B., 2001, Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells, *Acta Biochimica Polonica*, 48, 687-698.
- Malik, D., Sheoran, I.S., and Singh, R., 1992, Carbon metabolism in leaves of cadmium treated wheat seedlings, *Plant Physiol. Bioch.*, 30, 223-229.
- Malkowski, E., Kita, A., Galas, W., Karcz, W., and Kuperberg, J.M., 2002, Lead distribution in corn seedlings (*Zea mays* L.) and its effect on growth and the concentrations of potassium and calcium, *Plant Growth Regul.*, 37, 69-76.
- Mallick, N., and Mohn, F.H., 2003, Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*, *Ecotox. Environ. Safe.*, 55, 64-69
- Maranón, E., and Sastre, H., 1991, Heavy metal removal in packed beds using apple wastes , *Bioresource Technol.*, 38(1), 39-43
- Marschner, H., 1995, Mineral Nutrition of Higher Plants, Academic Press, London, pp. 299-312.
- Marschner, P., Godbold, D.L, and Jutschhe, G., 1996, Dynamics of lead accumulation in mycorrhizal and non-mycorrhizal Norway spruce (*Picea abies* (L.) karst.), *Plant Soil*, 178, 239-245

- Marshall, J., Corzo, A., Leigh, R.A., and Sanders, D., 1994, Membrane potential-dependent calcium transport in right-side-out plasma membrane vesicles from *Zea mays* L. roots, *Plant J.* 5, 683-694.
- Mascher, R., Lippmann, B., Holzinger, S., and Bergmann, H., 2002, Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants, *Plant Sci.*, 163, 961-969.
- Mathis, P., and Kleo, J., 1973, The triplet state of  $\beta$ -carotene and analog polyenes of different length, *Photochem. Photobiol.*, 18, 343-346.
- Mathys, W., 1977, The role of malate, oxalate and mustard oil glucosides in the evolution of zinc resistance in herbage plants, *Physiol. Plant.*, 40, 130-136.
- Matthews, D.J., Moran, B.M., McCabe, P.F., and Otte, M.L., 2004, Zinc tolerance, uptake, accumulation and distribution in plants and protoplasts of five European populations of the wetland grass *Glyceria fluitans*, *Aquat. Bot.*, 80, 39-52.
- McKersie, D.B. 1996, Oxidative stress, [www.Agronomy.psu.edu/Courses/AGRO518/Oxygen.htm](http://www.Agronomy.psu.edu/Courses/AGRO518/Oxygen.htm).
- Mehra, R.K., Tarbet E.B., Gray, W.R. and Winge, D.R., 1988, Metal specific synthesis of two metallothioneins and  $\gamma$ -glutamyl peptides of *Candida glabrata*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (USA), 5, 8815-8819.
- Mench, M., Morel, J.L., Cuckert, A., and Guillet, B., 1988, Metal binding with root exudates of low molecular weight, *J. Soil Sci.*, 33, 521-527.
- Mercan, U., 2004, Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi, *Y.Y.U. Vet. Fak. Derg.*, 5 (1-2), 91-96
- Metwally, A., Safronova, V.I., Belimov, A.A., and Diez, K.J., 2004, Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L., *J. Exp. Bot.*, 56, 167-178.
- Miles, C.D., Brandle, J.R., Daniel, D.J., Chu-Der, O., Schnore, P.D., and Uhlik, D.J., 1972, Inhibition of photosystem II in isolated chloroplasts by lead, *Plant Physiol.*, 49, 820-825.
- Mishra, A., and Choudhari, M.A., 1998, Amelioration of lead and mercury effects on germination and rice seedling growth by antioxidants, *Biol. Plant.*, 41, 469-473.
- Mohanty, N., Vass, I., and Demeter, S., 1989, Copper toxicity affects Photosystem II electron transport at the secondary quinone acceptor,  $Q_B$ , *Plant Physiol.*, 90, 175-179.

