

Eruca sativa (Roka) FİDELERİNDE
FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL
OLAYLAR ÜZERİNE KADMIYUMUN
ETKİLERİ

AHMET SAĞIROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Eruca sativa (Roka) FİDELERİNDE
FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL OLAYLAR
ÜZERİNE KADMIYUMUN ETKİLERİ

AHMET SAĞIROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKADEMİK DANIŞMAN
Doç. Dr. Yasemin ÖZDENER

SAMSUN - 2012

***Eruca sativa* (Roka) FİDELERİNDE FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL OLAYLAR ÜZERİNE KADMIYUMUN ETKİLERİ**

ÖZ

Bu çalışmada *Eruca sativa* fideleri farklı derişimlerde ($75 \mu\text{g.g}^{-1}$, $150 \mu\text{g.g}^{-1}$, $300 \mu\text{g.g}^{-1}$, $450 \mu\text{g.g}^{-1}$ ve $600 \mu\text{g.g}^{-1}$) kadmiyum (Cd) çözeltilerine maruz bırakılmıştır. Uygulama sonucunda Cd'un yapraklardaki lipit peroksidasyonuna, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlara, bitki yaş ve kuru ağırlığı ile su içeriğine olan etkisi belirlenmiştir. Ayrıca yaprak ve köklerdeki Cd içerikleri ve bazı mikrobesein elementi içerikleri ve bu elementlerin alımında Cd'un etkileri belirlenmiştir.

Uygulamalar sonucunda kök ve yaprakların yaş, kuru ağırlık ve su içeriklerinin azaldığı ortaya konmuştur.

Yapraklara taşınan Fe miktarı kadmiyum derişimindeki artış ile orantılı olarak artarken Cu taşınması önemli oranda azalmıştır. En yüksek çinko miktarı $600 \mu\text{g.g}^{-1}$ Cd uygulamasında olmuştur. Köklerde ise bakır ve çinko birikiminde artış olurken demir birikimi önemli oranda azalmıştır. En yüksek çinko birikimi ($1533.5 \mu\text{g.g}^{-1}$) $300 \mu\text{g.g}^{-1}$ Cd'da gözlenmiştir.

Kadmiyum uygulaması lipit peroksidasyonunu arttırırken protein olmayan tiyol gruplarında $450 \mu\text{g.g}^{-1}$ Cd' da yükselme gözlenmiştir. AsA, DHA ve toplam AsA içeriğinde değişmeye neden olmamıştır.

Enzimatik antioksidatif aktivitelere değişken durumların ortaya çıktığı gözlenmiştir. SOD aktivitesinde değişme olmazken, CAT, APX ve GPOX aktivitelere azalma görülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Eruca sativa*, kadmiyum, oksidatif stres, antioksidanlar

**THE EFFECTS OF CADMIUM ON THE PHYSIOLOGICAL AND
BIOCHEMICAL ACTIVITIES IN THE SEEDLINGS OF *Eruca sativa* (Rocket)**

ABSTRACT

In this study, *Eruca sativa* (Rocket) was treated with different cadmium (Cd) concentrations (75, 150, 300, 450 and 600 $\mu\text{g.g}^{-1}$). At the end of the treatment, the effects of Cd on lipid peroxidation, enzymatic and non-enzymatic antioxidants, fresh and dry masses, water content were determined in leaves. Cadmium and some micronutrient contents of leaves and roots were analysed. Furthermore the effects of Cd on the uptake of some micronutrients were determined.

As a result of treatments, fresh, dry mass and water content of leaves and roots were decreased.

While Cd content of leaves increased proportionally with the increase in Cd concentration, the Cu content decreased significantly. The highest zinc content was 600 $\mu\text{g.g}^{-1}$ Cd treatment. The accumulation of copper and zinc increased. Iron accumulation decreased in the roots significantly. The accumulation of highest levels of zinc (1533.5 $\mu\text{g.g}^{-1}$) was observed in 300 $\mu\text{g.g}^{-1}$ Cd treatment.

Lipid peroxidation was increased by Cd treatments. Increased of non-protein thiol groups was observed in 450 $\mu\text{g.g}^{-1}$ Cd treatment. Cd did not lead to change in AsA, DHA and total AsA content.

While there was not change in the activity of SOD, and decreased activity of CAT, APX, GPOX.

Key words: *Eruca sativa*, cadmium, oxidative stress, antioxidants

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmalarım boyunca her türlü destek ve yardımını esirgemeyen, fikir ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocam Doç. Dr. Yasemin ÖZDENER'e,

Çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen tüm hocalarıma,

Öğrenimim boyunca maddi ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim anneme, ablama, Özgü ELİPEK'e ve tüm aileme en içten dileklerle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Ağır Metaller.....	3
2.2. Ağır Metal Toksisitesi.....	4
2.3. Ağır Metal Alımı ve Taşınması.....	5
2.4. Kadmiyum Toksisitesi.....	7
2.5. Kadmiyum Toksisitesine Hücresel Düzeyde Tepkiler.....	8
2.6. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri.....	11
2.6.1. Singlet Oksijen.....	12
2.6.2. Hidrojen Peroksit.....	13
2.6.3. Süper Oksit.....	13
2.6.4. Hidroksil Radikali.....	14
2.7. Reaktif Oksijen Türlerinin Üretimi.....	14
2.7.1. Mitokondride Reaktif Oksijen Türlerinin Üretimi.....	15
2.7.2. Kloroplastta Reaktif Oksijen Türlerinin Üretimi.....	16
2.7.3. Peroksizomda Reaktif Oksijen Türlerinin Üretimi.....	16
2.8. Lipit Peroksidasyonu.....	17
2.9. Protein Oksidasyonu.....	18
2.10. DNA Oksidasyonu.....	19
2.11. Antioksidan Savunma Sistemi.....	19
2.11.1. Süperoksit Dismutaz (SOD, E.C. 1.15.1.1).....	20
2.11.2. Askorbat Peroksidaz (APX, E.C. 1.11.1.11).....	21
2.11.3. Katalaz (CAT, E.C. 1.11.1.6).....	22
2.11.4. Guaiacol Peroksidaz (GPOX, E.C. 1.11.1.7).....	23
2.11.5. Prolin (Pro).....	23
2.11.6. Askorbik Asit (Vitamin C).....	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	27

3.1. Materyal	27
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	27
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	28
3.1.3. Bitkilerin Yetiştirilmesi	29
3.1.4. Ağır Metal Uygulaması	29
3.1.5. Bitkilerin Hasat Edilmesi	30
3.2. Yöntemler.....	30
3.2.1. Yaş ve Kuru Ağırlıkların Belirlenmesi.....	30
3.2.2. Su İçeriğinin Belirlenmesi	31
3.2.3. Cd ve Bazı Mikrobesein Elementi içeriğinin belirlenmesi.....	31
3.2.3.1. Translokasyon Faktörü.....	34
3.2.4. Lipit Peroksidasyonu	34
3.2.4.1. Standart Grafiğinin Çizilmesi	35
3.2.5. Prolinin Belirlenmesi	35
3.2.6. Protein Olmayan Tiyol Gruplarının Belirlenmesi	36
3.2.7. Askorbik Asit Analizi	36
3.2.8. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	37
3.2.8.1. Süper Oksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini	38
3.2.8.2. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini	38
3.2.8.3. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivite Tayini	38
3.2.8.4. Guaiacol Peroksidaz (GPOX) Aktivite Tayini.....	39
3.2.9. İstatistiksel Analizler	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. Su İçeriği, Yaş ve Kuru Ağırlık	40
4.2. Mikrobesein Elementi ve Kadmiyum İçeriği.....	41
4.2.1. Translokasyon Faktörü	44
4.3. Lipit Peroksidasyonu.....	44
4.4. Prolin.....	46
4.5. Askorbat	47

4.6.	Protein Olmayan Tiyol Grupları	48
4.7.	Süperoksit Dismutaz Aktivitesi.....	49
4.8.	Katalaz Aktivitesi.....	50
4.9.	Askorbat Peroksidaz Aktivitesi.....	51
4.10.	Guaiacol Peroksidaz Aktivitesi	52
5.	TARTIŞMA.....	53
5.1.	Su İçeriği, Yaş ve Kuru Ağırlık	53
5.2.	Kadmiyum ve Bazı Mikrobesein Elementi İçerikleri ve Taşınmaları	54
5.3.	Lipit Peroksidasyonu.....	55
5.4.	Prolin.....	56
5.5.	Askorbat İçeriği.....	56
5.6.	Protein Olmayan Tiyol Grupları	57
5.7.	Antioksidan Enzim Aktiviteleri	58
5.7.1.	Süperoksit Dismutaz Aktivitesi	58
5.7.2.	Katalaz Aktivitesi	59
5.7.3.	Askorbat Peroksidaz Aktivitesi	59
5.7.4.	Guaiacol Peroksidaz Aktivitesi.....	60
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61
7.	KAYNAKLAR	62
	ÖZGEÇMİŞ	72

SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ**Simgeler**

μg	: Mikrogram
μM	: Mikromolar
μs	: Mikrosaniye
$^1\text{O}_2$: Singlet oksijen
Ag	: Gümüş
As	: Arsenik
B	: Bor
Ca	: Kalsiyum
Cd	: Kadmiyum
Co	: Kobalt
Cr	: Krom
Cu	: Bakır
Fe	: Demir
g	: Gram
H	: Hidrojen
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
Hg	: Civa
K	: Potasyum
Li	: Lityum
mL	: Mililitre
Mn	: Mangan
Mo	: Molibden
mV	: Milivolt
Ni	: Nikel
O_2	: Moleküler oksijen
O_2^-	: Süperoksit
OH \cdot	: Hidroksil radikali
Pb	: Kurşun

R·	: Lipit alkil radikali
RO·	: Alkoksil radikali
ROO·	: Lipit peroksil radikali
ROOR	: Peroksit dimeri
U	: Uranyum
V	: Volt
W	: Watt
Zn	: Çinko

Kısaltmalar

AA	: Askorbik asit
APX	: Askorbat peroksidaz
AsA	: Askorbat
CAT	: Katalaz
Cys	: Sistein
D	: Dalga boyu
DHA	: Dehidroaskorbat
DHAR	: Dehidroaskorbat redüktaz
dk.	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleotit asit
DTNB	: 5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit)
DTT	: Ditiyotreitol
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
Glu	: Glutamin
GPOX	: Guaiacol peroksidaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Glutasyon
HEDTA	: Hidroksi etil etilendiamin triasetik asit
HNE	: 4-hidroksi -2-nonenal
K.A.	: Kuru ağırlık
kDa	: Kilodalton
LPO	: Lipit peroksidasyonu
MDA	: Malondialdehit

MDHA	: Monodehidroaskorbat
MDHAR	: Monodehidroaskorbat redüktaz
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NBT	: Nitro blue tetrazolyum klorür
NEM	: N-Etilmalaimid
PC	: Fitoşelatin
Pro	: Prolin
PSI	: Fotosistem I
PSII	: Fotosistem II
PVPP	: Polivinilpolipirolidon
RNA	: Ribonükleotit asit
ROT	: Reaktif oksijen türleri
-SH	: Sülfidril grubu
SOD	: Süperoksit dismutaz
T.A.	: Taze ağırlık
TCA	: Triklor asetik asit
TEMED	: Tetra metil etilen daimin
TF	: Translokasyon faktörü
Y.A.	: Yaş ağırlık

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Ağır metaller aracılığıyla ROT oluşumu	5
Şekil 2.2. Kadmiyumun şelatlanması ve vakuolde tutulması	10
Şekil 2.3. AOX ve ROT dengesi.....	11
Şekil 2.4. ROT'nin sebep olduğu zararlar	12
Şekil 2.5. Enerji transferi ile ROT üretimi.....	12
Şekil 2.6. Fenton reaksiyonu.....	14
Şekil 2.7. Bitki hücresinde ROT üretimi	15
Şekil 2.8. Lipit peroksidasyon adımları	18
Şekil 2.9. ROT ve Antioksidan Savunma Mekanizması	20
Şekil 2.10. Askorbat-glutasyon döngüsü.....	22
Şekil 2.11. Prolin sentezi ve yıkılması.....	24
Şekil 2.12. Askorbik asitin yapısı ve oksidasyon ürünleri.....	25
Şekil 3.1. Metal Uygulama Sürecinde Bitkiler	30
Şekil 3.2. Cd kalibrasyon grafiği	32
Şekil 3.3. Fe kalibrasyon grafiği	32
Şekil 3.4. Cu kalibrasyon grafiği	33
Şekil 3.5. Zn kalibrasyon grafiği	33
Şekil 3.6. MDA standart grafiği.....	35
Şekil 3.7. Prolin standart grafiği	36
Şekil 4.1. Farklı derişimlerde Cd uygulanan <i>Eruca sativa</i> fidelerinde su içeriği, yaş ve kuru ağırlıklar	41
Şekil 4.2. Farklı derişimlerde Cd'a maruz bırakılan <i>Eruca sativa</i> yapraklarında bazı mikrobesein elementi ve Cd miktarları	42
Şekil 4.3. Farklı derişimlerde Cd'a maruz bırakılan <i>Eruca sativa</i> köklerinde bazı mikrobesein elementi ve Cd miktarları	43
Şekil 4.4. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan <i>Eruca sativa</i> yapraklarında MDA miktarı.....	45
Şekil 4.5. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan <i>Eruca sativa</i> yapraklarında prolin miktarı.....	46

