

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**AĞIR METAL STRESİNE BİTKİ CEVABINDA NİTRİK OKSİDİN  
(NO) KORUYUCU ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

**Maşuka SAKLI**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ERZURUM  
2011**

**Her hakkı saklıdır**



T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

AĞIR METAL STRESİNE BİTKİ CEVABINDA NİTRİK OKSİDİN (NO)  
KORUYUCU ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Prof. Dr. Ökkeş ATICI'nın danışmanlığında, Maşuka SAKLI (Dağdelen) tarafından hazırlanan bu çalışma 10/08/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği /oy çokluğu (3./3.)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : *Prof. Dr. Ökkeş Atıcı* İmza : *[Signature]*

Üye : *Doc. Dr. Ahmet Adıgüzel* İmza : *[Signature]*

Üye : *Yrd. Doc. Dr. Rahmi Dumlupınar* İmza : *[Signature]*

(imza)

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum  
Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ömer AKBULUT

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### AĞIR METAL STRESİNE BİTKİ CEVABINDA NİTRİK OKSİDİN (NO) KORUYUCU ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Maşuka SAKLI

Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

Bu çalışmada, bir bitkiye kadmiyum (Cd) stresinden önce uygulanan nitrik oksit (NO), bitki strese maruz kaldığında, antioksidatif stres toleransını artırabilme potansiyeli araştırılmıştır. Bu amaçla mısır (*Zea mays* cv. Karadeniz yıldızı) bitkilerine, Cd stresi öncesinde, iki farklı şekilde NO donörü olan sodyum nitroprusid (SNP) farklı seviyelerde (0.0, 0.01, 0.1, 0.5 mM) uygulanmıştır. Birincisinde, kum kültüründe yetiştirilen 12 günlük bitkilere SNP uygulanmış ve 14. günde farklı seviyelerde (0.0, 25, 50, 200 µM) Cd stresine maruz bırakılmışlardır. İkinci uygulamada ise tohumlar, ekilmenden önce SNP çözeltilerinde ön ıslatmaya bırakılmış ve daha sonra ekilmiştir. Yetişen fideler, 14. gün, aynı seviyelerdeki Cd stresine maruz bırakılmıştır. 17. gün her iki uygulamadan elde edilen bitkilerin yaprakları ve kökleri deney materyali olarak kullanılmıştır. Bitkilerin kök ve yapraklarından süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve peroksidaz (POX) aktiviteleri ile malondialdehid (MDA) ve içsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyeleri belirlenmiştir. SNP'nin doğrudan uygulandığı çalışma bulgularına göre, tek başına SNP uygulanmış bitki yapraklarında SOD aktivitesi düşerken, CAT ve POX aktivitesi artmıştır. Köklerde SNP enzimler üzerinde düzenli bir etki yapmamıştır. Tek başına Cd uygulanmış bitki yapraklarında, SOD aktivitesi düşerken, CAT ve POX aktivitesi artmıştır. Cd stresi köklerde enzimlerin aktivitesini düşürmüştür. SNP uygulanmış ve Cd'ye maruz kalmış (SNP+Cd) bitkilerde, CAT aktivitesi hem kökte hem de yapraklarda düşmüştür. POX aktivitesi ise 25 µM Cd stresinde, kökte artarken yaprakta düşmüş, ancak 50 ve 200 µM Cd stresinde bunun tam tersi olmuştur. SOD aktivitesi ise hem kökte hem de yaprakta 25 ve 50 µM Cd stresinde SNP ile artmış fakat 200 µM Cd'de aktivite kökte artarken yaprakta düşmüştür. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı, ayrı ayrı SNP ya da Cd uygulanmış bitkilerin kök ve yapraklarında düşmüştür. SNP+Cd uygulamaları ile ise kökte ve yapraklarda genelde artmıştır. MDA miktarında, SNP ile belirgin bir değişim olmamıştır. SNP+Cd'de, MDA kök ve yapraklarda 25 ve 50 µM Cd stresinde düşerken, 200 µM Cd'de artmıştır. SNP'nin tohumlara uygulandığı çalışmalarda, CAT aktivitesi tek başına SNP ya da Cd uygulanmış bitkilerin yapraklarında artarken köklerinde düşmüştür. SNP+Cd'de ise, köklerde artarken, yapraklarda ise düşmüştür. POX aktivitesi, SNP uygulanmış yapraklarda artarken, köklerde düşmüştür. Cd uygulanmış bitkilerde ise kök ve yapraklarda düşmüştür. SNP+Cd uygulanmış bitkilerde, POX aktivitesi hem yaprak hem de köklerde düşmüştür. SOD aktivitesinde SNP uygulanmış bitki kök ve yapraklarında değişmemiştir. Hem Cd uygulanmış hem de SNP+Cd uygulanmış bitkilerin yapraklarda ise artmıştır. Köklerde 0.01 mM SNP'de aktivite Cd stresinde düşerken, diğer SNP uygulamalarında belirgin bir değişim sergilememiştir. MDA ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarları birinci uygulamadan elde edilen sonuçlara benzer nitelikte olmuştur.

**2011, 89 Sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Kadmiyum, nitrik oksit, mısır, *Zea mays*, antioksidan enzim, reaktif oksijen, hidrojen peroksit, lipid peroksidasyonu

## ABSTRACT

MS Thesis

### INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE ROLE OF NITRIC OXIDE (NO) IN PLANT RESPONSE TO HEAVY METAL STRESS

Maşuka SAKLI

Atatürk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

In this work, the effect of exogenous nitric oxide (NO) applied a plant before cadmium stress (Cd) was investigated on the potential to increase the stress tolerance when the plant exposed to the stress. For this purpose, before Cd stress, NO donor sodium nitroprusside (SNP) at different levels (0.0, 0.01, 0.1, 0.5 mM) was applied to maize (*Zea mays* cv. Karadeniz yıldızı) in two different ways. In the first, SNP was directly applied on 12-day plants and then the plants were exposed to Cd at different levels (0.0, 25, 50, 200 µM) on 14 days. In the second, before sowing the seeds were presoaked in the SNP solutions and then the seeds were planted. The obtained seedlings were exposed to the same levels of Cd on 14 days. On 17 days, the leaves and roots of plants from the applications were used as experimental material. In the tissues of plants, activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POX) were determined. In addition, the levels of malondialdehyde (MDA) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were also evaluated in the same tissues. When the results in which SNP was applied to the plants are examined; in the leaves applied SNP, SOD activity decreased while CAT and POX activities increased. SNP did not affect the enzymes in the roots. Similarly, in the plant leaves applied Cd, the activity of SOD decreased whereas CAT and POX activity increased. But Cd stress decreased the activity of all enzymes in the roots. In the plants applied SNP and then exposed to Cd stress (SNP+Cd), CAT activity decreased both root and leaves. The activity of POX, under 25 µ M Cd stress, decreased in the leaves while increase in the roots, but plants under 50 and 200 µM Cd stress, an opposite situation was determined. SOD activity was increased by SNP+Cd treatment in both leaves and roots under 25 and 50 µM Cd but plants under 200 µM Cd stress increased in the roots while decreased in the leaves. The amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decreased in general in the plant's roots and leaves applied SNP or Cd individually. But SNP+Cd applications generally increased it in the root and leaves of the plants under 25 and 50 µM Cd stress. The amount of MDA did not show a significant variation in SNP applications alone. In the plants exposed to SNP+Cd stress, MDA content decreased in roots and leaves under 25 and 50 µM Cd stress, but increased in plants tissues under 200 µ M Cd stress. When the studies in which SNP was presoaked to seeds are examined; CAT activity increased in the leaves applied SNP or Cd alone while decreased in the roots of plants. In plants applied SNP+Cd, CAT activity increased in roots while decreased in the leaves of plants. POX activity increased in the leaves of the plant applied SNP while it decreased in their roots. It also decreased in roots and leaves of the plants applied Cd. In addition, POX activity decreased in roots and leaves of the plants applied SNP+Cd. It could not be obtained a significant variation at SOD activity from roots and leaves of plants applied SNP. Cd treatments increased SOD activity in roots and leaves of plants. SOD activity increased in the leaves of plants applied SNP+Cd. But its activity in roots was decreased by 0.01 mm SNP+all Cd treatments while other SNP+Cd treatments could not show a significant variation. MDA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contents were a similar nature to the results of the first application.

**2011, 89 Pages**

**Keywords:** Cadmium, nitric oxide, maize, *Zea mays*, antioxidant enzyme, reactive oxygen, hydrogen peroxide, lipid peroxidation

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada her an bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

İlgi, yardım ve desteğini gördüğüm Sayın Deniz TİRYAKİ, Sayın Arş. Gör. Nevzat ESİM'e tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca her an maddi ve manevi desteğini esirgemeyen eşim Osman SAKLI'ya , ablam Şahika DAĞDELEN'e ve aileme şükranlarımı sunarım.

Maşuka SAKLI

Temmuz 2011

## İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	15
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	19
3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	19
3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları.....	19
3.3. Yöntemler .....	22
3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi ve SNP ile Cd uygulamalarını yapılması .....	22
3.3.2. Yaprak ve köklerde antioksidan enzim aktivitesinin belirlenmesi .....	24
3.3.2.a. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi .....	25
3.3.2.b. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi .....	26
3.3.2.c. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi .....	27
3.3.3. Kök ve yapraklarda hidrojen peroksit miktarının belirlenmesi.....	27
3.3.4. Kök ve yapraklarda Lipid Peroksidasyon seviyesinin (MDA miktarının) belirlenmesi .....	28
3.4. İstatistik Analiz.....	28
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>29</b>
4.1. SNP'nin Fidelere Uygulandığı Çalışmalar ve Elde Edilen Bulgular .....	29
4.1.1. Antioksidan Enzim Aktivitesi Sonuçları.....	30
4.1.1.a. Katalaz Aktivitesine Ait Sonuçlar .....	30
4.1.1.b. Peroksidaz Aktivitesi Sonuçları .....	33
4.1.1.c. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Sonuçları.....	36
4.1.2. Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) ve Lipid Peroksidasyonuna Ait Sonuçlar.....	39
4.1.2.a. İçsel H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarlarına ait sonuçlar .....	39

4.1.2.b. Lipid peroksidasyon seviyesi (MDA miktarı) Sonuçları .....	42
4.2. SNP'nin Tohumlara Uygulandığı Çalışmalar ve Elde Edilen Bulgular .....	45
4.2.1. Antioksidan Enzim Aktivitesine Ait Sonuçları .....	45
4.2.1.a. Katalaz Aktivitesi Sonuçları .....	45
4.2.1.b. Peroksidaz Aktivitesi Sonuçları .....	49
4.2.1.c. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Sonuçları.....	52
4.2.2. Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) ve Lipid Peroksidasyonuna Ait Sonuçlar.....	55
4.2.2.a. İçsel H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Miktarına Ait Sonuçlar .....	55
4.2.2.b. Lipid peroksidasyon seviyesi (MDA miktarı) Sonuçları .....	58
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>61</b>
5.1. SNP'nin Fidelere Uygulandığı Çalışmalara Ait Sonuçların Değerlendirilmesi..	63
5.1.1 Antioksidan Enzim Aktivitelerine Ait Sonuçların Değerlendirilmesi .....	63
5.1.2 MDA ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Belirlenmesinden Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi ..	65
5.2. SNP'nin Tohumla Uygulandığı Çalışmalara Ait Sonuçların Değerlendirilmesi .	68
5.2.1 Antioksidan Enzim Aktivitelerine Ait Sonuçların Değerlendirilmesi .....	69
5.2.2 MDA ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Belirlenmesinden Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi ..	71
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>75</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>90</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

$\mu\text{L}$	:	Mikrolitre
$\mu\text{M}$	:	Mikromolar
APX	:	Askorbat peroksidaz
CAT	:	Katalaz
cDNA	:	Siklik Deoksiribo Nükleik Asit
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
E.C	:	Enzim kod numarası
E.Ü	:	Enzim ünitesi
EDTA	:	Etilendiamin tetra asetik asit
GR	:	Glutasyon redüktaz
kDA	:	Kilo dalton
mM	:	Milimolar
NAD	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADP(H)	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NBT	:	Nitroblue tetrazolium klorür
NiR	:	Nitrit Redüktaz
NO	:	Nitrik Oksit
$\text{NO}^-$	:	Nitroksil Anyonu
$\text{NO}^+$	:	Nitrozonyum İyonu
$\text{NO}_2^-$	:	Nitrit
$\text{NO}_3^-$	:	Nitrat
NOS	:	Nitrik Oksit Sentaz
NR	:	Nitrat Redüktaz
$\text{OH}^\cdot$	:	Hidroksil radikali
$\text{ONOO}^-$	:	Peroksinitrit
POX	:	Peroksidaz
PVP	:	Polivinilpirrolidon
ROS	:	Reaktif oksijen türleri



rpm	:	Devir/dakika
SNAP	:	S-Nitroso-N-Asetil-Penisilamin
SNP	:	Sodyum Nitropurid
SOD	:	Süperoksit dismutaz
TBA	:	Tiobarbutirik asit
TCA	:	Trikloroasetik asit
<i>x g</i>	:	Yerçekimi ivmesinin katı
XOR	:	Ksantin Oksidoredüktaz

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.1.</b> NO'in muhtemel biyosentez yolları (Wojtaszek, 2000 Selçukcan,2005	...10
<b>Şekil 1.2.</b> NOS aktivitesiyle NO üretim(Selçukcan,2005)	.....11
<b>Şekil 1.3.</b> NR ile NO üretimi(Selçukcan,2005)	.....11
<b>Şekil 3.1.</b> Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik.....	26
<b>Şekil 4.1.</b> SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin yapraklarına ait (CAT) aktivitesi sonuçları.....	32
<b>Şekil 4.2.</b> SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin köklerine ait katalaz (CAT) aktivitesi sonuçları	..... 32
<b>Şekil 4.3.</b> SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin yapraklarına ait peroksidaz (POX) aktivitesi sonuçları.....	35
<b>Şekil 4.4.</b> SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin köklerine ait peroksidaz (POX) aktivitesi sonuçları.....	35
<b>Şekil 4.5.</b> SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin yapraklarına ait süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi sonuçları.....	38
<b>Şekil 4.6.</b> SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin köklerine ait süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi sonuçları	..... 38
<b>Şekil 4.7.</b> SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin yapraklarına ait hidrojen peroksit( $H_2O_2$ ) miktarı sonuçlar.....	41
<b>Şekil 4.8.</b> SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin köklerine ait hidrojen peroksit( $H_2O_2$ ) miktarı sonuçları	.....41
<b>Şekil 4.9.</b> SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin yapraklarına ait lipid peroksidasyonu seviyesi (MDA miktarı olarak).....	44
<b>Şekil 4.10.</b> SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin köklerine ait lipid peroksidasyonu seviyesi (MDA miktarı olarak)	.....44
<b>Şekil 4.11.</b> Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz	

	kalmış mısır bitkisinin yapraklarına ait katalaz (CAT) aktivitesi sonuçları.....	48
<b>Şekil 4.12.</b>	Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin köklerine ait katalaz (CAT) aktivitesi sonuçları.....	48
<b>Şekil 4.13.</b>	Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin yapraklarına ait peroksidaz (POX) aktivitesi sonuçları.....	51
<b>Şekil 4.14.</b>	Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin köklerine ait peroksidaz (POX) aktivitesi sonuçları.....	51
<b>Şekil 4.15.</b>	Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin yapraklarına ait süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi sonuçları .....	54
<b>Şekil 4.16.</b>	Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin köklerine ait süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi sonuçları.....	54
<b>Şekil 4.17.</b>	Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin yapraklarına ait hidrojen peroksit( $H_2O_2$ ) miktarları .....	57
<b>Şekil 4.18.</b>	Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin köklerine ait hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) miktarları.....	57
<b>Şekil 4.19.</b>	Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin yapraklarına ait MDA miktarları .....	60
<b>Şekil 4.20.</b>	Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin köklerine ait MDA miktarları .....	60

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 4.1.</b> Kontrol şartlarında SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisine ait katalaz (CAT) aktivitesi sonuçları.....	31
<b>Çizelge 4.2.</b> Kontrol şartlarında SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisine ait peroksidaz (POX) aktivitesi sonuçları .....	34
<b>Çizelge 4.3.</b> Kontrol şartlarında SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisine ait süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi sonuçları.....	37
<b>Çizelge 4.4.</b> Kontrol şartlarında SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisine ait hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) miktarı sonuçları .....	40
<b>Çizelge 4.5.</b> Kontrol şartlarında SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisine ait lipid peroksidasyonu seviyesi (MDA miktarı olarak) sonuçları.....	43
<b>Çizelge 4.6.</b> Kontrol şartlarında SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisine ait katalaz aktivitesi(CAT) sonuçları.....	47
<b>Çizelge 4.7.</b> Kontrol şartlarında SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisine ait peroksidaz (POX) aktivitesi sonuçları .....	50
<b>Çizelge 4.8.</b> Kontrol şartlarında tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisine ait süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi sonuçları.....	53
<b>Çizelge 4.9.</b> Kontrol şartlarında SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisine ait hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) miktarı sonuçları.....	56
<b>Çizelge 4.10.</b> Kontrol şartlarında SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisine ait lipid peroksidasyonu (MDA miktarları) seviyeleri .....	59

## 1. GİRİŞ

Doğadaki canlıların önemli bir bölümünü oluşturan bitkiler, canlı yaşamının devamlılığı açısından ekosistemin temel elamanlarından biridir. Hem doğal hem de tarımsal koşullar altında, bitkiler sıklıkla çevresel streslere maruz kalırlar. Dünya genelinde bitkisel üretimde ürün kaybının başlıca nedeni abiyotik streslerdir ve önemli tarımsal ürünlerin ortalama üretimini yaklaşık %50 azaltarak tarım endüstrisinin geleceğini tehdit etmektedir (Mahajan and Tuteja 2005).

Stres bitkilerde zarar meydana getiren güç (potansiyel) olarak tanımlanmıştır (Hale and Orcutt 1987; Kocaçalışkan 2004). Stres genellikle bitkinin yaşayabilirlik, verimlilik, büyüme (biyolojik kütle birikimi) ya da primer özümleme işlemlerine (CO<sub>2</sub> ve mineral alınımı) dayanılarak ölçülmektedir (Taiz and Zeiger 2006). Bitkiler üzerinde stresin dereceleri geniş sınırlar içerisinde dağılım gösterir ve sıfır stresten, ılımlı ve şiddetli strese kadar çok değişken dereceleri bulunur. Stresin derecesi bitki türüne göre de değişebilmektedir. Yani bir bitki türünde yüksek derecede strese sebep olan bir faktör, diğer bitki türünde ılımlı veya sıfır strese sebep olabilir. Strese dayanıklılık, bitkinin büyüme ve gelişme dönemine göre de değişebilir. Bazı durumlarda bir bitkinin bütünü veya bir kısmı strese karşı dirençli olabilirken, diğer bazı kısımları ise strese daha duyarlı olabilmektedir (Hale and Orcutt 1987; Salisbury and Ross 1992; Taiz and Zeiger 2006). Birçok bitki, stresin öldürücü olmayan dozlarına maruz kaldıktan sonra strese daha dayanıklı olabilir. Bu olay kuvvetlenme (hardening) veya aklimasyon (uyum veya alışım) safhası olarak adlandırılır. Diğer bir yaklaşımla aklimasyon yeni bir çevreye maruz kalan bitkideki kalıtsal olmayan değişiklikler olarak tarif edilir (Hale and Orcutt 1987; Salisbury and Ross 1992; Kocaçalışkan 2004). Stresle alakalı diğer bir kavram adaptasyondur, bu ise pek çok nesil boyunca seçim sonucu kazanılan, genetiksel olarak belirlenmiş direncin düzeyini belirtir (Taiz and Zeiger 2006). Strese dayanıklılığın belli başlı iki tipinden birisi sakınma diğeri de toleranstır. Sakınma, dış çevrede stres oluşturabilecek koşullar olmasına rağmen, bitki hücrelerini stres altına sokmayan bir iç ortam sağlanmasıdır. Stres kavramı strese tolerans ile de yakından

ilişkilidir. Stres toleransı, bitkinin uygunsuz ortam koşulları ile başa çıkma potansiyelidir. Stres toleransı daha fazla tercih edilmekle birlikte, literatür de bu terimin yerine sıklıkla strese direnç terimi de kullanılmaktadır (Bray *et al.*2000;Mahajan and Tuteja 2005; Kocaçalışkan 2008).

Dünya üzerindeki kullanılabilir alanlar stres faktörlerine göre sınıflandırıldığında, doğal bir stres faktörü olan kuraklık stresi %26, bunu %20 ile ağır metalleri de içine alan mineral stresi ve %15 ile soğuk ve don stresi takip etmektedir. Bunların dışında kalan diğer tüm stresler %29'luk bir pay alırken, yalnızca %10'luk bir alan herhangi bir çevresel stres faktörüne maruz kalmamaktadır (Blum 1986; Güler 2008).

Dünya topraklarının %25'nin mineral eksikliği yönünden stres doğuracak durumda olduğu belirlenmiştir. Bu stresin etkisi bitkilerde mineral maddelerin eksikliği veya fazlalığı yüzünden ortaya çıkabilir. Doğadaki elementlerden 16 tanesinin bitkiler için esas element olduğu kabul edilmektedir. Bunlar bitki büyümesi için gerekli ve zorunlu olan elementlerdir. Bunların bir kısmı bitki dokularında bol miktarda bulunan makro elementler iken (C, H, O, N, P, K, S, Ca, Mg), bir kısmı ise çok az miktarda bulunan mikro elementlerdir (B, Cu, Zn, Fe, Mn, Cl, Mo). Bu elementlerin eksikliğinde yetersiz beslenme yüzünden ve fazlalığında ise toksik etki yüzünden stres oluşur. Bitkilerde strese neden olan elementler daha çok topraktan alınanlardır. Bunların strese neden olmaları çeşitli faktörlere bağlıdır (Kocaçalışkan 2001; Kadioğlu 1999).

- 1- Minerallerin topraktaki miktarı (azlığı – fazlalığı),
- 2- Bitki için toksik olup olmamaları
- 3- Topraktaki formu (alınış formunun bulunamaması – eksiklik),
- 4-Minerallerin bitkilere faydalı olabilmesi için geçirmeleri gereken kimyasal değişikliklerin oluşup oluşmaması,
- 5- Toprak çözeltisinin su miktarı,
- 6- Toprağın pH'sı (elementlerin pH'ya göre çözünmesi),
- 7- Minerallerin (iyonların) absorpsiyonu ve taşınması.

Bitki için esas olmayan bazı elementler de çoğunlukla eser miktarda buldukları zaman bile toksiktirler. Bunların atmosferde, toprakta ve sudaki birikimleri önemli çevre problemlerine yol açar. Ayrıca bitki verimliliğinde önemli kayıplara ve diğer canlılar için tehlikeli sağlık problemlerine sebep olurlar. Bunlar içerisinde en fazla dikkati çeken toksik ağır metaller arasında, kadmiyum (Cd), kurşun (Pb) ve alüminyum (Al) sayılabilir (Gratao *et al.* 2005).

Ağır metallerin gelişmekte olan endüstri, tarımsal teknoloji alanlarında kullanımının artması ve biyolojik birikim, toksisite sebebiyle; ağır metaller yaşayan organizmalar için büyük abiyotik stres faktörlerinden biri olmuştur. Ağır metallerin bitkilerdeki toksik etkisi, bitkilerin yer üstü ve yer altı bölümlerinin büyüme süreçlerini etkileyen geniş, güçlü ve hızlı bir inhibisyonudur. Bunun yanında fotosentez elemanlarının aktivitelerini düşürür, sıklıkla da senesens sürecinin ilerlemesi ile bağlantılıdır (Krupa *et al.* 1993; Maksymiec *et al.* 1994, 1995; Ouzounidou *et al.* 1995; Maksymiec and Baszynski 1996; Skorzynska-Polit and Baszynski 1997; Weckx and Clijsters 1997; Molas 2002; Sobkowiak and Dekert 2003; Alaoui-Sosse *et al.* 2004; Lin *et al.* 2005). Ağır metallerin etkisiyle bitki kökleri genellikle kısalır, incelir ya da az gelişir ve hatta ağır metallerin yüksek konsantrasyonları, bitkilerin ölümüne yol açar (Casella *et al.* 1988).

Kadmiyum (Cd) yüksek hareket yeteneğine sahip olması ve düşük konsantrasyonlarda bitkileri ve diğer canlıları etkilemeye başlamasından dolayı çok tehlikeli ağır metallerden bir tanesidir (CEPA 1994; Prasad *et al.* 1995; Das *et al.* 1997; Kamnev and Van der Lelie 2000). Genel olarak toprakta bulunan kadmiyum konsantrasyonu değişik seviyelerde bulunur ve toprak çözeltisi en az 35 µg/kg kadmiyum içerir. Bu toprakta sadece en fazla kadmiyum toplayan bitki türlerinden biri olan *Brassicaceae thlaspi caerulescens* büyüyebilir (Toppi *et al.* 1999). Kontamine alanlarda ortalama olarak 4 mg/kg ve kanalizasyon suyu ve endüstriyel atıklar nedeniyle metal yönünden zenginleştirilmiş toprakta ise 300 mg/kg kadmiyum bulunabilir (De la Rosa *et al.* 2004; Dorlhac de Borne *et al.* 1998). Küresel olarak kadmiyumun endüstride 5 adet uygulama alanı vardır. Bunlar; pil üretimi (%50), kaplama maddeler (%20), boya maddeleri (%18) plastik ve sentetik ürünler (%6) ve alaşımlardır (%6) (CEPA 1994; Lindqvist 1995;

Siripornadulsil *et al.* 2002). Kadmiyum pillerden, enerji istasyonlarından, ısıtma sistemlerinden, ağır metal endüstrisinden, su dezenfektasyonundan, şehir trafiğinden, çimento fabrikalarından ve fosfat gübresinin üretiminden fazla bir şekilde çevreye salınan bir metaldir (Toppi *et al.* 1999; Prasad 1995; Zornoza *et al.* 2002). Kadmiyumun bitki, hayvan ve insan sağlığı üzerine yıkıcı etkileri vardır, buna rağmen tüketimi halen gün geçtikçe artmaktadır (CEPA 1994).

Kadmiyumun bitki metabolizmasında çok önemli zararlara ve oksidatif strese neden olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir (Schützendübel *et al.* 2001; Vitoria *et al.* 2001 Benavides *et al.* 2005; Gratao *et al.* 2005). Bitkilerde kadmiyum çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik süreçleri bozar, hücre ölümüne ve büyümenin engellenmesine neden olur (Chaoui *et al.* 1997; Toppi and Gabrielli 1999 Sandalio *et al.* 2001 Guo *et al.* 2009; Popova *et al.* 2009; Xu *et al.* 2009). Mısır, pirinç ve buğdayın kadmiyuma toleransları karşılaştırıldığında, mısırdaki kadmiyumun diğer iki türden daha az biriktiği belirlenmiştir (Wojcik and Tukendorf 1999). Kadmiyumun doğrudan veya dolaylı olarak fotosentetik süreci engellediği de gösterilmiştir (Krupa and Baszynski 1995). Bitkilerdeki kök büyüme inhibisyonu kadmiyumun ve diğer ağır metallerin en önemli belirtilerinden biridir (Metwally *et al.* 2003; Rodriguez-Serrano *et al.* 2006; Kim *et al.* 2007; Groppa *et al.* 2008). Kadmiyumun pirinç köklerindeki toksik etkisi birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Hsu and Kao 2005; Guo *et al.* 2007; Yeh *et al.* 2007). Kadmiyumun oluşturduğu oksidatif strese karşı ayçiçeği bitkisinde NO'nun koruyucu rol oynadığı rapor edilmiştir (Laspina *et al.* 2005). Ayçiçeğinde Cd, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz (GR) aktivitelerini azalttığı, lipid peroksidasyon sürecini başlattığı ileri sürülmüştür (Gallego *et al.* 1996). Lipid peroksidasyonunun başlaması kadmiyum toksisitesi altındaki *Phaseolus vulgaris* ve *Phaseolus aureus*'da görülmüştür (Lozano-Rodriguez *et al.* 1997).

Birçok çevresel strese olduğu gibi Cd stresi de bitki metabolizmasında ortaya çıkardığı en önemli sorunlardan birisi 'Reaktif Oksijen Türlerinin' (ROS) oluşumuna sebep olmalarıdır. ROS yüksek derecede reaktiftir ve bitkiler için toksiktir ayrıca proteinler, lipitler, DNA ve karbohidratlara zarar vererek hücre ölümüne neden olabilir (Noctor and



Foyer 1998; Apel and Hirt 2004; Banu *et al.* 2009; Guo *et al.* 2009). ROS, hücrelerdeki savunmaya bağlı genlerin indüksiyonu için yayılabilir bir sinyal olarak çalışır. ROS bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok reaktif moleküller olarak tanımlanabilir. Reaktif oksijen türleri (veya serbest radikaller) arasında hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), süperoksid anyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ) ve hidroksil ( $\cdot OH$ ) radikali gibileri sayılabilir. Oksijen radikalleri içerisinde en reaktif ve en toksik olan  $\cdot OH$  radikali, su dahil rastladığı her moleküle tepkimeye girebilir. Bütün bu tepkimeler  $\cdot OH$ 'ın paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır (Halliwell 1994). Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur.  $\cdot OH$ 'ın başlıca hedefi doymamış yağ asitleridir ve zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir (Nishiyama *et al.* 1998; Güler 2008). Süperoksid gruplarından hızlı bir şekilde oluşan singlet oksijen ( $^1O_2$ ), hücre zarlarının glikolipid, fosfolipid, sterol ve gliserid yapısındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksitler, aldehitler, hidroksi yağ asitleri ve pentan gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünlerini oluştururlar (Slesak *et al.* 2007). Son derece aktif olan ve hücre hasarına yol açan süperoksid grubu ( $O_2^{\cdot-}$ ), bakır içeren bir enzim olan süperoksid dismutaz enzimiyle  $H_2O_2$  ve oksijene çevrilir. Süperoksid grubuna göre daha az etkili olan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucu oluşur. Süperoksitin olduğu yerlerde (peroksizomlar, elektron taşıma zinciri, plazma membranı, ekstraselüler matriks) önemli miktarda  $H_2O_2$ 'de üretilir (Slesak *et al.* 2007). Hidrojen peroksit, çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal süreçlere aracılık eder (Neill *et al.* 2002; Bright *et al.* 2006; McInnis *et al.* 2006). İlginç bir şekilde hidrojen peroksit, antioksidan enzimlerde artışlara neden olabilir (Pastori and Trippi 1992; Sairam and Srivastava 2000). Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz.  $H_2O_2$ 'nin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni demir ve bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalının öncülü olarak davranmasıdır. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan  $H_2O_2$ 'nin ortamdan uzaklaştırılması gerekir (Halliwell 1994; Güler 2008). Bu görevi katalaz ve peroksidaz gibi antioksidan

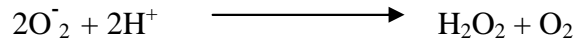
enzimler su ve oksijen gibi ürünlere dönüştürerek yerine getirir. Oksidatif streslere tolerans sağlamada bitkilerin bu enzimlerin hücrel seviyelerini düzenlenmesi oldukça önemlidir (Gechev *et al.* 2002; Minibaeva and Gordon 2003a, Mutlu 2005). Oksidatif stres, biyotik ve abiyotik stres koşullarında ortaya çıkan temel bir durumdur ve reaktif oksijen türleri ile antioksidan savunma arasında belirgin bir dengesizlik olduğu zaman meydana gelir (Foyer and Noctor 2000). Oksidatif stresin, çeşitli bitkilerde düşük sıcaklık (Taşğın *et al.* 2005), kuraklık (Menconi *et al.* 1995, Sairam *et al.* 1998, 2001), yüksek sıcaklık (Davidson *et al.* 1996, Sairam *et al.* 2000) ve ağır metal (Schützendübel *et al.* 2001) streslerine bir cevap olarak ortaya çıktığı rapor edilmiştir.

Serbest radikallerin (ROT) uyardığı hücre yıkımında önemli bir metabolik olay da, doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımına yol açan o lipid peroksidasyonu (LPO)'dur. Lipid peroksidasyonu; membran bütünlüğünün yok olmasına, hücrenin elektrolitlere permeabilitesinin artmasına neden olur. Özellikle kalsiyum ve sodyum iyonlarının hücre içerisine kontrolsüz geçişi, hücrenin enerji oluşturan mekanizmalarını olumsuz yönde etkileyebilir. İntrasellüler kalsiyum iyonlarındaki artış; protein ve lipidlerde daha fazla hasara neden olabilecek proteaz ve fosfolipazı aktive eder. Bu aynı zamanda DNA'da yapısal hasara ve hücre ölümüne neden olabilecek enzim inaktivasyonuna neden olabilir (Halliwell 1994). Birçok hastalıkta meydana gelen doku yıkımı serbest radikaller ve LPO olayı sonucu oluşur (Şimşek 1999). LPO olayı ile oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Akkuş 1995). Biyolojik sistemlerde LPO'yu başlatan serbest radikalın, süperoksit anyonu ile özellikle de hidroksil radikali olduğu kabul edilmektedir. Serbest radikal etkisi ile yağ asidi zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidinin radikal özelliği kazanmasına neden olmaktadır. Böylece oluşan lipid radikali, kararsız bir bileşik haline geçmiş olur. Molekül içi konjuge edilen bağlarının farklı pozisyonlara gelmesi ile değişikliğe uğrayabilen kararsız lipid radikalının moleküler oksijenle tepkimesi sonucu lipid peroksit radikali meydana gelir (Spiteller 2001; Kuru 2007).

Üç veya daha fazla çift bağ içeren (poliansature) yağ asitlerinin peroksidasyonunda, malondialdehid (MDA) meydana gelir (Yılmaz vd. 2003). MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik yada kantitatif bir indikatörü değildir, fakat LPO olayının

derecesi ile iyi bir korelasyon gösterir. Bu sebeple organizma da oluşan LPO düzeyini ölçmek için MDA seviyelerinin ölçümü, sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Heath and Packer 1968). MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve oluşan bu çözeltinin absorbans değerlerinden LPO'nun derecesi saptanabilmektedir (Yılmaz vd. 2003; Kuru 2007).