- Morel, J.L., Mench, M., and Guckert, A., 1986, A measurement of Pb, Cu, Cd binding with mucilage exudates from maize (*Zea mays* L.) roots. *Biol. Fert. Soils*, 2, 29-34.
- Munzuroğlu, O., and Geckil, H., 2002, Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*, *Arch. Environ. Con. Tox.*, 43, 203-213.
- Muranyi, A., Seeling, B., Ladewig, E. and Jungk, A., 1994, Acidification in the rhizosphere of rape seedlings and in bulk soil by nitrification and ammonium uptake, *Z. Pflanzenernähr Bodenkd.*, 157, 61-65.
- Murasugi, A., Wada C. and Hayashi Y., 1981, Cadmium-binding peptide unduced in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *J. Biochem.*, 90, 1561-1564.
- Nathalie, B., and Carpentier, R., 1999, Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, and Pb<sup>2+</sup> -Induced changes in Photosystem II photochemical yield and energy storage in isolated thylakoid membranes: A study using simultaneous Fluorescence and photoacoustic measurements, *Photosynth. Res.*, 59, 167-174.
- Nedunchezian, N., and Kulandaivelu, G., 1995. Effect of Cd and UV-B radiation on polypeptide composition and photosystem activities of *Vigna unguiculata* chloroplasts, *Biol. Plant*, 37, 437-441.
- Nellesen, J.E., Flethcher J.S., 1993, Assessment of published literature on the uptake, accumulation and translocation of heavy metals by vascular plants, *Chemosphere*, 9, 1669-1680.
- Niess, D.H., 1999, Microbial heavy-metal resistance, *Appl. Microbiol. Biotech.*, 51, 730-750.
- Nikookar, K., Moradshahi, A., Hosseini, L., 2005, Physiological responses of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* to copper toxicity, *Biomol. Eng.*, 22 (4), 141-146.
- Obroucheva, N.V., Bystrova, E.I., Ivanov, V.B., Anupova, O.V., and Seregin, I.V., 1998, Root growth responses to lead in young maize seedlings, *Plant Soil*, 200, 55-61.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, Y., 1979, Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.*, 95, 351-358.
- Ouzounidou, G., 1995, Cu-ions mediated changes in growth, chlorophyll and other ion contents in a Cu-tolerant *Koeleria splendens*, *Biol. Plant*, 37, 71-79.
- Öncel, I., Keleş, Y., and Üstün, A.S., 2000. Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings, *Environ. Pollut.*, 107, 315-320.