Şekil 4.6. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan <i>Eruca sativa</i> yapraklarının dehidroaskorbat (DHA), askorbat (AsA) ve toplam askorbat (DHA+AsA) içerikleri ...	47
Şekil 4.7. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan <i>Eruca sativa</i> yapraklarının protein olmayan -SH grubu içerikleri	48
Şekil 4.8. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan <i>Eruca sativa</i> yapraklarında SOD aktivitesi.....	49
Şekil 4.9. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan <i>Eruca sativa</i> yapraklarında CAT aktivitesi.....	50
Şekil 4.10. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan <i>Eruca sativa</i> yapraklarında APX aktivitesi.....	51
Şekil 4.11. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan <i>Eruca sativa</i> yapraklarında GPOX aktivitesi.....	52

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2.1. Bazı ağır metal tanımları	3
Çizelge 2.2. SOD izoenzimleri ve buldukları bölgeler	21
Çizelge 4.1. Farklı derişimlerde Cd uygulanan <i>Eruca sativa</i> fidelerinde su içeriği, yaş ve kuru ağırlıklar	40
Çizelge 4.2. Farklı derişimlerde Cd'a maruz bırakılan <i>Eruca sativa</i> yapraklarında bazı mikrobesein elementi ve Cd miktarları	42
Çizelge 4.3. Farklı derişimlerde Cd'a maruz bırakılan <i>Eruca sativa</i> köklerinde bazı mikrobesein elementi ve Cd miktarları	43
Çizelge 4.4. Farklı derişimlerde Cd'a maruz bırakılan <i>Eruca sativa</i> fidelerinde Cd için translokasyon faktörleri	44
Çizelge 4.5. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan <i>Eruca sativa</i> yapraklarında MDA miktarı	45
Çizelge 4.6. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan <i>Eruca sativa</i> yapraklarında prolin miktarı	46
Çizelge 4.7. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan <i>Eruca sativa</i> yapraklarının dehidroaskorbat (DHA), askorbat (AsA) ve toplam askorbat (DHA+AsA) içerikleri ...	47
Çizelge 4.8. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan <i>Eruca sativa</i> yapraklarının protein olmayan -SH grubu içerikleri	48
Çizelge 4.9. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan <i>Eruca sativa</i> yapraklarında SOD aktivitesi	49
Çizelge 4.10. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan <i>Eruca sativa</i> yapraklarında CAT aktivitesi	50
Çizelge 4.11. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan <i>Eruca sativa</i> yapraklarında APX aktivitesi	51
Çizelge 4.12. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan <i>Eruca sativa</i> yapraklarında GPOX aktivitesi	52

1. GİRİŞ

Biyosferin insan aktiviteleri sonucu toksik metaller ile kirlenmesi hem insan sağlığı hem de ekosistem için büyük bir problem arz etmektedir. Toksik metaller çevremizde doğal olarak bulunabilmektedir fakat fosil yakıtların kullanılması, madencilik, pestisitlerin kullanımı gibi aktiviteler sonucunda tehlikeli seviyelere ulaşmaktadır (Leyval ve ark., 1997). İnsan aktiviteleri sonucu ortalama olarak bir yılda 7,6 ton Cd, 35 ton Cu, 38 ton Mn, 332 ton Pb, 19 ton As dünya üzerine salınmaktadır (Nriagu, 2010). Besin zinciri yoluyla organizmalara dağılıp olumsuz etkiler göstermektedir.

Ağır metaller bitkiler üzerinde de toksik etkiler göstermektedir. Bitkilerde büyümenin durmasına, tohum çimlenmesinin engellenmesine, yaprak kıvrılmalarına, klorozis, mineral alımının engellenmesi, enzimlerin yapısının bozulması gibi toksisite belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olurlar. Bu metallerin bitkiler üzerindeki etkileri türlere göre değişmektedir; bazı türler toleranslı olup ağır metal birikimi gösterebilir. Ağır metallerden bazıları ise mikrobesein elementi olup bitki gelişimi için mutlaka gereklidirler (Rascio ve Navari-Izzo, 2011). Mikrobesein elementi eksikliğinde ya da bu elementlerin yüksek derişimlerine maruz kalınması durumunda bitkilerde toksik etkiler görülür. Cu, Fe, B, Cl, Ni, Zn, Mn, Mo mikrobesein elementleridir. Mikrobesein elementi eksikliğinde bazı morfolojik değişimler görülebilir. Örneğin Fe ve Mn eksikliğinde özellikle kökün epidermal hücrelerinde değişiklikler meydana gelir. Çinko eksikliğinde bitki büyümesi için yeterli oksin sentezlenemez, internod uzaması durur. Çinko bitkilerde dehidrogenaz, peroksidaz, oksidaz gibi bazı enzimlerin kofaktörüdür. Ayrıca bitkilerde azot metabolizmasının düzenlenmesinde, fotosentez ve oksin sentezinde görev yapmaktadır (Giehl ve ark., 2009; Colzi ve ark., 2011; Kadioğlu, 2011).

Elektrik santralleri, ısıtma sistemleri, şehir trafiği, maden işletmeleri, fosfatlı gübreler tüm yeryüzüne Cd'un salınmasına neden olur. Ayrıca kayaçların mineralizasyonu sonucunda doğal olarak çevreye salınabilir fakat insan kaynaklı Cd salınımına göre bu oran oldukça düşüktür. Yoğunluğu $8,6 \text{ g cm}^{-3}$ olan bu element neredeyse tüm organizmalar için toksiktir. Kadmiyum bitkilerde klorozis görülmesine, su dengesinin bozulmasına, bazı minerallerin alımı ile bazı enzimlerin aktivitelerinin engellenmesine buna bağlı olarak demir eksikliği görülmesine neden olur. Ayrıca Cd,

stomaların açılmasını engeller ve plasma membranda H^+/K^+ değişim oranının azalmasına sebep olur (Sanita di Toppi ve Gabbrielli, 1999).

Yeryüzünün birçok bölgesindeki topraklarda orta dereceli Cd kirliliği görülmektedir. Pirinç gibi bazı yenilebilir bitkiler, çeşitli organlarında Cd birikimi göstermektedir. Bu bitkiler kökleri vasıtasıyla topraktan Cd'ü alırlar. Köklerde şelatlanan Cd ksileme yüklenerek gövdeye taşınır, daha sonra floem aracılığıyla bitkide tohumlara taşınır ya da yapraklarda yeniden dağılımı yapılarak bu organlarda depo edilir (Clemens ve ark., 2002; Uraguchi ve ark., 2009). Bitkiler üreme ve gelişimleri için Cd'a ihtiyaç duymazlar fakat Cd'un biyoakümülyasyon indeksi iz elementler kadar yüksektir. Kadmiyum fitotoksisiteye neden olmasa dahi bitki dokularındaki derişimleri insanlar ve hayvanlar için tehlike oluşturur. Bu nedenle besin zinciri göz önüne alındığında Cd, en tehlikeli metallerden birisidir (Liu ve ark., 2007).

Eruca sativa (Brassicaceae), kökeni Akdeniz bölgesi olan ve tüm dünyada yayılım gösteren tek yıllık ya da iki yıllık bir bitkidir. İtalya ve Türkiye başta olmak üzere Avrupa ülkelerinde salata olarak yaprakları tüketilmektedir (Villamil ve ark., 2002). Birçok Brassicaceae türü ağır metal depo etmektedir (Xiong, 1998; Gisbert ve ark., 2004). Daha önce yapılan araştırmada *Eruca sativa* tohumlarının çimlenme aşamasında Cd'a önemli ölçüde toleranslı olduğu belirlenmiştir (Ozdener ve Kutbay, 2009). Fakat fidelerin Cd'a maruz kalması durumunda fizyolojik ve biyokimyasal tepkileri ile ilgili araştırmalar yeterli değildir. Bu araştırma ile Cd'un bitki besin elementlerinin alımı, kök ve yapraklarda birikme ve bu birikmenin büyüme ve metabolik seviyedeki etkileri açığa çıkarılmış olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ağır Metaller

Ağır metal terimi için genellikle elementlerin yoğunluğu, atom ağırlıkları, atom numarası gibi çeşitli kimyasal özellikleri dikkate alınarak yapılmış birçok tanım mevcuttur. Bu tanımlara göre yapılmış gruplandırma Çizelge 2.1.'de verilmiştir (Duffus, 2002).

Çizelge 2.1. Bazı ağır metal tanımları (Duffus, 2002)

a) Yoğunluğa göre yapılan tanımlar
<ul style="list-style-type: none"> ○ 4'ten daha büyük yoğunluğuna sahip metaller, ○ Yüksek yoğunluğa sahip metaller, özellikle yoğunluğu 5 ve üzerinde olan metaller, ○ 5'ten daha büyük yoğunluğa sahip metaller, ○ Yoğunluğu 6 g/cm^3'ten büyük metaller, ○ Yoğunluğu $4,5 \text{ g/cm}^3$'ten büyük metaller, ○ Yoğunluğu $3,5-5 \text{ g/cm}^3$ 'ün üzerinde olan metaller,
b) Atomik ağırlıklarına (nispi atomik kütle) göre yapılan tanımlar
<ul style="list-style-type: none"> ○ Yüksek atomik ağırlıklı metaller, ○ Atomik ağırlığı sodyumdan yüksek olan metaller, ○ Düşük derişimlerde yaşayan organizmalara zarar verebilen yüksek atomik ağırlığa sahip metalik elementler, ○ Kadmiyum, kurşun, cıva gibi nispeten yüksek atom ağırlığına sahip metallerdir. Bu tanımlamada kimyasal özellikler tam olarak belirli değildir,
c) Atom numarasına göre yapılan tanımlar
<ul style="list-style-type: none"> ○ Atom numarası 21 (scandium) ve 92 (uranyum) arasında olan metaller, ○ Atom numarası kalsiyumun atom numarasından büyük olan metaller, ○ Toprak çözeltilisinde bulunan bazı toleranslı türler ve ekotipler dışında bitki büyümesini engelleyen, yüksek atom ağırlığına sahip metaller,
d) Diğer kimyasal özelliklerine göre yapılan tanımlar
<ul style="list-style-type: none"> ○ Nispeten yüksek moleküler ağırlığa sahip metaller, ○ Dithizone ($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$) ile kolayca reaksiyona girebilen metaller. Örneğin; çinko, bakır, kurşun, ○ Yağ asitleri ile reaksiyona girerek sabun oluşturan metaller,

Bu tanımlara göre doğal olarak meydana gelen 90 elementten 53'ü ağır metaldir; fakat hepsi biyolojik olarak önemli değildir. Fizyolojik koşullar altında çözünebilirliği

göz önüne alındığında, 17 ağır metal canlı hücreler, organizmalar ve ekosistemler için önemlidir. Bu metaller arasında yer alan; Fe, Mo ve Mn önemli mikro besin elementleridir. Zn, Ni, Cu, V, Co yüksek ya da düşük öneme sahip iz elementlerdir. As, Hg, Ag, Sb, Cd, Pb ve U'un ise besin elementi olarak fonksiyonları bilinmemektedir (Schützendübel ve Polle, 2002; Benavides ve ark., 2005) .

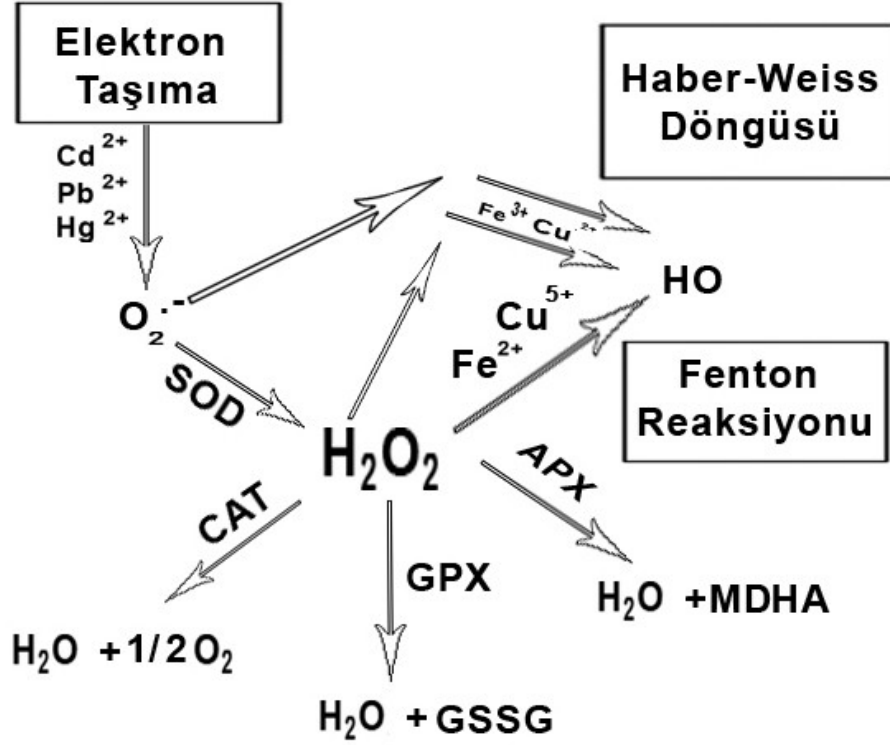
Karasal ekosistemlerde, ağır metallerin ana materyal ve atmosfer olmak üzere başlıca iki kaynağı vardır. Doğal kaynakları volkanlar ve kara parçalarıdır. Madencilik, fosil yakıtların tüketilmesi, metal endüstrisi, fosfatlı gübrelerin kullanılması gibi insan kaynaklı aktiviteler ağır metal yayılımını ve ekosistemde bu bileşiklerin birikimini artırır (Schützendübel ve Polle, 2002).