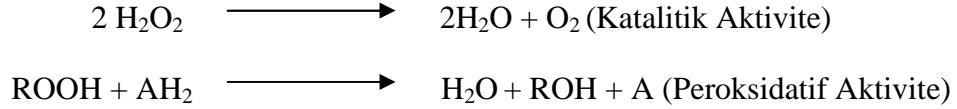
Bitkilerde gerek normal, gerekse stres şartlarında üretilen ROT bileşiklerinin bertaraf edilmesinde birçok antioksidan bileşik görev alır. Bunlar içerisinde antioksidan enzimler önemli bir yer teşkil eder. Bitki hücrelerinde bulunan önemli bir antioksidan enzim, süperoksit dismutazdır (E.C 1.15.1.1). Bu enzimin, süperoksit radikalini ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve moleküler oksijene çevirebildiği gösterilmiştir (Sairam and Srivastava 2000; Eyidoğan vd. 2003; Minibaeva and Gordon 2003). Bu aşağıdaki şekilde özetlenebilir.



SOD'un biri sitoplazmada, diğeri mitokondride olmak üzere iki izoenzimi bilinmektedir. Ökaryotlardaki mitokondriyal SOD, karakteristik  $Mn^{+2}$  muhtevası ve amino asit dizilişi bakımından birçok bakterininkine benzer. Buna karşılık sitoplazmadaki ise, tamamen farklı yapıya sahiptir ve  $Cu^{+2}$  ile  $Zn^{+2}$  iyonu ihtiva eder. Bu enzim, oldukça yüksek konsantrasyonda ve aktif halde bulunur. Çünkü mitokondride kullanılan oksijenin %1-5 arası süperoksit'e dönüşmekte ve ancak yüksek bir SOD aktivitesi tarafından bertaraf edilebilmektedir. Birçok çevresel ve biyotik streslerde hücrel SOD miktarının üretiminde artış olduğu belirlenmiştir (Hernandez *et al.* 2001; Minibaeva and Gordon 2003a; Eyidoğan vd. 2003). Ağır metallerin de SOD aktivitesi üzerine etkileri vardır. Örneğin; Cd stresi farklı bitki türlerinde SOD aktivitesinde çoğalmaya neden olur (Guo *et al.* 2009; Milone *et al.* 2003; Sandalio *et al.* 2001).

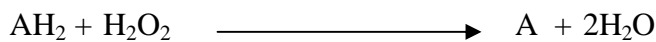
Antioksidan enzimlerden biri de katalazdır (E.C 1.11.1.6). Bu enzim, yüksek konsantrasyondaki  $H_2O_2$ 'nin, 2 elektronunu kullanarak su ve oksijene indirgenmesini

katalizleyen demir porfirin içeren tetramerik ve yüksek molekül ağırlığına sahip bir enzimdir (McClung 1997; Chaudiere and Ferrari 1999). Aynı zamanda CAT, düşük  $H_2O_2$  seviyelerinde alkoller, askorbat ve fenol içeren indirgenmiş substratları kullanarak peroksidatif aktivite gösterebilir (Chaudiere and Ferrari 1999). CAT'ın görev aldığı reaksiyonlar aşağıdaki gibi özetlenebilir.



Pek çok bitki hücresinde enzimin büyük bir kısmı,  $H_2O_2$ 'nin yüksek olduğu peroksizomlarda bulunur. CAT çok az miktarda mitokondri matriksinde de belirlenmiştir. CAT'ın bitki dokusunda  $H_2O_2$ 'nin uzaklaştırılmasında önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Patkowski and Urbanek 2003). CAT, solunum zincirinde, oksijenin eksik indirgenmesinden oluşan  $H_2O_2$ 'yi, su ve  $O_2$ 'ye indirger (Chaudiere and Ferrari 1999). CAT'ın hücrelerdeki temel fonksiyonu, moleküler  $O_2$  mevcudiyetinde metabolizmanın bazı kademelerinde üretilen,  $H_2O_2$ 'nin ve ROOH gibi bir peroksinin radikalliğini gidererek özellikle membranlarda oluşabilecek geri dönüşümsüz hasarları engellemektedir.

Antioksidan enzimlerden bir diğeri peroksidaz (E.C 1.11.1.7) enzimidir. POX,  $H_2O_2$ 'yi kullanarak fenoller ve hidrokinonlar gibi çok sayıda aromatik bileşenlerin dehidrojenasyonunu katalizleyen (Bergmeyer and Grabl 1983) ve *HEM* prostetik grubuna sahip bir enzimdir (Banci 1997; Kim *et al.* 2000). Çoklu moleküler formlara ve geniş bir hücre altı dağılımına sahip olan POX, bitkilerde büyük oranda bulunur. POX, elverişsiz çevresel faktörler altında üretilen zararlı oksijen radikallerinin seviyesini düzenler ve bitki hücresinin en önemli koruyucu enzimlerinden birisidir (Bakardjieva and Christov 1996). Molekül ağırlıkları 35-100 kDa arasında değişmektedir. POX'lar aşağıdaki reaksiyonu katalizlerler.



Bitkilerde bu reaksiyon sonucu;

1. Serbest fenollerin oksidatif polimerizasyonu ile hücre duvarında lignin ve suberin biyosentezi gerçekleşir.

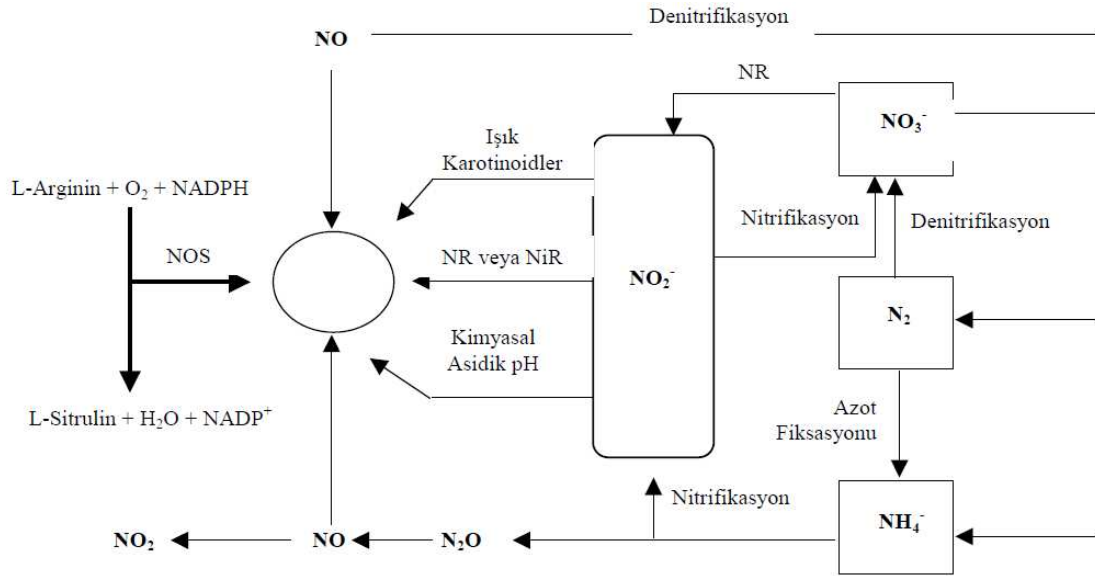
2. Hücre duvarına bağlı fenollerin oksidatif polimerizasyonu ile çapraz bağlanmalar olur ve hücre duvarı sertleşir. Sonuç olarak peroksidazlar, hidrojen peroksidi kontrol altında tutarak hücre duvarının şekillenmesini sağlarlar (De Pinto and De Gara 2004).

POX'ların spesifik aktivite, substrat ilgisi, kofaktörler, inhibitörlere hassasiyet ve optimum pH gibi biyokimyasal özellikleri farklı olan çok sayıda izoenzimleri bulunur (Banci 1997). Düşük sıcaklık, SO<sub>2</sub>, tuzluluk, parazit enfeksiyonu, patojenler, UV-ışık tesirleri gibi çeşitli stres faktörlerinden yüksek seviyede etkilenen POX aktivitesi, bu enzimin stres enzimi olarak anılmasına sebep olmuştur (Kerby and Somerville 1992; Bakardjieva Christov 1996; Chanda and Singh 1997; Kim *et al.* 2000; Lee and Lin 1996a,b). Cd ile negatif ilişki, POX aktivitesinde çoğalmaya neden olur (Metwally *et al.* 2005). Bitkisel POX; yapraklarda, yaralanan gövdelerde, kotiledon yapraklarda, çiçek saplarında belirlenmiş ve bu doku hücrelerinde nukleus, mitokondri, ribozom, hücre membranları ve hücre dışında (apoplast) lokalize olabilmektedir (Bergmeyer and Grabl 1983; Banci 1997; Hamed *et al.* 1998; Kim *et al.* 2000; Taşgın *et al.* 2006; Mutlu *et al.* 2009). POX enziminin çok sayıda fizyolojik olayda rol oynadığı ve birçok metabolik olayın gerçekleşmesine yardımcı olduğu açıktır. Bu yüzden bu kadar çok işlev ile bağdaştırılan POX enzimi ile ilgili araştırmalar yoğun bir şekilde sürdürülmektedir.

Nitrik oksit/azot monoksit (NO) uzun yıllardan bu yana bilim dünyasında bilinen gaz yapıda bir moleküldür. Bitkilerde NO'nun etkileri ile ilgili çalışmalar azot oksitler tarafından oluşturulan atmosferik kirlenme üzerine yoğunlaşmıştır. Bitkilerde NO salınımı ve bitki büyümesi üzerine olan etkileri ilk kez 1970' li yıllarda tanımlanmıştır (Anderson and Mansfield 1979; Klepper 1979). Sonraki yıllarda bitkilerin sadece atmosferik NO'ya maruz kalmadığı aynı zamanda bitkilerin önemli miktarlarda içsel olarak NO ürettikleri de kesinlik kazanmıştır (Wildt *et al.* 1997). İlk defa memeli

hücrelerinde, daha sonra da bitkilerde NO'nun büyüme ve gelişme süreçlerinde, biyotik ve abiyotik stres cevaplarının oluşmasında haberci molekül olduğu ispat edilmiştir (Anbar 1995; Leshem and Haramaty 1996; Durner *et al.* 1998; Beligni and Lamattina 2001a, b; Del Rio *et al.* 2004; Graziano and Lamattina 2005). Bununla birlikte, NO'nun 1998 yılında bitki savunma sinyali olarak tanımlanmasına kadar bitki büyüme ve gelişmesi üzerine olan etkileri Leshem (Leshem and Haramaty, 1996) ve Lamattina (Laxalt *et al.* 1997) gibi birkaç öncü araştırmacı ile sınırlı kalmıştır. Bu yıllardan sonra NO ve bitki biyolojisi ile ilgili çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmıştır (Leshem *et al.* 1998; Durner and Klessig 1999; Beligni and Lamattina 2001a, b; Wendehemme *et al.* 2001; Neil *et al.* 2002b, 2003; Del Rio *et al.* 2004; Graziano and Lamattina 2005).

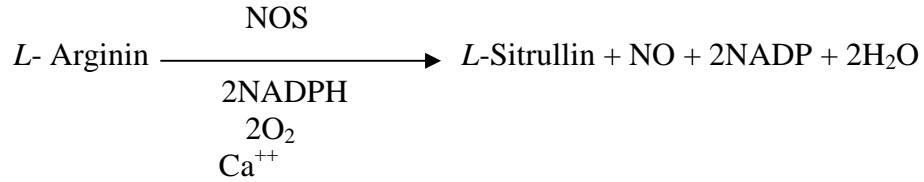
Bazı çalışmalarda, bitkilerin sadece atmosferik NO'ya karşı cevaplar oluşturmadığı aynı zamanda içsel olarak ürettikleri de bulunmuştur (Wildt *et al.* 1997; Barroso *et al.* 1999). NO sentezinde enzimatik ve enzimatik olmayan başlıca iki metabolik yol mevcuttur (Şekil 1.1).



**Şekil 1.1.** NO'nun muhtemel biyosentez yolları (Wojtaszek 2000; Selçukcan 2005)

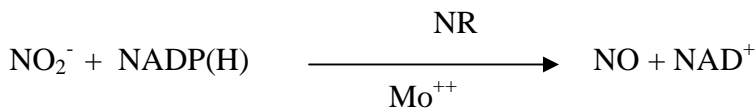
Enzimatik yollardan birinde, *L*-argininin, NO ve *L*-sitruline dönüşümü nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından katalizlenmektedir (Şekil 1.2). NOS'un bezelye yapraklarında kloroplast ve peroksizomların matriksinde bulunduğu gösterilmiştir

(Barroso *et al.* 1999). Tütün, soya fasulyesi, mısır, bezelye gibi bazı bitki türlerinde biyokimyasal, immunolojik ve moleküler teknikler kullanılarak NOS aktivitesinin olduğu rapor edilmiştir (Delledonne *et al.* 1998; Durner *et al.* 1998; Yamasaki and Sakihama 2000; Beligni and Lamattina 2001b; Del Rio *et al.* 2004). Ayrıca, Cueto vd. (1996) *Lupinus albus* kök ve nodüllerinde NOS'a benzer bir enzim aktivitesinin varlığını da bildirmişlerdir. Bitkilerde, memelilerdeki NOS'a benzer ne bir gen ya da cDNA, ne de herhangi bir protein henüz tam anlamı ile tanımlanmamasına karşın mısır fidelerinin kök ucu ve genç yapraklarında 116 kDa'luk NOS'a benzer bir protein varlığı saptanmıştır (Ribeiro *et al.* 1999).



**Şekil 1.2.** NOS aktivitesiyle NO üretimi (Selçukcan 2005)

Diğer enzimatik yolda ise NO üretiminin başlıca kaynağı NADP(H)'a bağımlı nitrat redüktaz (NR) enzimidir (Şekil 1.3). Kofaktör olarak molibden ( $\text{Mo}^{++}$ ) içeren bu enzim elektron vericisi NADP(H)'ı kullanarak  $\text{NO}_2^-$ 'den NO üretimini katalizlemektedir (Dean and Harper 1988; Yamasaki *et al.* 1999; Yamasaki and Sakihama 2000; Rockel *et al.* 2002; Lamattina *et al.* 2003). *Phytophthora infestans* mantarı ile enfekte olmuş patates tüberlerinde NR aktivitesinin teşvik edildiği gösterilmiştir (Yamamoto *et al.* 2003). Böylece bitki stres koşulları altında iken ayçiçeği ve mısır bitkisinde, ıspanak yapraklarında NR'a bağlı NO üretiminin artabileceği ileri sürülmüştür (Rockel *et al.* 2002).



**Şekil 1.3.** NR ile NO üretimi (Selçukcan 2005)

Bitkilerde NO üretiminin diğer enzimatik kaynakları ksantin oksidoredüktaz (XOR), peroksidaz, sitokrom P450 ve bazı  $Fe^{++}$  içeren proteinler olabilir. XOR'un bezelye yaprak peroksizomlarında bulunduğu ve bitkilerde haberci molekül olarak NO üretiminde anahtar rol oynadığı gösterilmiştir (Corpas *et al.* 2002). Bitki hücrelerinde önemli fizyolojik süreçlerde yaygın bir şekilde görev alan peroksidaz enziminin hem *N*-hidroksiarginin ve  $H_2O_2$ 'den, hem de hidroksiüre ve  $H_2O_2$ 'den NO üretimini sağladığı rapor edilmiştir (Boucher *et al.* 1992a; Huang *et al.* 2002b; Veicht 2004). Enzimatik olmayan yolda,  $NO_2$ , NO ve dihidroaskorbik asiti üretmek üzere pH 3-6 da askorbik asitle kimyasal olarak indirgenir. Bu reaksiyonun apoplastik alanlarda ve kloroplastlarda meydana geldiği ve arpa alevron hücrelerinde NO'nun bu şekilde sentezlendiği gösterilmiştir (Henry *et al.* 1997; Horemans *et al.* 2000; Beligni *et al.* 2002; Stöhr and Ullrich, 2002). Ayrıca NO, karotinoidler tarafından  $NO_2$ 'in ışığa bağımlı yolla indirgenmesi ile de oluşur (Cooney *et al.* 1994). Bununla birlikte NO, dışardan uygulanan sodyum nitropurissid (SNP) ve *S*-nitroso-*N*-asetil-penisilamin (SNAP) gibi NO vericilerinden (donörlerinden) enzimatik olmayan şekilde de ortaya çıkar (Leshem, 1996). NO, tek başına yüksek konsantrasyonlarda dahi hücreleri öldürmeyen toksik olmayan bir moleküldür (Pryor and Squadrito 1995). Bununla birlikte aerobik ortamda NO kararlı bir molekül değildir. Derişiminin artması ile oksidasyonu hızlanır. Bu nedenle ortamdaki derişimi ile kendi ömrü arasında ters bir orantı vardır. NO biyolojik sistemlerde  $O_2$  ile kuvvetli reaksiyona girdiğinde nitrozonyum iyonu ( $NO^+$ ), nitroksil anyonu ( $NO^-$ ), nitrit ( $NO_2^-$ ), nitrat ( $NO_3^-$ ), peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) gibi "aktif azot oksit türleri" meydana gelir. Hücrede NO, aktif oksijen türleriyle ( $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$ ,  $O_2^\cdot$ ,  $ONOO^\cdot$  vb.) kimyasal reaksiyona girdiğinde ise ya toksik ya da koruyucu etki gösterir. Ayrıca NO ve hücre içi antioksidan sistem (glutatyon, askorbat, karotinoidler ile antioksidan enzimler) arasında dolaylı bir koruyucu sinyal iletim yolu da mevcuttur (Beligni and Lamattina 1999a, b). NO üretimi ve salınması aşırı miktardaki serbest radikallerin ortamdaki uzaklaştırılması için diğer detoksifikasyon mekanizmalarına ilave olarak en etkili yoldur (Gould *et al.* 2003).

NO bitki büyüme, gelişme ve savunma cevaplarında yaygın bir hücre içi ve hücreler arası haberci molekül olduğu ileri sürülmüştür (Leshem, 1996). Tüm bitkiye ya da hücre



kültürüne dışardan NO uygulamaları, bu molekülün bazı fizyolojik ve biyokimyasal süreçleri nasıl etkilediği hakkında bilgiler elde edilmesine olanak sağlamıştır. Dışardan uygulanan NO, bitki büyüme ve gelişiminin çeşitli yönlerini (Ribeiro *et al.* 1999), patojenlere (Durner *et al.* 1998), ışığa (Beligni and Lamattina 2000), yerçekimi (Pedroso and Durzan, 2000) ile oksidatif strese (Beligni and Lamattina, 1999a) karşı oluşturulan cevapları etkilemektedir. Ayrıca bitkilerde katalaz, askorbat peroksidaz ve akonitaz enzimlerinin inhibisyonunda (Clark *et al.* 2000), hücre çeperi lignifikasyonunda (Ferrer and Ros Barcelo 1999), bekçi hücrelerinde iyon kanallarının düzenlenmesinde (Garcia Mata *et al.* 2003), kloroplast ve mitokondri fonksiyonlarında (Yamasaki *et al.* 2001), hücre ölümü (Pedroso *et al.* 2000a), senesens ve yaralanma sinyalinde NO'nun muhtemel rolleri tespit edilmiştir (Leshem 1996; Leshem and Haramaty 1996; Hung and Kao 2003).

Dışarıdan uygulanan NO'nun bitki büyüme ve gelişmesi ya da strese karşı oluşturulan bitki cevaplarının bir düzenleyicisi olarak etki ettiğini gösteren çok az kanıt olmasına rağmen bitki yaşam döngüsünde bazı olayların da rol oynadığı kesinlik kazanmıştır (Beligni *et al.* 2002). NO'nun tohum çimlenmesi, deetiyoasyon ve yaprak genişlemesini teşvik ettiği, hipokotil ve internod uzamasını inhibe ettiği, savunma genleri ve fitoaleksin üretimini arttırdığı bilinmektedir (Leshem 2000; Beligni and Lamattina 2001b). Marul tohumlarının ışık varlığında çimlenmesi SNP ve SNAP gibi NO donörleri tarafından teşvik edilebilmiştir (Beligni and Lamattina 2000). Beligni ve Lamattina (2001a,b) NO'nun bitkilerin özellikle gövdelerinde çeşitli metabolik ve gelişimsel süreçlerde rol oynadığını kanıtlamışlardır. Karanlıkta ya da düşük ışık şiddetinde büyüyen farklı bitki türlerinde (*Arabidopsis thaliana*, *Lactuca sativa*, *Solanum tuberosum*) nanomolar düzeydeki NO, hipokotil ve internod uzamasını belirgin bir şekilde azaltmıştır (Beligni and Lamattina 2000). Bazı bitkilerde NO yapraklarda olduğu gibi (Leshem and Haramaty 1996), köklerde de düşük konsantrasyonlarda doku genişlemesini teşvik ederken, yüksek konsantrasyonlarda inhibe etmektedir (Gouvêa *et al.* 1997).

Literatürde, konumuzla alakalı makalelerin hemen hepsinde, gerek ağırmetal stresi gerekse diğer streslerde, NO'nun bitkiye stres ajanı (kuraklık, tuzluluk, ağırmetal vb.) ile birlikte ve aynı zamanda uygulandığı tespit edilmiştir. Bu araştırmada ise konuya bakış açısı farklı tutulmuştur. Çalışmamızda amaç olarak, bitki strese girmeden önce, yani normal şartlarda büyürken uygulanan NO'nun, ileriki sürelerde bitkinin Cd stresi ile karşılaşması durumunda, bitkiyi koruyup koruyanmayacağı araştırılmak istenmiştir. Bu açıdan çalışmamız metodolojik olarak literatürdeki çalışmalardan farklıdır. Çalışmada bitki materyali, olarak model bir bitki olan mısır (*Zea mays*) seçilmiş ve literatürde bitkilerin strese cevap ve tolerans derecelerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan deneysel parametreler gerçekleştirilerek amaçlanan hedefe ulaşılmak istenmiştir. Bitkilerde NO'nun stres cevabını nasıl düzenlendiği ve bu cevapta nasıl rol aldığı ile ilgili yeterince çalışma bulunmamaktadır. Araştırmamız bu nedenle özgün değeri olan orijinal bir çalışmadır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bitkilerde patojen saldırısı, kuraklık, düşük ve yüksek sıcaklık, ultraviyole (UV), ozon gibi birbirinden farklı streslere karşı bitki cevaplarının düzenlenmesinde, NO'nun hem antioksidan sistemi düzenleyebildiği hem de antistres ajanı olarak görev yapabileceği ileri sürülmüştür (Neill *et al.* 2003). Bununla birlikte stres altında yetişen bitkilerde içsel NO miktarında büyük bir artış olduğu belirlenmiştir (Garcês *et al.* 2001). Biyotik strese aşırı duyarlılık (HR) cevabının teşviki esnasında patojen saldırısı sonrasında NO'nun bir sinyal molekülün yapabildiği şekilde sinyal iletimini harekete geçirebildiği belirtilmiştir (Dellodonne *et al.* 1998; Romero-Puertas and Dellodonne 2003). *Phytophthora infestans* mantarı tarafından enfekte olmuş patates yapraklarında NO'nun klorofil kaybını önlediği belirlenmiştir (Laxalt *et al.* 1997). Ayrıca SNP ve SNAP gibi iki NO vericisinin herbisit ile işlem görmüş patates yaprakları ve izole kloroplastlarda lipid peroksidasyonu, protein ve RNA yıkımını azalttığı saptanmıştır (Beligni 2000). Yabani tip *Arabidopsis thaliana* yapraklarında, mekanik stres ve yaralanma ile NO üretiminin arttığı ve bunu NOS aktivitesiyle gerçekleştirdiği bulunmuştur (Garcês *et al.* 2001). Son yıllarda NO'nun buğday fidelerinde kuraklıktan kaynaklanan oksidatif strese karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir (Garcia Mata and Lamattina 2001). NO, kuraklık stresine toleransta ve stoma hareketlerinde rol oynayan yeni bir molekül olarak kabul edilmektedir. Ciddi kuraklık stresi koşullarından sonra, 150 µM SNP ile muamele görmüş buğday yapraklarının su içeriğinin arttığı ve transpirasyon oranının azaldığı tespit edilmiştir. Bu deneylere paralel olarak NO *Tradescantia sp.* ve *Vicia faba*'da stoma kapanmasını teşvik etmektedir (Garcia Mata and Lamattina 2001; Garcia Mata *et al.* 2003). Su eksikliği ile teşvik edilen pirinç yapraklarının senesensinin NO tarafından inhibisyonunun artan süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ve azalan lipid peroksidasyonu ile ilgili olduğu gösterilmiştir (Cheng *et al.* 2002). Başka bir çalışmada UV-B stresi altında hem dışarıdan hem de içsel uygulanan NO'nun mısır yapraklarında büyüme ve gelişme süresince antistres molekül olarak rol oynamaktan çok, UV-B nin inhibe ettiği büyümede stres sinyal molekül olarak görev aldığı ileri sürülmüştür (An *et al.* 2005). Bitkilerde abiyotik stres etmeni olan kadmiyumun (Cd) oluşturduğu oksidatif strese karşı ayçiçeği bitkisinde NO'nun koruyucu rol oynadığı rapor edilmiştir (Laspina

*et al.* 2005). Toksik etkisi bilinen kurşun (Pb) ve kadmiyum (Cd) gibi ağır metal etkisinde çimlenmenin inhibe olduğu bilinmektedir. Bu inhibisyonun SNP ön muamelesi sonucu *Lupinus luteus* tohumlarında yüksek oranda engellendiği kanıtlanmıştır (Kopyra *et al.* 2003).

NO'nun; tuzluluk (Shi *et al.* 2007), ağır metal ve ısı stresi (Uchida *et al.* 2002; Koypra and Gwozdz 2003; Yu *et al.* 2005; Wang *et al.* 2010), kuraklık, UV-B ve soğuk streslerine maruz bırakılmış bitkilerde, POX aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. İlave olarak, barbunya bitkisine dışarıdan uygulanan NO'nun tek başına POX aktivitesini artırdığını, tuz stresine maruz bırakılmış bitkilerde ise aktiviteyi düşürdüğü tespit edilmiştir (Li *et al.* 2007). Düşük sıcaklığa maruz bırakılmış yabancı mavi hardal süspansiyon kültüründe POX aktivitesi NO'nun etkisiyle daha da arttığı belirlenmiştir (Liu *et al.* 2010). Cd uygulanınca bezelye yaprağında, *Phaseolus aureus*'da, havuç ve turpun köklerinde POX aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir (Sanita di Toppi and Gabrielli 1999; Liu and Yang 2000; Sandalio *et al.* 2001; Chen *et al.* 2003). Cd uygulanan ladin ağacı yapraklarında POX aktivitesinin başlangıçta arttığı, daha sonra düştüğü gözlemlenmiştir (Radotic *et al.* 2000). Mısır yaprakları Cd'e maruz bırakıldığında ise, POX aktivitesinin arttığı bulunmuştur (Lagriffoul *et al.* 1998; Kong *et al.* 1999).

NO'nun; tuzluluk (Shi *et al.* 2007; Li *et al.* 2008), ağır metal-ısı (Uchida *et al.* 2002; Koypra and Gwozdz 2003; Yu *et al.* 2005; Wang *et al.* 2010), kuraklık (Zhao *et al.* 2008) ve soğuk streslerine (Liu *et al.* 2010) maruz bırakılmış bitkilerde CAT aktivitesini artırdığı belirlenmiştir. Yapılan başka bir çalışmada barbunya bitkisine uygulanan NO'nun tek başına CAT aktivitesini artırırken, tuz stresine maruz bırakılmış bitkilerde ise aktiviteyi etkilemediği belirtilmiştir (Li *et al.* 2007). Cd stresi altında, CAT aktivitesinin *Phaseolus vulgaris* (Somashekaraiyah *et al.* 1992), *Lemna minor* (Mohan and Hosetti 1997) ve biberde (Leon *et al.* 2002) azalma gösterdiği ifade edilmiştir. Aksine CAT aktivitesi *Agropyron repens* (Brej 1998), *Raphanus sativus* (Vitoria *et al.* 2001) ve şeker kamışında (Fornazier *et al.* 2002a) çoğaldığı fakat soya fasulyesinde değişmeden kaldığı sonucuna ulaşılmıştır (Ferreira *et al.* 2002).

Şeker kamışına Cd uygulaması sonucunda SOD aktivitesi artmıştır (Malecka *et al.* 2001; Fornazier *et al.* 2002; Jouili and El Ferjani 2004). Cd uygulanmasıyla bazı bitkilerde SOD aktivitesinin değişmediği de bulunmuştur (Sanita di Toppi and Gabrielli 1999). Oksidatif stres altındaki buğday genotiplerinde SOD aktivitesinde bir değişiklik gözlenmezken (Sairam and Srivastava 2000), yüksek sıcaklık stresi veya tuz stresi altındaki buğday genotiplerinde önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir (Sairam *et al.* 2000; Eyidoğan vd 2003; Sakhabutdinova *et al.* 2004).

Hücre zarı lipidlerinin serbest radikallerle (süperoksit anyonu, singlet oksijen, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali) etkileşmesi sonucu lipid peroksidasyonu (LPO) gerçekleşir ve bu olumsuz durum hücre zarlarının bozulmasına neden olur. Peroksidasyonun derecesi, hücresel düzeyde stresin sebep olduğu hasarın hem ölçütü hem de yansıması olduğu kabul edilmektedir (de Azevedo Neto *et al.* 2006). Stres şartlarında, doymamış yağ asitlerinin peroksidasyon ürünü olarak ortaya çıkan malondialdehit (MDA) miktarındaki artış, hücre zarlarının yapısal bütünlüğünün bozulduğunu gösteren iyi bir indikatör olarak kabul edilmektedir (Posmyk *et al.* 2005). LPO ürünlerinin, Cd uygulanmış bezelye bitkisinde kök ve sürgünlerinde arttığı bildirilmiştir (Lozano-Rodriguez *et al.* 1997; Romero-Puertas *et al.* 2003). Cd tarafından LPO'nun arttığı *Phaseolus vulgaris* (Shaw 1995; Chaoui *et al.* 1997) ve *Helianthus annuus* bitkilerinde (Benavides and Tomaro 1996) belirlenmiştir. Mısır bitkilerine Cd uygulandıktan sonra MDA seviyesinin köklerde çoğaldığı, fakat yapraklarda çoğalmadığı gözlenmiştir (Hong *et al.* 2008). Stres durumlarında artan MDA miktarının dolayısıyla lipid peroksidasyon seviyesinin uygulanan NO ile azaldığına dair literatürde bazı çalışmalar mevcuttur. Soğuk stresi (Liu *et al.* 2010), tuz stresi (Shi *et al.* 2007; Q-Li *et al.* 2008), su stresi (Zhao *et al.* 2008), nikel fazlalığı (Kazemi *et al.* 2010), Cd fazlalığı (Singh *et al.* 2008), arsenik fazlalığı (Singh *et al.* 2009), yüksek sıcaklık stresi (Song *et al.* 2006) gibi streslerde artan MDA miktarının uygulanan NO tarafından düşürülebildiği bulunmuştur.

Tuzluluk (Huaifu *et al.* 2007; Q-Y. Li *et al.* 2008), düşük sıcaklık (Liu *et al.* 2010), ağır metal (Hsu and Kao 2004; Cui *et al.* 2010) gibi streslerde artan içsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının,

uygulanan NO tarafından düşürüldüğü belirlenmiştir. Bitki hücrelerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> artışı genellikle *Arabidopsis thaliana* ve domates bitkilerinin Cu, Cd (Drazkiewicz *et al.* 2004; Romero-Puertas *et al.* 2004; Maksymiec and Krupa 2006b) ve Hg (Cho and Park 2000) muamelesinden sonra gözlenmiştir. Ayrıca pirinç bitkisinin yapraklarında aşırı Cd varlığında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının arttığını belirlenmiştir (Hsu and Kao 2004).

MS besi yeri ortamında büyütülen kavak kalluslarda tuz stresi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını artırabilirken, ortama uygulanan NO'nun H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını daha da artırdığı rapor edilmiştir (Zhang *et al.* 2007).

Stres altında ki bitkilere uygulanan NO nun; tuzluluk stresi altındaki pamuk kalluslarında (Vital *et al.* 2008), kuraklık stresinde ki kamış bitkisinde (Zhao *et al.* 2008), Cd toksitesindeki arpa da (Chen *et al.* 2010), düşük sıcaklık stresinde ki yabani hardal süspansiyon kültüründe (Liu *et al.* 2010), amonyum toksitesinde ki *Hydrilla verticillata* bitkisinde (Wang *et al.* 2011) artan O<sub>2</sub><sup>•-</sup> miktarını azalttığı rapor edilmiştir.

Nitrik oksitin, stres durumlarında bazı bitki hücrelerinde içsel olarak arttığına dair bazı çalışmalar mevcuttur. Tuzluluk stresinde içsel olarak arbidopsis peroksizomlarında NO miktarının arttığı belirlenmiştir (Corpas *et al.* 2009). Kuraklık stresi altındaki bezelye, buğday ve tütünde içsel NO üretiminin arttığı rapor edilmiştir (Leshem and Haramaty 1996; Gould *et al.* 2003; Kolbert *et al.* 2005).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

İklim dolabı	: Sanyo, Japonya ve Jenotech, Kore
Masa santrifüjü	: Hettich EBA 21
Soğutmalı santrifüjü	: Hettich Micro 22 R
Spektrofotometre	: Shimadzu UVmini-1240
pH metre	: WTW unilab pH metre
Hassas terazi	: Shimadzu AY220
Buzdolabı	: Arçelik
Derin dondurucu (-30°C)	: Arçelik
Derin dondurucu (-80°C)	: Harris, İngiltere
Karıştırıcı	: Fisons Whirlmixer
Otomatik pipetler	: Nichipet EX ve Socorex
Çalkalayıcı	: Gallenkamp
Manyetik karıştırıcı	: Chiltern HS31
Soğuk su banyosu	: Huber Polystat CC1.

#### 3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

Araştırma süresince kullanılan çözeltilerin kullanıldığı yerler ve hazırlanış biçimleri aşağıda sunulmuştur. Çalışmalarımızda kullanılan kimyasal maddeler Sigma ve Fluka'dan temin edilmiştir.

**1. Arnon ve Hogland Besi Çözeltisi:** 1.02 g KNO<sub>3</sub>, 0.492 g Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0.23 g NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.49 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2.86 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.81 g MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0.08 mg CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0.22 mg ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.6 mg FeSO<sub>4</sub>, 0.6 mg tartarik asit saf su içerisinde çözülerek toplam hacmi 1 L tamamlanmıştır.