- Ort, D.R., 2002, Chilling-induced limitations on photosynthesis in warm-climate plants: contrasting mechanisms, *Environmental Control in Biology*, 40, 7-18.
- Padmaja, K., Parsad D.D.K., and Parsad A.R.K., 1990, Inhibition of chlorophyll synthesis in *Phaseolus vulgaris* L. Seedlings by cadmium acetate, *Photosynthetica*, 24, 399-404.
- Paivoke, A.E.A., 2002, Soil lead alters phytase activity and mineral nutrient balance of *Pisum sativum*, *Environ. Exp. Bot.*, 48, 61-73.
- Pawlak, K.P., Ruzik, R., Abramski, K., Cieurzyńska, M., and Gawrońska H., 2005, Cadmium speciation in *Arabidopsis thaliana* as a strategy to study metal accumulation system in plants, *Anal. Chim. Acta*, 540, 61-70.
- Peng, H., Tian, S., and Yang, X., 2005, Changes of root morphology and Pb uptake by two species of *Elsholtzia* under Pb toxicity, *Journal of Zhejiang University Science*, 6B(6), 546-552.
- Peralta, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., Tiemann, K.L., Gomez, E., Arteaga, S., Rascon, E., and Parsons, J.G., 2001, Uptake and Effects of Five Heavy Metals on Seed Germination and Plant Growth in Alfalfa (*Medicago sativa* L.), *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 66(6), 727-734.
- Petrucci, R.H. and Harwood, W.S., 1993a, *General Chemistry: Principles and Modern Applications*, 6th edition. Macmillan Publishing Company, New York.
- Petrucci, R.H. and Harwood, W.S., 1993b, *General Chemistry: Principles and Modern Applications*, 6th edition. Petrucci, R.H., and Harwood, W.S., (eds.), Macmillan Publishing Company, New York. pp. 874-879
- Pinto, A.P., Mota, A.M., de Varennes, A., and Pinto F.C., 2004, Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants, *Sci. Total Environ.*, 326, 239-247.
- Pinto, E., Sigaud-Kutner, T.C.S., Leitão, M.A.S., Okamoto, A.K., Morse D., and Colepicolo, P., 2003, Heavy metal-induced oxidative stress in algae, *J. Phycol.*, 39, 1008-1018.
- Placer, C.A., Cushman, L.L., and Johnson, B.C., 1990, Estimation of product of lipid peroxidation (Malondy Dialdehyde) in biochemical systems, *Anal. Biochem.*, 16, 259-264.
- Pohlmeier, A., 1999, Metal speciation, chelation and complexing ligands in plants. *Heavy Metal Stress in Plants: from molecules to ecosystems*. Prasad, M.N.V., and Hagemeyer, J., (eds.), Springer-Verlag, Berlin. pp. 29-50.
- Porter, N.A., 1984, Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, 105, 273-283.

- Poskuta, J.W., Parys, E., and Romanowaska, E., 1996, Toxicity of lead to photosynthesis, accumulation of chlorophyll, respiration and growth of *Chlorella pyrenoidosa*. Protective role of dark respiration, Acta Physiol. Plant, 18, 165-171.
- Price, A., Lucas, P.W., and Lea, P.J., 1990, Age dependent damage and glutathione metabolism in ozone fumigated barley: A leaf section approach, J. Exp. Bot., 41, 1309-1317.
- Prasad, M.N.V., 1999, Metallothioneins and metal binding complexes in plants. Heavy Metal Stress in Plants: from molecules to ecosystems. Prasad, M.N.V., and Hagemeyer, J., (eds.), Springer-Verlag, Berlin. pp. 51-72
- Prasad, M.N.V., and Strzalka, K., 1999, Impact of heavy metals on photosynthesis. Heavy Metal Stress in Plants: from molecules to ecosystems. Prasad, M.N.V., and Hagemeyer, J., (eds.), Springer-Verlag, Berlin. pp. 117-138
- Prasad, M.N.V., Malec, P., Waloszek, A., Bojko, M. and Strzaka, K., 2001, Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation, Plant Sci., 161, 881-889.
- Pryzmusinski, R., Sychala, M., and Gwozdz, E.A., 1991, Inorganic lead changes growth polypeptide pattern of lupin roots, Biochem. Physiol. Pflanz., 187, 51-57.
- Pulford, I.D., and Watson, C., 2003, Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees-a review, Environ. Int., 29, 529-540.
- Punz, W.F., and Sieghardt, H., 1993, The response of roots of herbaceous plant species to heavy metals, Environ. Exp. Bot., 33, 85-93.
- Puthotá, V., Cruz-Ortega, R., Johnson, J., and Ownby, J., 1991, An ultrastructural study of the inhibition of mucilage reaction in the wheat root cap by aluminium. Plant-Soil Interactions at Low pH. Wright, R.J., Baligar, V.C., and Murrmann, R.P. (eds.), Kluwer, Dordrecht. pp.779-787
- Qadir, S., Qureshi, M.I., Javed, S., and Abdin, M.Z., 2004, Genotypic variation in phytoremediation potential of *Brassica juncea* cultivars exposed to Cd stress, Plant Sci., 167, 1171-1181.
- Radmer R., and Kok B., 1974, Kinetic observation of the photosystem II electron acceptor pool isolated by mercuric ion, Biochim. Biophys. Acta, 357, 177-180.
- Ralf, P.J., and Burchett, M.D., 1998, Photosynthetic response of *Halophila ovalis* to heavy metal stress, Environ. Pollut., 103, 91-101.
- Ramos, I., Esteban, E., Lucena, J.J., and Garate, A., 2002, Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp. Cd-Mn interaction, Plant Sci., 162, 761-767.