2.2. Ağır Metal Toksisitesi

Yüksek derişimlerde ya da uzun süre düşük derişimlerde ağır metallerle maruz kalan bitkilerin vejetatif organlarının morfolojik ve fizyolojik olarak etkilendiği bilinmektedir (Gür ve ark., 2004). Bakır, çinko gibi bazı ağır metaller birçok enzim ve proteinin bileşeni olup bitki büyüme ve gelişmesi için gereklidir. Ancak bu elementler de yüksek derişimlerinde birçok bitki türünde büyümeyi engeller ve toksisite semptomlarının görülmesine neden olur (Hall, 2002). Ağır metal toksisitesi üç ana nedene dayanır:

- i. Metallerin, -tiyol, -histidin ve -karboksil gruplarına bağlanma eğilimleri nedeniyle proteinlerle direkt olarak etkileşime girerek hücrenin yapısını, katalitik ve taşıma bölgesinin değişmesine neden olması.
- ii. Oksidatif strese yol açabilen serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artırması (Şekil 2. 1).
- iii. Biyomoleküllerdeki esas katyonların yerini alarak fonksiyonlarının bozulmasına neden olması.

Metallerin farklı kimyasal özellikleri ve biyolojik sistemlerdeki farklı davranışları nedeniyle bu üç mekanizma, toksisite nedenlerinin açıklanmasına yetmeyebilir (Sharma ve Dietz, 2009).



Şekil 2.1. Ağır metaller aracılığıyla ROT oluşumu. Pinto ve ark.dan değiştirilerek (2003)

2.3. Ağır Metal Alımı ve Taşınması

Metaller toprakta kolloidlere tutunmuş olarak ya da organik maddelere bağlı halde bulunur. Bitkiler ancak toprak çözeltisi içindeki iyon halindeki metalleri alabilirler (Kafadar ve Saygideger, 2010). Ağır metal alınımı, bitki türüne bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Kök katyon değişim kapasitesi, kök yüzey alanı, toprak pH'sı, sıcaklık, metal derişimi gibi özellikler ağır metal alınımını etkilemektedir. Ayrıca bitkiler rizosfer pH'sını değiştirerek, yani rizosfere malat, sitrat, musilaj gibi maddeler (fitosidereför) salgılayarak ağır metal Emilimini arttırmaktadır (Kranner ve Colville, 2011). Düşük pH'da hidrojen iyonları, metallerle kolloidlere tutunmak için rekabete

girer. Böylece hidrojen iyonları kolloide tutunur, metaller toprak suyunda kalır ve bitkiler tarafından alınabilir (Greger, 1999).

Bitkiler tarafından metal alımı sırasında ortamdaki iyonların karşılıklı etkileşimleri bilinmektedir. Bitkilerin aşırı Mn'a maruz kalması, Mg alımını %50 azaltır. Mangan ve Mg absorpsiyon sırasında kök hücre zarındaki bağlanma bölgeleri için rekabet ederler ve birbirlerinin alımlarını etkilerler. Aynı şekilde ortamda bulunan Zn ve Cu iyonları Mn alımını azaltmaktadır (El-Jaoual ve Cox, 1998). Ayrıca Se'un bitkilerde Fe, Mg alımını azalttığı (Khattab, 2004); Cd'un Fe, Mn, Cu, Zn, Ni gibi besin elementleri ile bağlanma bölgeleri için rekabete girdiği belirlenmiştir (Benavides ve ark., 2005; Kranner ve Colville, 2011).

EDTA, HEDTA gibi bazı sentetik şelatlayıcılar metallerin topraktaki çözünürlüğünü ve bitki tarafından alımını artırır (Chaney ve ark., 1997).

Metaller ilk olarak kökteki hücre duvarlarına bağlanır. Metal iyonları taşıyıcı proteinler ve/veya kanal proteinleri gibi sekonder taşıyıcılar tarafından hücre içine alınır. Zar potansiyeli plazma membranı içersinde negatiftir ve kök epidermal hücrelerinde -200 mV'tur. Bu durum sekonder taşıyıcılar ile katyon alımı için güçlü bir sürücü kuvvet sağlar. Moleküler teknikler kullanılarak *Saccharomyces cerevisiae*'de bazı katyon taşıyıcılar belirlenmiştir. Bunlar mikro besin elementi alımından sorumlu ZIP (ZRT, IRT- benzeri protein) ve Nramp (doğal dirençli makrofaj protein) ailelerine aittir (Clemens ve ark., 2002).

Kök hücrelerine alınan metal iyonları burada şelatlanarak ksileme yüklenir (Kranner ve Colville, 2011). Endodermal hücre tabakasının çeperleri, metal iyonlarının apoplastik yoldan ksileme hareketi sırasında bir engel oluşturur. Metal iyonları bu engeli aşmak için simplastik yolu kullanmak zorundadır. Katyonlar kök hücrelerinden ksileme taşıyıcı proteinler vasıtasıyla yüklenirler (Clemens ve ark., 2002).

Ağır metallerin ksilemde taşınması bitki türü ve metal çeşidine göre değişiklik göstermektedir. Örneğin Ni, bazı bitkilerin ksileminde Ni-peptit kompleksi şeklinde taşınırken (Cataldo ve ark., 1978), metal biriktirici bitkilerde histidin amino asiti ile kompleks oluşturularak taşınır (Kerkeb ve Kramer, 2003).

Ağır metallerin bitki içerisinde dağılımı öncelikle ksilem ile gerçekleşiyor olmasına rağmen, bu elementlerin yaprak içinde ve bitkinin diğer kısımlarında dağılımı floem aracılığıyla gerçekleşmektedir (Clemens ve ark., 2002; Riesena ve Feller, 2005).

2.4. Kadmiyum Toksisitesi

Yüksek yapılı bitkiler tarafından Cd alımı; bu elementin toprak çözeltisindeki derişimi, pH, redoks potansiyeli, sıcaklık, organik madde miktarına bağlıdır. Kadmiyum, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn gibi besin elementleri ile membran geçirgenliği için rekabete girer. Hücre membranı, hücre içine metal girişini azaltarak ya da önleyerek metal dengesinin korunmasında rol oynar.

Kadmiyum, etkili bir şekilde taşınması ve düşük derişimlerde dahi bitkilerde etkilerini göstermeye başlaması ile en tehlikeli metallere biridir.

Birçok çevresel şartta Cd ilk olarak köke girer ve ilk hasarı burada oluşturur. Kadmiyum köke girer girmez apoplastik ya da simplastik yoldan; organik asit ve/veya fitoşelatin gibi bazı ligant kompleksleri şeklinde ksileme ulaşır. Normal şartlarda Cd iyonları köklerde tutulur, çok az bir kısmı gövdeye ulaşır. Genellikle bitkilerde Cd içeriği tohum<meyve<yaprak<gövde<kök şeklindedir. Gelişen meyvelere Cd taşınması floem ile olur.

Organik madde içeriği yüksek, asidik topraklarda Cd alımı düşüktür (Benavides ve ark., 2005).

Kadmiyum toksisitesi kolayca ayırt edilebilir. Bitkilerde genellikle büyümeyi engeller ve klorozise neden olur. Klorozis Fe eksikliğine bağlı olarak meydana gelir. Kadmiyum kaynaklı klorozis ise bu elementin doğrudan ya da dolaylı olarak yapraktaki Fe ile etkileşime girmesinden kaynaklanır. Gelişen bitkilerde yüksek Cd içeriği Fe alınmasını engeller. Ayrıca Cd toksisitesi, P eksikliği ya da Mn taşınmasının engellenmesine neden olabilir. Cd toksisitesi tür ve cinse bağlı olmakla birlikte bitkilerdeki semptomları genellikle; bazı elementlerin (Ca, Mg, P ve K gibi) ve su alınmasının, taşınmasının ve kullanılmasının engellenmesidir. Kadmiyum toksisitesi su

alınmasını engelleyerek bitkilerde kuraklık stresine benzer semptomların ortaya çıkmasına neden olur (Das ve ark., 1998).

Kadmiyum, köklerde Fe(II) redüktaz enziminin inhibisyonuna neden olur ve demir eksikliğini görülmesine yol açar. Ayrıca nitrat redüktaz aktivitesini azaltarak nitrat absorpsiyonunu ve köklerde nitrat taşınmasını engeller. Metal toksisitesi plazma membranının geçirgenliğini etkileyerek su içeriğinin azalmasına neden olabilir. Cd'un su dengesi üzerindeki etkileri belirtilmiştir. Ayrıca Cd lipit peroksidasyonuna neden olarak membranın işlevselliğini bozar, CO₂ fikse eden enzimlerin aktivitesini azaltır ve klorofil sentezini engeller. Böylece kloroplast metabolizmasının bozulmasına neden olur (Benavides ve ark., 2005).

Kadmiyum enzimatik ya da enzimatik olmayan antioksidanların aktivitesini azaltarak ya da serbest oksijen radikallerinin üretimini arttırarak oksidatif strese yol açar (Ci ve ark., 2010).

Yaprak fotosentezi Cd stresine çok duyarlıdır. Kadmiyum, karboksilik enzimlerin, fosfoenol piruvat karboksilaz, ribulaz, 1,5- bifosfat karboksilaz aktivitesini azaltarak CO₂ asimilasyonunu azaltır (Ci ve ark., 2010).

Yüksek Cd seviyesi RNAaz aktivitesini azaltarak bitkilerde RNA içeriğinin artmasına neden olur. Ayrıca proteinler de kadmiyum hasarına uğrarlar. Sistein, aspartat, glutamat ve histidin de Cd'a çok duyarlıdır (Deckert, 2005).

2.5. Kadmiyum Toksikitesine Hücresel Düzeyde Tepkiler

Bitkiler, Cd stresine hücresel düzeyde şu mekanizmalar ile tepki gösterirler; immobilizasyon (hareketsizleştirme), hücre dışında tutma, fitoşelatin sentezi, belirli bölgelerde tutma, metalotiyonin sentezi, stres proteinleri sentezi, etilen sentezi (Sanita di Toppi ve Gabbrielli, 1999).

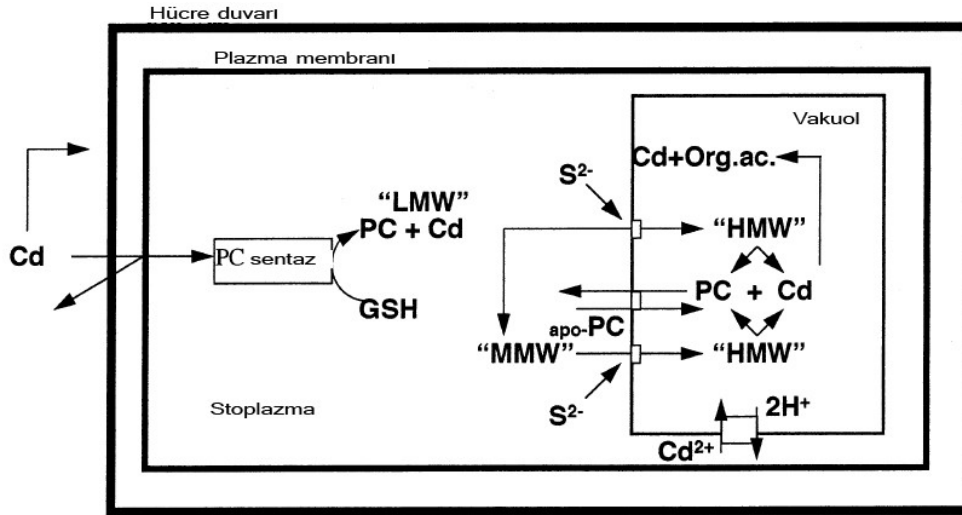
Kadmiyum stresine karşı ilk tepki köklerde görülür; hücre duvarı ve kalloz, müsülaj gibi hücre dışı karbonhidratlar tarafından Cd hareketsiz hale getirilir (Shaw, 1989). Kadmiyum iyonları, çalı fasulyesinin köklerinde ve yapraklarında hücre

duvarının hisditil grupları ve pektik bölgeler tarafından bağlanır (Leita ve ark., 1991). Fakat bu mekanizma ortamdaki Cd derişimi ya da türe göre farklılık gösterebilir (Verkleij ve ark., 1990).