**2. 0.01 mM SNP Çözeltisi:** 0.2975 g SNP 1 L saf suda çözülmüş, bu çözeltiden 10 mL alınarak son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

**3. 0.1 mM SNP Çözeltisi:** 0.2975 g SNP 1 L saf suda çözülmüş, bu çözeltiden 100 mL alınarak son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

**4. 0.5 mM SNP Çözeltisi:** 0.2975 g SNP 1 L saf suda çözülmüş, bu çözeltiden 500 mL alınarak son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

**5. 25 µM CdCl<sub>2</sub> Çözeltisi:** 0.0915 g CdCl<sub>2</sub> çözeltisi 500 mL saf suda çözülmüş, bu çözeltiden 12.5 mL alınarak son hacmi 500 mL'ye tamamlanmıştır.

**6. 50 µM CdCl<sub>2</sub> Çözeltisi:** 0.0915 g CdCl<sub>2</sub> çözeltisi 500 mL saf suda çözülmüş, bu çözeltiden 25 mL alınarak son hacmi 500 mL'ye tamamlanmıştır.

**7. 200 µM CdCl<sub>2</sub> Çözeltisi:** 0.0915 g CdCl<sub>2</sub> çözeltisi 500 mL saf suda çözülmüş, bu çözeltiden 100 mL alınarak son hacmi 500 mL'ye tamamlanmıştır.

**8. 103.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 1.4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80 mL saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 7.5'e kadar titre edilmiş ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

**9. 40 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Çözeltisi** (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 408 µL %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

**10. 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Çözeltisi** (Katalaz aktivitesi ölçümünde standart grafik hazırlamak için kullanılmıştır): 41 µL %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

**11. Peroksidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi:** 15 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' dan (d=1.13 g/mol) alınarak 5 mM olacak şekilde 100 mL 0.1 M fosfat tamponu (pH: 5.5) içinde çözümlenerek hazırlanmıştır.



**12. 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>**, pH 5.5 (Peroksidazın aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon çözeltisi): 3.55 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> alınmış, 200 mL saf suda çözülmüş ve pH: 5.5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır.

**13. 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** (pH: 7.8) (Süperoksit dismutaz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 2.9 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 200 mL saf suda çözülmüş ve son hacmi 250 mL'ye tamamlanmıştır.

**14. 13 mM Metionin Çözeltisi:** 0.485 g metionin, 250 mL, 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 7.8) tamponu içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

**15. 75 µM NBT (Nitroblue Tetrazolium Klorür):** 0.015 g NBT, 250 mL, 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 7.8) tamponu içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

**16. 0.1 mM EDTA (Etilen Daimin Tetra Asetik asit):** 0.075 g EDTA, 250 mL, 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 7.8) tamponu içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

**17. 2 µM riboflavin:** 0.038 g riboflavin, 1 L saf suda çözülmüştür. Bu çözeltiden 2 µM oluşturmak için, bundan 60 µL alınmış ve 3 mL'lik reaksiyon karışımına pipetlenmiştir.

**18. %5'lik TCA (trikloroasetik asit) :** 100 mL saf su içerisine 5 g TCA ilave edilir. TCA tam olarak çözülene kadar karıştırılarak hazırlanmıştır.

**19. %0.5'lik TBA (tiobarbutirik asit):** 100 mL saf su içine 20 g TCA çözülmüş ve içerisine 0.5 g TBA ilave edilir ve iyice karıştırılarak hazırlanmıştır.

**20. %5'lik Ti(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (titanyum disülfat çözeltisi)** (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının belirlenmesinde kullanılır): 1 g Ti(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 20 mL saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

**21. %19'luk NH<sub>4</sub>OH** (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> belirlenmesinde kullanılan): 4.16 mL NH<sub>3</sub> 20 mL saf suda çözülmesiyle hazırlanmıştır.

**22. 2 M'lık H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının belirlenmesinde kullanılan): 40 mL % 98'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> alınmış 160 mL saf su içerisine ilave edildikten sonra 200 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

### **3.3. Yöntemler**

#### **3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi ve SNP ile Cd uygulamalarını yapılması**

Bu araştırmada, monokotil bir bitki olan mısır (*Zea mays* cv. Karadeniz yıldızı) kullanılmıştır. Mısır bitkisine ait tohumlar, Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Elde edilen tohumların sterilizasyonu, birkaç kez çeşme suyu ile yıkandıktan sonra %10'luk ticari çamaşır suyunda 5 dk bekletilmiş ve en son saf su ile iyice yıkanarak yapılmıştır. Bitkiler yıkanmış kum kültüründe yetiştirilmişlerdir. Bitkilerin yetiştirildiği kum önce çeşme suyu ile 5 kez, 1 kez 1N HCL ile ve en son da saf su ile 2 kez yıkanmıştır ve her bir saksıya eşit ağırlıkta olacak şekilde yerleştirilmiştir. Bu işlemle kum içindeki metal iyonlarının uzaklaştırılması sağlanmıştır. Her saksıya (30x20x15 cm) büyüklükleri ve şekilleri homojen olan 25 g steril tohum ekilmiştir. Bitkiler bir iklim dolabında 22/20°C ve 12/12 saat ışık-karanlık periyodunda (20.000 lüks, %60 nem) 17 gün süreyle büyütülmüşlerdir. Her saksı, 10. güne kadar, günlük eşit miktarda çeşme suyu ile sulanmıştır. Onuncu günde bitkiler 1 kez olmak üzere eşit miktarda Hoagland besin çözeltisi ile sulanmıştır.

Çalışmanın amacında da anlatıldığı gibi bu araştırmada bitkilere bir sinyal bileşik olan NO uygulanmak istenmiştir. Ancak NO gaz formunda olan bir bileşik olduğu için açık bir alanda hassas ve dengeli uygulanması mümkün değildir. Bu sebeple araştırmamızda suda çözünebilir ve bitki tarafından alındığında parçalanarak NO üreten bir bileşik olan sodyum nitroprussid (SNP) kullanılmıştır. Bu özelliğinden dolayı SNP'ye NO donörü denilmektedir.

Araştırmamızda SNP uygulaması iki farklı şekilde gerçekleştirilmiştir. Birinci uygulamada; bitkiler kum kültüründe yetiştirilmiştir. Çimlenmeyi takiben 12. günde

farklı konsantrasyonlarda (0.0, 0.01, 0.1, 0.5 mM) ve her seferde taze hazırlanan eşit miktardaki (her saksı için 200 mL) SNP çözeltisi, bir atomizer yardımıyla bitki yapraklarına püskürtülmüştür. Püskürtme işlemi her saksı için eşit zamanda yapılmış ve işlem bütün yapraklardan damlamalar oluncaya kadar sürdürülmüştür. Daha sonra, 14. günde bu şekilde yetiştirilen bitkilerin yetiştirme ortamına, kadmiyum (Cd) çözeltisi (0.0, 25, 50, 200  $\mu$ M) her saksıya 70 mL olacak şekilde uygulanmıştır. Yukarıdaki uygulamalar yapıldıktan sonra, 17. gün (Cd uygulamasından 3 gün sonra) bitki yapraklarından ve köklerinden örnekler alınmıştır. Alınan örnekler hemen bir derin dondurucuya ( $-30^{\circ}\text{C}$ ) transfer edilmiştir. Örnekler kullanılıncaya kadar burada saklanmışlardır. Yukarıda ifade edilen uygulama için 16 saksı kullanılmış ve bunların SNP ve Cd uygulamaları düzeni aşağıdaki gibi olmuştur. Deneme hatalarını azaltmak için her bir gruba ait 4 saksı ekilmiştir (toplamda 60 saksı).

1. 0.0 mM SNP + 0.0  $\mu$ M Cd (Genel kontrol)
2. 0.01 mM SNP + 0.0  $\mu$ M Cd
3. 0.1 Mm SNP + 0.0  $\mu$ M Cd
4. 0.5 mM SNP + 0.0  $\mu$ M Cd
5. 0.0 mM SNP + 25  $\mu$ M Cd
6. 0.01 mM SNP + 25  $\mu$ M Cd
7. 0.1 mM SNP + 25  $\mu$ M Cd
8. 0.5 mM SNP + 25  $\mu$ M Cd
9. 0.0 mM SNP + 50  $\mu$ M Cd
10. 0.01 mM SNP + 50  $\mu$ M Cd
11. 0.1 mM SNP + 50  $\mu$ M Cd
12. 0.5 mM SNP + 50  $\mu$ M Cd
13. 0.0 mM SNP + 200  $\mu$ M Cd
14. 0.01 mM SNP + 200  $\mu$ M Cd
15. 0.1 mM SNP + 200  $\mu$ M Cd
16. 0.5 mM SNP + 200  $\mu$ M Cd

Araştırmamızda SNP'nin ikinci farklı uygulaması aşağıda anlatılan şekilde gerçekleştirilmiştir. Sterilize edilmiş mısır tohumları ekilmeden önce eşit miktardaki

0.0, 0.01, 0.1, 0.5 mM SNP çözeltilerinde 24 saat süre ile ön ıslatmaya (şişirme işlemi) tabi tutulmuşlardır. Ön ıslatmanın peşine tohumlar önce çeşme suyu ile ve daha sonra steril saf su ile yıkanmış ve birinci uygulamada anlatıldığı şekilde hazırlanan saksılara ekilmişler ve aynı şartlarda yetiştirilmişlerdir. Her saksı, 10. güne kadar, günlük eşit miktarda çeşme suyu ile sulanmıştır. Onuncu günde bitkiler 1 kez olmak üzere eşit miktarda Hoagland besin çözeltisi ile sulanmıştır. Bu şekilde yetiştirilen bitkilerin yetiştirme ortamına 14. günde Cd çözeltisi (0.0, 25, 50, 200 µM) her saksıya 70 mL olacak şekilde uygulanmıştır. Daha sonra, 17. gün (Cd uygulamasından 3 gün sonra) bitki yapraklarından ve köklerinden örnekler alınmıştır. Alınan örnekler hemen bir derin dondurucuya (-30°C) transfer edilmiştir. Örnekler kullanılıncaya kadar burada saklanmışlardır. Buradaki uygulamalar için de 16 saksı kullanılmış ve bunların SNP ve Cd uygulamaları düzeni, yukarıda verilen düzen şeklinde olmuştur. Deneme hatalarını azaltmak için her bir gruba ait 4 saksı ekilmiştir (toplamda 60 saksı). Birinci uygulama ile ikinci uygulama arasındaki en önemli fark, birinci uygulamada SNP bitki yapraklarına doğrudan verilmesi, ikinci uygulamada ise SNP'nin bitki tohumlarına emdirilmesi şeklinde olmasıdır.

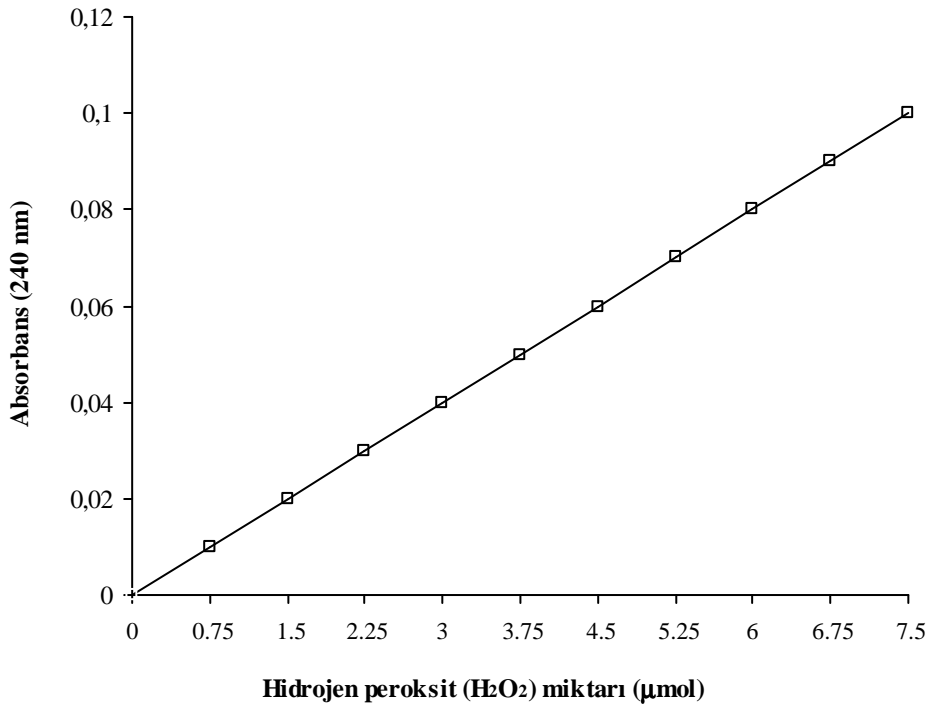
### **3.3.2. Yaprak ve köklerde antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi**

Antioksidan enzimlerin aktivitesinin belirlenmesi için öncelikle çalışılan kök ve yapraklardan protein izolasyonu ve ekstraksiyonu yapılmıştır. Bu işlem için, 0.5 g doku (yaprak veya kök) alınıp soğuk bir havan içine konulmuş ve üzerine sıvı azot ilave edilerek toz haline gelinceye kadar öğütülmüştür. Sonra üzerine 5 mL soğuk homojenat tamponu (1 mM EDTA içeren 0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH: 7.0) ilave edilmiş ve karışım bir santrifüj tüpüne aktararak 12000xg ve +4°C'de 15 dk. santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonucunda elde edilen süpernatant tek seferlik taze olarak antioksidan enzimlerin aktivite ölçümleri için kaynak olarak kullanılmıştır (Angelini *et al.* 1990; Angelini and Federico 1989) .

### 3.3.2.a. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi

Katalazın (CAT) aktivite tayini için kullanılan yöntem, Luck (1965) ile Havir and Mchale'nin (1987) uyguladığı yöntemdir. Bu metotla aktivite ölçümü, CAT aktivite ölçüm ortamındaki  $H_2O_2$ 'nin  $O_2$  ve  $H_2O$ 'ya dönüşümünü sağlarken meydana gelen absorbans azalmasının 240 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır (Havir *et al.* 1987). Reaksiyonda azalan  $H_2O_2$  miktarını belirlemede kullanılacak olan  $H_2O_2$  standart grafiği önceden hazırlanmıştır. Bunun için, 5 mM  $H_2O_2$  çözeltisinden 3 mL'lik spektrofotometre tüplerine sırasıyla; 0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 0.9, 1.05, 1.2, 1.35 ve 1.5 mL konulmuştur. Tüpün hacmi saf su ile 1.5 mL'ye tamamlanmış ve her tüpe 1.47 mL, 103.5 mM  $KH_2PO_4$  ve 30  $\mu$ L saf su ilave edilmiştir. Küvet spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 240 nm'de absorbans belirlenmiştir. Absorbans değerlerine karşılık gelen  $\mu$ M  $H_2O_2$  değerleri kullanarak bir standart grafik elde edilmiştir (Şekil 3.1).

CAT aktivite ölçümü için 3 mL'lik spektrofotometre küvetine, 103 mM  $KH_2PO_4$  tamponundan 1.475 mL ve 40 mM'lık  $H_2O_2$  substrat çözeltisinden 1.5 mL konulduktan sonra, 25  $\mu$ L enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Küvet spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 240 nm'de 5 dakika boyunca 1 dk. aralıklarla köre karşı absorbansı okunmuştur. Ölçümlerde absorbansın doğrusal olarak azaldığı aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplanmıştır. Bu ortalama absorbans değerleri, standart grafik yardımıyla  $\mu$ mol cinsinden  $H_2O_2$  miktarına dönüştürülmüştür. 25 °C'de, 1 dakika içinde substratı 1  $\mu$ mol azaltan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar gram yaprak başına düşen enzim ünitesi olarak sunulmuştur (Gong *et al.* 2001).



**Şekil 3.1** Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik.

### 3.3.2.b. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Peroksidaz (POX) aktivite tayini, guaikol ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin substrat olduğu reaksiyonun ürünü olan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm'de izlenmesi esasına dayanmaktadır (Angelini *et al.* 1989). Aktivite ölçümü için spektrofotometre küvetine; 100 mL 0.1 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH: 5.5) ve 5 mM guaikol içeren substrat çözeltisinden 3 mL konulduktan sonra, üzerine 10 µL enzim ekstraktı ilave edilmiştir. 470 nm'de 5 dakika boyunca absorbans artışı 1 dakika aralıklarla kaydedilmiş ve absorbansın doğrusal olarak arttığı kısımdaki absorbans artışı 1 dakikaya oranlanmıştır. 25 °C'de 1 dakikada, absorbansı 0.01 artıran enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar g doku başına düşen enzim ünitesi (EU/g doku) olarak sunulmuştur (Yee *et al.* 2002).

### 3.3.2.c. Süperoksid dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

Süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesi, nitro blue tetrazoliumun (NBT) fotokimyasal indirgenmesinin inhibisyonunu, spektrofotometrik olarak belirleme esasına dayanır (Agarwal and Pandey 2004; Yordanova *et al.* 2004). Reaksiyon karışımı (3 mL); 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH: 7.8), 13 mM metiyonin, 75  $\mu\text{M}$  NBT, 2  $\mu\text{M}$  riboflavin ve 0.1 mM EDTA içermektedir. Aktivite ölçümü için 3 mL spektrofotometre küvetine yukarıdaki riboflavin içermeyen reaksiyon karışımından 2.84 mL alınmış ve üzerine 100  $\mu\text{L}$  enzim ekstraktı pipetlenmiştir. Reaksiyon, tüp üzerine 100  $\mu\text{M}$ 'lık riboflavin çözeltisinden 60  $\mu\text{L}$  pipetlenip karıştırıldıktan hemen sonra, beyaz bir ışık kaynağı önüne yerleştirmek suretiyle başlatılmıştır. Tüp, ışık kaynağının karşısında 15 dk. tutulmuş ve reaksiyon ışık kaynağının kapatılmasıyla durdurulmuştur. 15 dk. içerisinde NBT'nin renk açılma yoğunluğu 560 nm'de köre karşı okunmuştur. Kör, Aynı işlemin enzimsiz örneğinden oluşmaktadır. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm'de gözlenen NBT indirgenmesinin % 50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve değerler EU/g doku olarak sunulmuştur.

### 3.3.3. Kök ve yapraklarda hidrojen peroksit miktarının belirlenmesi

$\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin miktar tayini için kullanılan yöntem Mukherjee and Choudhuri (1983) tarafından kullanılmıştır. Hidrojen peroksit miktarının belirlenmesi için taze bitki dokusu (0.5 g ) 4 mL soğuk aseton ile homojenize edilmiş ve bulamaç 10.000 xg'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantın 1 mL'si %5  $\text{Ti}(\text{SO}_4)_2$  ve 0.2 mL amonyak ile karıştırılmıştır. Çökelti biçimlendikten sonra reaksiyon karışımı 10.000xg'de 10 dk santrifüj edilmiş, sonra pelet 2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 'de eritilmiş ve 415 nm'de absorbansı okunmuştur.

$\text{H}_2\text{O}_2$  miktarını belirlemede kullanılan  $\text{H}_2\text{O}_2$  standardı için, 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  çözeltisinden ependorf tüpüne sırasıyla; 0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 0.9, 1.05, 1.2, 1.35 ve 1.5 mL konulmuştur. Tüpün hacmi aseton ile 1.5 mL'ye tamamlanmış ve her tüpe 0.15 mL

%5'lik  $Ti(SO_4)_2$  ve %19'luk  $NH_4OH$  ilave edilmiştir. Çökelek oluştuktan sonra karışım 10.000  $\mu g$ 'de 5 dk daha santrifüj edilmiştir. Tüpün süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen pelet 3 mL 2 M'lık  $H_2SO_4$  içinde çözülmüş ve küvet spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 415 nm'de absorbans köre karşı okunmuştur. Absorbans değerlerine karşılık gelen  $\mu M$ ,  $H_2O_2$  değerleri kullanılarak standart grafik elde edilmiştir.

#### **3.3.4. Kök ve yapraklarda Lipid Peroksidasyon seviyesinin (MDA miktarının) belirlenmesi**

MDA miktarının belirlenmesi için kullanılan yöntem Heath and Packer (1968) tarafından kullanılmıştır. Bunun için yaklaşık 0.5 g taze bitki materyali %10'luk TCA (trichloro-acetic acid) 10 mL %25'lik 2-TBA (thiobarbituric acid) ile homojenize edilmiştir. Homojenat sıcak su banyosunda 95 °C de 30 dk inkübe edilmiş ve sonra 10.000  $\mu g$ 'de 10 dk santrifüj edilmiştir, 532 nm'de absorbans değerleri okunduktan sonra 600 nm deki non-spesifik absorpsiyon için belirlenen absorbans değeri çıkarılmıştır. Lipid peroksidasyonunun hesaplanması: 1 mL çözeltideki MDA (nmol/ml): $[(A_{532}-A_{600}) / 155000] \times 10^6$  formülüyle hesaplanır. Sonuçlar MDA (nmol / gram doku) şeklinde verilmektedir.

#### **3.4. İstatistik Analiz**

Sonuçlar, her bir uygulamadan üç örnek (3 paralel) ve her bir örnekten 3 tekrerrü yapıldıktan sonra elde edilen 9 değerlerin ortalamasıdır. Sonuçların karşılaştırılması, SPSS 13.0 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmış ve istatistik anlamlar, 0.05 hata seviyesinde Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak belirlenmiştir



#### 4. BULGULAR

Çalışmamızda bitkiler Cd stresine maruz kalmadan önce uygulanan NO'nun (SNP olarak uygulanmış) bitkilerin Cd stresine karşı tolerans düzeyini artırıp artıramadığı belirlenmek istenmiştir. Bu amaçla mısır bitkisi (*Zea mays* cv. Karadeniz yıldızı) model bitki olarak seçilmiştir. Mısır bitkileri Cd stresine maruz kalmadan önce iki farklı yöntemle SNP uygulanmıştır. Bu yüzden araştırmamızın iki ana ayağı bulunmaktadır. Bunlardan birincisinde mısır bitkileri kontrollü şartlarda yetiştirilmiş ve fidelere doğrudan (0.01, 0.1, 0.5 mM) SNP uygulanmıştır. Daha sonra bu bitkiler (25, 50, 200 µM) Cd stresine maruz bırakılmışlardır. Çalışmanın ikinci ayağında ise, mısır bitki tohumları ekimden önce (0.01, 0.1, 0.5 mM) SNP çözeltilerinde ön ıslatmaya bırakılmış ve tohumlar daha sonra ekilmiş ve yetişen fideler (25, 50, 200 µM) Cd stresine maruz bırakılmıştır. Her iki uygulamadan elde edilen bitkiler deney materyali olarak kullanılmışlardır. Çalışmadan elde edilen bulguların sunumunda, önce SNP'nin doğrudan fidelere uygulamasından elde edilen bulgular ve daha sonra SNP'nin tohuma uygulamasından elde edilen bulgular verilmiştir. Sonuçlar sunulurken her bir veri, kendi kontrolü ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

##### 4.1. SNP'nin Fidelere Uygulandığı Çalışmalar ve Elde Edilen Bulgular

Çalışmalarımızın bu aşamasında, mısır bitkileri kontrollü şartlarda yetiştirilmiş ve 12. gün bitki fidelerine farklı konsantrasyonlarda (0.01, 0.1 ve 0.5 mM) SNP uygulanmış (püskürtülerek) ve bu uygulamadan 2 gün sonra (14. Gün), SNP uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) bitkiler farklı seviyelerde (25, 50 ve 200 µM) Cd stresine maruz bırakılmışlardır. Bu uygulamalardan sonra elde edilen bitkilerin kök ve yapraklarından antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, CAT, POX), LPO ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyeleri tespit edilerek mısır bitkisinin Cd stresine verdiği antioksidatif cevaplar belirlenmiştir. Çalışılan her bir parametreye ait sonuçların sunumunda, önce yapraklardan elde edilen sonuçlar, peşine aynı bitkilerin köklerinden elde edilen sonuçlar verilmiştir.

#### 4.1.1. Antioksidan Enzim Aktivitesi Sonuçları

##### 4.1.1.a. Katalaz Aktivitesine Ait Sonuçlar

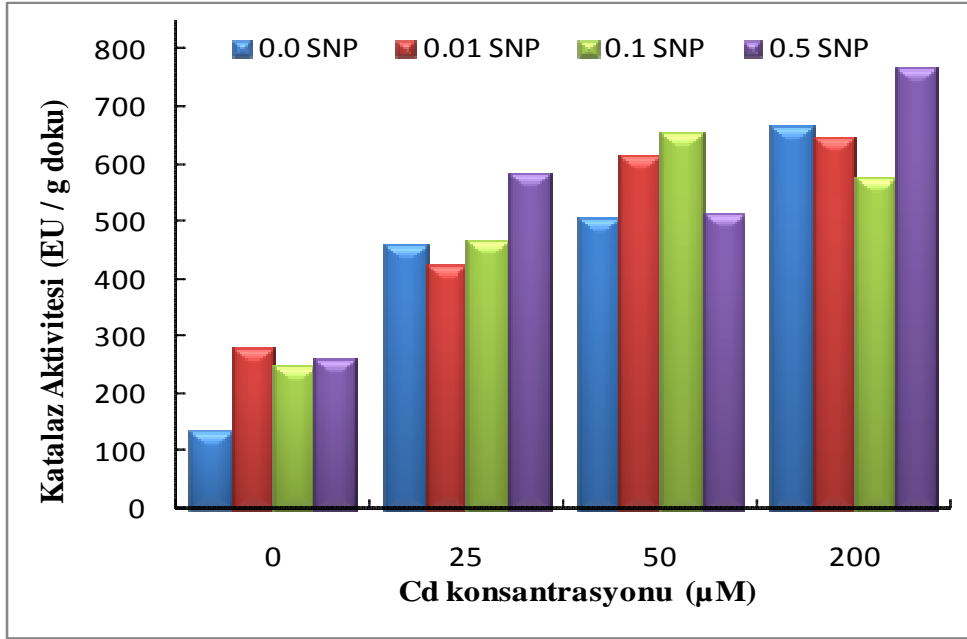
0.01, 0.1 ve 0.5 mM SNP uygulamasından sonra farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 200  $\mu$ M) Cd stresine maruz bırakılmış bitkilerin yaprakları kullanılarak CAT aktivitesi belirlendiğinde önemli bulgular elde edilmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.1). Tek başına SNP (0.01, 0.1 ve 0.5 mM) uygulanmış bitkilerin yapraklarındaki CAT aktivitesi kontrole göre kıyaslandığında, üç konsantrasyonda da %100'e yakın bir artış görülmüştür ( $P<0.05$ ). Tek başına 25, 50, 200  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında CAT aktivitesi de artış göstermiş ve kontrole göre sırasıyla, %341, %378, %499 gibi önemli oranlarda ( $P<0.05$ ) yüksek bulunmuştur. Diğer taraftan önceden SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış bitkilere baktığımızda, sadece Cd uygulanmış kontrolleriyle kıyaslandığında, 0.01, 0.1 mM SNP, 25  $\mu$ M Cd uygulanmış bitki yapraklarında CAT aktivitesinde önemli bir değişiklik ( $P>0.05$ ) yapmazken, 0.5 mM SNP CAT aktivitesini artırmıştır ( $P<0.05$ ). 50  $\mu$ M Cd stresine maruz bırakılmış bitki yapraklarında 0.01, 0.1 mM SNP aktiviteyi artırırken, 0.5 mM SNP'de önemli bir değişiklik ( $P>0.05$ ) belirlenmemiştir. 200  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitkilerde ise, 0.1 mM SNP aktiviteyi düşürmüş, buna karşılık 0.5 mM SNP artırmıştır ( $P<0.05$ ). SNP'nin 0.01 mM'ı CAT aktivitesinde önemli bir değişiklik yapmamıştır ( $P>0.05$ ).

Aynı bitkilerin köklerinden elde edilen CAT aktivitesine ait sonuçlar Çizelge 4.1 ve Şekil 4.2'de sunulmuştur. Tek başına SNP uygulanmış bitkilerin köklerinde CAT aktivitesi 0.01 mM SNP ile artış göstermiş ( $P<0.05$ ), ancak 0.1 ve 0.5 mM SNP ile önemli bir değişiklik görülmemiştir ( $P>0.05$ ). Tek başına Cd uygulamasında, 25  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde CAT aktivitesi %76 oranında artarken, 50  $\mu$ M Cd uygulamasında %49 oranında düşmüştür. 200  $\mu$ M Cd uygulamasında ise aktivitede önemli bir değişiklik görülmemiştir ( $P>0.05$ ). Diğer taraftan önceden SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış bitkilere baktığımızda, sadece Cd uygulanmış kontrolleriyle kıyaslandığında, 25  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde CAT

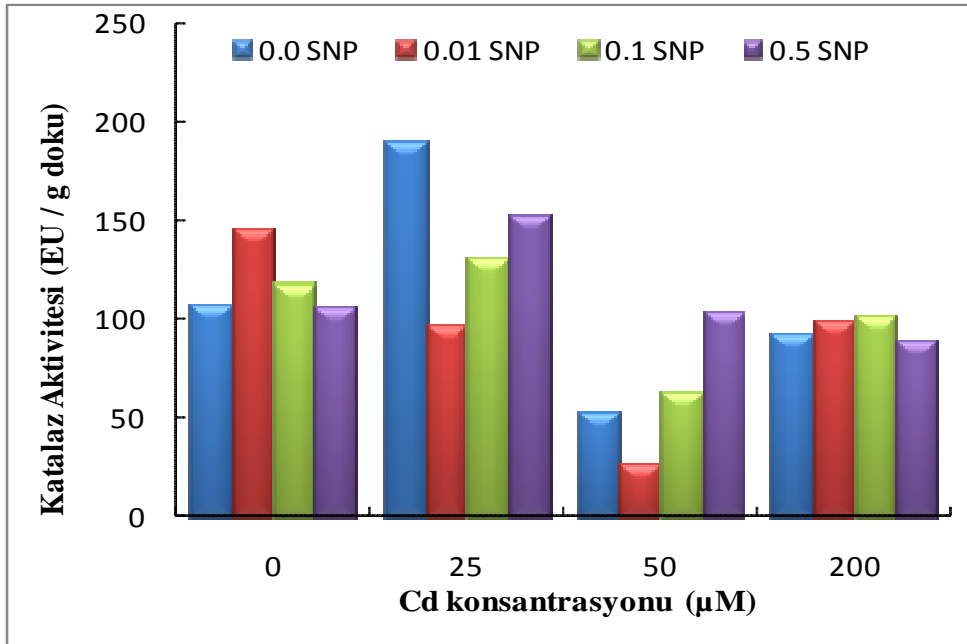
aktivitesi SNP'nin üç konsantrasyonunda da azaldığı görülmüştür ( $P < 0.05$ ). 50  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde CAT aktivitesi SNP'nin 0.01 mM ile %50 azalırken, 0.5 mM SNP %100 artış görülmüştür. Ancak 0.1 mM ile önemli bir değişim belirlenememiştir. 200  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde, CAT aktivitesi SNP'nin üç konsantrasyonunda da (0.01, 0.1, 0.5 mM) önemli bir değişiklik belirlenememiştir ( $P > 0.05$ ).

**Çizelge 4.1.** Kontrol şartlarında SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisine ait katalaz (CAT) aktivitesi sonuçları. Tabloda kök ve yaprak sütunlarının her birinde farklı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $P < 0.05$ ).

Uygulamalar		Yaprak			Kök		
		$\Delta A_{240/25 \mu\text{L}}$	$\text{H}_2\text{O}_2$ ( $\mu\text{mol} / 25 \mu\text{L}$ )	EU / g doku	$\Delta A_{240/25 \mu\text{L}}$	$\text{H}_2\text{O}_2$ ( $\mu\text{mol} / 25 \mu\text{L}$ )	EU / g doku
Cd ( $\mu\text{M}$ )	SnP (mM)						
0.0	0.0	0.022	0.335	134 j	0.018	0.270	108 de
	0.01	0.046	0.699	280 g	0.024	0.365	146 b
	0.1	0.042	0.622	249 h	0.020	0.295	118 d
	0.5	0.044	0.655	262 g	0.017	0.265	106 ef
25	0.0	0.076	1.145	458 e	0.032	0.475	190 a
	0.01	0.071	1.065	426 f	0.016	0.242	97 fg
	0.1	0.078	1.172	469 e	0.022	0.327	131 c
	0.5	0.097	1.460	584 c	0.025	0.382	153 b
50	0.0	0.084	1.265	506 d	0.008	0.132	53 h
	0.01	0.102	1.540	616 b	0.005	0.067	27 k
	0.1	0.110	1.642	657 b	0.011	0.160	64 I
	0.5	0.086	1.290	516 d	0.017	0.26	104 ef
200	0.0	0.110	1.670	668 b	0.015	0.232	93 gh
	0.01	0.108	1.615	646 b	0.016	0.247	99 fg
	0.1	0.096	1.440	576 c	0.017	0.255	102 ef
	0.5	0.128	1.922	769 a	0.015	0.222	89 h



**Şekil 4.1.** SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin yapraklarına ait katalaz (CAT) aktivitesi sonuçları



**Şekil 4.2.** SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin köklerine ait katalaz (CAT) aktivitesi sonuçları

#### 4.1.1.b. Peroksidaz Aktivitesi Sonuçları

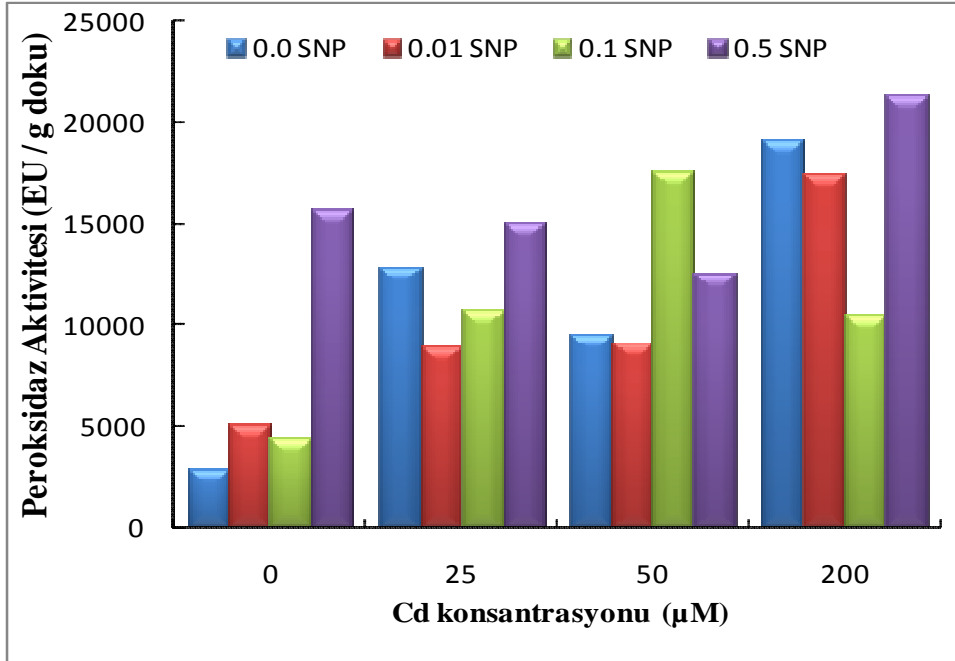
Farklı konsantrasyonlarda (0.01, 0.1 ve 0.5 mM) SNP uygulamalarından sonra 25, 50 ve 200  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında POX aktivitesine ait sonuçlar Çizelge 4.2 ve Şekil 4.3'te sunulmuştur. Tek başına SNP uygulanmış bitkilerin yapraklarında POX aktivitesi sonuçları incelendiğinde, 0.01, 0.1 ve 0.5 mM SNP uygulanmış bitkilerde POX aktivitesi artış göstermiş ve bu artışlar kontrole göre, %72, %48, %530 gibi önemli oranlarda gerçekleşmiştir. Tek başına Cd uygulamasında 25, 50 ve 200  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında da POX aktivitesinde artış görülmüş ve bu artışlar kontrole göre sırasıyla %434, %324 ve %645 gibi yüksek değerlere ulaşmıştır. Elde edilen değerler istatistik olarak da önemli bulunmuştur ( $P<0.05$ ). SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış bitkilerden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 25  $\mu$ M Cd'ye maruz kalmış bitkilerin yapraklarında 0.01 ve 0.1 mM SNP, POX aktivitesini azaltırken, 0.5 mM SNP artırmıştır ( $P<0.05$ ). 50  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında 0.01 mM SNP'de önemli bir değişim ( $P>0.05$ ) görülmezken, 0.1 ve 0.5 mM SNP'lerde aktivitede önemli artışlar belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). 200  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında ise 0.1 mM SNP POX aktivitesini azaltırken, 0.5 mM SNP POX aktivitesini artırmıştır ( $P<0.05$ ), ancak 0.01 mM SNP POX aktivitesi üzerinde önemli bir değişime neden olamamıştır ( $P>0.05$ ).