- Ranieri A., Castagna, A., Scebba, F., Careri, M., Zagnoni, I., Predieri, G., Pagliari, M., and Toppi, L.S., 2005, Oxidative stress and phytochelatin characterisation in bread wheat exposed to cadmium excess, *Plant Physiol. Bioch.*, 43, 45-54.
- Rao, V.M., Hale, B.A., Omrod, D.P., 1995, Amelioration of ozone induced oxidative damage in wheat plants grown under high carbon dioxide, *Plant Physiol.*, 109, 421-432.
- Rashid, A., Camm, E.L., and Ekramoddoullah, K.M., 1994, Molecular mechanism of action of Pb and Zn<sup>2+</sup> on water oxidizing complex of photosystem II, *FEBS Lett.*, 350, 296-298.
- Rashid, A., and Popovic, r., 1990, Protoective role of CaCl<sub>2</sub> against Pb<sup>2+</sup> inhibition in Photosystem II, *FEBS Lett*, 271, 181-184.
- Rauser, W.E. (1990). Phytochelatins, *Annu. Rev. Biochem.*, 59, 61-86.
- Rauser, W.E., 1995, Phytochelatins and related peptides: structure, biosynthesis, and function, *Plant Physiol.*, 109, 1141-1149.
- Rauser, W.E., 1999, Structure and function of metal chelators produced by plants, *Cell Biochem. Biophys.*, 31, 19-48.
- Reddy, A.M., Kumar, S.G., Jyothsnakumari, G., Thimmanaik, S., and Sudhakar, C., 2005, Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) verdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.), *Chemosphere*, 60, 97-104.
- Reddy, G.N. and Prasad, M.N.V., 1990, Heavy metal binding proteins peptides, occurrence, structure, synthesis and functions review, *Environ. Exp. Bot.*, 30, 252-264.
- Rivetta, A., Negrini, N., and Cocucci, M., 1997, Involvement of Ca<sup>2+</sup> calmodulin in Cd<sup>2+</sup> toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination, *Plant Cell Environ.*, 20, 600-608.
- Robinson, N.J. and Jackson P.J., 1986, "Metallothionein-like" metal complexes in angiosperms, their structure and function, *Physiol. Plant.*, 67, 499-506.
- Robinson, B., Russell, C., Hedley, M., and Clothier, B., 2001, Cadmium adsorption by rhizobacteria: implications for New Zealand pastureland, *Agr. Ecosyst. Environ.*, 87(3), 315-321.
- Romanowska, E., Igamberdiev, A.U., Parys, E., and Gardeström, P., 2002, Stimulation of respiration by Pb in detached leaves and mitochondria of C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants, *Physiol. Plant*, 116, 148-154.