Teorik olarak, plazma membranı vasıtasıyla Cd iyonlarının hücre içine girişinin engellenmesi en iyi savunma stratejisidir (Rivetta ve ark., 1997).

Fitoşelatinler (PC); glutatyondan sentezlenen, ağır metalleri bağlayan γ -Glu-Cys polimerleridir. Fitoşelatinler, 2-11 adet tekrarlayan γ -Glu-Cys birimleri içerir ve metal şelatlayıcı fonksiyonu ile ağır metallerin vakuollerde depolanmasını kolaylaştırır (Vatamaniuk ve ark., 2000). Genelde Cd, kükürt metabolizmasının farklı aşamalarına yüksek ilgi gösterir. İlk etkilerini ATP-sülfirilaz üzerinde yaparlar (de Knecht ve ark., 1995). Kadmiyum hücre içine girdiğinde hemen sülfür metabolizması ile ilişkili olan fitoşelatin sentezinde artış görülür. Fitoşelatinler Cd ile çeşitli kompleksler oluşturur (Sanita di Toppi ve Gabbrielli, 1999).

Kadmiyumun detoksifikasyon yollarından biri de vakuolde hapsedilip Cd iyonlarının sitoplazmada serbest dolaşımının engellenmesidir. Kadmiyuma maruz kalma fitoşelatin sentezini uyarır ve hemen düşük moleküler ağırlıklı fitoşelatin-Cd kompleksi oluşur (Vögeli-Lange ve Wagner, 1996). Serbest Cd^{2+} iyonları, $Cd^{2+}/2H^{+}$ antiport kanallarından vakuole girebilirler. Vakuol pH'sı asidik olduğu için yüksek molekül ağırlıklı kompleksler ayrışır. Kadmiyum sitrat, oksalat, malat gibi vakuol organik asitleriyle kompleks oluşturur. Şekil 2.2.'de fitoşelatinler tarafından Cd'un tutulması ve vakuollerde hapsedilmesi gösterilmektedir (Sanita di Toppi ve Gabbrielli, 1999).



Şekil 2.2 Kadmiyumun şelatlanması ve vakuolde tutulması. (PC fitoşelatini, GSH redükte glutasyonu, LMW düşük moleküler ağırlıklı bileşiği, MMW orta moleküler ağırlıklı bileşiği, YMW yüksek moleküler ağırlıklı bileşiği, Org. ac. organik asitleri ifade etmektedir.) (Sanita di Toppi ve Gabbrielli, 1999)

Hayvanlarda, mavi-yeşil alglerde ve mantarlarda Cd ve ağır metaller sisteyince zengin bileşikler olan metalotiyoninler tarafından detoksifiye edilir. Yüksek yapılı bitkilerde Cd uyarıtlı metalotiyoninler hakkında kesin kanıtlar yoktur. Bu nedenle metalotiyoninler Cd detoksifikasyonunda ikinci plandadır (Sanita di Toppi ve Gabbrielli, 1999).

Tüm organizmalarda ağır metal, sıcaklık, tuzluluk gibi stres şartlarında, sıcaklık şok proteinleri (SŞP) ya da daha genel adıyla stres proteinlerinin sentezi görülür. Önemli stres proteinleri SŞP100, SŞP90, SŞP70, SŞP60 ve küçük SŞP (17-30 kDa) olmak üzere beş sınıfta toplanırlar (Waters ve ark., 1996). Bazı türlerde Cd'a maruz kalınması sonucu 10000-70000 Da moleküler ağırlığına sahip proteinlerin sentezi görülür. *Phaseolus vulgaris* köklerinde Cd stresi altında 42000 Da ağırlığa sahip proteinlerin sentezlendiği belirlenmiştir (Leita ve ark., 1991).

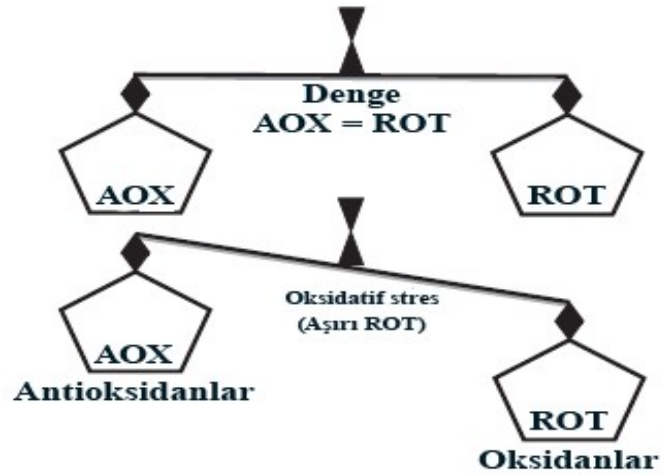
Kadmiyumun *Phaseolus vulgaris*'de etilen biyosentezini, çözünür ve çözünmez fenolik madde birikimini arttırdığı belirlenmiştir. Etilen üretimi guaiacol peroksidaz aktivitesini artırır. Kadmiyuma maruz kalmadan 10 - 15 saat sonra etilen sentezi doruk noktasına ulaşır ve daha sonra bir gün içinde yavaş yavaş eski seviyesine düşer. Kadmiyumun şelatlanması ve vakuollerde tutulmasına bağlı olarak serbest Cd

derişiminin düşmesi ile birlikte etilen sentezi de azalır (Sanita di Toppi ve Gabbrielli, 1999).

2.6. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri

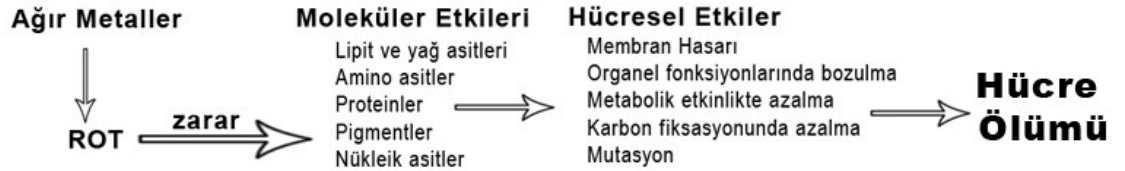
Oksidatif stres, canlı organizmalarda çeşitli ajanların faaliyeti sonucu prooksidatif ve antioksidatif reaksiyonlar arasındaki dengede meydana gelen kayma olarak tanımlanabilir. Sıcaklık, ağır metaller, patojen enfeksiyonu, kirlilik, ışık, aşırı tuzluluk, kuraklık, soğuk gibi bazı çevresel ve biyolojik faktörler oksidatif strese neden olabilir (Bartosz, 1997).

Bitkilerde, ROT aerobik metabolizmanın sekonder ürünleri olarak kloroplast, mitokondri ve peroksizomlarda sürekli üretilmektedir. Fakat ağır metaller ROT'nin oluşumunu arttır (Benavides ve ark., 2005). ROT üretimi ve yok edilmesi arasındaki denge kesinlikle kontrol altında tutulmalıdır. Abiotik stres faktörleri, ROT yakalayıcıları ve üretimi arasındaki dengeyi bozmaktadır (Şekil 2.3.)



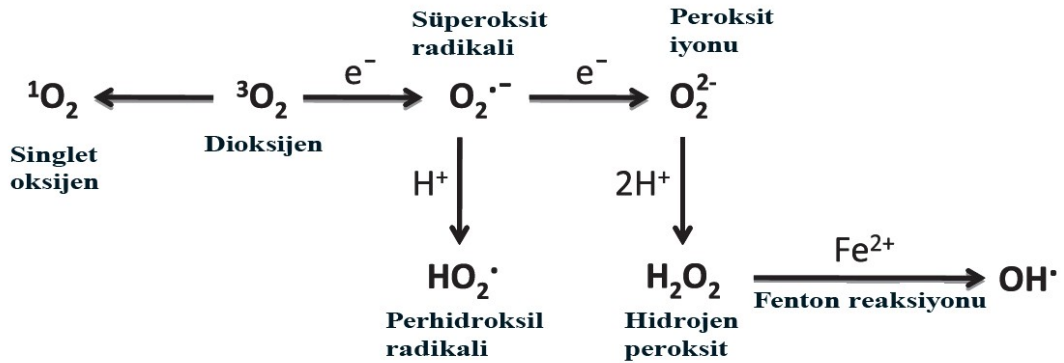
Şekil 2.3. AOX ve ROT dengesi (Gill & Tuteja, 2010)

ROT; lipid peroksidasyonuna, protein oksidasyonuna neden olarak ve nükleik asitlere zarar vererek birçok hücrel fonksiyonu etkiler. ROT hücrelere zarar verebilmenin yanında yeni genlerin ekspresyonu gibi bazı tepkilere de yol açabilir (Gill ve Tuteja, 2010). Şekilde 2.4.'de ROT'nin etkileri gösterilmektedir.



Şekil 2.4. ROT'nin sebep olduğu zararlar (Scandalios, 1993)

Solunuma imkan veren ve enerji üretim sistemlerinde son elektron yakalayıcısı olarak kullanılan atmosferik O_2 , hücrelerde ROT'nin oluşmasına neden olur. Atmosferik O_2 nisbeten reaktif olmamasına rağmen O_2 , H_2O_2 , OH^\cdot , 1O_2 gibi ROT'nin oluşumuna yol açar (Şekil 2. 5). Bakır, çinko gibi metallerin varlığında Haber-Weiss mekanizmasıyla ya da Fenton reaksiyonları ile OH^\cdot radikali oluşur. OH^\cdot , biyolojik dünyanın en reaktif ve en tehlikeli kimyasal türüdür (Gill ve Tuteja, 2010).



Şekil 2.5. Enerji transferi ile ROT üretimi (Gill & Tuteja, 2010)

2.6.1. Singlet Oksijen

Singlet oksijen, moleküler oksijenin elektronlarının yeniden düzenlenmesi yani enerji aktarımı ile meydana gelen formudur. Singlet oksijende spin kısıtlaması kalktığı

için moleküler oksijene göre daha reaktiftir ve protein, DNA ve lipitleri doğrudan oksitleyebilir. Singlet oksijenin, sigma ve delta formu olmak üzere iki tipi vardır. Delta singlet oksijende iki adet çiftlenmemiş elektron bulunur ve bu uzun ömürlü esas formudur. Sigma singlet oksijende çiftlenmemiş elektron bulunmaz, enerjisi fazla, kısa ömürlüdür ve serbest radikal değildir (Halliwell, 2006).

Singlet oksijen fotosentez boyunca PSII'de sürekli üretilmektedir. Reaksiyon merkezi sitokrom b_{559} ve D1, D2 proteinlerinin heterodimerleridir. Heterodimer, reaksiyon merkezinin klorofil P680, feofitin, elektron yakalayıcıları Q_A ve Q_B den oluşan fonksiyonel prostetik gruplarını bağlar (Apel ve Hirt, 2004).

2.6.2. Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak indirgenmesi ya da süperoksitlerin dismutasyonu sonucunda oluşur.

Demir, bakır gibi geçiş metallerinin varlığında; hidrojen peroksit Haber-Weiss Reaksiyonu ile hidroksil radikallerinin oluşmasına öncülük eder. Paylaşılmamış elektron içermediği için kendisi reaktif olmayan hidrojen peroksit bu özelliğinden dolayı oksitleyici olarak kabul edilir (Gill ve Tuteja, 2010).

Haber-Weiss reaksiyonu; $O_2^{\cdot -}$ ve H_2O_2 etkileşimi ile yüksek reaktif özellik gösteren hidroksil radikallerinin olduğu reaksiyonlardır. Bu reaksiyon sonucunda enzimatik olarak, daha toksik radikaller oluşur (Kehrer, 2000).

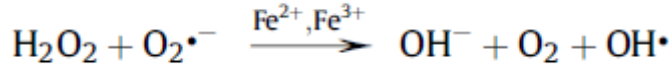
2.6.3. Süper Oksit

Süper oksit fotosentez sırasında kloroplastlarda $O_2^{\cdot -}$ 'in kısmi indirgenmesi ya da elektron transferi ile oluşur. Başlıca üretim yeri PSI'in tilakoid membrana bağlı elektron yakalayıcılarıdır. Orta derecede reaktif olan süper oksitin yarılanma ömrü 2-4 μs 'dir. Süper oksit oluşumu daha reaktif bir ROT olan hidroksil radikalinin oluşumunu tetikler.

Süper oksit Fe (II) ile reaksiyona girerek sonuçta hidroksil radikalinin oluşmasını sağlayacak olan Haber-Weiss reaksiyonlarını başlatır (Gill ve Tuteja, 2010).

2.6.4. Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali biyolojik sistemlerde reaktif oksijen türleri içinde en aktif olanıdır ve genellikle geçiş metallere özellikle Fe(II) ve Fe(III)'un katalizörlüğünde gerçekleşen Fenton Reaksiyonları sonucu oluşur (Şekil 2.6) (Gill ve Tuteja, 2010).