Köklerden de elde edilen POX aktivitesine ait sonuçlar Çizelge 4.2 ve Şekil 4.4'de sunulmuştur. Tek başına SNP uygulanmış bitki köklerinde, 0.01 mM SNP POX aktivitesini azaltmıştır ( $P<0.05$ ), ancak 0.1 ve 0.5 mM SNP uygulamaları POX aktivitesinde önemli bir değişikliğe neden olamamıştır ( $P>0.05$ ). Tek başına Cd uygulamasında 25  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde POX aktivitesi azalırken ( $P<0.05$ ), 50 ve 200  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde POX aktivitesinde önemli bir değişiklik görülmemiştir ( $P>0.05$ ). SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış bitkilerden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 25  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde SNP uygulamalarının üçü de POX aktivitesini önemli ölçüde ( $P<0.05$ ) artırmıştır. 50  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitki

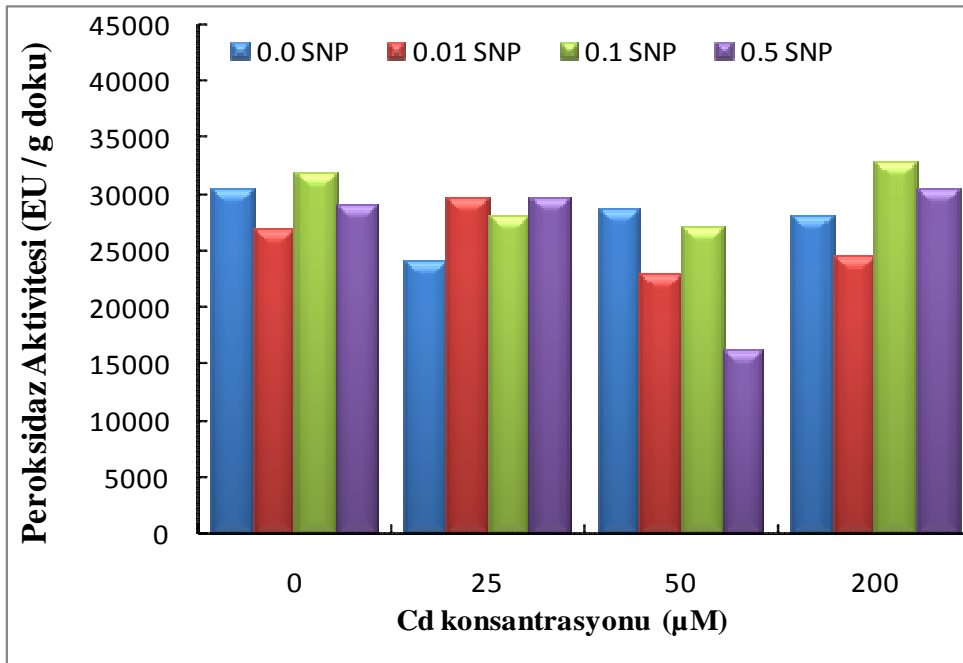
köklerinde 0.01 ve 0.5 mM SNP, POX aktivitesini azaltırken ( $P<0.05$ ), 0.1 mM SNP önemli bir değişiklik yapmamıştır ( $P>0.05$ ). 200  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde 0.01 mM SNP uygulaması, POX aktivitesini azaltırken, 0.1 mM SNP artırmıştır ( $P<0.05$ ), ancak 0.5 mM SNP POX aktivitesinde önemli bir değişikliğe sebep olamamıştır ( $P>0.05$ ).

**Çizelge 4.2.** Kontrol şartlarında SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisine ait peroksidaz (POX) aktivitesi sonuçları. Tabloda kök ve yaprak sütunlarının her birinde farklı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $P<0.05$ ).

Uygulamalar		Yaprak			Kök		
Cd ( $\mu\text{M}$ )	SNP (mM)	$\Delta A_{470}/10 \mu\text{l}$	EU /10 $\mu\text{l}$	EU / g doku	$\Delta A_{470}/10 \mu\text{l}$	EU /10 $\mu\text{l}$	EU / g doku
0.0	0.0	0.030	2.957	2957 j	0.305	30.47	30470 b
	0.01	0.051	5.093	5093 h	0.268	26.84	26843 e
	0.1	0.044	4.370	4370 I	0.318	31.75	31750 a
	0.5	0.155	15.69	15693 c	0.290	29.01	29003 bc
25	0.0	0.128	12.83	12830 d	0.240	24.05	24050 f
	0.01	0.089	8.906	8907 g	0.297	29.76	29763 b
	0.1	0.107	10.72	10723 e	0.281	28.11	28113 cde
	0.5	0.150	14.96	14967 c	0.297	29.76	29763 b
50	0.0	0.095	9.550	9550 f	0.286	28.63	28630 b
	0.01	0.092	9.170	9170 fg	0.230	23.02	23020 c
	0.1	0.176	17.59	17593 b	0.270	27.08	27083 f
	0.5	0.125	12.53	12530 d	0.162	16.26	16263 e
200	0.0	0.191	19.06	19063 a	0.281	28.09	28087 cd
	0.01	0.175	17.53	17530 b	0.246	24.57	24573 f
	0.1	0.105	10.47	10473 e	0.327	32.75	32747 a
	0.5	0.213	21.30	21303 a	0.305	30.50	30503 b



Şekil 4.3. SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin yapraklarına ait peroksidaz (POX) aktivitesi sonuçları



Şekil 4.4. SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin köklerine ait peroksidaz (POX) aktivitesi sonuçları

#### 4.1.1.c. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Sonuçları

Farklı konsantrasyonlarda (0.01, 0.1 ve 0.5 mM) SNP uygulamasından sonra, 25, 50 ve 200  $\mu$ M Cd stresine maruz bırakılmış bitki yapraklarında, SOD aktivitesinde önemli sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.5). Tek başına SNP uygulanmış bitki yapraklarında SNP'nin üç konsantrasyonu (0.01, 0.1 ve 0.5 mM) SOD aktivitesini önemli seviyelerde düşürmüştür ( $P<0.05$ ). Tek başına 25, 50 ve 200  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında da SOD aktivitesinin düştüğü belirlenmiş ve en fazla düşüşlerin 25 ve 50  $\mu$ M Cd stresinde olduğu gözlenmiştir ( $P<0.05$ ). SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış bitkilerden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 25  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitkilerde 0.01 mM SNP, SOD aktivitesinde azalışa neden olurken, 0.1 ve 0.5 mM SNP ise SOD aktivitesinde artışa neden olmuştur. Elde edilen veriler kontrol değerlerine göre kıyaslandığında farklılıkların istatistik olarak anlamlı olduğu görülmüştür ( $P<0.05$ ). 50  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitkilerde SNP'nin üç uygulamasında SOD aktivitesinde artış görülmüş ve bu artışların oranları kontrollerine göre sırasıyla, %53, %275 ve %326 gibi yüksek değerlerde olmuştur. İlave olarak, 200  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitkilerde SNP'nin üç uygulamasında da SOD aktivitesini azaltmıştır ( $P<0.05$ ).

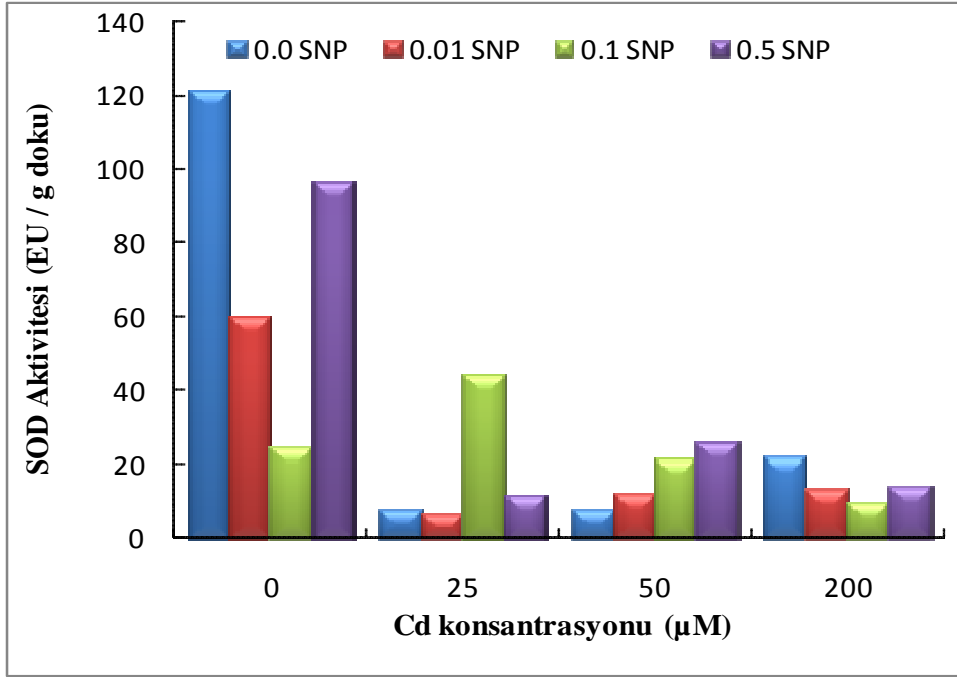
Çalışmalarımızda mısır köklerine ait sonuçlar da incelendiğinde SOD aktivitesine ait önemli sonuçlar elde edildiği görülebilir (Çizelge 4.3, Şekil 4.6). Tek başına SNP uygulanmış bitki köklerinde 0.01 mM SNP uygulaması SOD aktivitesini artırırken, 0.5 mM SNP azaltmıştır ( $P<0.05$ ). SNP'nin 0.1 mM uygulamasında ise SOD aktivitesinde önemli bir değişim görülmemiştir ( $P<0.05$ ). Tek başına Cd uygulamasında 25 ve 200  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde SOD aktivitesinde azalma görülmüştür, özellikle 200  $\mu$ M Cd stresinde aktivite önemli ölçüde azalmıştır ( $P<0.05$ ). Ancak 50  $\mu$ M Cd stresinde aktivitenin arttığı görülmüştür ( $P<0.05$ ). SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış bitkilerden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 25  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde 0.01 mM SNP ile SOD aktivitesi artmış, ancak 0.1 mM SNP ile azalmıştır ( $P<0.05$ ). SNP'nin 0.5 mM uygulaması ise SOD aktivitesinde önemli bir değişiklik yapmamıştır ( $P>0.05$ ). 50  $\mu$ M Cd stresine maruz



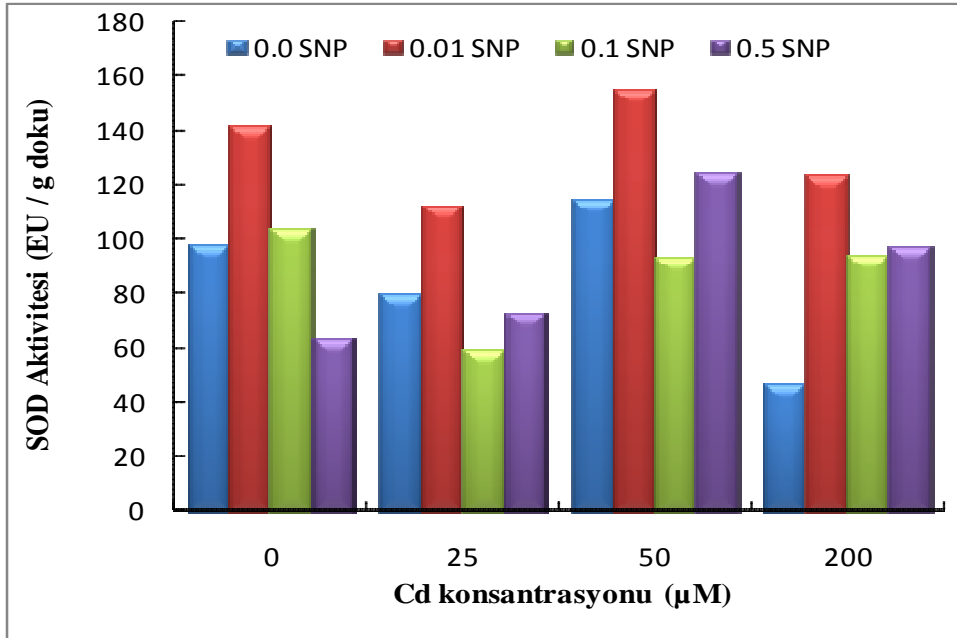
kalmış bitki köklerinde 0.01 mM SNP, SOD aktivitesini artırırken, 0.1 mM SNP aktiviteyi azaltmıştır ( $P<0.05$ ). SNP'nin 0.5 mM uygulaması ise aktivite üzerinde önemli bir değişikliğe sebep olmamıştır ( $P>0.05$ ). 200  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde SNP'nin üç uygulaması da SOD aktivitesini arttırmış ( $P<0.05$ ) ve özellikle 0.01 mM SNP, SOD aktivitesini en fazla arttıran uygulama olmuştur.

**Çizelge 4. 3.** Kontrol şartlarında SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisine ait süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi sonuçları. Tabloda kök ve yaprak sütunlarının her birinde farklı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $P<0.05$ ).

Uygulamalar		Yaprak			Kök		
Cd ( $\mu\text{M}$ )	SNP (mM)	$\Delta A_{560}/100 \mu\text{L}$	EU/100 $\mu\text{L}$	EU/g doku	$\Delta A_{560}/100 \mu\text{L}$	EU/100 $\mu\text{L}$	EU/g doku
0.0	0.0	0.461	1.21	121 a	0.3348	0.98	98 d
	0.01	0.285	0.6	60 c	0.48	1.417	141.7 a
	0.1	0.1304	0.244	24.4 e	0.353	1.035	103.5 d
	0.5	0.288	0.968	96.8 b	0.2165	0.635	63.5 g
25	0.0	0.022	0.077	7.7 j	0.289	0.798	79.8 f
	0.01	0.023	0.068	6.8 j	0.408	1.126	112.6 c
	0.1	0.126	0.44	44 d	0.215	0.594	59.4 I
	0.5	0.034	0.119	11.9 h	0.265	0.73	73 g
50	0.0	0.025	0.079	7.9 j	0.333	1.145	114.5 c
	0.01	0.038	0.121	12.1 gh	0.4514	1.55	155 a
	0.1	0.065	0.217	21.7 f	0.2728	0.937	93.7 e
	0.5	0.077	0.258	25.8 e	0.3618	1.243	124.3
200	0.0	0.066	0.218	21.8 f	0.1548	0.465	46.5 f
	0.01	0.04	0.132	13.2 g	0.412	1.237	123.7 b
	0.1	0.03	0.099	9.9 I	0.3142	0.943	94.3 e
	0.5	0.042	0.138	13.8 g	0.324	0.97	97 de



**Şekil 4.5.** SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin yapraklarına ait süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi sonuçları



**Şekil 4.6.** SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin köklerine ait süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi sonuçları

#### 4.1.2. Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve Lipid Peroksidasyonuna Ait Sonuçlar

##### 4.1.2.a. İçsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarlarına ait sonuçlar

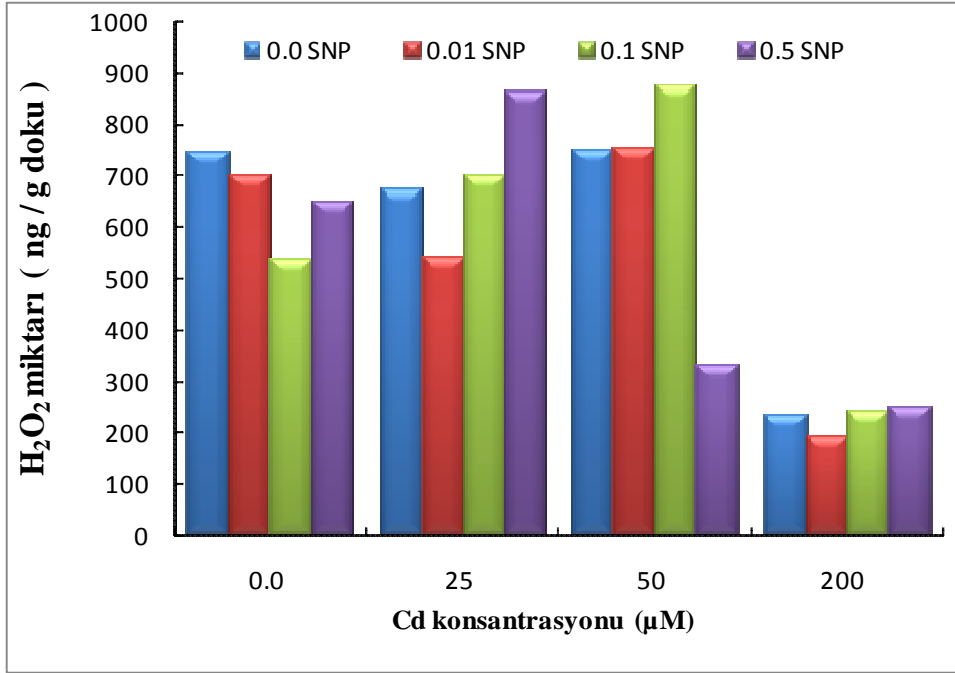
0.01, 0.1 ve 0.5 mM SNP uygulamasından sonra farklı konsantrasyonlarda (25, 50 ve 200 µM) Cd stresine maruz bırakılmış bitki yapraklarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı belirlenmiş ve yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4, Şekil 4.7’te sunulmuştur. Tek başına SNP uygulanmış bitki yapraklarında 0.01 mM SNP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında önemli bir değişikliğe neden olmamıştır (P>0.05), ancak SNP’nin diğer iki uygulaması H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında azalmaya sebep olmuştur (P<0.05). Tek başına Cd uygulamasında 25 ve 50 µM Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında önemli bir değişiklik görülmemiştir (P>0.05), ancak 200 µM Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (P<0.05). SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış bitkilerden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 25 µM Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında 0.01 mM SNP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını azaltırken (P<0.05), 0.1 mM SNP H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında önemli bir değişikliğe neden olmamıştır (P>0.05). Buna karşın 0.5 mM SNP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında artışa neden olmuştur. 50 µM Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında 0.01 mM SNP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında önemli bir değişikliğe neden olmamıştır (P>0.05). SNP’nin 0.1 mM uygulaması H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında artışa neden olurken (P<0.05), 0.5 mM uygulaması ise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında önemli bir azalışa neden olmuştur (P<0.05). 200 µM Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında 0.01 mM SNP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını azaltırken, SNP’nin diğer iki uygulaması (0.1 ve 0.5 mM) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında önemli bir değişikliğe neden olmamıştır (P>0.05).

Aynı konsantrasyonlardaki SNP uygulamasından sonra Cd stresine maruz bırakılmış bitki köklerinde de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı belirlenmiş ve yapılan çalışmalardan önemli sonuçlara ulaşılmıştır (Çizelge 4.4, Şekil 4.8). Tek başına SNP uygulanmış bitki köklerinde 0.01 ve 0.5 mM SNP uygulamaları H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında önemli bir değişikliğe neden olmamıştır (P>0.05). Ancak 0.1 mM SNP konsantrasyonu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını azaltmıştır. Tek başına Cd uygulamasında 25, 50 ve 200 µM Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının üç uygulama ile azaldığı görülmüştür. Azalma oranları kontrol bitkilerine

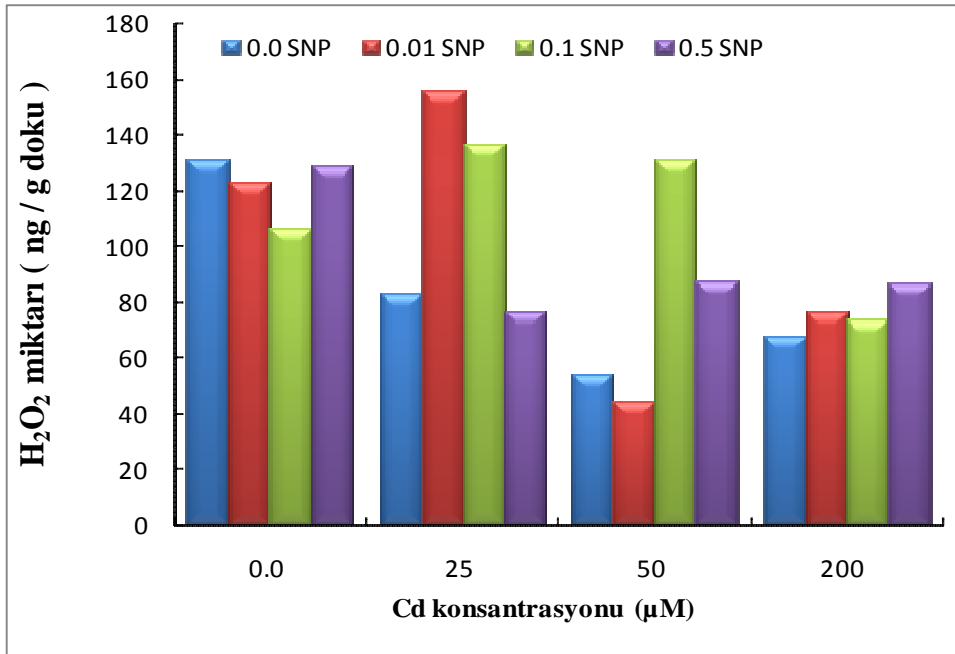
göre sırasıyla %36, %59 ve %48 gibi önemli oranlarda gerçekleşmiştir. SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış bitkilerden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 25  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında 0.01 ve 0.1 mM SNP uygulamaları,  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarını arttırmıştır ( $P<0.05$ ). 0.5 mM SNP ise  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarında önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. 50  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde 0.01 mM SNP,  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarını azaltırken ( $P<0.05$ ), 0.1 ve 0.5 mM SNP konsantrasyonu ise  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarını arttırdığı görülmüştür ( $P<0.05$ ).  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarında en fazla artış 0.1 mM SNP uygulanmış bitki köklerinde görülmüştür. 200  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde 0.01 ve 0.5 mM SNP  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarını arttırırken ( $P<0.05$ ), 0.1 mM SNP  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarında önemli bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P>0.05$ ).

**Çizelge 4.4.** Kontrol şartlarında SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisine ait hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) miktarı sonuçları. Tabloda kök ve yaprak sütunlarının her birinde farklı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $P<0.05$ ).

Uygulamalar		Yaprak			Kök		
Cd ( $\mu\text{M}$ )	SNP (mM)	$\Delta A_{415}/1.5 \text{ ml}$	$\text{H}_2\text{O}_2$ (ng/1.5 ml)	$\text{H}_2\text{O}_2$ (ng/g doku)	$\Delta A_{415}/1.5 \text{ ml}$	$\text{H}_2\text{O}_2$ (ng /1.5 ml)	$\text{H}_2\text{O}_2$ (ng/g doku)
0.0	0.0	0.843	140.37	748.63 b	0.147	24.49	130.61 b
	0.01	0.791	131.82	703.05 c	0.139	23.12	123.28 c
	0.1	0.608	101.21	539.78 d	0.120	19.90	106.18 d
	0.5	0.732	121.10	650.63 c	0.145	24.11	128.62 bc
25	0.0	0.761	126.74	675.95 c	0.094	15.57	83.08 e
	0.01	0.612	101.95	543.78 d	0.175	29.19	155.72 a
	0.1	0.791	131.82	703.05 c	0.154	25.57	136.39 b
	0.5	0.973	162.10	864.54 a	0.086	14.32	76.42 f
50	0.0	0.846	140.90	751.48 b	0.061	10.16	54.20 h
	0.01	0.850	141.69	755.71 b	0.051	8.41	44.87 I
	0.1	0.988	164.52	877.42 a	0.147	24.53	130.84 b
	0.5	0.373	62.14	331.42 e	0.098	16.36	87.30 e
200	0.0	0.265	44.11	235.24 f	0.076	12.66	67.52 g
	0.01	0.220	36.71	195.80 g	0.086	14.32	76.41 f
	0.1	0.276	45.90	244.80 f	0.083	13.74	73.30 f
	0.5	0.2827	47.09	251.16 f	0.098	16.28	86.85 e



**Şekil 4.7.** SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin yapraklarına ait hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) miktarı sonuçlar



**Şekil 4.8.** SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin köklerine ait hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) miktarı sonuçları

#### 4.1.2.b. Lipid peroksidasyon seviyesi (MDA miktarı) Sonuçları

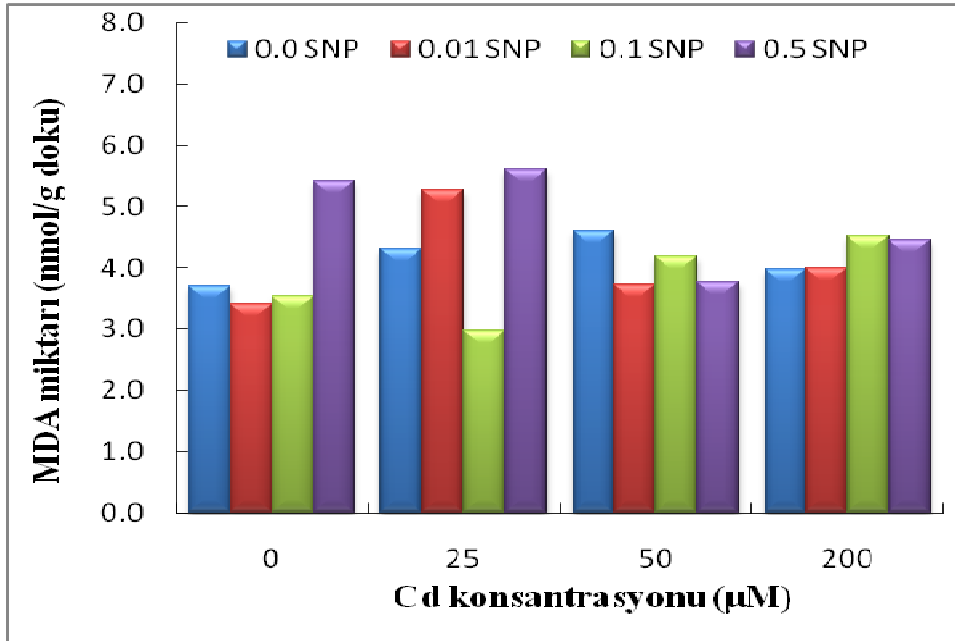
Farklı konsantrasyonlarda (0.01, 0.1 ve 0.5 mM) SNP uygulamasından sonra, 25, 50 ve 200  $\mu$ M Cd stresine maruz bırakılmış bitki yapraklarında lipid peroksidasyon seviyesi (MDA miktarı olarak) ait sonuçlar Çizelge 4.5'te ve daha iyi yorumlanabilmesi için de Şekil 4.9 sunulmuştur. Tek başına SNP uygulanmış bitki yapraklarında SNP'nin iki konsantrasyonu (0.01 ve 0.1 mM) MDA seviyesinde önemli bir değişiklik yapmazken, 0.5 mM SNP MDA seviyesini önemli ölçüde artırmıştır ( $P<0.05$ ). Tek başına Cd uygulamasında, 25 ve 50  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında MDA seviyesinde sırasıyla, %16 ve %24 oranında bir artış görülürken ( $P<0.05$ ), 200  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında MDA seviyesinde önemli bir değişiklik görülmemiştir ( $P>0.05$ ). SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış bitkilerden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 25  $\mu$ M Cd stresine maruz bırakılmış bitkilerde 0.01 ve 0.5 mM SNP, MDA miktarını artırmıştır. Artış miktarı kontrole kıyasla sırasıyla, %23 ve %30 oranlarında olmuştur. SNP'nin 0.1 mM uygulaması ise MDA miktarını %31 oranında azaltmıştır ( $P<0.05$ ). 50  $\mu$ M Cd stresine maruz bırakılmış bitki yapraklarında MDA miktarı 0.01 ve 0.5 mM SNP uygulamaları ile kontrole göre sırasıyla %19 ve %18 oranında düşerken, 0.1 mM SNP konsantrasyonunda MDA seviyesinde önemli bir değişiklik görülmemiştir ( $P>0.05$ ). 200  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında 0.01 mM SNP MDA seviyesinde önemli bir değişiklik görülmemiştir ( $P>0.05$ ), ancak 0.1 ve 0.5 mM SNP ile MDA seviyesinde artış tespit edilmiştir.

Köklerde de MDA seviyesine ait önemli sonuçlar elde edilmiş ve sonuçlar Çizelge 4.5, Şekil 4.10'da sunulmuştur. Tek başına SNP uygulanmış bitki köklerinde 0.01 ve 0.5 mM SNP, MDA seviyesini kontrole göre sırasıyla %41 ve %28 oranında artırmıştır. SNP'nin 0.1 mM uygulaması MDA seviyesinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P>0.05$ ). Tek başına Cd uygulamasında 25, 50 ve 200  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde, 25  $\mu$ M Cd stresinde MDA seviyesi önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). Ancak 50  $\mu$ M Cd stresinde MDA seviyesinin azaldığı belirlenirken, 200  $\mu$ M Cd stresinde MDA seviyesinde önemli bir değişiklik

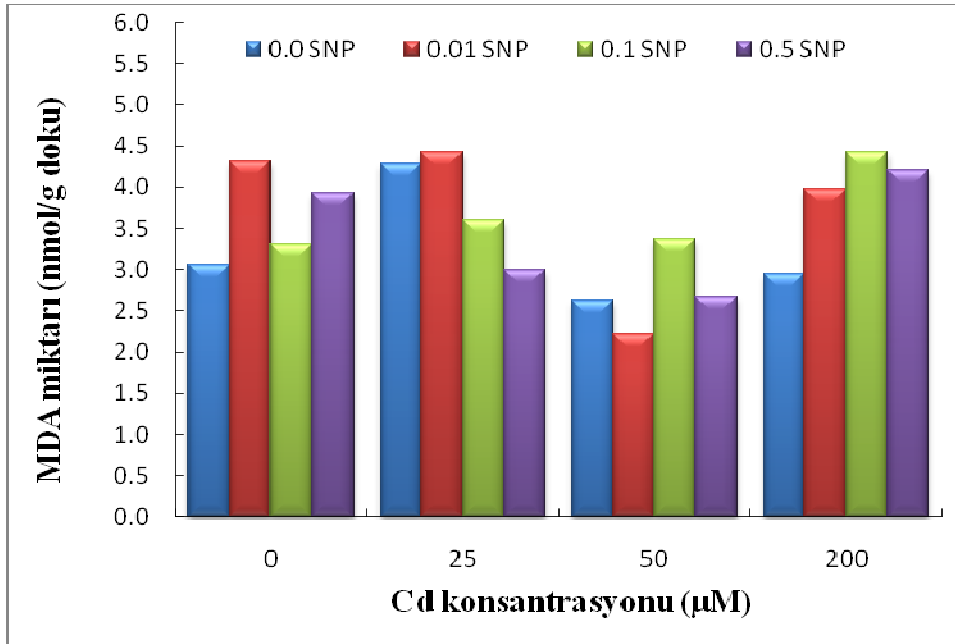
görülmemiştir ( $P>0.05$ ). SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış bitkilerden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 25  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde 0.01 mM SNP, MDA seviyesi üzerine önemli bir etkisi olmamıştır ( $P>0.05$ ). Ancak 0.1 ve 0.5 mM SNP uygulamaları MDA seviyesini kontrole göre sırasıyla %16 ve %30 oranında azaltmıştır ( $P<0.05$ ). 50  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde 0.01 mM SNP, MDA seviyesini azaltırken, 0.1 mM SNP ise MDA seviyesini arttırdığı belirlenmiştir. SNP'nin 0.5 mM uygulaması ise MDA seviyesinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P>0.05$ ). 200  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde MDA seviyesi SNP'nin üç konsantrasyonunda da arttığı görülmüştür ( $P<0.05$ ). Artış miktarları kontrole göre sırasıyla %34, %49 ve %43 oranında olmuştur.