- Ros, R., Cooke D.T., Burden, R.S., and James C.S., 1990, Effect of herbicide MCPA, and the heavy metals, cadmium and nickel, on the lipid composition, Mg-ATPase activity and fluidity of plasma membranes from rice, *Oryza sativa* cv. Bahia shoots, *J. Exp. Bot.*, 41, 457-467.
- Ros, R., Morales, A., Segura, J., and Picazo, I., 1992, In vivo and in vitro effects of nickel and cadmium on the plasma membrane ATPase from rice (*Oryza Sativa* L.) shoots and roots, *Plant Sci.*, 83, 1-6.
- Rudakova, E.V., Karakis, K.D., and Sidorshina, E.T., 1988, The role of plant cell walls in the uptake and accumulation of metal ions, *Fiziol. Biochim. Kult. Rast.* 20, 3-12.
- Ruis-Jiménez, J., Luque-García, J.L., and Luque de Castro, M.D., 2003, Dynamic ultrasound-assisted extraction of cadmium and lead from plants prior to electrothermal atomic absorption spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 480, 231-237.
- Saeed, A., Akhter, W., and Iqbal, M., 2005, Removal and recovery of heavy metals from aqueous solution using papaya wood as a new biosorbent, *Sep. and Purif. Technol.*, 45, 25-31.
- Sairam, R. K., Deshmukh, P. S., and Shukla. D. S., 1997. Tolerance to drought and temperature stress in relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat. *J. Agron. and Crop Sci.* 178: 171-178.
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P.B.A., Dusenkov, V., Ensley, B.D., and Chet, I., 1995, Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants, *Bio/Technology*, 13, 468-474.
- Salt, D.E., Prince, R.C., Baker, A.J.M., Raskin, I., and Pickering, I.J., 1999, Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy, *Environ. Sci. Technol.*, 33, 713-717.
- Sanità di Toppi, L., and Gabbrielli, R., 1999, Response to cadmium in higher plants, *Environ. Exp. Bot.*, 41, 105-131.
- Sarvari, E., Gaspar, L., Fodor, F., Cseh, E., Kropfl, K., Varga, A., and Baron, M., 2002, Comparison of the effects of Pb treatment on thylakoid development in poplar and cucumber plants, *Acta. Biol. Szeged*, 46, 163-165
- Saxena, P.K., KrishnaRaj, S., Dan, T., Perras, M.R., and Vettakkorumakankav, N.N., 1999, Phytoremediation of Heavy Metal Contaminated and Polluted Soils. *Heavy Metal Stress in Plants: from molecules to ecosystem.* Prasad, M.N.V., and Hagemeyer, J., (eds), Springer-Verlag, Berlin. pp. 305-325
- Scandalios, J.G., 1993, Oxygen stress and superoxide dismutases, *Plant Physiol.*, 101: 7-12.

- Schreiber, U., Bilger, W., and Neubauer, C., 1994, Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assesment of *in vivo* photosynthesis. Ecological Studies. Schulze, E.D., and Caldwell, M.M., (eds.), Springer-Verlahg, Berlin, pp. 49-70.
- Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D.L., and Polle, A., 2001, Cadmium-Induced Changes in Antioxidative Systems, Hydrogen Peroxide Content, and Differentiation in Scots Pine Roots, *Plant Physol.*, 127, 887-898.
- Schützendübel, A., Nikolova, P., Rudolf, C., and Polle, A., 2002, Cadmium and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup> induced oxidative stress in *Populus canescens* roots, *Plant Physiol. Bioch.*, 40, 577-584.
- Sengar, R.S., and Pandey, M., 1996, Inhibition of chlorophyll biosynthesis by lead in greening *Pisum sativum* leaf segments, *Biol. Plant*, 38, 459-462.
- Seregin, I.V., and Ivaniov, V.B., 1997, Histochemical investigation of cadmium and lead distribution in plants, *Fiziol. Rast.*, 44, 915-921.
- Seregin, I.V., Shpigun, L.K., and Ivaniov, V.B., 2004, Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize roots, *Russ. J. Plant Physiol*, 51, 525-533.
- Sersen, F., Kralova, K., and Bumbalova, A., 1998, action of mercury on the photosynthetic aparatus of spinach chloroplasts, *Photosynthetica*, 35, 551-559.
- Shah, K., Kumar, R.G., Verma, S., and Dubey, R.S., 2001, Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings, *Plant Sci.*, 161, 1135-1144.
- Shaw, B.P., 1995, Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedlings of *Phaseolus aureus*, *Biol. Plant*, 37, 587-596.
- Sharma P., and Dubey, R.S., 2005, Lead toxicity in plants, *Braz. J. Plant Physiol.*, 17(1), 35-52.
- Sharma, S.S., Kaul, S., Metwally, A., Goyal, K.C., Finkemeier, I., and Dietz, K.J., 2004, Cadmium toxicity to barley (*Hordeum vulgare*) as affected by varying Fe nutritional status, *Plant Sci.*, 166, 1287-1295.
- Sharma, N.C., Sahi, S.V., and Jain, J.C., 2005, *Sesbania drummondii* cell cultures: ICP-MS determination of the accumulation of Pb and Cu, *Microchem. J.*, 81, 163-169.
- Sheoran, I.S., Singal, H.R., and Singh, R., 1990, Effect of cadmium and nickel on photosynthetic and the enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeon pea (*Cajanus cajan*), *Photosynth. Res.*, 23, 345-351.