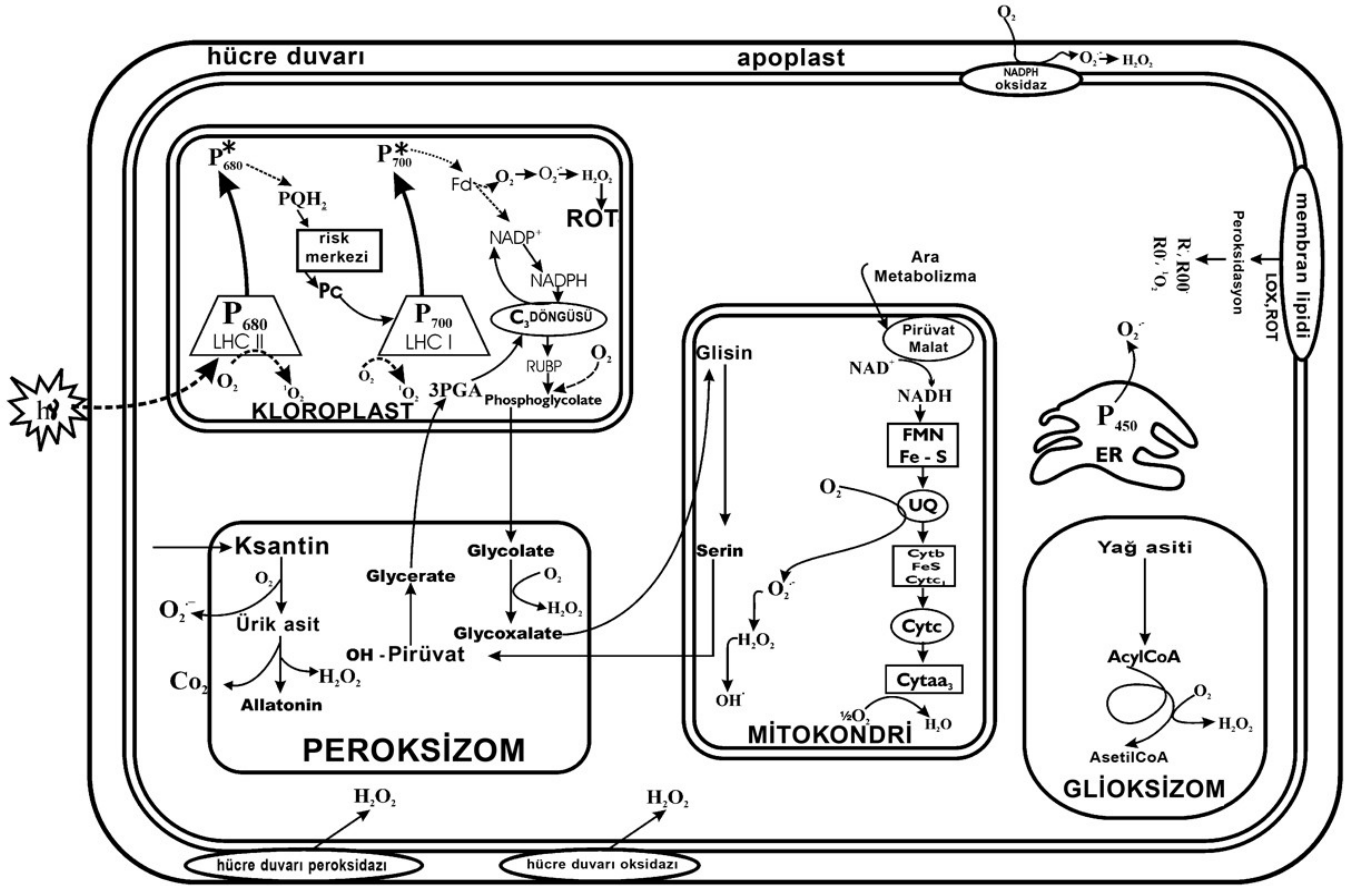


Şekil 2.6. Fenton reaksiyonu (Gill ve Tuteja, 2010)

Kısa yarılanma ömrüne sahip ve son derece reaktif olan hidroksil radikalleri karşılaştıkları ilk molekülle reaksiyona girerler (Genestra, 2007). Bu radikal için özel bir süpürücü yoktur ve DNA, RNA, proteinler dâhil olmak üzere tüm biyolojik moleküllerle tepkimeye girebilir (Vranova ve ark., 2002).

2.7. Reaktif Oksijen Türlerinin Üretimi

Fotosentez yapan bitkiler diğer organizmalardan daha fazla oksidatif hasar riski taşır. Kloroplastlar ve peroksizomlar ve mitokondriler ROT'nin başlıca üretim bölgeleridir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Bitki hücresinde ROT üretimi (Bhattacharjee, 2005)

2.7.1. Mitokondride Reaktif Oksijen Türlerinin Üretimi

Bitki mitokondrisi ROT hedefi olmanın yanında başlıca ROT üretim bölgelerindedir. Bitki mitokondrileri elektron taşıma sistemi (ETS) özel bileşenleri ve fotorespirasyon gibi süreçlerdeki fonksiyonları ile hayvan mitokondrilerinden önemli farklılıklar gösterir. Bitki mitokondrisinin çevresi fotosentez ürünleri olan O_2 ve karbonhidratlar yönünden oldukça zengindir. Normal solunum şartları altında mitokondrilerde ROT üretimi gerçekleşir fakat çeşitli biyotik ve abiyotik stres şartları altında bu üretim oranı artış gösterir (Gill ve Tuteja, 2010).

Solunum sırasında, kompleks I ve kompleks II başta olmak üzere mitokondriyal ETS'de elektron tutucu olarak O_2 kullanılır. Böylece süper oksit iyonları oluşur. Mn-

SOD süper oksiti hidrojen peroksite dönüştürür. Oluşan H_2O_2 Fe ve Cu ile reaksiyona girerek fenton reaksiyonları sonucu OH^\cdot oluşturur (Navrot ve ark., 2007).

2.7.2. Kloroplastta Reaktif Oksijen Türlerinin Üretimi

Fotosentez ile kloroplastlarda üretilen O_2 , fotosistemde rastgele elektron tutabilir; böylece O_2^\cdot oluşur. Çeşitli stres şartlarında kloroplastlarda ROT üretiminde artış meydana gelir. Normal olarak elektron akışı, fotosistem merkezinden $NADP^{+}$ ya doğrudur. $NADP^{+}$ elektron almasıyla $NADPH$ 'a indirgenir ve Calvin döngüsüne girer ve son elektron alıcısı CO_2 'i indirger. ETS'nin aşırı yüklenmesi durumunda elektronların bir kısmı ferrodoksinde O_2 'ye sapar ve O_2^\cdot oluşur (Wise ve Naylor, 1987). O_2^\cdot , SOD'ın katalizörlüğünde H_2O_2 ve O_2 'e dönüştürülür. SOD tarafından üretilen H_2O_2 APX katalizörlüğünde askorbat (AA) tarafından suya indirgenir. Bu sırada AA da monodehidroaskorbat (MDHA) radikaline oksitlenir. Ardından MDHA, kendiliğinden ferrodoksin ile reaksiyona girerek AA'e indirgenir ya da MDHA redüktaz katalizörlüğünde $NADPH$ ile reaksiyona girer ve AA'a indirgenir. Bu reaksiyon sırasında $NADPH$, $NADP^{+}$ ye yükseltgenir. MDHA kendiliğinden ferrodoksin ile reaksiyona girip askorbata indirgenemezse, AA ve dehidroaskorbata (DHA) dönüşür. DHA, DHA redüktaz tarafından AA'a indirgenir. En sonunda ferrodoksin ve $NADP^{+}$, AA üretimi için PS I'de indirgenir. Bu reaksiyonlarda PS II'de sudan elde edilen elektronlar kullanılır (Asada, 2006).

2.7.3. Peroksizomda Reaktif Oksijen Türlerinin Üretimi

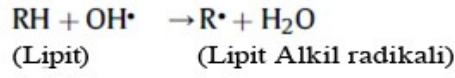
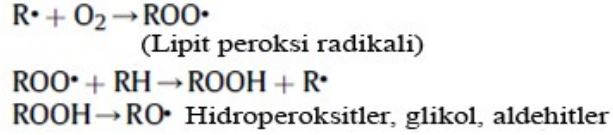
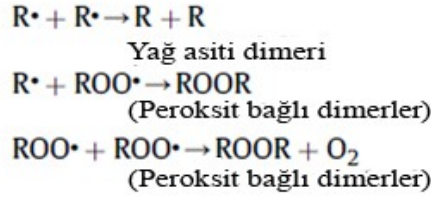
Peroksizomlar çift katmanlı lipit zarla çevrili küresel mikrocisimciklerdir. Peroksizomlar hücrede ROT'nin üretildiği başlıca bölgelerden birisidir. Kloroplast ve mitokondri gibi peroksizomlarda da normal metabolizmanın ürünü olarak O_2^\cdot radikali üretilir. Peroksizomlarda O_2^\cdot iki bölgede üretilir (del Rio ve ark., 2002). Bunlardan biri ksantin ve hipoksantin ürik aside oksidasyonunu katalizleyen ksantin oksidazın bulunduğu organel matriksidir (Corpas ve ark., 2001). Diğeri ise bir flavoprotein

NADH ve sitokrom b'den oluşan küçük bir ETS barındıran peroksizom membranıdır (del Rio ve ark., 2002).

Peroksizomlarda H_2O_2 ve O_2 üretiminin artması hücre ölümüne neden olabilecek oksidatif hasara sebep olur. Fakat aynı zamanda peroksizomlarda üretilen H_2O_2 ve O_2 düşük seviyelerinde, bitkilerde patojen uyarılı programlanmış hücre ölümleri için sinyal molekülü olarak rol oynar (McDowell ve Dangl, 2000).

2.8. Lipit Peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu (LPO) tüm canlılar için en zarar verici süreçtir. Çeşitli stres faktörleri altında, lipit yıkımını belirlemek için membran hasarı parametre olarak kullanılır. Lipit peroksidasyonu sırasında ketonlar, malondialdehit (MDA) ve küçük hidrokarbon parçaları oluşur (Garg ve Manchanda, 2009). Bu bileşenlerden bazıları tiyobarbiturik asit ile reaksiyona girerek tiyobarbiturik asit reaktif maddeleri (TBARS) adı verilen renkli ürünler oluştururlar (Heath ve Packer, 1968). Reaktif oksijen türü üretimi belirli bir seviyeyi aştığında hücre ve organel membranlarında LPO meydana gelir. Lipit peroksidasyonu oksidatif stres boyunca hücrenin normal fonksiyonlarını bozmakla kalmaz aynı zamanda lipit kaynaklı radikallerin üretimini de artırır (Montillet ve ark., 2005). Lipit peroksidasyonu üç adımdan meydana gelir; başlangıç adımı, ilerleme adımı ve sonlanma adımı (Şekil 2.8). H_2O_2 ve O_2 reaksiyonları başlatabilir ayrıca OH da reaksiyonları başlatacak kadar reaktiftir. Membranda LPO'nun başlaması için doyamamış yağ asitlerinin açıl grubundan bir hidrojen atomunun ayrılması gerekir (Davies, 2000) .

Başlangıç adımı**İlerleme adımı****Sonlanma adımı**

Şekil 2.8. Lipit peroksidasyon adımları (Gill ve Tuteja, 2010)

Lipit peroksidasyonu membran akışkanlığını azaltır ve sızdırmayı artırır. Ayrıca membran proteinlerinde hasara, iyon kanallarının, reseptörlerin ve enzimlerin inaktivasyonuna sebep olurlar. Lipit peroksidasyonu sonucunda 4-hidroksi -2-nonenal (HNE), MDA gibi aldehitler yanı sıra keto yağ asitleri de oluşur (Møller ve ark., 2007).

Bitkiler abiyotik strese maruz kaldığında, ROT üretiminin artması nedeniyle LPO'nun ve farklı bitkilerde Cd stresi altında lipit peroksidaz birikiminin önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir (Mobin ve Khan, 2007; Singh ve ark., 2008).