**Çizelge 4.5.** Kontrol şartlarında SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisine ait lipid peroksidasyonu seviyesi (MDA miktarı olarak) sonuçları. Tabloda kök ve yaprak sütunlarının her birinde farklı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $P<0.05$ ).

Uygulamalar		Yaprak			Kök		
Cd ( $\mu\text{M}$ )	SNP (mM)	$\Delta A_{532-600}$	MDA (nmol/ml)	MDA (nmol/g doku)	$\Delta A_{532-600}$	MDA (nmol/ml)	MDA (nmol/g doku)
0.0	0.0	0.173	1.113	3.709 d	0.143	0.919	3.064 ed
	0.01	0.159	1.026	3.419 d	0.201	1.296	4.322 a
	0.1	0.164	1.058	3.526 d	0.154	0.990	3.300 c
	0.5	0.252	1.622	5.407 a	0.183	1.180	3.935 b
25	0.0	0.200	1.290	4.300 b	0.200	1.287	4.289 a
	0.01	0.246	1.583	5.278 a	0.206	1.325	4.418 a
	0.1	0.139	0.893	2.978 e	0.168	1.080	3.601 c
	0.5	0.261	1.683	5.612 a	0.140	0.900	2.999 d
50	0.0	0.215	1.384	4.612 b	0.122	0.787	2.623 e
	0.01	0.174	1.119	3.730 d	0.103	0.664	2.215 f
	0.1	0.195	1.258	4.193 bc	0.157	1.013	3.376 c
	0.5	0.176	1.132	3.773 d	0.124	0.800	2.666 e
200	0.0	0.185	1.190	3.967 c	0.138	0.887	2.956 d
	0.01	0.186	1.200	3.999 c	0.185	1.190	3.967 b
	0.1	0.211	1.358	4.526 b	0.206	1.325	4.418 a
	0.5	0.208	1.338	4.461 b	0.196	1.264	4.214 a



**Şekil 4.9.** SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin yapraklarına ait lipid peroksidasyonu seviyesi (MDA miktarı olarak)



**Şekil 4.10.** SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin köklerine ait lipid peroksidasyonu seviyesi (MDA miktarı olarak)



## 4.2. SNP'nin Tohumlara Uygulandığı Çalışmalar ve Elde Edilen Bulgular

Çalışmamızın bu aşamasında, mısır bitki tohumları ekimden önce farklı seviyelerde SNP çözelltilerinde (0.01, 0.1 ve 0.5 mM) 24 saat ön ıslatmaya bırakılmıştır. Ön ıslatmaya alınmış tohumlar daha sonra ekilmişlerdir. Bu uygulamadan sonra elde edilen fideler ise 14. gün Cd (25, 50, 200  $\mu$ M) stresine maruz bırakılmışlardır. Yapılan uygulamalardan sonra elde edilen bitkilerin kök ve yapraklarından antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, CAT, POX), LPO ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarları belirlenerek mısır bitkisinin Cd stresine verdiği antioksidatif cevaplar belirlenmiştir. Bu çalışmanın da her bir parametreye ait sonuçlarının sunumunda, önce yapraklardan elde edilen sonuçlar, peşine aynı bitkilerin köklerinden elde edilen sonuçlar verilmiştir. Sonuçlar sunulurken her bir veri, kendi kontrolü ile istatistik anlam baz alınarak karşılaştırılmıştır.

### 4.2.1. Antioksidan Enzim Aktivitesine Ait Sonuçları

#### 4.2.1.a. Katalaz Aktivitesi Sonuçları

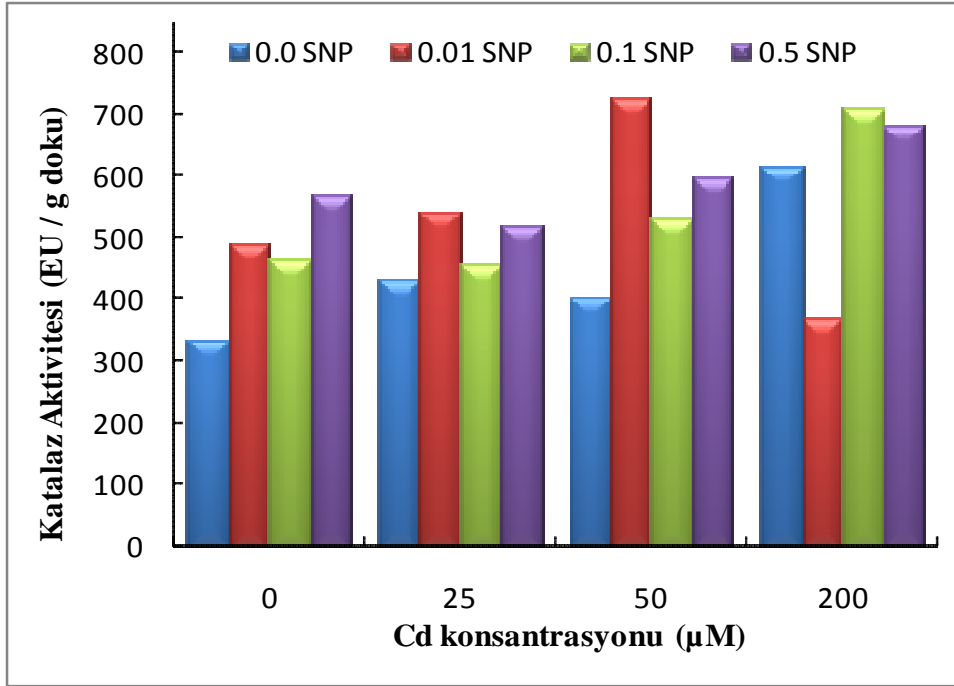
Tohumlara 0.01, 0.1 ve 0.5 mM SNP uygulamasından sonra farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 200  $\mu$ M) Cd stresine maruz bırakılmış bitki yapraklarında CAT aktivitesine ait sonuçlar Çizelge 4.6 ve Şekil 4.11'de sunulmuştur. Tohumlarına tek başına SNP uygulanmış bitkilerin yapraklarında SNP'nin 0.01, 0.1 ve 0.5 mM uygulamalarında CAT aktivitesinde kontrole göre sırasıyla %47, %39 ve %71 oranında artışlar belirlenmiştir. Tohumlarına SNP uygulaması yapılmamış, ancak 25, 50 ve 200  $\mu$ M Cd stresine maruz bırakılmış bitki yapraklarında da CAT aktivitesi önemli seviyelerde artmış ( $P<0.05$ ) ve bu artışlar kontrole göre sırasıyla %30, %22, %85 gibi önemli oranlarda olmuştur. Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra ise Cd stresine maruz kalmış bitkilerden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 25  $\mu$ M Cd stresindeki bitki yapraklarında SNP'nin 0.01, 0.5 mM uygulamalarında CAT aktivitesinin sırasıyla kontrole göre %25 ve %20 oranında arttığı görülmüştür ( $P<0.05$ ) ancak 0.1 mM SNP'de aktivitede önemli bir değişiklik görülmemiştir ( $P>0.05$ ). 50  $\mu$ M Cd stresindeki bitki yapraklarında SNP'nin üç uygulaması da CAT aktivitesinde artış görülmüştür ( $P<0.05$ ).

Buradaki artış miktarları kontrole göre sırasıyla %79, %31 ve %48 oranında olmuştur. 200  $\mu$ M Cd stresindeki bitki yapraklarında, SNP'nin 0.01 mM uygulaması CAT aktivitesini %40 oranında düşürürken ( $P<0.05$ ), 0.1 ve 0.5 mM uygulamaları CAT aktivitesini sırasıyla %15 ve %11 oranında arttırmıştır ( $P<0.05$ ).

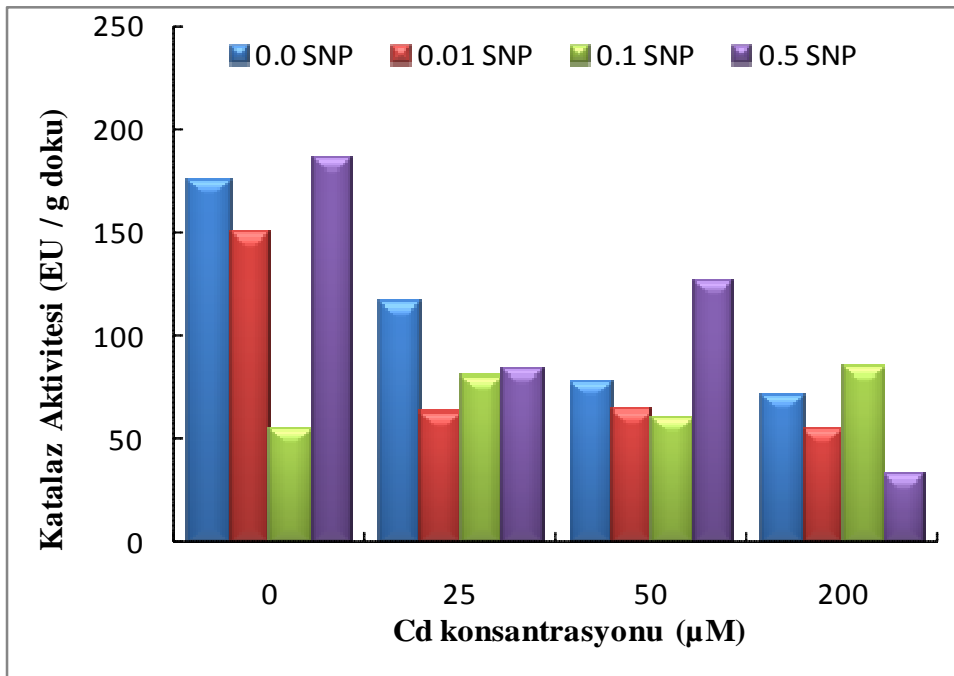
Aynı bitkinin köklerinden elde edilen CAT aktivitesine ait sonuçlar Çizelge 4.6 ve Şekil 4.12'de sunulmuştur. Tohumlarına tek başına SNP uygulanmış bitkilerin köklerinde 0.01 ve 0.1 mM SNP uygulamaları CAT aktivitesini kontrole göre sırasıyla %14 ve %68 oranında düşürmüştür ( $P<0.05$ ). SNP'nin 0.5 mM uygulaması ise CAT aktivitesinde önemli bir değişikliğe neden olamamıştır ( $P>0.05$ ). Tek başına Cd uygulamasında 25, 50 ve 200  $\mu$ M Cd stresi altındaki bitki köklerinde CAT aktivitesi kontrole göre sırasıyla %34, %55 ve %59 oranında azalmıştır ( $P<0.05$ ). Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış bitkilerden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 25  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde CAT aktivitesi SNP'nin üç uygulaması ile azalmıştır ( $P<0.05$ ). 50  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde CAT aktivitesi SNP'nin 0.01 ve 0.1 mM uygulamaları ile düşerken, 0.5 mM ile önemli ölçüde artmıştır ( $P<0.05$ ). 200  $\mu$ M Cd stresindeki bitki köklerinde, CAT aktivitesi SNP'nin 0.01 ve 0.5 mM uygulamaları ile azalmıştır ( $P<0.05$ ), ancak 0.1 mM SNP ile ise önemli seviyede ( $P<0.05$ ) artmıştır

**Çizelge 4.6.** Kontrol şartlarında SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisine ait katalaz (CAT) aktivitesi sonuçları. Tabloda kök ve yaprak sütunlarının her birinde farklı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $P < 0.05$ ).

Uygulamalar		Yaprak			Kök		
		$\Delta A_{240}/25\mu\text{L}$	$\text{H}_2\text{O}_2$ ( $\mu\text{mol}/25\mu\text{L}$ )	EU/g doku	$\Delta A_{240}/25\mu\text{L}$	$\text{H}_2\text{O}_2$ ( $\mu\text{mol}/25\mu\text{L}$ )	EU/g doku
Cd ( $\mu\text{M}$ )	SNP (mM)						
0.0	0.0	0.056	0.833	333 g	0.029	0.440	176 a
	0.01	0.082	1.223	489 d	0.025	0.378	151 b
	0.1	0.077	1.158	463 d	0.009	0.140	56 g
	0.5	0.095	1.420	568 c	0.031	0.468	187 a
25	0.0	0.072	1.083	433 d	0.020	0.293	117 c
	0.01	0.090	1.353	541 c	0.011	0.160	64 ef
	0.1	0.076	1.138	455 d	0.014	0.203	81 d
	0.5	0.087	1.300	520 c	0.014	0.213	85 d
50	0.0	0.068	1.013	405 e	0.013	0.198	79 d
	0.01	0.121	1.810	724 a	0.011	0.163	65 ef
	0.1	0.088	1.325	530 c	0.010	0.153	61 ef
	0.5	0.100	1.495	598 b	0.021	0.318	127 c
200	0.0	0.103	1.540	616 b	0.012	0.180	72 e
	0.01	0.062	0.925	370 f	0.009	0.138	55 g
	0.1	0.118	1.773	709 a	0.014	0.215	86 d
	0.5	0.114	1.708	683 a	0.006	0.085	34 h



**Şekil 4.11.** Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin yapraklarına ait katalaz (CAT) aktivitesi sonuçları



**Şekil 4.12.** Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin köklerine ait katalaz (CAT) aktivitesi sonuçları

#### 4.2.1.b. Peroksidaz Aktivitesi Sonuçları

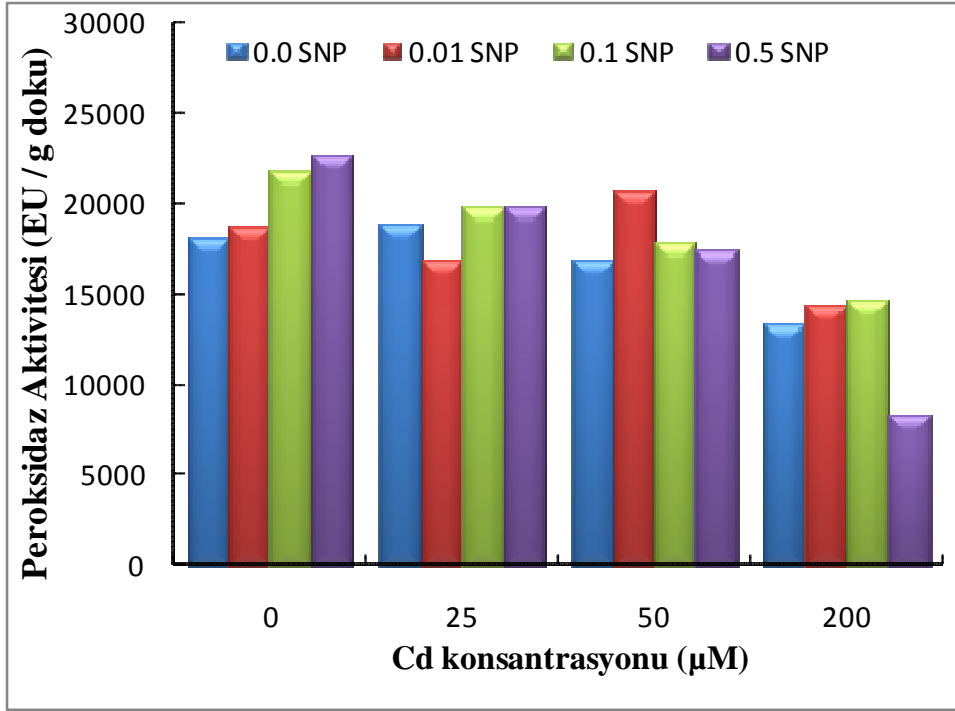
Tohumlarına SNP uygulamasından sonra Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında POX aktivitesinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7 ve Şekil 4.13'de sunulmuştur. Tohumlarına tek başına SNP uygulanmış bitkilerin yapraklarında POX aktivitesi SNP'nin 0.01 mM uygulaması ile önemli bir değişiklik göstermemiştir ( $P>0.05$ ). Ancak 0.1 ve 0.5 mM SNP ile sırasıyla %21 ve %25 oranında artış göstermiştir ( $P<0.05$ ). Tek başına Cd uygulamasında 25 ve 50  $\mu\text{M}$  Cd stresi altındaki bitki yapraklarında POX aktivitesinde önemli bir değişiklik belirlenmemiştir ( $P>0.05$ ). Ancak 200  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında POX aktivitesinin kontrole göre kıyaslandığında azaldığı görülmüştür ( $P<0.05$ ). Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış bitkilerden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 25  $\mu\text{M}$  Cd'ye maruz kalmış bitkilerin yapraklarında 0.01 mM SNP ile POX aktivitesi azalırken ( $P<0.05$ ), 0.1 ve 0.5 mM SNP ile POX aktivitesinde önemli bir değişiklik kaydedilmemiştir ( $P>0.05$ ). Buna ilave olarak, 50  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında 0.01 mM SNP ile POX aktivitesinde artış görülürken ( $P<0.05$ ), 0.1 ve 0.5 mM SNP uygulamalarında POX aktivitesinde önemli bir değişim belirlenmemiştir ( $P>0.05$ ). 200  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında 0.01 ve 0.1 mM SNP ile POX aktivitesinde önemli bir değişiklik görülmezken ( $P>0.05$ ), 0.5 mM SNP konsantrasyonunda POX aktivitesinde önemli oranda azalma görülmüştür ( $P<0.05$ ).

Köklerden elde edilen POX aktivitesine ait sonuçlar Çizelge 4.7 ve Şekil 4.14'de sunulmuştur. Tohumlarına tek başına SNP uygulanmış bitki köklerinde 0.01 mM SNP ile POX aktivitesi düşerken ( $P<0.05$ ), 0.1 ve 0.5 mM SNP uygulamalarında POX aktivitesinde önemli bir değişiklik belirlenmemiştir ( $P<0.05$ ). Tek başına Cd uygulamasında 25  $\mu\text{M}$  Cd stresindeki bitki köklerinde POX aktivitesinde önemli bir değişim görülmezken ( $P>0.05$ ), 50 ve 200  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde POX aktivitesinde azalma belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış bitkilerden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 25  $\mu\text{M}$  Cd stresi altındaki bitki köklerinde SNP'nin 0.01 ve 0.1 mM uygulamaları POX aktivitesinde önemli bir değişikliğe ( $P<0.05$ ) neden olamamıştır.

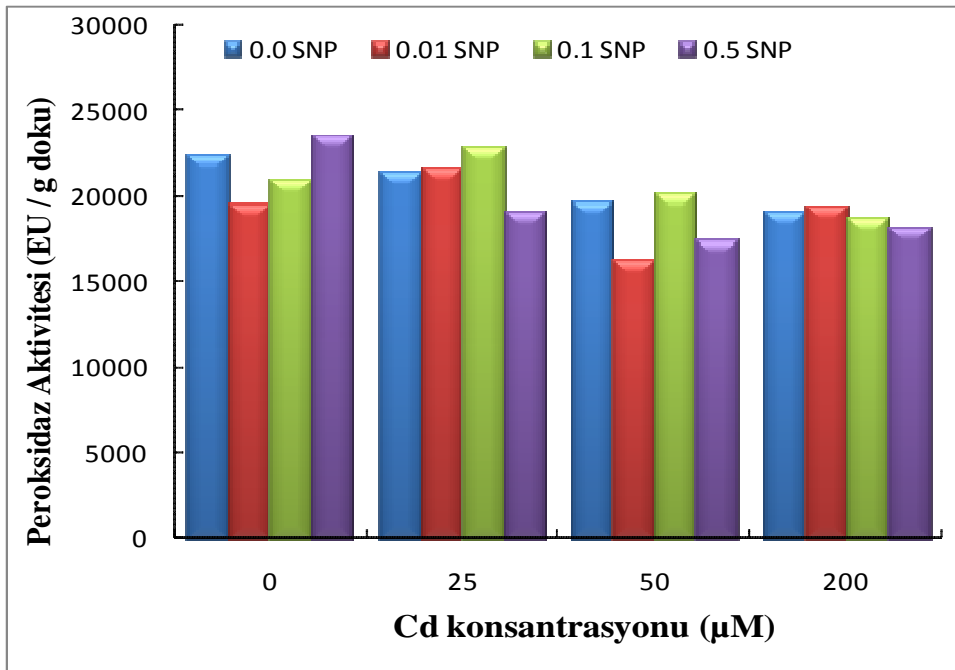
Ancak, 0.5 mM SNP, POX aktivitesini düşürmüştür ( $P<0.05$ ). 50  $\mu\text{M}$  Cd stresindeki bitki köklerinde 0.01 ve 0.5 mM SNP ile POX aktivitesi azalırken, 0.1 mM SNP konsantrasyonunda önemli bir değişiklik görülmemiştir ( $P>0.05$ ). 200  $\mu\text{M}$  Cd stresindeki bitki köklerinde SNP uygulamalarının üçü de POX aktivitesi üzerinde kontrole göre önemli değişikliklere neden olamamıştır ( $P>0.05$ ).

**Çizelge 4.7.** Kontrol şartlarında SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisine ait peroksidaz (POX) aktivitesi sonuçları. Tabloda kök ve yaprak sütunlarının her birinde farklı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $P<0.05$ ).

Uygulamalar		Yaprak			Kök		
Cd ( $\mu\text{M}$ )	SnP (mM)	$\Delta A_{470}/10 \mu\text{l}$	EU/ 10 $\mu\text{l}$	EU/g doku	$\Delta A_{470}/10 \mu\text{l}$	EU/10 $\mu\text{l}$	EU/ g doku
0.0	0.0	0.180	18.047	18047 d	0.224	22.390	22390 ab
	0.01	0.188	18.777	18777 d	0.196	19.600	19600 de
	0.1	0.218	21.780	21780 a	0.210	20.980	20980 dc
	0.5	0.226	22.623	22623 a	0.235	23.537	23537 a
25	0.0	0.189	18.900	18900 d	0.214	21.397	21397 bc
	0.01	0.168	16.827	16827 e	0.217	21.700	21700 bc
	0.1	0.197	19.740	19740 c	0.229	22.877	22877 ab
	0.5	0.198	19.830	19830 c	0.191	19.093	19093 e
50	0.0	0.169	16.923	16923 e	0.197	19.660	19660 de
	0.01	0.207	20.663	20663 b	0.163	16.293	16293 f
	0.1	0.178	17.837	17837 e	0.202	20.173	20173 dc
	0.5	0.174	17.440	17440 e	0.175	17.493	17493 f
200	0.0	0.134	13.377	13377 f	0.191	19.123	19123 e
	0.01	0.144	14.367	14367 f	0.194	19.393	19393 e
	0.1	0.147	14.657	14657 f	0.187	18.727	18727 e
	0.5	0.083	8.303	8303 g	0.182	18.157	18157 e



**Şekil 4.13.** Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin yapraklarına ait peroksidaz (POX) aktivitesi sonuçları



**Şekil 4.14.** Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin köklerine ait peroksidaz (POX) aktivitesi sonuçları

#### 4.2.1.c. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Sonuçları

Tohumlarına SNP uygulandıktan sonra, Cd stresine maruz bırakılmış bitkilerin yapraklarında SOD aktivitesi belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8 ve Şekil 4.15’de sunulmuştur. Tohumlara tek başına SNP uygulanmış bitkilerin yapraklarında 0.01 mM SNP, SOD aktivitesini azaltmıştır ( $P<0.05$ ). SNP’nin 0.1 ve 0.5 mM uygulamaları SOD aktivitesinde kontrole göre önemli bir değişiklik yapmamıştır ( $P<0.05$ ). Cd stresi altındaki bitkilerde ise, Cd’un 25 ve 200  $\mu\text{M}$  uygulamaları SOD aktivitesini artırmış ( $P<0.05$ ) ve bu artışlar kontrole göre sırasıyla %57 ve %242 gibi önemli oranlarda gerçekleşmiştir. Buna karşılık 50  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında kontrol ile deney grupları arasında önemli bir değişiklik belirlenememiştir ( $P>0.05$ ). Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış bitkilerden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 25  $\mu\text{M}$  Cd stresindeki bitkilerde SNP’nin 0.01 mM uygulaması SOD aktivitesinde önemli bir değişiklik yapmamıştır ( $P>0.05$ ). SNP’nin 0.1 mM uygulaması SOD aktivitesini azaltmış, ancak 0.5 mM’ı ise SOD aktivitesini artırmıştır. 50  $\mu\text{M}$  Cd stresindeki bitkilerde SNP’nin üç uygulaması SOD aktivitesini önemli seviyelerde ( $P<0.05$ ) artırmış ve bu artışlar kontrollerine göre kıyaslandığında sırasıyla %56, %12 ve %83 oranlarında tespit edilmiştir. 200  $\mu\text{M}$  Cd stresindeki bitkilerde SNP’nin 0.01 ve 0.5 mM uygulamaları SOD aktivitesini artırırken ( $P<0.05$ ), 0.1 mM’ı ise önemli bir değişiklik yapmamıştır ( $P>0.05$ ).

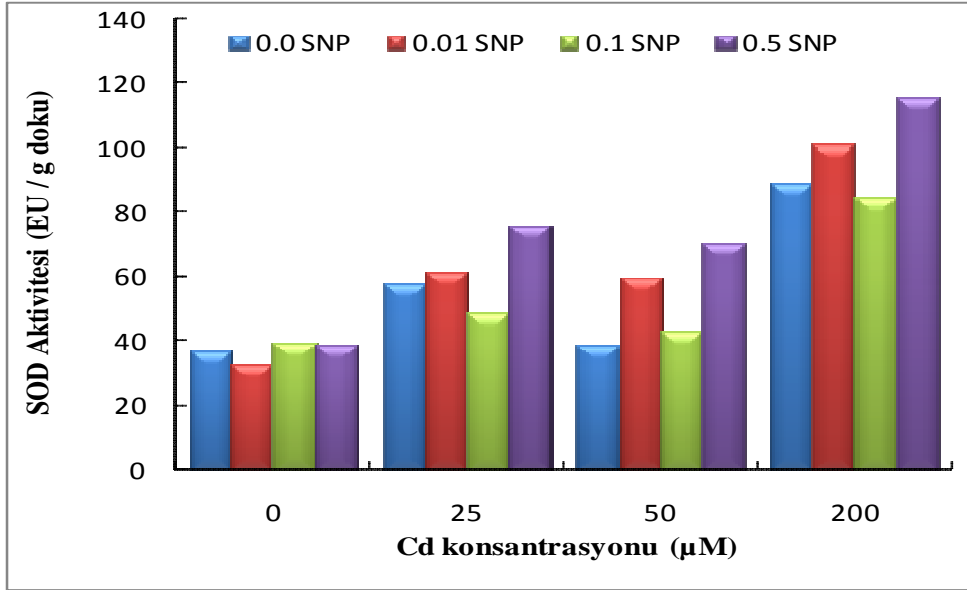
Köklerden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.8 ve Şekil 4.16’da sunulmuştur. Tohumlarına tek başına SNP uygulanmış bitki köklerinde 0.01 ve 0.5 mM SNP uygulamaları SOD aktivitesinde önemli oranlarda değiştirmemiştir ( $P>0.05$ ). SNP’nin 0.1 mM uygulaması ise SOD aktivitesinde artırmıştır ( $P<0.05$ ). Tek başına Cd uygulamasında 25, 50 ve 200  $\mu\text{M}$  Cd stresi altındaki bitki köklerinde SOD aktivitesinde önemli artışlar belirlenmiştir ( $P<0.05$ ) bu artışlar kontrol ile karşılaştırıldığında sırasıyla %11, %19 ve %30 oranlarında olduğu tespit edilmiştir. Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış bitkilerden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 25  $\mu\text{M}$  Cd stresindeki bitki köklerinde 0.01 ve 0.1 mM SNP uygulamaları SOD aktivitesini düşürmüştür ( $P<0.05$ ), ancak 0.5 mM SNP aktivitede önemli bir değişiklik yapmamıştır



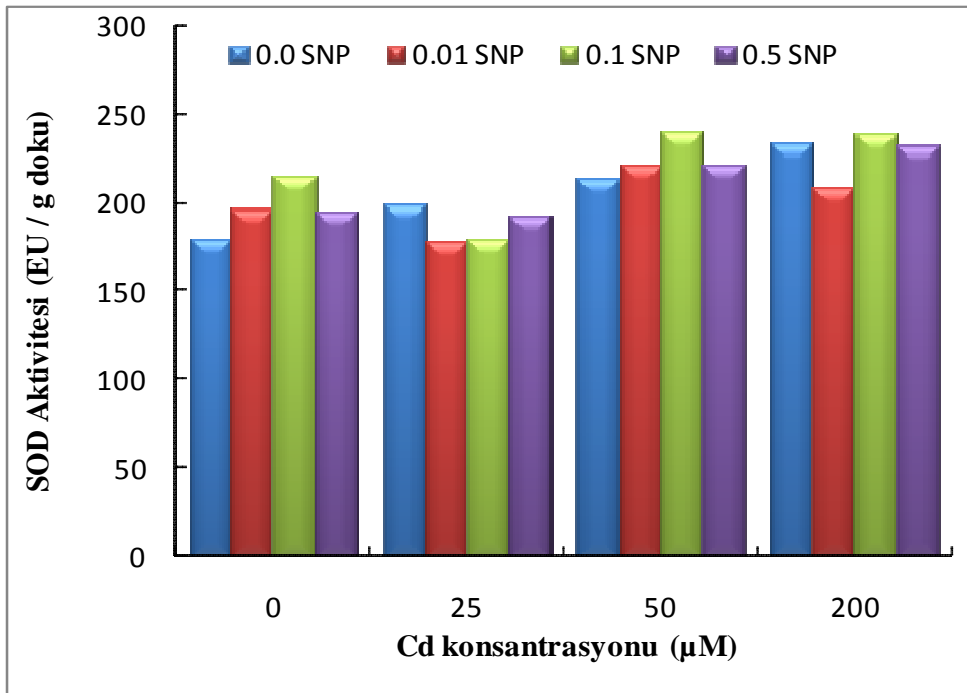
( $P>0.05$ ). 50  $\mu\text{M}$  Cd stresindeki bitki köklerinde 0.01 ve 0.5 mM SNP uygulamaları SOD aktiviteyi etkilemezken, 0.1 mM SNP artırmıştır ( $P<0.05$ ). 200  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde 0.01 mM SNP, SOD aktivitesini düşürmüştür ( $P<0.05$ ), fakat 0.1 ve 0.5 mM SNP uygulamaları ile aktivitede önemli bir değişiklik kaydedilememiştir ( $P>0.05$ ).

**Çizelge 4.8.** Kontrol şartlarında tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisine ait süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi sonuçları. Tabloda kök ve yaprak sütunlarının her birinde farklı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $P<0.05$ ).

Uygulamalar		Yaprak			Kök		
Cd ( $\mu\text{M}$ )	SNP (mM)	$\Delta A_{560}/100 \mu\text{L}$	EU/100 $\mu\text{L}$	EU/g doku	$\Delta A_{560}/100 \mu\text{L}$	EU/100 $\mu\text{L}$	EU/g doku
0.0	0.0	0.1078	0.367	36.7 gf	0.7156	1.795	179.5 e
	0.01	0.0888	0.327	32.7 g	0.783	1.965	196.5 cd
	0.1	0.107	0.395	39.5 f	0.859	2.155	215.5 bc
	0.5	0.105	0.387	38.7 f	0.776	1.947	194.7 d
25	0.0	0.157	0.578	57.8 d	0.7918	1.986	198.6 cd
	0.01	0.1675	0.617	61.7 d	0.708	1.776	177.6 e
	0.1	0.1316	0.485	48.5 e	0.662	1.793	179.3 e
	0.5	0.2062	0.759	75.9 c	0.7095	1.922	192.2 d
50	0.0	0.1044	0.385	38.5 f	1.4056	2.142	214.2 b
	0.01	0.1626	0.599	59.9 d	1.4512	2.212	221.2 b
	0.1	0.117	0.43	43 f	1.571	2.394	239.4 a
	0.5	0.191	0.704	70.4 c	1.366	2.216	221.6 b
200	0.0	0.241	0.888	88.8 b	1.4373	2.33	233 a
	0.01	0.2736	1.008	100.8 a	1.2825	2.08	208 c
	0.1	0.2295	0.845	84.5 b	1.47	2.385	238.5 a
	0.5	0.3142	1.157	115.7 a	0.744	2.315	231.5 a



**Şekil 4.15.** Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin yapraklarına ait süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi sonuçları



**Şekil 4.16.** Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin köklerine ait süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi sonuçları

## 4.2.2. Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve Lipid Peroksidasyonuna Ait Sonuçlar

### 4.2.2.a. İçsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Miktarına Ait Sonuçlar

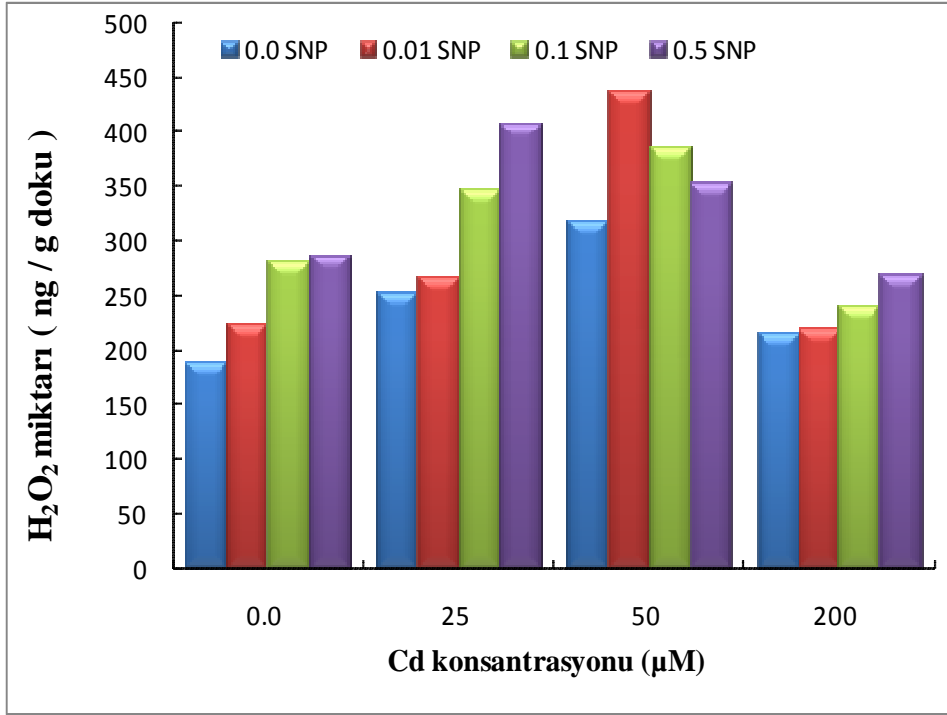
Tohumlarına SNP uygulamasından sonra, Cd stresine maruz bırakılmış bitkilerin yapraklarına ait içsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarları Çizelge 4.9 ve Şekil 4.17’de sunulmuştur. Tek başına SNP uygulanmış bitkilerin yapraklarında SNP’nin üç uygulaması (0.01, 0.1 ve 0.5 mM), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını önemli ölçüde artırmıştır (P<0.05). Bahsi geçen artışlar kontrole göre kıyaslandığında, sırasıyla %17, %47 ve %50 oranlarında olduğu belirlenmiştir. Tek başına Cd uygulamasında 25, 50 ve 200 µM Cd stresi altındaki bitkilerin yapraklarında da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında artış belirlenmiştir (P<0.05), bu artışlar da artışlar kontrole göre kıyaslandığında, sırasıyla %32, %67 ve %13 oranında olduğu tespit edilmiştir. Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış bitkilerden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 25 µM Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında, 0.01 mM SNP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında önemli bir değişikliğe neden olmazken (P>0.05), 0.1 ve 0.5 mM SNP kontrole göre sırasıyla %37 ve %61 oranında artırmıştır. 50 µM Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında SNP’nin üç uygulaması da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını kontrole göre sırasıyla %37, %21 ve %11 oranında artırdığı belirlenmiştir (P<0.05). 200 µM Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında 0.01 mM SNP H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında önemli bir değişiklik yapmazken (P>0.05), SNP’nin diğer iki uygulama H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında artışlara neden olmuştur (P<0.05). Artış oranları kontrole göre sırasıyla %11 ve %24 oranında olduğu tespit edilmiştir.