- Shudhakar, C., Syamalambai, L., and Veeranjanyulu, K., 1992, Lead tolerance of certain legume species grown on lead ore tailings, *Agric. Ecosyst. Environ.*, 41, 253-261.
- Sigfridsson, K.G.V., Bernát, G., Mamedov, F., and Styring, S., 2004, Molecular interference of Cd<sup>2+</sup> with Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1659, 19-31.
- Sgherri, C.L.M., Liggini, B., Puliga, S. and Navari-Izzo, F., 1994, Antioxidant system in *Sporobolus stapianus*: changes in response to desiccation and rehydration, *Phytochemistry*, 35, 561-565.
- Sinha, S.K., Srivastava, H.S., and Tripathi, R.D., 1993, Influence of some growth regulators and cations on the inhibition of chlorophyll biosynthesis by lead in maize, *B. Environ. Contam. Tox.*, 51, 241-246.
- Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A, Semane, B., Hoet, P., Laere, A.V., and Vangronsveld, J., 2005, Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application, *Plant Physiol. Bioch.*, 43, 437-444.
- Stefanov, K., Popova, I., Kamburova, E, Pancheva, T., Kimenov, G., Kuleva, L., and Popov, S., 1993, Lipid and sterol changes in *Zea mays* caused by lead ions, *Phytochemistry*, 33, 47-41.
- Stefanov, K., Seizova, K., Popova, I., Petkov, V.L., Kimenov, G., and Popov, S., 1995, Effects of lead ions on the phospholipid composition in leaves *Zea mays* and *Phaseolus vulgaris*, *J. Plant Physiol.*, 147, 243-246.
- Steffens, J.C., 1990, The heavy metal-binding peptides of plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41, 553-575.
- Stiborova, M., Doubravova, M., and Leblova, S., 1986, A comparative study of the effect of heavy metal ions on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and phosphoenol pyruvate carboxylase, *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 181, 373-379.
- Stillman, M.J., 1995, Metallothioneins. Co-ordination, *Chem. Rev.*, 144, 461-511.
- Stobart, A.K., Griffiths, W., Bukhari, I.A., and Sherwood, R.P., 1985, The effect of Cd<sup>2+</sup> on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley, *Physiol. Plant.*, 63, 293-298.
- Stohs, S.J., and Bagchi, D., 1995, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Radikal Bio. Med.*, 18, 321-336
- Stolt, J.P., Sneller, F.E.C., Bryngelsson, T., Lundborg, T., and Schat, H., 2003, Phytochelatin and cadmium accumulation in wheat, *Environ. Exp. Bot.*, 49, 21-28.