2.9. Protein Oksidasyonu

Protein oksidasyonu oksidatif stresin yan ürünleri ya da ROS tarafından indüklenen proteinin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanmıştır. Pek çok protein oksidasyon tipi aslında geri dönüşümsüzdür. Ancak sülfürlü amino asit içeren birkaç tanesinin oksidasyonu geri dönüşümlüdür. Protein karbonilasyonu geniş çapta protein

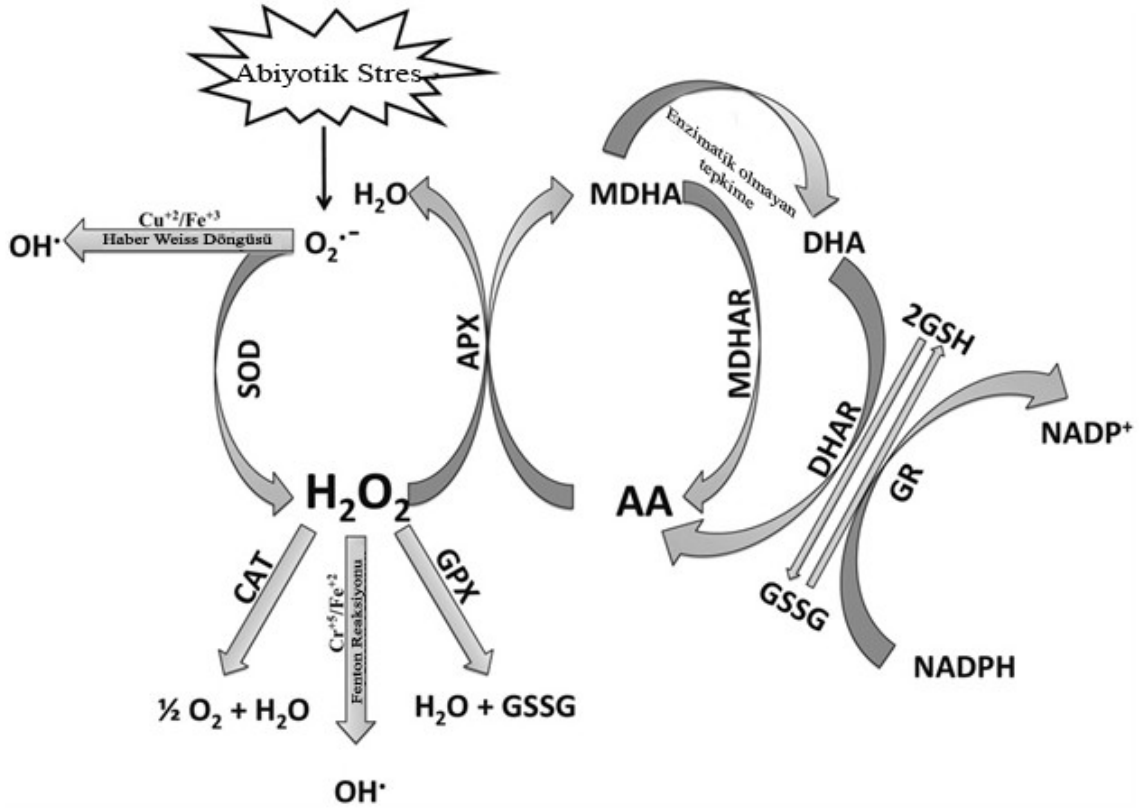
oksidasyon belirteci olarak kullanılır. Protein karbonilasyonu amino asitler arasındaki bağların doğrudan oksidasyonu yüzünden oluşabilir. ROS sentez ve etki yeri neresi olursa olsun , thiol grupları ve sülfürlü amino asit içeren proteinler muhtemel ROS hedefleridir. Cys ve Met özellikle 1O_2 ve OH^\cdot ile oldukça reaktiftir (Gill ve Tuteja, 2010).

2.10. DNA Oksidasyonu

Bitki DNA'sı çok sağlamdır fakat abiyotik ya da biyotik stres sonucu hasar görebilir (Tuteja ve ark., 2009). Yüksek ROT seviyesi hücrel yapılar, nükleik asitlere, lipit ve proteinlere zarar verebilir (Valko ve ark., 2006). OH^\cdot , DNA'nın yapısında yer alan pürin, pirimidin bazları, DNA'nın deoksiriboz omurgası gibi bütün moleküllerde hasara sebep olabilir. 1O_2 öncelikli olarak guanin ile reaksiyona girer; H_2O_2 ve O_2^\cdot ise hiçbir DNA bileşeni ile reaksiyona girmez (Wiseman ve Halliwell, 1996). Reaktif oksijen türleri DNA'da baz silinmeleri, oksidasyon ve alkilasyon gibi baz modifikasyonlarına sebep olabilir (Tuteja ve ark., 2001). DNA'nın hasar görmesi organizmanın büyüme ve gelişmesini etkileyen fotosentetik proteinlerin hasar görmesine, hücre membranının yıkımına, protein sentezinin azalması gibi fizyolojik etkilere neden olur (Britt, 1999).

2.11. Antioksidan Savunma Sistemi

Bitkilerin yüksek sıcaklıklar, ağır metaller, kuraklık, aşırı su, hava kirliliği, besin noksanlığı ya da tuz stresi gibi elverişsiz çevre şartlarına maruz kalması 1O_2 , O_2^\cdot , H_2O_2 ve OH^\cdot gibi reaktif oksijen türlerinin üretimini artırabilir. Bitkiler kendilerini bu toksik oksijen ara ürünlerine karşı korumak için hücrelerinde ve kloroplast, mitokondri, peroksizom gibi organellerinde antioksidan savunma sistemlerini kullanırlar. Bir çok araştırma hücrel antioksidan mekanizmasının uyarılmasının çeşitli streslere karşı koruma için önemli olduğunu kanıtlamıştır. Antioksidan savunma sisteminin bileşenleri enzimatik ya da enzimatik olmayan antioksidanlardır (Şekil 2.9.) (Gill ve Tuteja, 2010).



Şekil 2.9. ROT ve Antioksidan Savunma Mekanizması (Gill ve Tuteja, 2010)

2.11.1. Süperoksit Dismutaz (SOD, E.C. 1.15.1.1)

SOD oksidatif stres görülebilen tüm hücre içi bölgelerde bulunur ve en etkili enzimatik antioksidandır. Çeşitli çevresel stresler ROT üretiminde artmaya neden olmaktadır. Artan ROT seviyesine karşı ilk savunma hattını SOD oluşturur. Bu nedenle bitki stres toleransında çok önemlidir. Süperoksit dismutaz, $O_2^{\bullet -}$ dismutasyonunu katalizleyerek bir $O_2^{\bullet -}$ 'nin H_2O_2 'ye indirgenmesini diğerinin ise O_2 'ye oksitlenmesini sağlar. $O_2^{\bullet -}$ 'yi ortadan kaldırarak Haber-Weiss reaksiyonları ile OH oluşumunu önler. Bu reaksiyon doğal dismutasyondan 10000 kat daha hızlıdır. Süperoksit dismutaz metal kofaktörlerine göre üç sınıf altında toplanır, bu tipler farklı hücresel bölgelerde bulunan Cu/Zn -SOD, Mn-SOD ve Fe-SOD'dur (Gill ve Tuteja, 2010). *Arabidopsis thaliana*'da üç Fe-SOD geni (FSD1), üç Cu/Zn-SOD geni (CSD1, CSD2, CSD3) ve bir Mn-SOD geni (MSD1) bulunur (Kliebenstein ve ark., 1999). Bazı SOD izoenzimleri KCN ve H_2O_2 'ye duyarlıdır ve buna dayalı ters boyama yöntemi ile SOD izoenzimlerinin aktivitesi belirlenebilir. Mn-SOD bu inhibitörlerin ikisine de

dirençliyen Fe-SOD KCN'ye dirençli, H₂O₂'ye duyarlıdır. Cu/Zn-SOD ise her iki inhibitöre de duyarlıdır. Mn-SOD ökaryotik hücrelerin mitokondrilerinde ve peroksizomlarda, Cu/Zn-SOD sitosolde ve yüksek yapılı bitkilerin kloroplastlarında bulunur. Bitkilerde Fe-SOD nadiren bulunur. Fe-SOD içeren bitkilerde bu enzim kloroplastlarda bulunur (Çizelge 2.2) (Alscher ve ark., 2002; Ferreira ve ark., 2002; del Rio ve ark., 2003) .

Çizelge 2.2. SOD izoenzimleri ve buldukları bölgeler

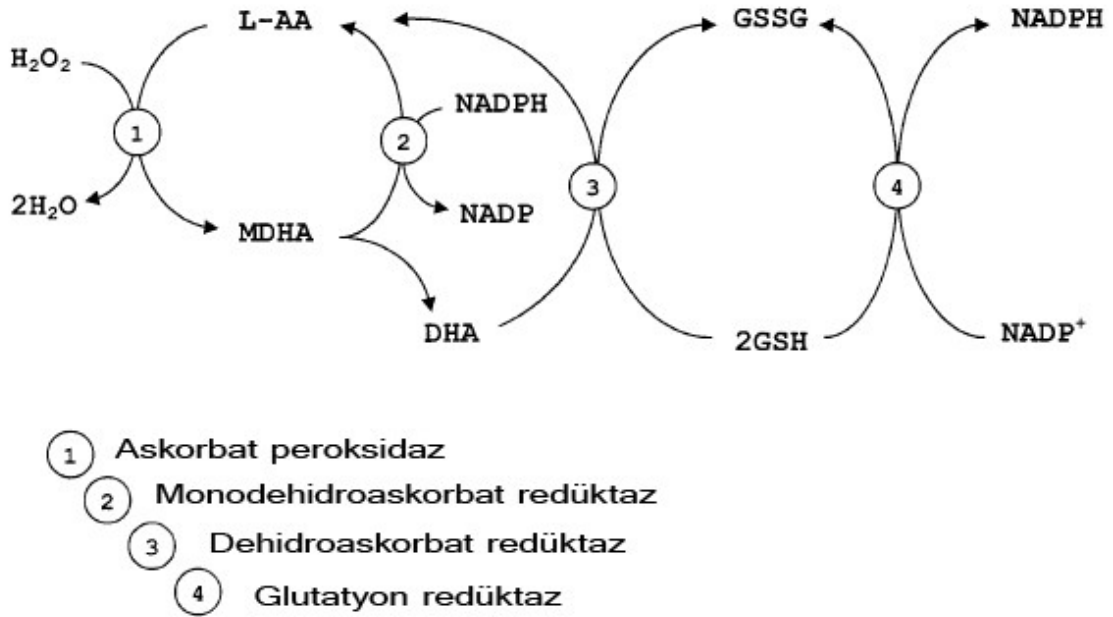
SOD izoenzimleri	Lokalizasyon	Direnç	Duyarlılık
Fe-SOD	Kloroplast	KCN	H ₂ O ₂
Mn-SOD	Mitokondri ve peroksizomlar	H ₂ O ₂ ve KCN	
Cu/Zn-SOD	Kloroplast ve sitosol		H ₂ O ₂ ve KCN

2.11.2. Askorbat Peroksidaz (APX, E.C. 1.11.1.11)

Askorbat peroksidaz yüksek bitkilerde, alglerde ve diğer organizmalarda ROT'nin temizlenmesinde ve hücrenin korunmasında önemli rol oynar. Askorbat peroksidaz H₂O₂'i iki adet suya parçalar ve askorbat-glutatyon döngüsünde yer alır. Askorbat peroksidazın 5 farklı izoenzimi vardır. Bunlar, tilakoid (tAPX) ve glioksizom membran formları (gmAPX) yanı sıra kloroplast stromal çözünür form (sAPX), sitololik form (cAPX)dir. Askorbat peroksidazın H₂O₂'ye CAT, POD'dan daha yüksek ilgisi vardır. Stres sırasında ROT'nin temizlenmesinde kritik bir role sahiptir. Farklı stres koşulları altında APX ekspresyonu artar. Kadmiyum stresi *altında Ceratophyllum demersum*, *B. juncea*, *T.aestivum* ve *V. mungo* yapraklarında APX aktivitesinin arttığı saptanmıştır (Gill ve Tuteja, 2010).

Askorbat peroksidaz H₂O₂'yi suya indirgerken elektron vericisi olarak askorbati (AA) kullanır ve ardında AA, monodehidroaskorbata (MDHA) oksitlenir. Monodehidroaskorbat kendiliğinde dehidroaskorbata (DHA) ya da AA'a indirgenebilir veya yükseltgenebilir. Ayrıca MDHA, MDHA redüktaz tarafından doğrudan AA'a

indirgenebilir. Bu işlem sırasında MDHA, NADPH'ı elektron vericisi olarak kullanır. DHA redüktaz, DHA'ı indirgerken glutasyonu (GSH) kullanır ve oksitlenmesine sebep olur. Oksitlenen GSH, GSH redüktaz tarafından indirgenirken NADPH'da indirgenir. Böylece askorbat-glutasyon döngüsü ile toksik seviyelerde H_2O_2 birikimi engellenir (Şekil 2.10.) (Shigeoka ve ark., 2002).



Şekil 2.10. Askorbat-glutasyon döngüsü (Davey ve ark., 2000)

2.11.3. Katalaz (CAT, E.C. 1.11.1.6)

Tetramerik hem içeren CAT, H_2O_2 'i doğrudan H_2O ve O_2 'e parçalayabilir. Katalaz stres şartları altında ROT detoksifikasyonu için mutlaka gereklidir. Ayrıca CAT tüm enzimler arasında en yüksek turnover oranına sahip olanıdır, bir CAT molekülü bir dakikada 6 milyon H_2O_2 molekülünü H_2O ve O_2 'e dönüştürebilir. Katalaz peroksizomlarda ortaya çıkan ROT'nin tutulması için önemlidir. Yüksek yapılı bitkilerdeki CAT izoenzimleri hakkında oldukça çok bilgi mevcuttur; örneğin *H. vulgare*'de 2, *Helianthus annuus* kotiledonlarında 4 izoformu mevcuttur (Gill ve Tuteja, 2010).