Aynı bitkilerin köklerinde de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarına ait önemli sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.18). Tek başına SNP uygulanmış bitki köklerinde 0.01 ve 0.1 mM SNP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını düşürmüştür (P<0.05), ancak 0.5 mM SNP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında önemli bir değişikliğe neden olmamıştır (P>0.05). Tek başına Cd uygulamasında 25 ve 200 µM Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının iki uygulamada da azaldığı görülmüştür. Azalma oranı kontrole göre sırasıyla %21 ve %50 oranlarında belirlenmiştir. Buna karşılık 50 µM Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarında önemli bir değişiklik görülmemiştir (P>0.05). Tohumlarına SNP uygulanmış

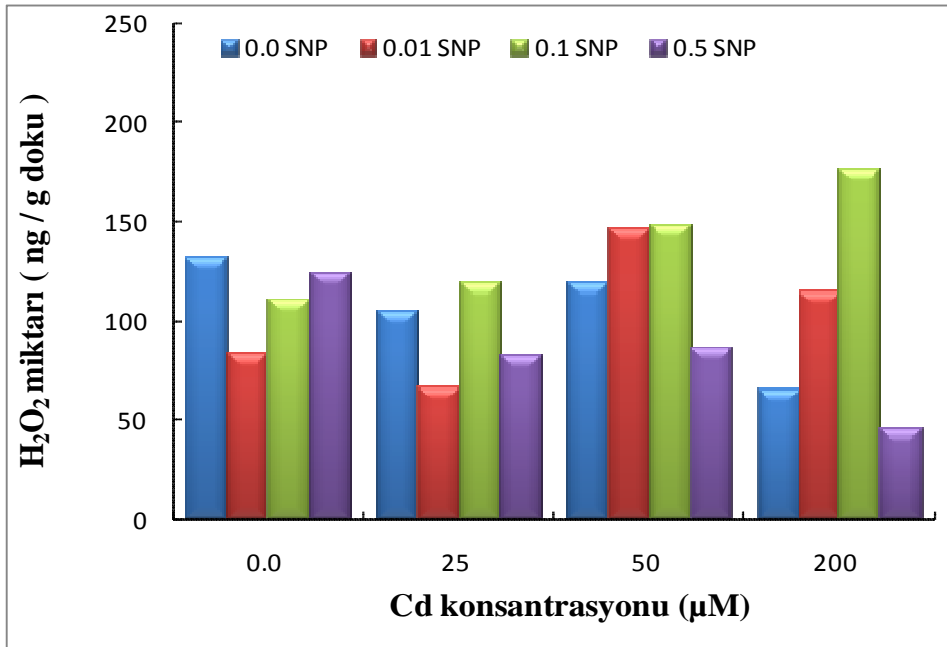
ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış bitkilerden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 25  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde 0.01 ve 0.5 mM SNP  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarında kontrole göre sırasıyla %36 ve %21 oranında azalmaya neden olurken ( $P<0.05$ ), 0.1 mM SNP konsantrasyonu  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarını %14 oranında arttırdığı görülmüştür ( $P<0.05$ ). 50  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde 0.01 ve 0.1 mM SNP uygulamaları  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarını arttırmıştır ( $P<0.05$ ). Artış oranları kontrole göre sırasıyla %23 ve %24 oranında olmuştur. SNP'nin 0.5 mM uygulaması ise  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarını düşürmüştür ( $P<0.05$ ). 200  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde 0.01 ve 0.1 mM SNP uygulamaları  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarını artırmış ve bu artışlar kontrole göre sırasıyla, %74 ve %268 oranında bulunmuştur. Aksine 0.5 mM SNP uygulaması ise  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarını düşürmüştür ( $P>0.05$ ).

**Çizelge 4.9.** Kontrol şartlarında tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisine ait hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) miktarı sonuçları. Tabloda kök ve yaprak sütunlarının her birinde farklı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $P<0.05$ ).

Uygulamalar		Yaprak			Kök		
Cd ( $\mu\text{M}$ )	SNP (mM)	$\Delta\text{A}_{415}/1.5 \text{ ml}$	$\text{H}_2\text{O}_2$ (ng/1.5 ml)	$\text{H}_2\text{O}_2$ (ng/g doku)	$\Delta\text{A}_{415}/1.5 \text{ ml}$	$\text{H}_2\text{O}_2$ (ng/1.5 ml)	$\text{H}_2\text{O}_2$ (ng/g doku)
0.0	0.0	0.215	35.819	191.035 h	0.149	24.823	132.391 b
	0.01	0.252	41.942	223.688 g	0.094	15.702	83.744 d
	0.1	0.315	52.521	280.110 de	0.125	20.867	111.289 c
	0.5	0.324	53.895	287.441 de	0.140	23.324	124.395 b
25	0.0	0.285	47.439	253.010 ef	0.118	19.659	104.847 c
	0.01	0.301	50.188	267.671 e	0.076	12.620	67.306 e
	0.1	0.391	65.141	347.417 b	0.135	22.408	119.508 c
	0.5	0.459	76.386	407.393 a	0.094	15.577	83.078 d
50	0.0	0.360	59.934	319.650 c	0.135	22.408	119.508 c
	0.01	0.494	82.259	438.713 a	0.165	27.531	146.830 b
	0.1	0.434	72.346	385.846 b	0.167	27.767	148.089 b
	0.5	0.399	66.432	354.303 b	0.098	16.244	86.632d
200	0.0	0.244	40.650	216.802 g	0.075	12.412	66.196 e
	0.01	0.248	41.358	220.578 g	0.129	21.547	114.917 c
	0.1	0.271	45.149	240.793 ef	0.199	33.209	177.114 a
	0.5	0.302	50.313	268.337 e	0.052	8.663	46.204 f



**Şekil 4.17.** Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin yapraklarına ait hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) miktarları



**Şekil 4.18.** Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin köklerine ait hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) miktarları

#### 4.2.2.b. Lipid peroksidasyon seviyesi (MDA miktarı) Sonuçları

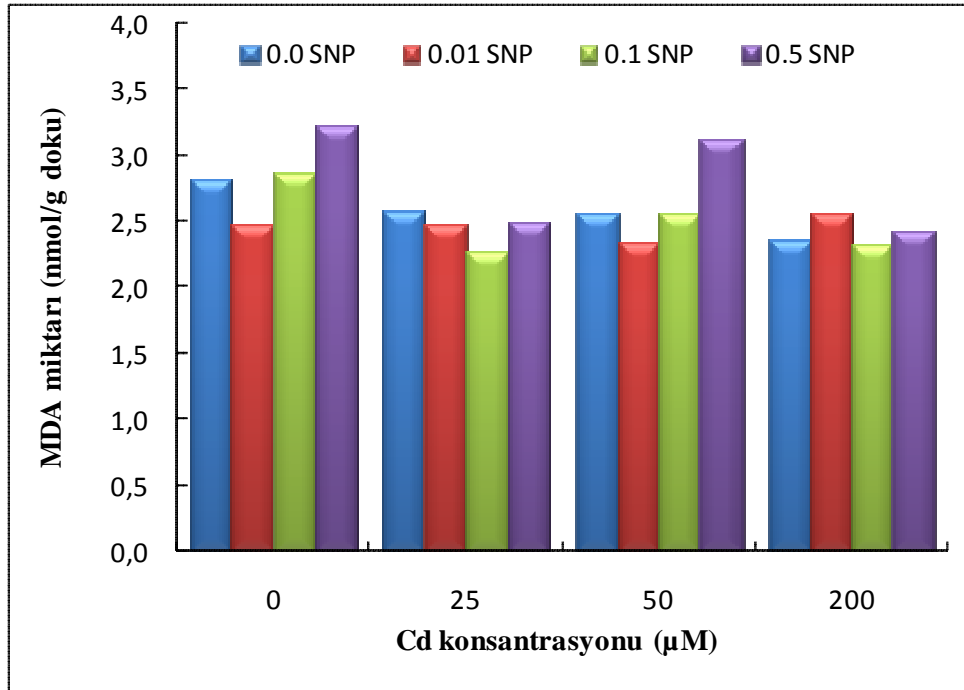
Tohumlarına SNP uygulamasından sonra, Cd stresine maruz bırakılmış bitkilerin yapraklarına ait lipid peroksidasyon seviyesi (MDA miktarı olarak) sonuçları Çizelge 4.10'da ve daha iyi yorumlanabilmesi için de Şekil 4.19'da sunulmuştur. Tohumlarına tek başına SNP uygulanmış bitkilerin yapraklarında 0.01 mM SNP, MDA miktarını önemli seviyelerde düşürürken ( $P < 0.05$ ), aksine 0.5 mM SNP artırmıştır ( $P < 0.05$ ). SNP'nin 0.1 mM uygulaması MDA miktarı üzerinde önemli bir değişiklik yapmamıştır ( $P > 0.05$ ). Tek başına Cd uygulamasında, 25 ve 50  $\mu\text{M}$  Cd stresi altındaki bitki yapraklarında MDA miktarında önemli bir değişiklik görülmemiştir ( $P > 0.05$ ). 200  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında ise MDA miktarı düşmüştür ( $P < 0.05$ ). Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış bitkilerden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 25  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz bırakılmış bitkilerde 0.01 ve 0.5 mM SNP, MDA miktarı üzerinde önemli bir değişiklik yapmamış ( $P > 0.05$ ) fakat 0.1 mM SNP MDA miktarını düşürmüştür ( $P < 0.05$ ). 50  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz bırakılmış bitki yapraklarında 0.01 ve 0.1 mM SNP uygulamaları MDA miktarı önemli oranda değiştirmezken ( $P > 0.05$ ), 0.5 mM SNP artırmıştır. 200  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında ise SNP'nin üç uygulaması da MDA miktarı önemli bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ ).

Aynı bitkilerin köklerinden elde edilen MDA miktarlarına ait sonuçlar ise Çizelge 4.10 ve Şekil 4.20'de sunulmuştur. Tohumlarına tek başına SNP uygulanmış bitkilerin köklerinde 0.01mM SNP uygulaması MDA miktarını azaltmıştır ( $P < 0.05$ ). SNP'nin 0.1 mM uygulaması MDA miktarı üzerinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P > 0.05$ ). Ancak 0.5 mM SNP uygulaması MDA miktarını artırmıştır ( $P < 0.05$ ). Tek başına Cd uygulamasında 25, 50 ve 200  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde 25ve50  $\mu\text{M}$  Cd stresindeki bitkilerin köklerinde MDA miktarında önemli bir değişiklik görülmemiştir ( $P > 0.05$ ). Ancak 200  $\mu\text{M}$  Cd stresinde MDA miktarının azaldığı görülmüştür ( $P < 0.05$ ). Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış bitkilerden elde edilen sonuçlar incelendiğinde, 25  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde 0.01, 0.1 ve 0.5 mM SNP MDA miktarını kontrole göre

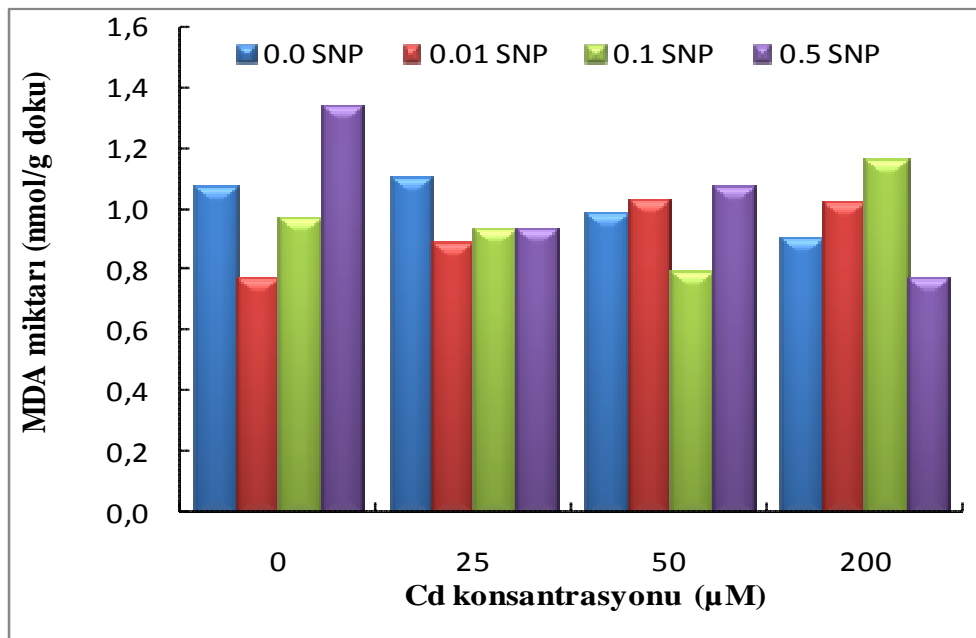
sırasıyla %19, %16, %16 oranında düşürmüştür ( $P<0.05$ ). 50  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde 0.01ve0.5 mM SNP ile MDA miktarında önemli bir değişiklik görülmemiştir ( $P>0.05$ ). Ancak 0.1 mM SNP MDA miktarını azaltmıştır ( $P<0.05$ ). 200  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki köklerinde MDA miktarı 0.01ve0.1 mM SNP uygulamasında arttığı belirlenmiş ( $P<0.05$ ) ve artışlar kontrole göre sırasıyla %13 ve %29 oranlarında tespit edilmiştir. 0.5 mM SNP ise MDA miktarını azaltmıştır ( $P<0.05$ ).

**Çizelge 4.10.** Kontrol şartlarında tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisine ait lipid peroksidasyonu (MDA miktarları) seviyeleri. Tabloda kök ve yaprak sütunlarının her birinde farklı harfler ile belirtilen veriler arasındaki fark istatistik olarak önemlidir ( $P<0.05$ ).

Uygulamalar		Yaprak			Kök		
		$\Delta A_{532-600}$	MDA (nmol /ml)	MDA (nmol/g doku)	$\Delta A_{532-600}$	MDA (nmol /ml)	MDA (nmol/g doku)
Cd ( $\mu\text{M}$ )	SNP (mM)						
0.0	0.0	0.131	0.845	2.817 b	0.050	0.323	1.075 bc
	0.01	0.116	0.745	2.483 cd	0.036	0.232	0.774 f
	0.1	0.134	0.864	2.881 b	0.045	0.290	0.968 d
	0.5	0.150	0.968	3.225 a	0.063	0.403	1.344 a
25	0.0	0.121	0.777	2.591 c	0.052	0.332	1.107 b
	0.01	0.116	0.745	2.483 c	0.042	0.268	0.892 e
	0.1	0.106	0.684	2.279 e	0.044	0.281	0.935 d
	0.5	0.116	0.748	2.494 cd	0.044	0.281	0.935 d
50	0.0	0.120	0.771	2.569 c	0.046	0.297	0.989 d
	0.01	0.109	0.703	2.344 d	0.048	0.310	1.032 d
	0.1	0.120	0.771	2.569 c	0.037	0.239	0.796 f
	0.5	0.146	0.938	3.128 a	0.050	0.323	1.075 bc
200	0.0	0.110	0.710	2.365 d	0.042	0.271	0.903 e
	0.01	0.120	0.771	2.569 c	0.048	0.306	1.021 c
	0.1	0.108	0.697	2.322 d	0.054	0.348	1.161 b
	0.5	0.113	0.729	2.430 cd	0.036	0.232	0.774 f



**Şekil 4.19.** Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin yapraklarına ait MDA miktarları



**Şekil 4.20.** Tohumlarına SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış mısır bitkisinin köklerine ait MDA miktarları



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bütün canlılar için toksik bir ağır metal olan kadmiyumun (Cd), bitkilerin büyüme ve gelişmesi üzerinde de çok fazla olumsuzluklara sebep olduğu birçok çalışmada ortaya konulmuştur (Schützendübel *et al.* 2001; Vitoria *et al.* 2001; Benavides *et al.* 2005; Gratao *et al.* 2005; Tiryaki 2009). Bitki dokularında Cd birikimi, çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik süreçleri bozar ve özellikle oksidatif stresi teşvik ederek büyümenin engellenmesine neden olur ve daha ileri toksik seviyelerde ise hücre ve dokuların ölümüne yol açar (Chaoui *et al.* 1997; Toppi and Gabrielli, 1999; Sandalio *et al.* 2001; Xu *et al.* 2009; Guo *et al.* 2009; Popova *et al.* 2009; Tiryaki 2009). Ağır metal stresini de içine alan çevresel streslere maruz kalan bitkilerde, metabolizmada ortaya çıkan bozulmaların bir sonucu olarak hücrelerde yüksek düzeyde oksidatif özellikleri olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) hızlı bir artışı meydana gelir. Bitki böyle bir durumla karşılaştığında, ROS bileşiklerinin zararsız hale getirilmesi için antioksidan sistemini harekete geçirir ve bu sistemin önemli bir parçası antioksidan özellikleri olan katalaz (CAT), peroksidaz (POX), süperoksit dismutaz (SOD) gibi enzimlerin aktivitelerinin düzenlenmesini sağlar.

Son yıllarda, stresli çevrelere bitki toleransının artırılması için bitkide antioksidatif savunma sisteminin düzenlenmesini sağlayan doğal sinyal moleküller üzerinde yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bir sinyal bileşik, bitkide stres bilgisinin alınmasını, bu bilginin gerekli yerlere iletilmesini ve bitkide bu strese karşı bir cevap oluşturulmasını tetikleyen bir bileşik olarak değerlendirilebilir. Nitrik oksit (NO) bitkilerde sentezlenen ve günümüzde birçok bitki stresinde önemli düzenleyici rolleri olduğu kabul edilen bir sinyal moleküldür (Beligni and Lamattina 2001; Neill *et al.* 2002a,b).

Çalışmamızda, bitkiye önceden uygulanan NO'nun, bitki Cd stresi ile karşılaştığı bir durumda, antioksidatif sistemi düzenleyebilme rolü belirlenerek stresten koruyabilme potansiyeli araştırılmıştır. Literatürde Cd stresi altındaki bitkilerde NO'nun koruyucu rolü ile ilgili çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır ve bunların çoğunda NO, bitkiye Cd stresine eş zamanlı olarak verilmiştir. Bizim çalışmamızda ise bitki strese girmeden önce yapılan NO uygulamasıyla, NO'nun bitkinin daha sonra karşılaşacağı strese karşı

antioksidatif sistemi harekete geçirebilme potansiyeli araştırılmıştır. Bu nedenle araştırmamızda monokotil bir bitki olan mısır (*Zea mays* cv. Karadeniz yıldızı) bitkisine, NO gaz formunda olan bir sinyal bileşik olduğu için, suda çözünebilir ve bitki tarafından alındığında parçalanarak NO üreten bir bileşik olan sodyum nitroprussid (SNP) uygulanmıştır. Daha sonra bitkiler Cd stresine maruz bırakılmışlardır. Çalışmamızda, ön denemeler ve literatür bilgilerine göre; SNP uygulamaları için 0.01, 0.1 ve 0.5 mM; Cd uygulamaları için ise 25, 50 ve 200 µM konsantrasyonlar kullanılmıştır.

Çalışmalarımızda SNP, mısır bitkisinin tohumlarına (tohumlara ön ıslatma ile emdirme) veya normal şartlarda yetiştirilmiş bitkilere (fidelere yapılan püskürme ile) olmak üzere iki farklı şekilde uygulanmıştır. Yapılan literatür incelemelerinde SNP'nin genellikle bitki fidelerine uygulandığı gözlemlenirken (Laspina *et al.* 2005; Chen *et al.* 2010), bizim çalışmamızda yer alan ikinci uygulamasında ise literatürde bilgilerinin aksine SNP muamelesi tohumlar üzerinde gerçekleşmiştir. Araştırmamızda her iki uygulama içerisinde (1) tek başına SNP uygulaması, (2) tek başına Cd uygulaması ve (3) önceden SNP uygulanmış (tohumlara veya fidelere) ve daha sonra Cd stresine maruz bırakılmış (SNP+Cd) grupları bulunmaktadır. Herbir gruptan elde edilen bitki yaprak ve köklerinden antioksidan enzimlerden SOD, CAT ve POX enzim aktiviteleri belirlenmiş ve stresten korunma derecesini farklı bir açıdan gösteren lipid peroksidasyon (LPO) ve içsel hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) seviyeleri de belirlenmiştir. Hücre membranlarındaki fosfolipidlerin oksidasyon ürünü karakteristik olarak malondialdehid (MDA). Bu bileşiğin seviyesi ölçülerek LPO derecesi belirlenebilmektedir (Sandalio *et al.* 2001; Xu *et al.* 2009; Guo *et al.* 2009). Mevcut bilgilerimize göre, Cd stresi altındaki bitkilerde NO'nun rolünü çalışan çok az sayıda araştırma olması nedeniyle çalışmamızın birçok bulgusunun literatür için yeni olduğunu düşünüyoruz. Aşağıda araştırmamızdan elde edilen sonuçların yorumlanması ve diğer araştırmacıların sonuçları ile karşılaştırmalı değerlendirmeleri bulunmaktadır.

## 5.1. SNP'nin Fidelere Uygulandığı Çalışmalara Ait Sonuçların Değerlendirilmesi

Çalışmamızın bu bölümünde, mısır bitkileri kontrollü şartlarda yetiştirilmiş ve 12. gün bitki fidelere farklı konsantrasyonlarda (0.01, 0.1 ve 0.5 mM) SNP püskürtme yöntemi kullanılarak uygulanmış ve bu uygulamadan 2 gün sonra ise (14. Gün), SNP uygulanmış ve uygulanmamış (kontrol) bitkiler farklı seviyelerde (25, 50 ve 200 µM) Cd stresine maruz bırakılmışlardır. Elde edilen bitkilerin kök ve yapraklarında deneyler gerçekleştirilmiştir.

### 5.1.1 Antioksidan Enzim Aktivitelerine Ait Sonuçların Değerlendirilmesi

Araştırmamızda, SNP uygulamasıyla bitki yapraklarında SOD aktivitesi düşerken, CAT ve POX aktivitesi artmıştır (Şekil 4.1-6). SNP uygulamasıyla ayçiçeği (Laspina *et al.* 2005) ve bezelyede (Kopyra *et al.* 2006) yapılan ayrı ayrı çalışmalarda, elde ettiğimiz bulgulara benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bitkilere NO uygulamasıyla, hücrelerde süperoksid anyonunun ( $O_2^-$ ) içsel seviyesinin düştüğü ve bu nedenle de SOD aktivitesinin azaldığı, diğer taraftan da ortamda biriken  $H_2O_2$  toksisitesinin de, aktiviteleri artırılan POX ve CAT enzimlerinin etkinliğiyle zararsız hale geldiği düşünülmektedir. NO'nun kendisinin bir antioksidan ajan görevi görerek, NO uygulanmış hücrelerde süperoksid anyonunun ( $O_2^-$ ) içsel seviyesini ve dolayısıyla da SOD aktivitesini azalttığı ileri sürülmüştür (Kopyra *et al.* 2006). Köklerde ise SNP uygulaması, özellikle 0.5 mM konsantrasyonda, SOD aktivitesini düşürmüş ve POX ile CAT aktivitelerinde önemli bir değişiklik yapmamıştır. Literatürde SNP'nin kök antioksidan enzimleri üzerindeki etki mekanizmalarını gösteren çalışmalar neredeyse yok denecek kadar azdır. Ancak, buğday bitki kökleriyle yapılan bir çalışmada SNP uygulamasının SOD aktivitesini düşürdüğü ve POX ile CAT aktivitelerini değiştirmedığı rapor edilmiştir (Singh *et al.* 2008). Bu sonuçlara göre, SNP'nin dolayısıyla da NO'nun çalıştığımız mısır bitkisinin kök ve yapraklarında da antioksidan enzimlerin aktivitelerini düzenleyebildiği ileri sürülebilir.

Çalışmalarımızda, tek başına Cd (25, 50, 200 µM) uygulanmış bitki yapraklarında da SOD aktivitesi düşerken, CAT ve POX aktivitesi artmıştır. Köklerde ise Cd stresi uygulamaları enzimlerin aktivitesini genelde düşürmüştür (Şekil 4.1-6). Bu konuda yapılan birçok çalışmada Cd stresinin antioksidan enzimler üzerine etkileri incelenmiş, bazısında bu enzimlerin aktivitelerinin arttığı (Hsu and Kao 2004; Laspina *et al.* 2005), bazı çalışmalarda ise düştüğü tespit edilmiştir (Rodriguez-Serrano *et al.* 2006; Kopyra *et al.* 2006; Serrano *et al.* 2006; Chen *et al.* 2010). Literatürde, bazı bitkilere yapılan çalışmalarda bizim bulgularımızla uyumlu olan sonuçlar bulunmaktadır (Kong *et al.* 1999; Fornazier *et al.* 2002; Kopyra *et al.* 2006; Chen *et al.* 2010). Bu konuda yapılan çalışmaların verileri arasında çelişkiler görülse de, Cd stresinin antioksidan enzimler üzerinde etkisinin, bitkilerin türüne, doku çeşidine, bitkinin gelişme dönemine, kullanılan Cd'nin konsantrasyonuna ve stres süresine bağlı olarak değişebildiği ileri sürülmüştür (Gratao *et al.* 2005; Kopyra *et al.* 2006). Bulgularımızdan görüldüğü gibi Cd stresi SOD aktivitesini hem yaprakta hem de kökte önemli seviyelerde düşürmüştür. Böyle bir durumda hücrelerde üretilen süperoksit anyonunun ( $O_2^-$ ) seviyesi artacak ve bu toksik radikal, hücrelerde ölümcül hasarlar oluşturacaktır. Bitkinin bu strese bir cevap olarak yapraklarda CAT ve POX aktivitesini artırması ise stres cevabının düzenlenmesinde yeterli olamadığı düşünülmektedir.

Araştırmamızda en önemli amaç, bitki Cd stresine maruz kalmadan yapılan NO uygulamasının, bitki daha sonra bu strese yüzleştğinde, Cd stresi ile bozulan antioksidan sistemi düzenleyip düzenleyemeyeceğini ortaya koyabilmektir. Çalışmalarımızda, SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış bitkilerden elde edilen bulgularda, SNP uygulamaları CAT aktivitesini hem kökte hem de yapraklarda genelde düşürmüştür (Şekil 4.1-2). Bazı çalışmalarda sonuçlarımızla çelişen bulgular olsa da (Laspina *et al.* 2005; Chen *et al.* 2010), Cd stresi altındaki bitkilere NO uygulamasının CAT aktivitesini genelde düşürdüğü belirlenmiştir (Hsu and Kao 2004; Singh *et al.* 2008). POX aktivitesi ise; 25 µ M Cd stresinde, SNP uygulamaları ile kökte artarken, yaprakta düşmüş, ancak 50 ve 200 µM Cd stresinde, SNP genelde aktiviteyi yaprakta artırırken, kökte düşürmüştür (Şekil 4.3-4). Bu sonuca göre POX aktivitesinin uygulanan SNP+Cd konsantrasyonuna göre değişebildiği görülmektedir. POX

aktivitesinin yapraklarda arttığı (Laspina *et al.* 2005; Chen *et al.* 2010) buna karşılık köklerde düştüğü (Singh *et al.* 2008) ile ilgili çalışmaların bulunması sonuçlarımızı desteklemektedir. POX aktivitesinin yapraklarda SNP+Cd muamelesiyle düştüğü de rapor edilmiştir (Hsu and Kao 2004). Sonuçlarımızda SOD aktivitesi hem kökte hem de yaprakta 25 ve 50  $\mu\text{M}$  Cd stresinde SNP ile genelde artmış, fakat 200  $\mu\text{M}$  Cd'de aktivite SNP ile kökte artarken, yaprakta düştüğü belirlenmiştir (Şekil 4.5-6). Tek başına Cd uygulamalarında SOD aktivitesinin düştüğü belirlenmiştir. Ancak, bitkiye önceden uygulanan SNP, bitki Cd stresine maruz kaldığında düşen SOD aktivitesini tekrar artırarak, bitkinin stres cevabının düzenlenmesine önemli katkı sağladığı ileri sürülebilir. Birçok çalışmada bulgularımızı destekleyen verilere ulaşmak mümkündür (Cheng *et al.* 2002; Laspina *et al.* 2005; Kopyra *et al.* 2006). Ancak SNP uygulaması bu etkiyi 200  $\mu\text{M}$  Cd şartlarında tam olarak gerçekleştirememiştir. Bu durum, 200  $\mu\text{M}$  Cd'nin toksik seviyesinin çok yüksek olması ve SNP'nin bu seviyedeki Cd stresinde SOD aktivitesini düzenleyemediğini gösterebilir. Singh vd. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada bizim verilerimize benzer olarak, 5 mM gibi yüksek konsantrasyonda Cd stresine maruz bırakılan buğday bitkilerinde, NO uygulamasının SOD aktivitesini yapraklarda düşürdüğü belirlenmiştir.

### 5.1.2 MDA ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Belirlenmesinden Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi

Tek başına SNP uygulanmış bitki kök ve yapraklarında özellikle 0.1 mM SNP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının azalmasına sebep olmuştur (Şekil 4.7-8). Literatürde bitkilere tek başına SNP uygulamalarının yapıldığı çalışma çok nadir olmakla birlikte, arpa köklerine SNP uygulamasının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını düşürdüğü ileri sürülmüştür (Singh *et al.* 2008). Soya fasulyesi süspansiyon kültüründe (Kopyra *et al.* 2006) ve pirinç yapraklarında (Hsu and Kao 2004) yapılan çalışmalarda da içsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının SNP tarafından düşürüldüğü belirlenmiştir. Bu sonuç, elde edilen bulgularımızla uyusmaktadır. Bizim çalışmamızda ise kök ve yapraklarda SNP'nin bazı konsantrasyonlarında, içsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının kontrole göre arttığı görülmüştür. Bunun olası en önemli sebebinin, bitki ve doku farklılığı veya uygulanan SNP'nin konsantrasyonu olabilir. Bitki dokularının sinyal bileşiklere verdiği cevabın konsantrasyona ve dokulara bağlı olarak değişebildiği

bilinmektedir. Ayrıca bu bileşikler uygun konsantrasyon üzerinde beklenenden farklı olarak ters bir etki yapabilirler (Taiz and Zeiger 2004). NO da bir sinyal bileşik olduğundan köklere göre yaprakların bu sinyal bileşiğe muhtemelen daha hassas olması, iki doku arasında SNP konsantrasyonlarına bağlı olarak etki farklılığına neden olabilir.

Tek başına Cd uygulamasında 25 ve 50  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarında önemli bir değişiklik görülmemiştir, ancak 200  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Aynı bitkinin köklerinde ise  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarının üç Cd uygulaması ile azaldığı görülmüştür (Şekil 4.7-8). Birçok bitkiyle yapılan çalışmalarda Cd uygulamasının, gerek köklerde gerekse yapraklarda, içsel  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarını artırdığı belirtilmiştir (Cheng *et al.* 2002; Laspina *et al.* 2005; Kopyra *et al.* 2006; Singh *et al.* 2008). Görüldüğü gibi bizim mısır bitkisinden elde ettiğimiz sonuçlar, yukarıda verilen literatür bulgularıyla örtüşmemektedir ve hatta tersi niteliğindedir. Yukarıda tek başına Cd uygulamasında SOD aktivitesinin düştüğü belirlenmişti (Şekil 4.1-6). Bilindiği gibi hücrelerin değişik kompartımanlarında bulunan SOD, yüksek derecede toksik olan süperoksid anyonunu ( $\text{O}_2^-$ ) bir substrat olarak kullanarak,  $\text{H}_2\text{O}_2$  oluşumu reaksiyonunu gerçekleştirir (Minibaeva and Gordon 2003). Doğal olarak, bu enzimin aktivitesinin azaltılması, bitki dokularında içsel  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarını azaltacaktır. Bu nedenle çalışmamızda Cd uygulaması, öncelikle SOD aktivitesini azaltmakta ve dolayısıyla da  $\text{H}_2\text{O}_2$  üretimini düşürmektedir.  $\text{H}_2\text{O}_2$  üretiminin azalması her zaman bitki için faydalı ve strese direnç göstergesi olarak değerlendirilmemelidir. Çünkü bu bileşik üretilmezse ortamda daha toksik olan süperoksid anyonu birikecek ve bu da hücrelere önemli ölçüde zararlar verecektir. Bu nedenle çalışmamızın sonucu önemli bir bulgu olarak değerlendirilmelidir. SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış bitkilerde (Şekil 4.7-8), SNP uygulamaları kökte ve yapraklarda özellikle 25 ve 50  $\mu\text{M}$  Cd stresindeki bitkilerde  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarını genelde artırmıştır. Diğer uygulamalarda ise belirgin bir düzen sergilememiştir. Bu sonuca göre, mısır bitkisine önceden uygulanan NO, bitki Cd stresine maruz kaldığında azalan  $\text{H}_2\text{O}_2$  seviyesini iyi bir düzenleme yaparak, artırabilmiştir. Bu sonuç SNP+Cd uygulamasının SOD aktivitesi üzerindeki etkisiyle de desteklenmektedir (Şekil 4.5-6). Bitkimiz, SNP+Cd uygulamasında SOD aktivitesini artırmaktadır. Bu nedenle de SNP+Cd uygulamasında içsel  $\text{H}_2\text{O}_2$  seviyesinin

artırılabilirdiğini görüyoruz. Bu sonuç, bitkiye önceden uygulanan NO'nun bitkiyi Cd stresine önceden hazırlayabildiği şeklinde yorumlanabilir.