- Symeonides, L.T., McNeilly, T., and Bradshaw, A.D., 1985, A differential tolerance of three cultivars of *Agrostis capillara* L. to cadmium, copper, lead, nickel and zinc. *New Phytol*, 101, 309-315.
- Şahin, S., 2001, Türkiye’de Mısır Ekim Alanlarının Dağılışı ve Mısır Üretimi, G.Ü. Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi, 1, 73-90.
- Tang, P.L, LeeC.K., Low, K.S., and Zainal, Z., 2003, Sorption of Cr(VI) and Cu(II) in aqueous solution by ethylenediamine modified rice hull, *Environ Technol.*, 24, 1243-1251.
- Tee, T. W., and Khan, R.M., 1998, Removal of lead, cadmium, and zinc by waste tea leaves, *Environ. Technol. Lett.*, 9, 1223-1232
- Tester, M., and Leigh, R.A., 2001, Partitioning of nutrient transport processes in roots, *J. Exp. Bot.*, 52, 445-457.
- Tewari, R.K., Kumar, P., Sharma, P.N., and Bisht, S.S., 2002, Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt, *Plant Sci.*, 162, 381-388.
- Torresdey, J.L.G., Videa, J.R.P., Rosa, G.D.L., and Parsons, J.G., 2005, Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy, *Coordin. Chem. Rev.*, 249, 1797-1810.
- Tripathi, R.D., Yunus, M. and Mehra, R.K., 1996, Phytochelatins and phytomellthioneins: the potential of these unique metal detoxifyng systems in plants, *Physiol. Mol. Biol.*, 2, 101-104.
- Ünalın, Ş., 2006, Ağır Metal Stresi Altındaki Mısır Bitkisinde Antioksidan Enzim Savunma Sisteminin Davranışı ve Mısırın Ağır Metal Kirliliğinin Giderilmesinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara, 66s.
- Vallee, B.L., and Ulmer, D.D., 1972, Biochemical effects of mercury, cadmium and lead, *Annu. Rev. Biochem.*, 41, 91-128.
- Van Assche, F., and Clijsters, H., 1986, Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentration of zinc: effect on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, *J. Plant Physiol.*, 125, 355-360.
- Van Assche, F., and Clijsters, H., 1990, Effects of metals on enzyme activity in plants, *Plant Cell Environ.*, 13, 195-206.
- Vance, C.K., and Miller, A.F., 1998, Spectroscopic comparison of the pH dependencies of Fe-substituted (Mn) superoxide dismutase and Fe-superoxide dismutase, *Biochemistry*, 37, 5518-5527.

- Verkleij, J.A.C., and Schat, H., 1990, Mechanisms of metal tolerance in higher plants. Heavy metal tolerance in plant: evolutionary aspects. Shaw, J. (ed.), CRC Press, Boca Raton. pp. 179-193.
- Verma S. and 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.
- Vitoria, A.P., Lea, P.J., and Azevedo, R.A. 2001, Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues, *Phytochemistry*, 57, 701-710.
- Vojtechova, M., and Leblova, S., 1991, Uptake of lead and cadmium by maize seedlings effect of heavy metals on the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase isolated from maize, *Biol. Plant.*, 33, 386-394.
- Wagner, G.J., 1993, Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health, *Adv. Agron.*, 51, 173-212.
- Walker, W.M., Miller, J.E., and Hassett, J.J., 1977. Effect of lead and cadmium upon the calcium, magnesium, potassium and phosphorus concentration in young corn plants, *Soil Sci.*, 124, 145-151.
- Wang, S.Y., Jiao, H., and Faust, M., 1991, Changes in ascorbate, Glutathione and related enzyme activity, during thidiazuron-induced bud break of apple, *Plant Physiol.*, 82, 231-236.
- Wang, W.S., Shan, X.Q., Wen B., and Zhang S.Z., 2003, Relationship between the extractable metals from soils and metals taken up by maize roots and shoots, *Chemosphere*, 53, 523-530.
- Wang, G., Su, M.Y., Chen, Y.H., Lin, F.F., Luo, D., and Gao, S.F., 2006, Transfer characteristics of cadmium and lead from soil to the edible parts of six vegetable species in southeastern China, *Environ. Pollut.*, in press.
- Weigel, H.J., 1985, Inhibition of photosynthetic reactions of isolated intact chloroplast by cadmium, *J. Plant Physiol*, 119, 179-189.
- Welsh, R.P.H., and Denny, P., 1979, The translocation of lead and copper in two submerged aquatic angiosperm species, *J. Exp. Bot.*, 30, 339-345.
- Wierzbicka, M., 1994, Resumption of mitotic activity in *Allium cepa* root tips during treatment with lead salts, *Environ. Exp. Bot.*, 34, 173-180.
- Wierzbicka, M., and Obidzińska, J., 1998, The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species, *Plant Sci.*, 137, 155-171.
- Wolterbeek, H.T., van der Meer, A.J.G.M., 2002, Transport rate of arsenic, cadmium, copper and zinc in *Potamogeton pectinatus* L.: radiotracer experiments with  $^{76}\text{As}$ ,  $^{109,115}\text{Cd}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  and  $^{65,69}\text{Zn}$ , *Sci. Total Environ.*, 287, 213-230.