Metal stresi altında CAT aktivitesi türlere göre değişiklik gösterir. *Phragmites australis* (Iannelli ve ark., 2002), *Capsicum annuum* (León ve ark., 2002) ve *A. thaliana*

(Cho ve Seo, 2005) yapraklarında Cd stresi altında CAT aktivitesinin azaldığı; *Oryza sativa* (Hsu ve Kao, 2004), *Brassica juncea* (Mobin ve Khan, 2007), *Cicer arietinum* (Hasan ve ark., 2008) ve *Vigna mungo* (Molina ve ark., 2008) köklerinde ise arttığı belirlenmiştir.

2.11.4. Guaiacol Peroksidaz (GPOX, E.C. 1.11.1.7)

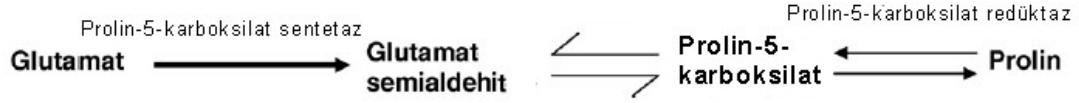
Guaiacol peroksidaz indol-3-asetik asite (IAA) parçalanır ve lignin biyosentezinde rol oynar. Ayrıca H₂O₂'i parçalayarak biyotik strese karşı koruma görevi yapar. Guaiacol peroksidaz elektron vericisi olarak guaiacol gibi aromatik bileşikleri kullanır. Guaiacol peroksidaz aktivitesi stres şartları ve bitki türüne göre değişiklik gösterir (Gill ve Tuteja, 2010).

Kadmiyuma maruz kalan *Phaseolus vulgaris*' de GPOX aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (Smeets ve ark., 2005). Guaiacol peroksidaz aktivitesi köklerde, gövde ve yapraklara oranla daha yüksektir (Chaoui ve ark., 1997).

2.11.5. Prolin (Pro)

Prolin güçlü bir antioksidan ve programlanmış hücre ölümü önleyicidir. Prolin mikroorganizmalarda, bitkilerde ve hayvanlarda ROT'nin olumsuz etkilerini azaltır. Prolin tuz, metal ve kuraklık stresi altındaki bitki ve alglerde ROT'ni süpürme yanında önemli bir redoks sinyal molekülüdür (Gill ve Tuteja, 2010). Ayrıca patates gibi bazı bitkilerde önemli bir osmotik düzenleyicidir. Domates gibi diğer bitkilerde ise toplam osmotik düzenleyicilerin çok az bir kısmı prolindir .

Prolin sentezinin ilk adımı glutamatın fosforilasyonudur. Bitkilerde pirolin-5-karboksilat sentetaz glutamatın, glutamat- γ -semialdehite dönüşmesini katalizler. GSA kendiliğinden pirolin-5-karboksilata (P5C) dönüşür. P5C, P5C redüktaz tarafından proline indirgenir (Şekil 2.11.) (Kishor ve ark., 2005).

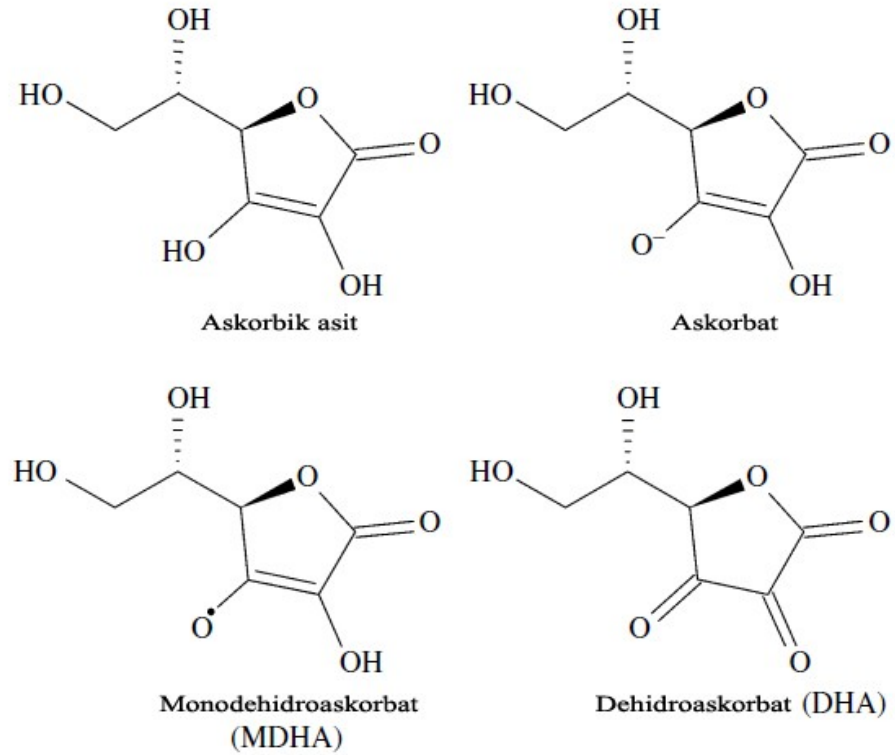


Şekil 2.11. Prolin sentezi ve yıkılması (Ashraf ve Foolad, 2007)

Bitkilerde Pro sadece glutamattan sentezlenmez, arginine, ornithin yoluyla da sentezlenebilir (Kishor ve ark., 2005).

2.11.6. Askorbik Asit (Vitamin C)

Askorbik asit (AA), kuru tohumlar hariç nerdeyse bütün bitki dokularında meydana gelir. Askorbik asit derişimi yapraklarda ve meristemde köklerden daha yüksektir. Özellikle turunçgillerin meyveleri olmak üzere bazı bitkilerin meyvelerinde yüksek AA derişimi görülür. Ancak her bitkide AA derişimi meyvelerde yapraklardan daha yüksek değildir. Askorbik asit hücre duvarı dahil tüm hücre içi bölgelerde görülür fakat vakuollerde düşük derişimlerde bulunur (Smirnoff, 2005). Askorbik asit hücrede çeşitli faaliyetleri gerçekleştirirken indirgenir veya yükseltgenir. Şekil 2.12.'de askorbik asitin ve oksidasyon ürünlerinin yapısı verilmiştir.



Şekil 2.12. Askorbik asitin yapısı ve oksidasyon ürünleri (Smirnoff, 2005)

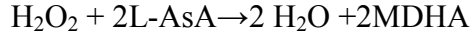
Askorbik asit (AA), ROT'nin sebep olduğu hasarı azaltıcı ya da önleyici rol oynayan, bol bulunan, suda çözünebilir ve güçlü bir antioksidandır (Gill ve Tuteja, 2010).

Askorbik asit bitkilerde; enzim kofaktörü, antioksidan, oksalat ve tartarat sentezinde rol oynamasının yanında fotosentezde de görevlidir.

Askorbik asit önemli birçok enzimatik reaksiyonda enzim kofaktörü olarak yer alır. Bu enzimler, aktif bölgelerinde demir ya da bakır bulunan mono- veya dioksigenazlardır. Bu enzimler maksimum aktivite gösterebilmeleri için AA'ye ihtiyaç duyarlar.

Askorbik asit singlet oksijen, hidrojen peroksit, süperoksit, hidroksil radikali gibi ROT ile hızlıca reaksiyona girebilmektedir ve bunların detoksifiye edilmesinden sorumludur.

Askorbik asit plazma membranı ve kloroplastlarda elektron taşınmasında, elektron alıcı/vericisidir. Askorbik asit kloroplastlarda APX'ler için substrat teşkil eder. Tilakoidlerde meydana gelen peroksitlerin süpürülmesini sağlar.



Kloroplastlarda APX aktivitesi sonucu AA indirgenir ve monodehidroaskorbat (MDHA) oluşur. Bu molekül PS I'de elektron yakalayıcısı olarak görev yapmaktadır.

Ayrıca AA tartarat ve oksalat biyosentezinde substrat olarak kullanılmaktadır (Davey ve ark., 2000).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1,1,3,3 tetrametoksiopropan	$C_{11}H_{24}O_4$	Sigma
2,2- Bipyridin	$C_{10}H_8N_2$	Fluka
5,5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit)	$[-SC_6H_3(NO_2)CO_2H]_2$	Sigma
Askorbik asit	$C_6H_8O_6$	Sigma
Bakır Sülfat	$CuSO_4.5H_2O$	Carlo Erba Reagents
Demir -3- Klorür	$FeCl_3$	Sigma
Dipotasyum Hidrojen Fosfat	K_2HPO_4	Carlo Erba Reagents
Etilendiamin Tetraasetik Asit	$C_{10}H_{12}N_2Na_2O_8.2H_2O$	Sigma
Folin Ayıracı		Sigma
Glasiyal asetik asit	CH_3COOH	Carlo Erba Reagents
Guaiacol	$C_7H_8O_2$	Sigma
Hidrojen Peroksit	H_2O_2	Sigma-Aldrich
Kadmiyum Klorür	$CdCl_2.5H_2O$	Carlo Erba Reagents
Meta-fosforik Asit	HPO_3	Merck
Metiyonin	$C_5H_{11}NO_2S$	Sigma
N-Etilmalaimid	$C_6H_7NO_2$	Fluka
Ninhidrin	$C_9H_6H_4$	Merck
Nitrik asit	HN_3	Carlo Erba
Nitroblue Tetrazolium Klorid	$C_{40}H_{30}N_{10}O_6Cl_2$	Bend
Orto-fosforik asit	H_3PO_4	Akkimya
Perklorik asit	$HClO_4$	Merck
Polivinil piridin	C_6H_9NO	Sigma
Potasyum Dihidrojen Fosfat	KH_2PO_4	Sigma
Potasyum Sodyum Tartarat	$COOK(CHOH)_2COONa.4H_2O$	Carlo Erba Reagents
Riboflavin	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	Acros Organics
Sığır Serum Albümin (BSA)		Merck
Sodyum Hidroksit	$NaOH$	Carlo Erba Reagents
Sülfosalisilik Asit	$C_7H_6O_6S$	Sigma

Tiyobarbitürük asit	$C_4H_4N_2O_2S$	J.T.Baker
Triklor Asetik Asit	$C_2HCl_3O_2$	J.T.Baker

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Hassas Terazı	Ohaus
Derin Dondurucu	Sanyo Ultra Low
Soğutmalı Santrifüj	Kubota
Spektrofotometre	T70 UV_VIS 500
Su Banyosu	Elektro-mag
Buz Makinesi	Scotsman AF-20
Distile Su Cihazı	Autostill 8000X Jencons
Otomatik Pipetler	Nichiryo
pH Metre	WTW pH315i/SET
Buzdolabı	Arçelik
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Stuart CB162
Vorteks	Nüvemix
Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi	UNICAM 929

3.1.3. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Eruca sativa bitkisine ait tohumlar 2:1 oranında dere kumu-torf karışımı ile doldurulmuş viyollere ekildi. Kullanılan dere kumu % 0,2'lik HCl çözeltisinde 1 saat bekletilerek sterilizasyonu sağlanmış ardından önce akar musluk suyu ile sonra distile su ile yıkanmış ve fırında kurutulmuştur. Torf kullanılmadan önce 0,8 mm por çapına sahip elekten geçirilmiştir. Kum torf karışımı viyollere doldurulmadan önce oda sıcaklığında kurutulmuştur.

Viyollerin üzeri alüminyum folyo ile kapatılarak tohumlar 25 °C'de çimlenmeye bırakılıp çimlenmenin ardından viyollerin üzeri açılmıştır. Bitkiler gün aşırı Hoagland besin solüsyonu ile daha önceden belirlenen tarla kapasitesinde sulanmıştır. Bitkiler iki yapraklı hale geldiklerinde her bir kapta 30 fide olacak şekilde saksılara aktarılmıştır. Bitkiler 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyotta 25 °C'de iklim odasında yetiştirilmiştir.

3.1.4. Ağır Metal Uygulaması

Bitkilere uygulanacak Cd miktarı belirlenirken ön çalışmalar ve daha önce yapılmış olan çalışmalar dikkate alınmıştır. 75 $\mu\text{g.g}^{-1}$, 150 $\mu\text{g.g}^{-1}$, 300 $\mu\text{g.g}^{-1}$, 450 $\mu\text{g.g}^{-1}$, ve 600 $\mu\text{g.g}^{-1}$ büyütme ortamı olacak şekilde Cd içeren birer litrelik çözeltiler $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ tuzundan hazırlanmıştır.

Bitkiler 4 yapraklı olduğunda metal çözeltisi verilmeye başlanmıştır. Bitkiler gün aşırı tarla kapasitesinde sulanmaya devam edilmiştir. Sulama işlemlerinde metal çözeltisi ve besin solüsyonu değiştirilerek kullanılmıştır. Metal uygulanan bitkiler, metal çözeltisi ile sulandığında kontrol grubu bitkilerine saf su verilmiştir. Şekil 3.1.'de metal uygulama sürecinde bitkilerin fotoğrafı verilmiştir.