Stres şartlarında, doymamış yağ asitlerinin peroksidasyon ürünü olarak ortaya çıkan malondialdehit (MDA) miktarındaki artış, hücre zarlarının yapısal bütünlüğünün bozulduğunu gösteren iyi bir indikatör olarak kabul edilmektedir (Posmyk *et al.* 2005). Bizim çalışmamızda, MDA miktarı (lipid peroksidasyonunun bir göstergesi), tek başına uygulanan SNP uygulamalarında özellikle de 0.5 mM SNP ile bitkilerin kök ve yapraklarında hafif artmış ancak diğer uygulamalarda belirgin bir değişim olmamıştır (Şekil 4.9-10). Bitkilerde yapılan bazı çalışmalarda tek başına SNP'nin MDA miktarını düşürdüğü veya değiştirmedeği ifade edilmektedir (Hsu and Kao 2004; Laspina *et al.* 2005). Bunun önemli sebebinin bitki ve doku farklılığı veya uygulanan SNP'nin konsantrasyonu olduğu düşünülmelidir. Çünkü SNP düşük konsantrasyonlarda içsel MDA miktarını değiştirmedeği halde, 0.5 mM SNP de artırmıştır. Muhtemelen bu konsantrasyon bu bitki için fazla olmakta ve bu yüzden de toksik olabilmektedir. Bitki dokularının sinyal bileşiklere verdiği cevabın konsantrasyona ve dokulara bağlı olarak değişebildiği bilinmektedir. Ayrıca bu bileşikler uygun konsantrasyon üzerinde beklenenden farklı olarak ters bir etki yapabildiği iyi bilinen bir olaydır (Taiz and Zeiger 2004). NO da bir sinyal bileşik olduğundan uygulanan konsantrasyonlarına bağlı olarak etki farklılığına neden olabilir. Tek başına uygulanan Cd stresindeki bitkilerin kök ve yapraklarında genelde önemli derecede artmış ancak köklerde özellikle 50 ve 200  $\mu$ M Cd uygulamalarında farklı sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.9-10). Yapılan birçok çalışmada tek başına Cd stresinin bitkilerde MDA miktarını dolayısıyla da LPO seviyesini artırdığı belirlenmiştir. Bu çalışmalarda Cd'nin toksik bir ağır metal olduğu için hücre membranlarındaki peroksidasyonu artırarak böyle bir etkiye neden olduğu ileri sürülmüştür (Gratao *et al.* 2005; Singh *et al.* 2008; Chen *et al.* 2010). Ancak Cd'nin bu etkisi uygulanan konsantrasyonlarına bağlı olarak bitkiler arasında farklı sonuçların çıkmasına neden olabilmektedir. Örneğin, mısır bitkilerine Cd uygulandıktan sonra MDA seviyesinin köklerde çoğaldığı, fakat yapraklarda çoğalmadığı gözlenmiştir (Hong *et al.* 2008). SNP uygulanmış ve daha sonra Cd stresine maruz kalmış bitkilere baktığımızda, SNP uygulamaları kökte ve yapraklarda özellikle 25 ve 50  $\mu$ M Cd

stresindeki bitkilerde MDA miktarını genelde düşürmüştür, ancak 200 µM Cd stresindeki bitkilerde artırmıştır (Şekil 4.9-10). Bu sonuca göre, mısır bitkisine önceden uygulanan NO, bitki Cd stresine maruz kaldığında artan LPO seviyesini iyi bir düzenleme yaparak düşürebilmiştir. Ancak uygulanan NO konsantrasyonunun seviyesi bu düzenlemede önemli olduğu ortaya çıkmıştır. Görüldüğü gibi, bitkiye önceden uygulanan NO'nun bitkiyi Cd stresine önceden hazırlayabildiği ve bitki daha sonra bu strese maruz kaldığında onu koruyabildiği anlaşılmaktadır. Literatürde bu anlamda çalışma pek bulunmasa da birkaç çalışmadan elde edilen sonuçlar, bulgularımızı desteklemektedir (Hsu and Kao 2004; Chen *et al.* 2010).

## 5.2. SNP'nin Tohuma Uygulandığı Çalışmalara Ait Sonuçların Değerlendirilmesi

Çalışmamızın bu bölümünde, mısır bitki tohumları ekimden önce farklı seviyelerde SNP çözeltilerinde (0.01, 0.1 ve 0.5 mM) ön ıslatmaya (pretreatment) bırakılmış ve daha sonra ekilmiştir. Bu uygulamadan sonra elde edilen fideler, 14. gün Cd (25, 50, 200 µM) stresine maruz bırakılmıştır. Elde edilen bitkilerin kök ve yapraklarında deneyler gerçekleştirilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde yapılan çalışmalarda SNP, çalışmamızın birinci bölümünde yapılabileceği benzer olarak bitki yapraklarına uygulanmıştır (Hsu and Kao 2004; Laspina *et al.* 2005; Chen *et al.* 2010). NO'nun doğrudan tohuma uygulandığı çalışmalar bulunsa da bunlar daha çok çimlenme dönemindeki fizyolojik etkileriyle ilgilidir (Kopyra and Gwozdz 2003; Hu *et al.* 2007). Bizim çalışmamızda farklı olarak SNP mısır bitkisinin tohumuna uygulanmış ve bitki normal şartlarda 14 günlük haline geldiğinde Cd stresine maruz kalmıştır. Görüldüğü gibi SNP uygulamasıyla Cd stresinin verilmesi arasında bir bitki için uzun bir süre bulunmaktadır. Bu tarz uygulamanın sonuçlarının nasıl olabileceği tartışmasının yanında, faydalı sonuçlar alınırsa, NO'nun zirai uygulamasının da daha kolay olmasını sağlar. Çünkü zirai bir yaklaşım olarak tohuma yapılan uygulamaların hem maliyeti düşürdüğü, hem de daha sağlıklı uygulamalar olduğu bilinmektedir. Diğer taraftan bu çalışmadan elde edilen bulgular, çalışmamızın birinci bölümündeki çalışmalarla veya literatür bulgularıyla karşılaştırıldığında, farklı sonuçların ortaya çıkması da olası bir durumdur. Böyle bir sonuç bütünüyle uygulamanın tarzına ve bitkinin bulunduğu



gelişme dönemine (tohum fazı) dayandırılarak açıklanabilir. Sonuçlar yorumlanırken daha önceki yapılan çalışmaların uygulama şekliyle farklı olsa da, bir fikir vermesi ve değerlendirmede yardımcı olması nedeniyle onlarla karşılaştırılmalar da yapılmıştır.

### 5.2.1 Antioksidan Enzim Aktivitelerine Ait Sonuçların Değerlendirilmesi

Tohumlarına tek başına SNP uygulanmış bitkilerin yapraklarında SOD aktivitesi, 0.01 mM SNP ile azalırken (Şekil 4.15-16), CAT ve POX aktivitesi ise artmıştır (Şekil 4.11-14). Köklerde SNP'nin 0.1 mM uygulaması ile SOD artmış, CAT düşmüş ve POX ise değişmemiştir (Şekil 4.11-16). NO uygulamasının gerçekleştirildiği ayçiçeği (Laspina *et al.* 2005) ve bezelye (Kopyra *et al.* 2006) kullanılarak yapılan çalışmalarda elde edilen verilere benzer sonuçlar bizim çalışmalarımızda da elde edilmiştir. Bitkilere NO uygulamasıyla, hücrelerde süperoksid anyonunun ( $O_2^-$ ) içsel seviyesinin düştüğü ve bu nedenle de SOD aktivitesinin azaldığı, diğer taraftan da ortamda biriken  $H_2O_2$  toksisitesinin de, aktiviteleri artırılan POX ve CAT enzimlerinin etkinliğiyle zararsız hale geldiği düşünülmektedir. NO'nun kendisinin bir antioksidan ajan görevi görerek, NO uygulanmış hücrelerde süperoksid anyonunun ( $O_2^-$ ) içsel seviyesini ve dolayısıyla da SOD aktivitesini azalttığı da ileri sürülmüştür (Kopyra *et al.* 2006). SNP'nin kök antioksidan enzimleri üzerindeki çalışmaları neredeyse yok denecek kadar azdır. Ancak, buğday bitki kökleriyle yapılan bir çalışmada da SNP uygulamasının SOD aktivitesini köklerde düşürdüğü ve POX ile CAT aktivitelerini değiştirmedeği rapor edilmiştir (Singh *et al.* 2008). Bizim sonuçlarımız, SNP'nin dolayısıyla da NO'nun tohuma yapılan uygulamasının bitki çimlendikten sonra büyüme ve gelişmesine devam ettiğinde antioksidan enzimleri etkileyebildiğini göstermektedir.

Tek başına Cd stresi uygulanmış bitkilerde, SOD aktivitesi bitkinin kök ve yapraklarında artmıştır (Şekil 4.15-16). CAT aktivitesi yapraklarda önemli seviyelerde artarken köklerde ise düşmüştür (Şekil 4.11-12). Aynı uygulamalarla, POX aktivitesinin yapraklarda ve köklerde kontrole göre düştüğü belirlenmiştir (Şekil 4. 13-14). Bu konuda yapılan birçok çalışmada Cd stresinin antioksidan enzimler üzerinde etkileri incelendiğinde bazısında bu enzimlerin aktivitelerinin arttığı (Hsu and Kao 2004;

Laspina *et al.* 2005), bazı çalışmalarda ise düştüğü veya bazısının (SOD) azalıp, bazısının (CAT ve POX) artabildiği belirlenmiştir (Rodriguez-Serrano *et al.* 2006; Kopyra *et al.* 2006; Chen *et al.* 2010). Literatürde, bazı bitkilere yapılan çalışmalarda bizim bulgularımızla uyumlu olan sonuçlar bulunmaktadır (Laspina *et al.* 2005; Hsu *et al.* 2006; Rodriguez-Serrano *et al.* 2006). Bu konuda yapılan çalışmaların verileri arasında çelişkiler görülse de, Cd stresinin antioksidan enzimler üzerinde etkisinin, bitkilerin türüne, doku çeşidine, bitkinin gelişme dönemine, kullanılan Cd'nin konsantrasyonuna ve stres süresine bağlı olarak değişebildiği ileri sürülmüştür (Gratao *et al.* 2005; Kopyra *et al.* 2006).

Bu çalışmada amaçlardan bir de bitki Cd stresine maruz kalmadan önce tohumlara uygulanan NO'nun, bitki daha sonra büyüme ve gelişme döneminde bu stresle yüzleştğinde, Cd stresi ile bozulan antioksidan sistemi düzenleyip düzenleyemeyeceğini ortaya koyabilmektir. Çalışmalarımızda, tohumlarına SNP uygulanmış ve Cd stresine maruz kalmış bitkilerden (SNP+Cd) elde edilen sonuçlar incelendiğinde, CAT aktivitesinin yapraklarda genelde arttığı belirlenmiştir. Ancak aynı bitkilerin köklerinde ise CAT aktivitesi SNP+25 ve SNP+ 50  $\mu$ M Cd uygulamalarında düşmüştür (Şekil 4.11-12). Ancak SNP'nin bazı konsantrasyonlarında artışlar da belirlenmiştir. Bazı çalışmalarda sonuçlarımızla çelişen bulgular olsa da Cd stresi altındaki bitkilere NO uygulamasının CAT aktivitesini yapraklarda artırdığı (Laspina *et al.* 2005; Chen *et al.* 2010) ve köklerde düşürdüğü (Singh *et al.* 2008) ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır. SNP+Cd uygulamalarında POX aktivitesinin, 25  $\mu$ M Cd stresindeki bitkilerin yapraklarında 0.01 mM SNP ile azalırken, 50  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında ise 0.01 mM SNP ile arttığı belirlenmiştir. 200  $\mu$ M Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında 0.01 ve 0.1 mM SNP ile aktivitede önemli bir değişiklik görülmezken, 0.5 mM SNP'de aktivitede önemli oranda azalma görülmüştür (Şekil 4. 13-14). Köklerde SNP+Cd uygulamaları ise özellikle 50 ve 200  $\mu$ M Cd stresinde POX aktivitesini düşürmüş, diğer uygulamalarda ise önemli bulgu belirlenmemiştir (Şekil 4. 13-14). Bu sonuca göre POX aktivitesinin uygulanan SNP+Cd konsantrasyonuna göre değişebildiği görülmektedir. POX aktivitesinin yapraklarda arttığı (Laspina *et al.* 2005; Chen *et al.* 2010) buna karşılık köklerde

düştüğü (Singh *et al.* 2008) ile ilgili çalışmaların bulunması sonuçlarımızı desteklemektedir. POX aktivitesinin yapraklarda SNP+Cd muamelesiyle düştüğü de rapor edilmiştir (Hsu and Kao 2004). SNP+Cd uygulamalarında, SNP+25 µM Cd stresindeki bitkilerin yapraklarında 0.1 mM SNP, SOD aktivitesini hem yaprak hem de kökte azaltmıştır, ancak 0.5 mM SNP+Cd uygulamalarının tümü yapraklarda SOD aktivitesini artırmıştır (Şekil 4.15-16). Görüldüğü gibi SNP'nin uygulanan konsantrasyonu antioksidan enzimler üzerinde çok belirleyici olmaktadır. Birçok çalışmada bulgularımızı destekleyen verilere ulaşmak mümkündür (Cheng *et al.* 2002; Laspina *et al.* 2005; Kopyra *et al.* 2006). Benzer olarak, Cd stresi altındaki buğday bitkilerinde yapılan çalışmada da NO uygulamasının SOD aktivitesini yapraklarda düşürdüğü belirlenmiştir (Singh *et al.* 2008).

### 5.2.2 MDA ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Belirlenmesinden Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi

Tek başına SNP uygulamaları, bitkilerin yapraklarında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını önemli ölçüde artırmıştır. Bitki köklerinde ise 0.01 ve 0.1 mM SNP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını düşürmüştür ancak 0.5 mM SNP, önemli bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4.17-18). Literatürde bitkilere tek başına SNP uygulamalarının yapıldığı çalışma çok nadir olmakla birlikte, arpa köklerine SNP uygulamasının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarını düşürdüğü ileri sürülmüştür (Singh *et al.* 2008). Bu sonuç bizim köklerden elde edilen sonuçlarımızı desteklemektedir. Soya fasulyesi süspansiyon kültüründe (Kopyra *et al.* 2006) ve pirinç yapraklarında (Hsu and Kao 2004) yapılan çalışmalarda da içsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının SNP tarafından düşürüldüğü belirlenmiştir. Bu sonuç elde edilen bulgularımızla uyuşmamaktadır. Bizim çalışmamızda ise yapraklarda SNP'nin bazı konsantrasyonlarında içsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının kontrole göre arttığı görülmüştür. Bunun olası en önemli sebebinin çalışmamızın bu bölümünde yapılan SNP uygulamasının farklılığından (tohum uygulama) kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Bitki dokularının sinyal bileşiklere verdiği cevabın uygulama zamanına, konsantrasyona ve dokulara bağlı olarak değişebildiği bilinmektedir. NO da bir sinyal bileşik olduğundan kök ve yapraklarda SNP konsantrasyonlarına bağlı olarak etki farklılığına neden olabilir.

Bu çalışmada, 25, 50 ve 200  $\mu\text{M}$  Cd stresi altındaki bitkilerin yapraklarında  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarında artış belirlenmiştir.  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarı, bitki köklerinde genelde azaldığı görülmüştür (Şekil 4.17-18). Birçok bitkiyle yapılan çalışmalarda Cd uygulamasının, gerek köklerde gerekse yapraklarda, içsel  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarını artırdığı belirtilmiştir (Cheng *et al.* 2002; Laspina *et al.* 2005; Kopyra *et al.* 2006; Singh *et al.* 2008). Görüldüğü gibi bizim mısır bitkisinden elde ettiğimiz sonuçlar, yukarıda verilen literatür bulgularıyla, kökler hariç, örtüşmektedir.  $\text{H}_2\text{O}_2$  üretiminin azalması her zaman bitki için faydalı ve strese direnç göstergesi olarak değerlendirilmemelidir. Çünkü bu bileşik üretilmezse ortamda daha toksik olan süperoksit anyonu birikecek ve bu da hücrelere önemli ölçüde zararlar verecektir. Bu nedenle çalışmamızın sonucu önemli bir bulgu olarak değerlendirilmelidir. SNP+Cd uygulamalarında, genelde 0.1 ve 0.5 mM SNP uygulamalarının yapıldığı tohumlara ait bitkilerin yapraklarında  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarı artmıştır (Şekil 4.17-18).  $\text{H}_2\text{O}_2$  miktarı, aynı bitkilerin köklerinde ise 0.1 mM SNP ile bütün Cd uygulamalarında artırılırken, 0.5 mM SNP ile aksine aynı Cd uygulamalarında düşürülmüştür (Şekil 4.17-18). Bu sonuca göre, mısır bitkisinin tohumlarına ekilmeden önce uygulanan NO'nun, bitki Cd stresine maruz kaldığında içsel  $\text{H}_2\text{O}_2$  seviyesini düzenleyebilecek bir potansiyele sahip olduğu görülmektedir.

MDA miktarı, tohumlarına tek başına SNP uygulanmış bitkilerin hem yaprak hem de köklerinde 0.01 mM SNP uygulaması ile önemli seviyelerde düşerken, aksine 0.5 mM SNP artmıştır (Şekil 4.19-20). Bitkilerde yapılan bazı çalışmalarda tek başına SNP'nin MDA miktarını düşürdüğü veya değiştirmedeği ifade edilmektedir (Hsu and Kao 2004; Laspina *et al.* 2005). Bunun önemli sebebinin bitki ve doku farklılığı veya uygulanan SNP'nin konsantrasyonu olduğu düşünülmelidir. Çünkü düşük SNP konsantrasyonlarında (0.01mM), içsel MDA miktarının düştüğü, 0.5 mM SNP de arttığı görülmüştür (0.5 mM SNP, fidelere yapılan uygulamalarda da aynı etkiyi yapmıştır). Muhtemelen bu konsantrasyon bu bitki için fazla olmakta ve bu yüzden de toksik olabilmektedir. Bitki dokularının sinyal bileşiklere verdiği cevabın konsantrasyona ve dokulara bağlı olarak değişebildiği bilinmektedir. Ayrıca bu bileşikler uygun konsantrasyon üzerinde, beklenenden farklı olarak ters bir etki yapabildiği iyi bilinen bir olaydır (Taiz and Zeiger 2004). NO da bir sinyal bileşik olduğundan uygulanan

konsantrasyonlarına bağı olarak etki farklılığına neden olabilir. Çalışmamızda, 25 ve 50  $\mu\text{M}$  Cd stresi altındaki bitki kök ve yapraklarında MDA miktarında önemli bir değişiklik görülmezken, 200  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitkilerin kök ve yapraklarında ise MDA miktarı düşmüştür (Şekil 4.19-20). Yapılan bazı çalışmalarda tek başına Cd stresinin bitkilerde MDA miktarını dolayısıyla da LPO seviyesini artırdığı belirlenmiştir. Bu çalışmalarda Cd'nin toksik bir ağır metal olduğu için hücre membranlarındaki peroksidasyonu artırarak böyle bir etkiye neden olduğu ileri sürülmüştür (Gratao *et al.* 2005; Singh *et al.* 2008; Chen *et al.* 2010). Ancak Cd'nin bu etkisi uygulanan konsantrasyonlarına bağı olarak bitkiler arasında farklı sonuçların çıkmasına neden olabilmektedir. Örneğin, mısır bitkilerine Cd uygulandıktan sonra MDA seviyesinin köklerde çoğaldığı, fakat yapraklarda çoğalmadığı gözlenmiştir (Hong *et al.* 2008). SNP+Cd uygulamalarında, 25  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz bırakılmış bitkilerin yaprak ve köklerinde 0.1 mM SNP, MDA miktarını düşürdüğü, 50  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz bırakılmış bitki yapraklarında 0.5 mM SNP'nin MDA miktarını arttırdığı, köklerinde ise etkili olamadığı görülmüştür. Ancak köklerde 0.1 mM SNP MDA miktarını azaltmıştır. 200  $\mu\text{M}$  Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında ise SNP'nin üç uygulaması da MDA miktarında önemli bir değişikliğe neden olmamıştır, köklerde ise artırmıştır. Bu sonuç, mısır bitkisinin tohumuna uygulanan NO'nun, bitki Cd stresine maruz kaldığında artan LPO seviyesini iyi bir düzenleme yaparak düşürebildiğini göstermektedir. Ancak uygulanan NO konsantrasyonun seviyesi bu düzenlemede önemli olduğu anlaşılmaktadır. Görüldüğü gibi, bitki tohumuna ön ıslatma şeklinde uygulanan NO'nun bitkiyi Cd stresine önceden hazırlayabildiği ve bitki daha sonra bu strese maruz kaldığında onu koruyabildiği anlaşılmaktadır. Şu ana kadar yapılan araştırmalar içerisinde, mevcut bilgilerimize göre, bu anlamda henüz bir çalışma bulunmadığından sonuçlarımızın literatür için yeni bir bilgi olduğu düşünülmektedir.

#### **Bu araştırmadan elde edilen önemli sonuçlar ve öneriler:**

Sonuç olarak, hem doğrudan bitkilere hem de tohumu yapılan uygulamalarda, SNP dolayısıyla da nitrik oksit (NO), bitki Cd stresine maruz kaldığında;

1. SOD aktivitesini hem yapraklarda ve hem de köklerde artmıştır. Bu durum SNP'nin tohuma yapılan uygulamalarında daha belirgin olduğu da görülmektedir.
2. CAT aktivitesini yapraklarda artırmış, köklerde ise düşürmüştür. Bu durum özellikle 0.1 mM SNP uygulamasında çok açıktır.
3. POX aktivitesini hem yapraklarda ve hem de köklerde artmıştır. Bu durum SNP'nin tohuma yapılan uygulamalarında daha belirgin olduğu da görülmektedir.
4. Özellikle 0.1 mM SNP uygulamasında, Cd stresinin 25 ve 50  $\mu$ M durumlarında antioksidan enzimleri daha iyi düzenleyebildiği görülebilmektedir. 200  $\mu$ M Cd stresi ise bitki için çok toksik geldiği ve SNP'nin bu yüksek toksititede enzimlerin düzenlenmesinde başarılı olamadığı düşünülmektedir.
5. Özellikle 0.1 mM SNP uygulamasında, Cd stresinin 25 ve 50  $\mu$ M durumlarında LPO seviyesini düşürdüğü belirlenmiştir. 200  $\mu$ M Cd stresi ise bitki için çok toksik geldiği ve SNP'nin bu yüksek toksititede artan LPO seviyesini düşürmekte başarılı olamamıştır.
6. İçsel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı üzerinde, özellikle fidelere yapılan uygulamalarda, artırma yönünde bir etki yapmıştır.
7. Gerek fidelere gerekse tohumlara ön ıslatma yapılarak uygulanan NO, bitkiyi sonradan gelecek ağır metal stresine hazırlayabilecek sinyal yollarını açmakta ve bitki stresle karşılaştığında cevap mekanizmalarını harekete geçirebilmektedir.
8. NO'nun tohuma yapılan uygulamasının, bu anlamdaki bir çalışma için, neredeyse bir ilk olduğu değerlendirildiğinde, bu araştırma gerek bitki fizyolojisi alanındaki benzer çalışmalara, gerekse bu konudaki zirai araştırma ve uygulama çalışmalarına da önemli bir katkı sağlayabilir.

**KAYNAKLAR**

- Aebi, H., 1974. Catalase, in:H.U. Bergmeyer (Ed), Methods of enzymatic analysis, Varley, Chemie/ Academic Pres, Weinheim/ New York, pp.680.
- Agarwal, S. and Pandey V., 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologia Plantarum*, 48(4), 555-560.
- Akalan, İ., 1982. Türkiyede toprak kaynaklarının kullanılması ve sorunları 'Çevre 82' sempozyumu. E.Ü. Atatürk Kültür Merkezi, İzmir.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza yayınları. Konya.
- Alaoui-Sosse B, Genet P, Vinit-Dunand F, Toussaint M-L, Epron D, Badot P-M (2004). Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Sci* 166:1213–1218
- Al-Hakimi, AMA., Hamada, A.M., 2001. Counteraction of salinity stress on wheat plants by grain soaking in ascorbic acid, thiamine or sodium salicylate. *Biol. Plant*, 44, 253-261.
- An, L., Liu, Y., Zhang, M., Chen, T. ve Wang, X., 2005. Effects of Nitric Oxide on Growth of Maize Seedling Leaves in the Presence or Absence of Ultraviolet-B Radition, *Journal of Plant Physiology*, 162, 317-326.
- Anbar, M., 1995, Nitric oxide: a synchronizing chemical messenger, *Experientia*, 51: 481–490.
- Anderson, L. ve Mansfield, T:A., 1979. The Effects of Nitric Oxide Pollution on The Growth of Tomato. *Environmental Pollution*, 20, 113-121
- Angelini, R. and Federico R., 1989. Histochemical evidence of poliamin oxidation and generation of hydrogen peroxide in the cell wall. *J.Plant Physiol*, (135), 212-217.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.*, 55, 373-99.
- Baet, S.H., Kwan I.S., Part T.I., Yun S.J., Kim J.K. and Chai K.G., 2000. Activities and isozyme profiles of antioxidant enzymes in intercellular compartment of overwintering barley leaves. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 33(5), 385-390.
- Bakardjieva, N., and Christov, K., 1996.Effect of calcium and zinc ions on the sensitivity of peroxidase from moses (*Mnium* sp) and ferns (*Polydium vulgare*) to high temperature. *Can. J . Bot.*, (74), 1665-1670.
- Banci, L., 1997. Structural properties of peroxidase. *J. Biotech.*,(53), 253-263.
- Banu, M.N.A., Hoque M.A., Watanabe-Sugimoto, M., Matsuoka, K., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., *et al.* 2009. Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. *J.Plant Physiol*, 166, 146-56.
- Barroso, J.B., Corpas, F.J., Carreras, A., Sandalio, L.M.,Valderrama, R., Palma, J.M., Lupianez, J.A. ve del Rio, L.A., 1999,Localization of Nitric Oxide Synthase in Plant Peroxisomes, *Journal of Biological Chemistry*, 274, 36729-36733.
- Beligni, M.V. ve Lamattina, L., 1999, Is Nitric Oxide Toxic or Protective?, *Trends in Plant Sciences*, 4, 299.

- Beligni, M.V. ve Lamattina, L., 1999a, Nitric Oxide Counteracts Cytotoxic Processes Mediated by Reactive Oxygen Species in Plant Tissues, *Planta*, 208,337-344.
- Beligni, M.V. ve Lamattina, L., 1999b. Is nitric oxide toxic or protective?, *Trends Plant Sci.*, 4: 299–300.
- Beligni, M.V., Garcia Mata, C., Graziano, M. ve Lamattina, L., 2000. Nitric oxide functions as both antioxidant and antistress agent in plants, American Society of Plant Biologists Meetings, July 15-19, San Diego, California, USA, Poster,0649.
- Beligni, M.V. ve Lamattina, L., 2000. Nitric Oxide Stimulates Seed Germination and De-etiolation and Inhibits Hypocotyl Elongation, Three Light-Inducible Responses in Plants, *Planta*, 210, 215-221.
- Beligni, M.V. ve Lamattina, L., 2001. Nitric Oxide in Plants: The History is just Beginnings, *Plant, Cell and Environment*, 24, 267-278.
- Beligni, M.V. ve Lamattina, L., 2001a. Nitric Oxide in Plants: The History is just Beginning, *Plant, Cell and Environment*, 24, 267-278
- Beligni, M.V. ve Lamattina, L., 2001b. Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth, *Trends Plant Sci.*, 6(11): 508-509.
- Beligni, M.V., Fath, A., Bethke, P.C., Lamattina, L. ve Jones, R.L., 2002. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers, *Plant Physiol.*, 129 (4): 1642–1650.
- Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M.L., 2005. Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*,(17), 21-34.
- Bergmeyer, J., and Grabl, M., 1983. *Methods of Enzymatic Analysis* (Third Edition), pp. 190-302, Germany.
- Blum, A., 1986. *Plant Breeding for Stress Environments*, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Boeuf, G., Legnard B. and Rambour S., 1999. Influence of light conditions on development, apoplastic peroxidase activities and peroxidase activities and peroxidase isoenzymes in chicory root explants. *Physiol. Plant*, (106), 331-336.
- Boeuf, G., Legnard B. and Rambour S., 2001. Effect of NAA on the development, apoplastic peroxidase activities, and peroxidase isoenzymes in chicory root explants. *J. Plant Physiol*, (158), 963-969.
- Bonnet, M., Oliver, C., and Veisseire, P., 2000. Effects of zinc and influence of *Acremonium lolii* on growth parameters, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activities of ryegrass. *Journal of Experimental Botany*, 51(346), 945-953.
- Boucher, J.L., Genet, A., Vadon, S., Delaforge, M. ve Mansuy, D., 1992a. Formation of nitrogen oxides and citrulline upon oxidation of Nw-hydroxy-Larginine by heme proteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 184: 1158–1164.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E., 2000, Responses to abiotic stresses, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, W. Gruissem, B. Buchanan, R. Jones (eds), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp. 158-1249.
- Brej, T., 1998. Heavy metal tolerance in *Agropyron repens* (L.) P.Bauv. Populations from the *Legnica copper* smelter area, Lower Silesia. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, (67), 325-333.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S., Neill, S.J., 2006. ABA-induced no generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis. *Plant J.*, 45, 113-122.



- Carreras, A., Quiros, M., Leon, A.M., Palma, J.M., Sandalio, L.M. ve Del Rio, L.A., 2002, Peroxisomes as a source of nitric oxide in plant cells, *Free Radical Biol. Med.*, 33 (S1): 187.
- Casella S, Frassinetti S, Lupi F, Squartini A (1988). Effect of cadmium, chromium and copper on symbiotic and free-living *Rhizobium leguminosarium* biovar trifolii. *FEMS Microbiol Lett* 49:343–347g
- CEPA, Classification of Environmental Protection Activities (1994).
- Chanda, S.V., and Singh, V.D., 1997. Changes in peroxidase and IAA oxidase activities during wheat grain development. *Plant Physiol. Biochem.*, (35), 245-250.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H., El Ferjani E., 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci.*, 127, 139-47.
- Chaudiere, J., and Ferrari-Iliou R., 1999. Intracellular antioxidants from chemical to biochemical mechanism. *Food Chem. Toxicol.*, (37), 949-962.
- Chen, Y.X., He, Y.F., Luo, Y.M., Yu, Y.L., Lin, Q., Wong, M.H., 2003. Physiological mechanism of plant roots exposed to cadmium. *Chemosphere*, 50(6), 789-793.
- Chen, F., Wang, F., Sun, H., Cai, Y., Mao, W., Zhang, G., Vincze, E., Wu, F., 2010. Genotype-dependent effect of exogenous nitric oxide on Cd-induced changes in antioxidative metabolism, ultrastructure, and photosynthetic performance in barley seedlings (*Hordeum vulgare*), *J. Plant Growth Regul.* 29, 394–408.
- Cheng, F.Y., Hsu, S.Y. ve Kao C.H., 2002. Nitric oxide counteracts the senescence of detached rice leaves induced by dehydration and polyethylene glycol but not by sorbitol, *Plant Growth Regul.*, 38: 265–272.
- Cho, U-H, Park J-O (2000). Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Sci* 156:1–9
- Clark, D., Durner, J., Navarre, D.A. ve Klessig, D.F., 2000. Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase, *Mol. Plant Microbe Interact.*, 13: 1380–1384
- Cooney, R.V., Harwood, P.J., Custer, L.J. ve Franke, A.A., 1994, Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids, *Environmental Health Perspectives*, 102: 460–462.
- Cordoba-Pedragosa, M.C., Cordoba, F., Villalba, J.M., Gonzales-Reyes, J.A., 2003. Zonal changes in ascorbate and hydrogen peroxide contents, peroxidase and ascorbate-related enzyme activities in onion roots. *Plant Physiol.*, 131, 696-706.
- Corpas, F.J., Palma, J.M., Del Río, L.A., and Barroso, J.B., 2009. Evidence supporting the existence of L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytol.* (184), 9–14.
- Cueto, M., Hernandez-Perera, O., Martin, R., Bentura, M.L., Rodrigo, J., Lamas, S. ve Golvano, M.P., 1996. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*, *FEBS Letters*, 398: 159–164.
- Cui, X.M., Zhang, Y.K., Wu, X.B., Liu, C.S., 2010. The investigation of the alleviated effect of copper toxicity by exogenous nitric oxide in tomato plants. *Plant Soil Environ.* (56), 274–281.
- Das, P., Samantaray, S., Rout, G.R. 1997. Studies on cadmium toxicity in plants: A review. *Environ. Poll.* 98:29-36

- Davidson, J.E., Whyte, B., Bissinger, P.H., Schiesti, R.H., 1996. Oxidative stress in involved in heat induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 93, 5116-5121.
- Dean, J.V. ve Harper, J.E., 1988. The conversion of nitrite to nitrogen oxide(s) by the constitutive NAD(P)H-nitrate reductase enzyme from soybean, Plant Physiology, 88: 389–395.
- De Azevedo Neto, A. D., Prisco, J. T., Eneas-Filho, C. E. B. de Abreu, E. Gomes-Filho (2006). Effect of salt stress on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. Environmental and Experimental Botany. 56:87-94.
- De La Rosa, G., Peralta-Videa, J.R., Montes., Parsons, J.G., Cano-Aguilera, I., Gardea-Torresdey, J.L., 2004. Cadmium uptake and translocation in tumbleweed (*Salsolakali*), a potential Cd-hyperaccumulator desert plant species: ICP/OES and XAS studies. Chemosphere. 55:1159-1168.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A. ve Lamb, C., 1998, Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. Nature, 394: 585–588.
- Del Rio, L.A., Corpas, F.J. ve Barroso, J.B., 2004, Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants, Phytochemistry, 65 (7): 783-792.
- De Pinto, M.C., De Gara, L., 2004. Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. J. Exp. Bot., 55, 2559-2569.
- Demir, Y., and Kocaçalışkan, İ., 2001. Effect of NaCl and proline on polyphenol oxidase activity in bean seedlings. Biologia Plantarum, (44), 607-609.
- Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R., 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). J. Exp. Bot., 52, 1101-9.
- Dohlhac de Borne, D.F., Elmayan, T., De Roton, C., De Hys, L., Tepfer, M. 1998. Cadmium partitioning in transgenic tobacco plants expressing a mammalian metallothionein gene. Molecular breeding. 4:83-90.
- Drazkiewicz, M., Skorzyńska-Polit, E., Krupa, Z., 2004. Copper –induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. Bio.Metals, 17, 379-387.
- Durner, J., Wendehenne, D. ve Klessig, D.F., 1998, Defense Gene Induction in Tobacco by Nitric Oxide, Cyclic GMP and Cyclic ADP-Ribose, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 95, 10328-10333.
- Durner, J. ve Klessig, D.F., 1999. Nitric oxide as a signal in plants. Current Opinion in Plant Biology, 2: 369–374.
- Eberhard, S., Doubrova, N., Marta, V., Mohnen, D., Southwick, A., Darviell, A., and Albersheim, P., 1989. Pectic cell wall fragments regulate tobacco thin-cell layer explant morphogenesis. Plant Cell, (1), 747-755.
- Edwards, R., Blount J.W., Dixon R.A., 1991. Glutathione and elicitation of the Phytoalexin response in legume cell cultures. Planta, (184), 403-409.
- El-Hendawy, S.E., Hu, Y., Yakout, G.M., Awad, A.M., Hafiz, S.E., and Schmidhalter, U., 2005. Evaluation salt tolerance of wheat genotypes using multiple parameters. Europ. J. Agronomy, (22), 243-253.
- Eyidoğan, F.İ., Öktem, H.A., Yücel, M., 2003. Superoxide dismutase activity in salt stressed wheat seedlings. Acta Physiologia Plantarum, (25), 263-269.