- Wójcik, M., Vangronsveld, J., and Tukiendorf, A., 2005, Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens*: I. Growth parameters, metal accumulation and phytochelatin synthesis in response to cadmium, *Environ. Exp. Bot.*, 53, 151-161.
- Wu, F., Zhang, G., and Dominy, P., 2003, Four barley genotypes respond differently to cadmium: lipid peroxidation and activities of antioxidant capacity, *Environ. Exp. Bot.*, 50, 67-78.
- Wycisk, K., Kim, E.J., Schroeder, J.I., and Krämer, U., 2004, Enhancing the first enzymatic step in the histidine biosynthesis pathway increases the free histidine pool and nickel tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Lett.*, 578, 128-134.
- Yang, Y.Y., Jung, J.Y., Song, W.Y., Suh, H.S., and Lee, Y., 2000, Identification of rice varieties with high tolerance or sensitivity to lead and characterization of the mechanism of tolerance, *Plant Physiol.*, 124, 1019-1026.
- Young, A.J., 1991, The photoprotective role of carotenoids in higher plants, *Physiol. Plant.*, 83, 702-708.
- Yurtsever, N., 1984, Deneysel İstatistik Metotlar, T.C. Tarım, Orman ve Köy İşleri Bakanlığı, Köy Hizmetleri Genel Müdürlüğü Yayınları, Yayın no:121, Teknik yayın no:56, Ankara, 183-220.
- Zacchini, M., Rea, E., Tullio, M. and Agazio, M., 2003, Increased antioxidative capacity in maize calli during and after oxidative stress induced by a long lead treatment, *Plant Physiol. Bioch.*, 41, 49-54.
- Zheljazkov, V.D., Craker, L.E., and Xing B., 2005, Effects of Cd, Pb, and Cu on growth and essential oil contents in dill, peppermint, and basil, *Environ. Exp. Bot.*, in press.
- Zenk, M.H., 1996, Heavy metal detoxification in higher plants-a review, *Gene*, 179, 21-30.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Beycan Ayhan

Doğum Yeri : ANKARA

Doğum Yılı : 1970

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise : 1984-1987

Lisans : 1999-2003

Yabancı Dil : İngilizce

Yayınları :

Ayhan, B., Ekmekçi, Y. ve Tanyolaç, D., 2006, Bitkilerde Ağır Metal Zararları ve Korunma Mekanizmaları, Anadolu Üniversitesi, Bilim ve Teknoloji Dergisi, baskıda

Ayhan, B., Ekmekçi, Y., and Tanyolaç, D., 2005, Preliminary Studies on Maize (*Zea mays* L.) Cultivars Exposed to Cadmium Stress at Seedling Stage, II. International Environmental Protection Symposium, Kütahya, Turkey, 8-10 September (Poster)

Ekmekçi, Y., Tanyolaç, D., and Ayhan, B., 2006, Effect of Cadmium on Antioxidant Enzyme and Photosynthetic Activities in Leaves of Two Maize Cultivars, J. Plant Nutr., İncelemede