- Ferreira, R.R., Fornazier, R.F., Vitoria, A.P., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2002. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. *Journal of Plant Nutrition*, (25), 327-342.
- Ferrer, M.A. ve Ros Barcelo, A., 1999. Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by the xylem of *Zinnia elegans*, *Plant, Cell and Environment*, 22: 891–897.
- Fornazier, R.F., Ferreira, R.R., Vitoria, A.P., Molina, S.M.G., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2002. Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities in sugar cane. *Biologia Plantarum*, 45(1), 91-97.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2000. Oxygen processing in photosynthesis; regulation and signalling. *New Phytologist*, 146, 359-388
- Gallego, S.M, Benavides, M.P., Tomaro, M.L., 1996. Effect of heavy metal ions on sunflower leaves evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci.*, 121, 151-159.
- Garces, H., Durzan, D. ve Pedroso, M.C., 2001. Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*, *Annals of Botany*, 87:567-574.
- Garcia Mata, C. ve Lamattina, L., 2001. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress, *Plant Physiol.*, 126: 1196–1204
- Garcia Mata, C., Gay, R., Sokolovski, S., Hills, A., Lamattina, L. ve Blatt, M.R., 2003, Nitric oxide regulates K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100: 11116–11121.
- Gechev, T., Gadjev, I., Van Breusegem, F., Inze, D., Dukiandjiev, S., Taneve, V., and Minkov, I., 2002. Hydrogen peroxide protect tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *CMLS*, (59), 708-714.
- Gomez, J.M., Hernandez, J.A., Jimenez, A., del Rio, L.A., Sevilla, F., 1999. Differential response of antioxidative enzymes of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plants. *Free Radic Res.*, (31), 11-18.
- Gong, Y., Toivonen P.M.A., Lau O.L. and Wiersma P.A., 2001. Antioxidant system level in 'Braeburn' apple in related to its browning disorder. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, (42), 259-264.
- Gould, K.S., Lamotte, O., Klinguer, A., Pugin, A. ve Wendehenne, D., 2003. Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response?, *Plant Cell Environ.*, 26: 1851–1862.
- Gouvea, C.M.C.P., Souza, J.F., Magalhaes, A.C.N. ve Martins, I.S., 1997. NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation*, 21: 183–187.
- Gratao, L.P., Polle, A., Lea, P., and Azevedo, A., 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 32, 481-494.
- Graziano, M., Beligni, M.V., ve Lamattina, L., 2002. Nitric Oxide Improves Iron Availability in Plants, *Plant Physiology*, 130, 1852-1859.
- Graziano, M. ve Lamattina, L., 2005. Nitric oxide and iron in plants: an emerging and converging story, *Trends in Plant Science*, 10 (1): 4-8.

- Groppa, M.D., Rosales, E.P., Iannone M.F., Benavides, M.P., (2008). Nitric oxide, polyamines and Cd-induced phytotoxicity in wheat roots. *Phytochemistry* 69:2609–2615
- Guo, B., Liang, Y.C., Zhu, Y.G., Zhao, F.J., (2007). Role of salicylic acid in alleviating oxidative damage in rice roots (*Oryza sativa*) subjected to cadmium stress. *Environ Pollut* 147:743–749
- Guo, B., Liang, Y., Zhu, Y., 2009. Does salicylic acid regulate antioxidant defense systems, cell death, cadmium uptake and partitioning to acquire cadmium tolerance in rice? *J. Plant Physiol*, 166, 20-31.
- Güler, N.S., 2008. *Ctenanthe setosa*'da yaprak kıvrılması sırasında apoplastik ve simplastik alanlarda antioksidan sistemde meydana gelen değişimler. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Hale, M.G., Orcutt, D.M., 1987. *The physiology of plants under stress*, John Wiley and, New York, 206p.
- Halliwell, B. 1994. Free Radicals and antioxidants: A personal view. *Nutri.Rev.* 52, 253-265
- Hamed, R.R., Maharem, T.M., Fatah, M.M.A., and Ataya, F.S., 1998. Purification of peroxidase isoenzymes from Turnip roots. *Phytochemistry*, (48), 1291-1294.
- Havir, E.A. and Mchale N.A., 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol*, (84), 1291-1294.
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 25, 189-198.
- Henry, Y.A., Ducastel, B. ve Guissani, A., 1997, Basic chemistry of nitric oxide and related nitrogen oxides, *Nitric Oxide Research from Chemistry to Biology*, Landes Co. Biomed. Publ, Austin, USA, 15–46.
- Hernandez, J.A., Jimenez A., Mullineaux P.M., Sevilla F., 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses. *Plant Cell Environ*, (23), 853-862.
- Hernandez, J.A., Ferrer, M. A., Jimenez, A., Barcelo, A. R., and Sevilla, F., 2001. Antioxidant systems and O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in apoplast of pea leaves. Its relation with salt induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology*, (127), 817-831.
- Hodges, D.M., Andrews, C.J., Johnson, D.A., Hamilton, R.I., 1997. Antioxidant enzyme and compound responses to chilling stress and their combining abilities in differentially sensitive maize hybrids. *Crop Sci.*, 37, 857-863.
- Hong, W., ShiCheng, Z., WenJian, X., XiuBin, W., HongLi, F., Wei, Z., 2008. Effect of cadmium stress on photosynthesis, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 14, 36-42
- Horemans, N., Foyer, C.H. ve Asard, H., 2000. Transport and action of ascorbate at the plasma membrane, *Trends Plant Sci.*, 5: 263–267.
- Hsu, Y.T., Kao, C.H., 2004. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant growth regul.* 42, 227–238.
- Hsu, Y.T., Kao, C., H 2005. Abscisic acid accumulation and cadmium tolerance in rice seedlings. *Physiol Plant.* 124:71–80.

- Hsu, Y.T., Kuo, M.C., Kao, C.H., 2006. Cadmium-induced ammonium ion accumulation of rice seedling at high temperature is mediated through abscisic acid. *Plant and Soil*. 287, 267-277..
- Hu, K.-D., Hu, L.-Y., Li, Y.H., Zhang, F.Q., Zhang, H., 2007. Protective roles of nitric oxide on germination and antioxidant metabolism in wheat seeds under copper stress. *Plant Growth Regul.* 53:173-183.
- Huaifu, F., Shirong, G., Yansheng, J., Runhuna, Z. and Juan, L. 2007. Effects of exogenous nitric oxide on growth, active oxygen species metabolism and photosynthetic characteristics in cucumber seedlings under NaCl stress. *Front. Agric. China*, (1), 308-314
- Huang, J., Sommers, E.M., Kim-Shapiro, D.B. ve King, S.B., 2002b, Horseradish peroxidase catalyzed nitric oxide formation from hydroxyurea, *J. Am. Chem. Soc.*, 124: 3473-3480.
- Hung, K.T. ve Kao, C.H., 2003, Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid, *J. Plant Physiol.*, 160 (8): 871-879.
- Janda, T., Szalai, G., Antunovics, Zs., Horvath, E., Paldi, E., 2000. Effect of benzoic acid and aspirin on chilling tolerance and photosynthesis in young maize plants. *Maydica*, 45, 29-33.
- Janda, T., Szalai, G., Rios-Gonzales, K., Veisa, O., and Paldi, E., 2003. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Science*, (164), 301-306.
- Janda, T., Szalai, G., Tari, I., Paldi, E., 1999. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta*, (208), 175-180.
- Jouili, H., and El Ferjani, E., 2004. Effects of copper excess on superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in sunflower seedlings (*Helianthus annuus* L.). *Acta Physiologia Plantarum*, 26(1), 29-35..
- Kadioğlu, A., 1999. *Bitki Fizyolojisi*. Trabzon.
- Kadioğlu, A., 2004. *Bitki Fizyolojisi*. Trabzon.
- Kamnev, A.A., Van Der Lelie, D. 2000. Chemical and biological parameters as tools to evaluate and improve heavy metal phytoremediation. *Bioscience Reports* 20:239-258.
- Kazemi, N., Khavari-Nejad, A.R., Fahimi, H., Saadatmand, S., Nejad-Sattari, T., 2010. Effects of exogenous salicylic acid and nitric oxide on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in leaves of *Brassica napus* L. under nickel stress. *Scientia Horticultura*, 126, 402-407.
- Kerby, K., and Somerville, S. C., 1992. Purification of an infection-related, extracellular peroxidase from barley. *Plant Physiol.*, (100), 397-402.
- Kim, D.Y., Bovet, L., Maeshima, M., Martinoia, E., Lee, Y., (2007). The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *Plant J* 50:207-218
- Kim, K.Y., Kwon, S.Y., Lee, H.S., Hur, Y., Bang, C.W., Choi, K.S., and Kwak., 2000. Differential expression of four sweet potato peroxidase genes in response to abscisic acid and ethaphon. *Phytochemistry*, (54), 19-22.
- Klepper, L.A., 1979, Nitric Oxide (NO) and Nitrogen Dioxide (NO<sub>2</sub>) Emissions from Herbicide-Treated Soybean Plants. *Atmosphere and Environment*, 13, 537.
- Kocaçalışkan, İ., 2001. *Bitki Fizyolojisi*. Kütahya.

- Kocaçalışkan, İ., 2004. Bitki Fizyolojisi. Kütahya.
- Kolbert, Z., Bartha, B., Erdei, L., 2005. Generation of nitric oxide in roots of *Pisum sativum*, *Triticum aestivum* and *Petroselinum crispum* plants under osmotic and drought stress. *Acta Biol Szegediensis*, 49,13–16.
- Kong, X.S., Guo, X.P., Zhang, M.X., 1999. Effect of cadmium stress on the growth and phytochemistry of maize seedlings. *J. Huazhong Agric Univ.*, 18, 111-113.
- Kopyra, M., ve Gwozdz, E.A., 2003, Nitric Oxide Stimulates Seed Germination and Counteracts the Inhibitory Effect of Heavy Metals and Salinity on Root Growth of *Lupinus luteus*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, 1011-1017.
- Kopyra, M., Stachon-Wilk M., Gwozdz E. A., 2006. Effects of exogenous nitric oxide on the antioxidant capacity of cadmium-treated soybean cell suspension. *Acta Physiologiae Plantarum*. 28,(6), 525-536.
- Kronfuss, G., Wieser G., Havranek W.M. and Polle A., 1996. Effects of ozone and mild drought stress on total apoplastic guaiacol and lipid peroxidation in current-year needles of young Norway Spruce (*Picea abies* L., Karst.). *J. Plant Physiol.*, (148), 203-206.
- Krupa Z, Siedlecka A., Maksymiec, W., Baszynski, T., (1993). In vivo response of photosynthetic apparatus of *Phaseolus vulgaris* L. to nickel toxicity. *J Plant Physiol* 142:664–668
- Krupa, Z., Baszynski, T., 1995. Some aspects of heavy-metals toxicity towards photosynthetic apparatus-direct and indirect effects on lights and dark reaction. *Acta Phsiol Plant* 17, 177-190.
- Kuru, H.İ., 2007. Arseniğin insan ve bazı canlılarda oksidatif enzimler üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi.Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Kütahya.
- Lagriffoul, A., Mocquat, B., Mench, M., Vangronsveld, 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.
- Lamattina, L., Garcia MaTa, C., Graziano, M. ve Pagnussat, G., 2003.Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54:109–136.
- Laspina NV, Groppa MD, Tomaro ML, Benavides MP (2005). Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. *Plant Sci* ,168, (7), 252-260
- Laxalt, A.M., Beligni, M.V. ve Lamattina, L., 1997. Nitric Oxide Preserves the Level of Chlorophyll in Potato Leaves Infected by *Phytophthora infestans*. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 643-651.
- Lee, T.M., and Lin, Y.H., 1996a. Peroxidase activity in ethylene-induced rice (*Oryza sativa* L.) coleoptil elongation. *Bot. Bull. Acad.Sin.*, 37(4), 239-245.
- Lee, T.M., and Lin, Y.H., 1996b. Peroxidase activity in ethylene-, ABA-, or MeJA, treat rice (*Oryza sativa* L.) roots. *Bot. Bull. Acad. Sin.*,(37), 201-207.
- Leon, A.M., Palma, J.M., Corpas, F.J., Gomez, M., Romero-Puertas, M.C., Chatterjee, D., Mateos, R.M., del Rio, I.A., Sandalio, L.M., 2002. Antioxidative enzymes in cultivars of peppers plants with different sensitivity to cadmium. *Plant Physiology and Biochemistry*,(40), 813-820.
- Leshem, Y.Y., 1996, Nitric oxide in biological systems, *Plant Growth Regulation*, 18:155–169.

- Leshem, Y.Y. ve Haramaty, E., 1996. The Characterisation and Contrasting Effects of the Nitric Oxide Free Radical in Vegetative Stress and Senescence of *Pisum sativum* Linn. Foliage, Journal of Plant Physiology, 148, 258-263.
- Leshem, Y.Y., Wills, R.B.H. ve KU, V.V., 1998, Evidence for the function of the free radical gas nitric oxide (NO•) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants, Plant Physiol. Biochem., 36: 825–833.
- Leshem, Y.Y., 2000, Nitric oxide in plants, Occurrence, function and use, Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers
- Li, S.W., Xue, L.G., Xu, S.J., Feng, H.Y., An, L.Z., 2007. Hydrogen peroxide involvement in formation and development of adventitious roots in cucumber. Plant Growth Regul., 57, 173-180.
- Li, Q.Y., Niu, H.B., Yin, J., Wang, M.B., Shao, H.B., Deng, D.Z., Chen, X.X., Ren, J.P., Li, Y.C., 2008. Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative-stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare*). Colloids and Surfaces B; Biointerfaces, 65, 220-225.
- Li, S.W., Xue, L.G., Xu, S.J., Feng, H.Y., An, L.Z., 2009. Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings. Environ. Exp. Bot., 65, 63-71.
- Lin Ch-Ch, Chen L-M, Liu Z-H (2005) Rapid effect of copper on lignin biosynthesis in soybean roots. Plant Sci 168:855–861
- Lindqvist ,O. 1995 Enviromental impact and mercury and other heavy metals.J.Power Sources.57: 3-7
- Liu, P., and Yang, Y.A., 2000. Effects of molybdenum and boron on membrane lipid peroxidation and endogenous protective systems of soybean leaves. Acta Botanica Sinica, 42(5), 461-466.
- Liu, Y., Jiang,H., Zhao,Z., and An,L., 2010. Nitric oxide synthase like activity-dependent nitric oxide production protects against chilling induced oxidative damage in *Chorispora bungeana* suspension cultured cells. Plant physiology and Biochemistry. 48, 936-944.
- Lozano-Rodriguez, E., Hernandez, L.E., Bonay, P., Carpena-Ruiz, R.O., 1997. Distribution of Cd in shoot and root tissues of maize and pea plants: physiological disturbances. J.Exp. Bot, 48, 123-128.
- Luck, H., 1965. Catalase in: Methods of Enzymatic Analysis (Ed. H. Bergmeyer). pp. 885-895.
- Mahajan, S., Tuteja, Narendra., 2005, Cold, salinity and drought stresses: An overview, Archives of Biochemistry and Biophysics , 444, 139-158.
- Maksymiec, W., Baszynski T. (1996) Chlorophyll fluorescence in primary leaves of excess Cu-treated runner bean plants depends on their growth stages and the duration of Cuaction. J Plant Physiol 149:196–200
- Maksymiec, W., Russa R, Urbanik-Sypniewska T., Baszynski, T., (1994). Effect of excess Cu on the photosynthetic apparatus of runner bean leaves treated at two different growth stages. Physiol Plant 91:715–721.
- Maksymiec, W., Bednara J., Baszynski T., (1995). Responses of runner plants to excess copper as a function of plant growth stages: effects on morphology and structure of primary leaves and their chloroplast ultrastructure. Photosynthetica 31:427–435.

- Maksymiec, W., Krupa Z., (2006b). 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., Tomaszewska, B., 2001. Antioxidative defense of lead stress in subcellular compartments of pea root cells. *Acta Biochemica Polonica*, 48(3), 687-698.
- Mc Clung, C.R., 1997. Regulation of catalases in *Arabidopsis*. *Free Radical Bio. Med.*, (23), 489-496.
- McInnis, S.M., Desikan, R., Hancock, J.T., Hiscock, S.J., 2006. Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: potential signalling crosstalk? *New Phytol.*, 172, 221-228.
- Menconi, M., Sgherri, C.L.M., Pinzino, C., Navari-Izzo, F., 1995. Activated oxygen production and detoxification in wheat plants subjected to a water deficit programme. *J.Exp.Bot.*, 46, 1123-1130.
- Metwally, A., Finkemeier I, Georgi M, Dietz K, (2003). Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol* 132:272–281
- Metwally, A., Safranova, V.I., Belimov, A.A., Dietz, K.J., 2005. Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. *J. Exp. Bot.*, 56, 167-78.
- Milone, M.T., Sgherri, C., Clijsters, H., Navari-Izzo, F., 2003. Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environ Ex. Bot.*, 50, 265-76.
- Minibaeva, F.V., and Gordon, L. Kh., 2003a. Superoxide production and the activity of extracellular peroxidase in plant tissues under stress conditions. *Russ. J. of Plant Physiology*, 50 (3), 411-416.
- Mishra, A., Choudhuri, M.A., 1999. Effects of salicylic acid on heavy metal-induced membrane deterioration mediated by lipoxygenase in rice. *Biol. Plant*, 42, 409-415.
- Mohan, B.S., and Hosetti, B.B., 1997. Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in sewage stabilization ponds. *Environmental pollution*, (89), 233-238.
- Molas, J. (2002). Changes of chloroplast ultrastructure and total chlorophyll concentration in cabbage leaves caused by excess of organic Ni(II) complexes. *Environ Exp Bot* 47:115–126
- Moller, I.M., 2001. Plant mitochondria and oxidative stress electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 561-591.
- Mukherjee, S.P., Choudhuri, M.A., 1983. Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiologia Plantarum*, 58, 166-170.
- Mutlu, S., 2005. Tuz stresi ve salisilik asitin buğday yapraklarında apoplastik ve simplastik antioksidan enzimler üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Mutlu, S., Atıcı, Ö., and Nalbantoğlu, B., 2009. Effect of salicylic acid and salinity on apoplastic antioxidant enzymes in two wheat cultivars differing in salt tolerance. *Biologia Plantarum*, 53 (2), 334-338.
- Neill, S.J., Desikan, R., Hancock, J.T., 2002. Hydrogen peroxide signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5, 388-395.



- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., 2002a. Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. *J Exp Bot* 53,1237–1242.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A. ve Hancock, J.T., 2002b, Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signalling in stomatal guard cells, *Plant Physiol.*, 128:13–16.
- Neill, S.J., Desikan, R. ve Hancock, J.T., 2003. Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol.* 159: 11–35.
- Nishiyama, Y., Ikeda, H. ve Haramaki, N., 1998. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure, *Am. Heart. J.*, 135, 115.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione; keeping active oxygen under control. *Annu Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.*, 49, 249-79.
- Ouzounidou G, Giamparova M, Moustakas M, Karataglis S (1995) Responses of maize (*Zea mays* L.) plants to copper stress. I. Growth *Environ Exp Bot* 35:167–176
- Özcan, S., Gürel, E., And Babaoğlu, M., 2001. *Bitki Biyoteknolojisi*. S.Ü. Vakfı Yayınları.
- Özden, D.M., Dursun, H., and Sevinç A.N., 2000. The land resources of Turkey and activities of general directorat services. *Proceeding of International Symposium on Desertification*, 13-17 June, Konya, Turkey.
- Pastori, G.M., Trippi, V.S., 1992. Oxidative stress induces high rate of glutathione reductase synthesis in a drought resistant maize strain. *Plant Cell Physiol.*, 33, 957-996.
- Patykowski, J., and Urbanek, H., 2003. Activity of enzymes related to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and metabolism in leaf apoplastic fractions of tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *J. Phytopathol.*, (151), 153-161.
- Pedroso, M.C. ve Durzan D.J., 2000, Effect of different gravity environments on DNA fragmentation and cell death in *Kalanchoë* leaves, *Ann. Bot.*, 86: 983–994.
- Pedroso, M.C., Magalhaes J.R. ve Durzan D.J., 2000a. A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues, *J. Exptl. Bot.*, 51: 1027–1036.
- Popova, L.P., Maslenkova, L.T., Yordanova, R.Y., Ivanova, A.P. Krantev, A.P., Szalai, G., 2009. Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. *Plant Physiol Biochem*, 47, 224-31.
- Posmyk, M.M., Bailly C., Szafranska K., Janas K.M., Corbineau F., 2005, Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedlings, *J. Plant Physiol.*, (162), 403-412.
- Prasad, M.N.V. 1995. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environ. Exp. Bot.* 35:525-545.
- Pryor, W.A. ve Squadrito, G.L., 1995, The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide?, *American Journal of Physiology*, 268: L699-L700.
- Radotic, K., Ducic, T., Mutavdzic, D., 2000. Changes in peroxidase activity and isoenzymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, (44), 105-113.

- Ranieri, A., Castagna, A., Amoroso, S., Nali, C., Lorenzini, G., Soldatini, G.F., 1998. Ascorbate levels and ascorbate peroxidase activation in two differently sensitive poplar clones as a result of ozone fumigation. In: De Kok, L.J., Stulen, I., (ed). Responses of plant metabolism to air pollution and global change. Pp. 435-438. Backhuys Publishers, Leiden.
- Ribeiro, E.A., Cunha, F.Q., Tamashiro, W.M.S.C. ve Martins, I.S., 1999. Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells, FEBS Letters, 445: 283–286.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J. ve Kaiser, W.M., 2002. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro, J. Exp. Bot., 53: 103–110.
- Rodriguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., Zabalza, A., Corpas, F.J., Gomez, M., del Rio, L.A. *et al.* 2006. Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. Plant Cell Environ., 29, 1532-44.
- Romero-Puertas, M.C. ve Dellodonne, M., 2003. Nitric oxide signalling in plant-pathogen interactions, IUBMB Life, 55: 579–583.
- Romero-Puertas MC, Rodriguez-Serrano M, Corpas FJ, Gomez M, Del Rio LA, Sandalio LM (2004). Cadmium-induced subcellular accumulation of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pea leaves. Plant Cell Environ 27:1122–1134
- Sairam, R.K., Chandrasekhar, V., Srivastava, G.C., 2001. Comparison of hexaploid and tetraploid cultivars in their response to water stress. Biol. Plant, 44, 89-94.
- Sairam, R.K., Desmukh, P.S., Saxena, D.C., 1998. Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. Biol. Plant, 41, 384-394.
- Sairam, R.K., Rao, K.V., Srivastava, G.C., 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress antioxidant activity and osmolyte concentration. Plant Sci, 163, 1037-1046.
- Sairam, R.K., Srivastava, G.C., 2000. Induction of oxidative stress and antioxidant activity by hydrogen peroxide treatment in tolerant and susceptible wheat genotypes. Biologia Plantarum, 43(3), 381-386.
- Sairam, R.K., Srivastava, G.C., 2002. Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. Plant Sci., 162, 897-904.
- Sairam, R.K., Srivastava, G.C., Agarwal, S., Meena, R.C., 2005. Differences in antioxidants activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes. Biol. Plant., 49, 85-91.
- Sairam, R.K., Srivastava, G.C., Saxena, D.C., 2000. Increased antioxidant activity under elevated temperatures; a mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes. Biol. Plant, 43, 245-251.
- Sakhabutdinova, A.R., Fatkhutdinova, D.R., and Shakirova, F.M., 2004. Effect of salicylic acid on the activity of antioxidant enzymes in wheat under conditions of salination. Applied Biochemistry and microbiology, 40 (5), 501-505.
- Sakurai, N., 1998. Dynamic function and regulation of apoplast in the plant body. Journal of Plant Resources, 111(1101), 133-148.
- Salisbury, F.B. and Ross C.W., 1992. Plant Physiol. Wadsworth Publishing Company. California, USA, Pp. 682.

- Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gomez, M., Romero-Puertas, M.C., del Rio, L.A., 2001. Cadmium induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*, (52), 2115-2126.
- Sanita di Toppi, L., and Gabrielli, R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 41, 105-130.
- Scandalios, J.G., 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.*,(101), 7-12.
- Schettel, N.L., and N.E. Balke, 1983. Plant growth response to several allelopathia chemicals. *Weed Sci.*, (31), 293-298.
- Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D.L., Polle, A., 2001. Cadmium-induced changes in antioxidants systems, hydrogen peroxide content and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiology*,(127), 887-898.
- Selçukcan, Ç., Haziran 2005. Ayçiçeği (*Helianthus annuus L.*) .Bitkisinde Senesens ile Nitrik Oksit Arasındaki İlişkinin İncelenmesi.Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.
- Shaw, B.P.,1995. Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidant enzymes in seedlings of *Phaseolus aureus*.*Biol.Plant*, 37, 587-596.
- Shi, Q., Ding, F., Wang, X., Wei, M., 2007. Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant Physiol Biochem*, 45, 542–550.
- Singh, H.P., Batish, D.R., Kaur, G., Arora, K., Kohli, R.K., 2008. Nitric oxide (as sodium sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. *Environ. Exp. Bot.* 63: 158-167.
- Singh, H.P., Kaur S., Batish, D.R., Sharma, V.P., Sharma, N., Kohli, R.K.,2009. Nitric oxide alleviates arsenic toxicity by reducing oxidative damage in the roots of *Oryza sativa* (rice). *Nitric Oxide*. 2009 Jun;20(4):289-297.
- Siripornadulsil,S., Traina,S.,Verma,D.P.S.,Sayre, R.T., 2002. Molecular mechanisms of proline mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell* .14:2837-2847.
- Skorzynska-Polit E., Baszynski T., (1997). Differences in the sensitivity of the photosynthetic apparatus in Cd-stressed runner bean plants in relation to their age. *Plant Sci* 128:11–21
- Slesak, I.,Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S. Ve Miszalski, Z., 2007. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses, *Acta Biochim. Pol.*, 54, 39-50.
- Sobkowiak R, Deckert J., (2003). Cadmium-induced changes in growth and cell cycle gene expression in suspension-culture cells of soybean. *Plant Physiol Biochem* 41:767–772
- Somashekaraiah, B.V., Padmaja, K., Prasad, A.R.K., 1992. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxidase in chlorophyll degradation. *Physiologica Plantarum*, (85), 85-89.
- Song, L., Ding, W., Zhao, M., Sun, B., Zhang, L., 2006. Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Sci* 171, 449–458.
- Spiteller, G., 2001. Peroxidation of lineoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases, *Mechanisms of Ageing and Development*, Vol. 122, 617-657

- Stöhr, C. ve Ullrich, W.R., 2002, Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplasmic space, *J. Exp. Bot.*, 53: 2293–2303.
- Şimşek, F., 1999. Free radicals, antioxidants and lipid peroxidation. *Türkiye Klinikleri. J. Pediatr*, 8, 42-47.
- Taiz and Zeiger., 2006, *Plant physiology.*, Palme yayınevi, Ankara.
- Taşgın, E., Atıcı, Ö., Nalbantoğlu, B., Popova, P. L., 2006. Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. *Phytochemistry*, (67), 710-715.
- Tiryaki, D., 2009. Salisilik asidin kadmiyum toksisitesi altındaki buğdaylarda apoplastik antioksidatif sistem üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Erzurum.
- Toppi, L.S.D., Gabrielli, R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.*, 41, 105-30.
- Uchida, A., Jagendorf, A.T., Hibino, T., Takabe, T., Takabe, T., 2002 Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sci* 163, 515–523.
- Veicht, N.C., 2004. Horseradish peroxidase: a modern review of a classic enzyme, *Phytochemistry*, 65: 249–259.
- Vital, S.A., Fowler, R.W., Virgen, A., Gossett, D.R., Banks, S.W., Rodriguez, J., 2008. Opposing Roles for Superoxide and Nitric Oxide in the NaCl-Induced Up-Regulation of Antioxidant Enzyme Activity In Cotton Callus Tissue. *Environ Exp Bot.*, 62, 60-68.
- Vitoria, A.P., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2001. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry*, (57), 701-710.
- Wang, H-H., Huang J-J., Bi Rong ., 2010 . Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in aluminum tolerance in red kidney bean roots. *Plant Science* , 281–288.
- Wang, C., WeiLi, S., Wang, L., 2011. Nitricoxide supplementation alleviates ammonium toxicity in the submerged macrophyte *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 67–73.
- Weckx JEJ, Clijsters HMM (1997). Zn phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol Biochem* 35:405–410
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D.F. ve Durner, J., 2001, Nitric oxide: comparative synthesis and signalling in animal and plant cells, *Trends Plant Sci.*, 6:177–183.
- Wildt J, Kley D, Rockel A, Rockel P, Segschneider HJ. 1997. Emission of NO from several higher plant species. *Journal of Geophysical Research* 102: 5919–5927.
- Willekens, H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C. and Van Montagu, M., 1997. Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO Journal*, (16), 4806-4818.
- Wojcik, M., Tukendorf, A., 1999. Cd tolerance of maize, rye and wheat seedlings. *Acta Physiol Plant*, 21, 99-107.
- Wojtaszeks, P., 2000, Nitric oxide in plants: To NO or not to NO, *Phytochemistry*, 54 (1): 1-4.
- Xu, J., Yin, H.X., Li, x., 2009. Protective effects of proline against cadmium toxicity in micropropagated hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. *Plant Cell Rep.*, 28, 325-33.

- Yamamoto, A., Katou, S., Yoshioka, H., Doke, N. ve Kawakita, K., 2003. Nitrate reductase, a nitric oxide-producing enzyme: induction by pathogen signals, *J. Gen. Plant Pathol.*, 69: 218–229.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y. ve Takahashi, S., 1999, An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme, *Trends in Plant Science*, 2: 128–129.
- Yamasaki, H. ve Sakihama, Y., 2000. Simultaneous production of nitric oxide and peroxyxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation, *FEBS Lett.*, 468: 89–92.
- Yamasaki, H., Shimoji, H., Ohshiro, Y. ve Sakihama, Y., 2001. Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria, *Nitric Oxide Biol. Chem.*, 5: 261–270.
- Yee, Y., Tam N.F.Y., Wong Y.S. and Lu C.Y., 2002. Growth and physiological responses of two mangrove species (*Bruguira gymnorrhiza* and *Kandelia candel*) to waterlogging. *Environ. Exp. Bot.*, 1-13.
- Yeh, C.M., Chien, P.S., Huang, H.J., (2007). Distinct signalling pathways for induction of MAP kinase activities by cadmium and copper in rice roots. *J. Exp. Bot.* 58:659–671
- Yılmaz, S. and Ozan, T. S., 2003. Meme kanserli hastalarda lipid peroksidasyonu ve bazı enzim aktiviteleri arasındaki ilişki, *Türk Biyokimya Dergisi*, 28, (4), 252-256.
- Yordanova, R.Y., Christov K.N. and Popova L.P., 2004. Antioxidative enzymes in barley plants subjected to soil flooding. *Environ. and Exp. Botany*, (51), 93-101.
- Yu, C.C., Hung, K.T., Kao, C.H., 2005. Nitric oxide reduces Cu toxicity and Cu-induced  $\text{NH}_4^+$  accumulation in rice leaves. *J Plant Physiol* (162), 1319–1330.
- Zhang, F., Wang, Y., Yang, Y., Wu, H., Wang, D., and Liu, J., 2007. Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in salt resistance in the calluses from *Populus euphratica* *Plant, Cell and Environ.* 30, 775–785.
- Zhao, L., He, J., Wang, X., Zhang, L., 2008. Nitric oxide protects against polyethylene glycol- induce 165, 182–191
- Zornoza, P., Vazquez, S., Esteban, E., Fernandez-Pascual, M., Carpena, R., 2002. Cadmium-stress in nodulated white lupin: strategies to avoid toxicity. *Plant Phys. Biochem.* 40:1003-100.

## ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Osmaniye’de doğdu. İlk orta ve lise öğrenimini Osmaniye’de tamamladı. 2003 yılında girdiği Karadeniz Teknik Üniversitesi Giresun Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2007 yılında mezun oldu. Aynı yıl başladığı Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.