Şekil 3.1. Metal Uygulama Sürecinde Bitkiler

3.1.5. Bitkilerin Hasat Edilmesi

Bitkiler 1 L olarak hazırlanan metal çözeltileri verildikten 2 gün sonra hasat edilmiştir. Hasat edilen bitkilerin kökleri akan su altında yıkanarak temizlenmiştir. Bu bitkilerin kökleri, kök yüzeyine tutunan metallere arındırılması amacıyla 0,1 M EDTA çözeltisinde 1 dakika bekletilmiş ve 3 defa saf su ile yıkanmıştır. Temizlenen kökler 60 °C'de etüvde kurularak analizler için saklanmıştır. Bitkilerin en genç 3 yaprağı analizlerde kullanılmak üzere 0,2 ve 0,5 g tartılarak tüplere doldurulmuş, sıvı azot ile dondurulduktan sonra -80 °C de muhafaza edilmiştir.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Yaş ve Kuru Ağırlıkların Belirlenmesi

Bitkiler hasat edildikten sonra akar musluk suyu ile temizlenmiş ve kâğıt havlu ile kurulandıktan sonra son çıkan 3 yaprağının ağırlığı ölçülmüştür. Yaş ağırlıkları belirlenen yapraklar fırında 70 °C'de kurutulup hassas terazi ile kuru ağırlıkları belirlenmiştir.

3.2.2. Su İçeriğinin Belirlenmesi

Yaş ve kuru ağırlıklar belirlendikten sonra farkları alınarak bitkinin su içeriği g bitki⁻¹ olarak belirlenmiştir.

$$S.İ. = Y.A. - K.A.$$

S.İ. : Su içeriği

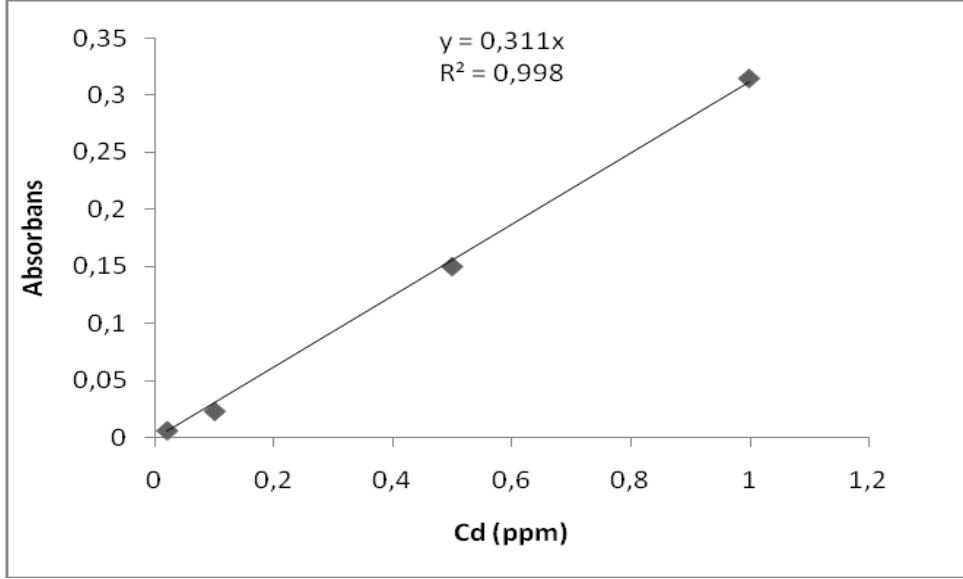
Y.A. : Yaş ağırlık

K.A. : Kuru ağırlık

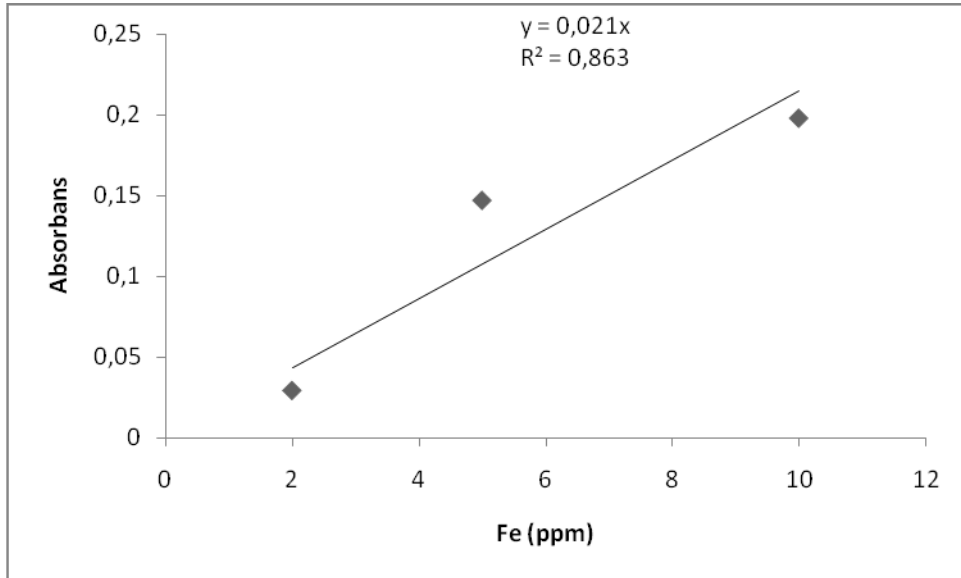
3.2.3. Cd ve Bazı Mikrobesein Elementi içeriğinin belirlenmesi

Eruca sativa bitkisinin kurutulmuş öğütölmüş yaprak ve kökleri 0,2 g tartılarak 5 mL nitrik asit ve 3 mL perklorik asit karışımında yaş yakma yöntemiyle yakılmış ve saf su ile son hacimleri 55 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra Cd, Cu, Zn ve Fe içerikleri atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile ölçölmüştür (Demirevska-Kepova ve ark., 2004)

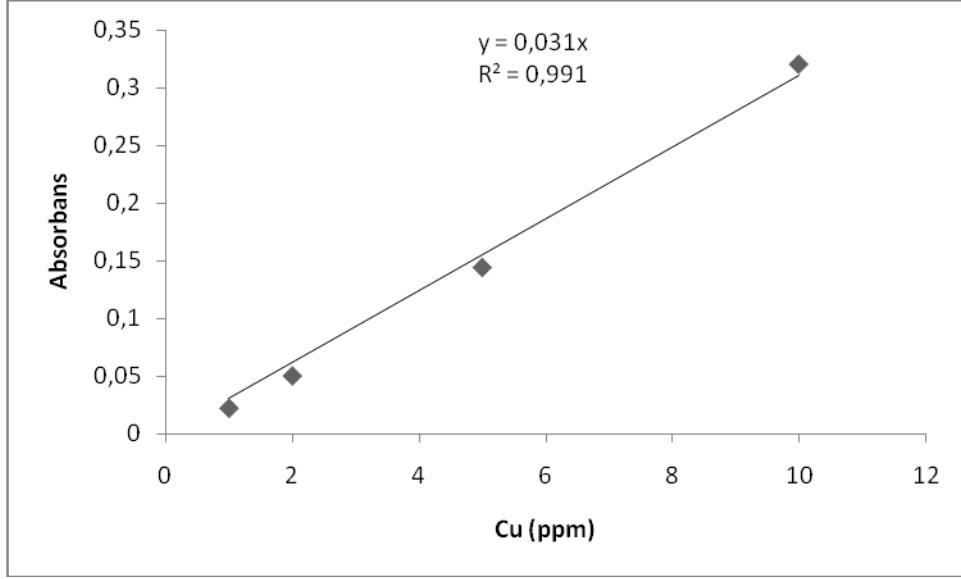
Dokulardaki element içeriğini belirlemek için bu elementlerin standartları ile absorbansları arasındaki doğrusal ilişkiyi gösteren regresyon eğrisi kullanılmıştır. şekil 3.2, şekil 3.3, şekil 3.4 ve şekil 3.5'de kullanılan bu grafikler verilmiştir.



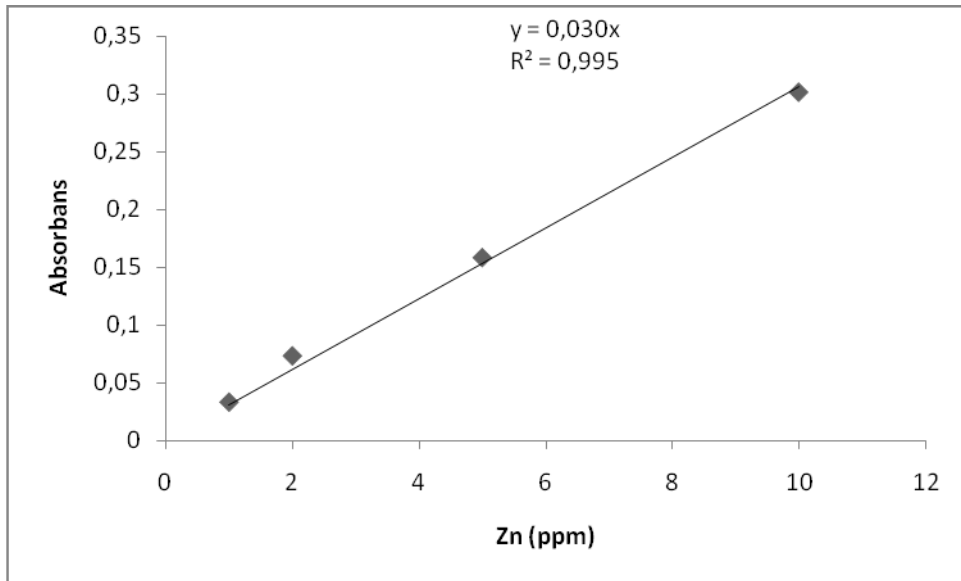
Şekil 3.2. Cd kalibrasyon grafiği



Şekil 3.3. Fe kalibrasyon grafiği



Şekil 3.4. Cu kalibrasyon grafiği



Şekil 3.5. Zn kalibrasyon grafiği

3.2.3.1. Translokasyon Faktörü

Translokasyon faktörü (TF) yapraklardaki Cd miktarının köklerdeki Cd miktarına oranı olarak tanımlanır (Tu ve Ma, 2002). *Eruca sativa* fidelerinde Cd için translokasyon faktörü aşağıdaki şekilde belirlenmiştir.

$$TF = Y_{Cd} / K_{Cd}$$

Y_{Cd} = Yapraklardaki Cd miktarı

K_{Cd} = Köklerdeki Cd miktarı

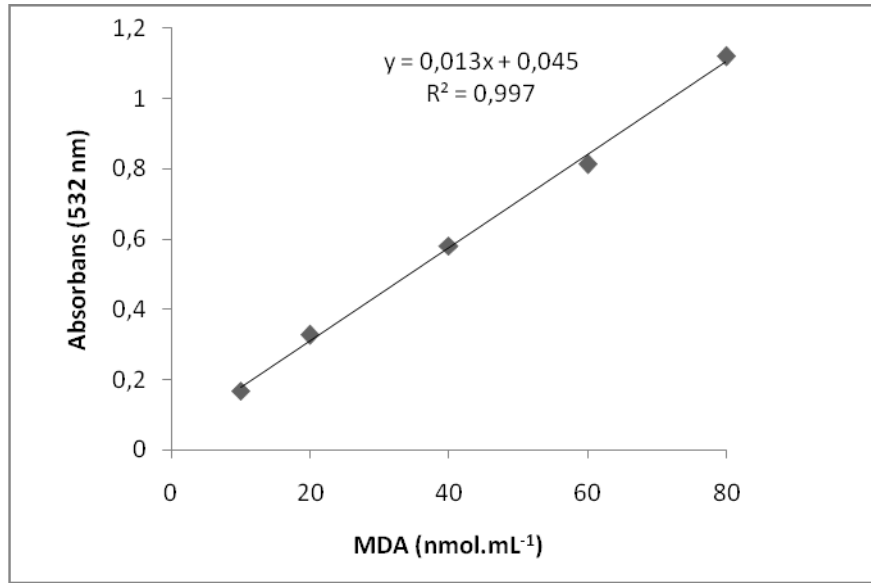
3.2.4. Lipit Peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu, membran lipitlerinin oksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit seviyesinin ölçülmesi ile belirlenir. Malondialdehit sıcak ortamda tiyobarbitüarik asit (TBA) ile renkli bileşik oluşturur. Bu bileşiğin absorbansı spektrofotometrik olarak ölçülmesi lipit peroksidasyonu belirlenir.

0,2 g yaprak cam tozu ve sıvı azot yardımı ile %0,25 TBA içeren 2 mL %10 triklor asetik asit (TCA) ile homojenize edildikten sonra 95 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin ardından tüpler 5 dakika buz içerisinde bekletilerek reaksiyon sonlandırmış ve 15000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantın absorbansı 532 nm dalga boyunda okunarak standart grafikten lipit peroksidasyon ürünlerinin miktarı nmol g^{-1} olarak belirlenmiştir (Heath ve Packer, 1968).

3.2.4.1. Standart Grafiğinin Çizilmesi

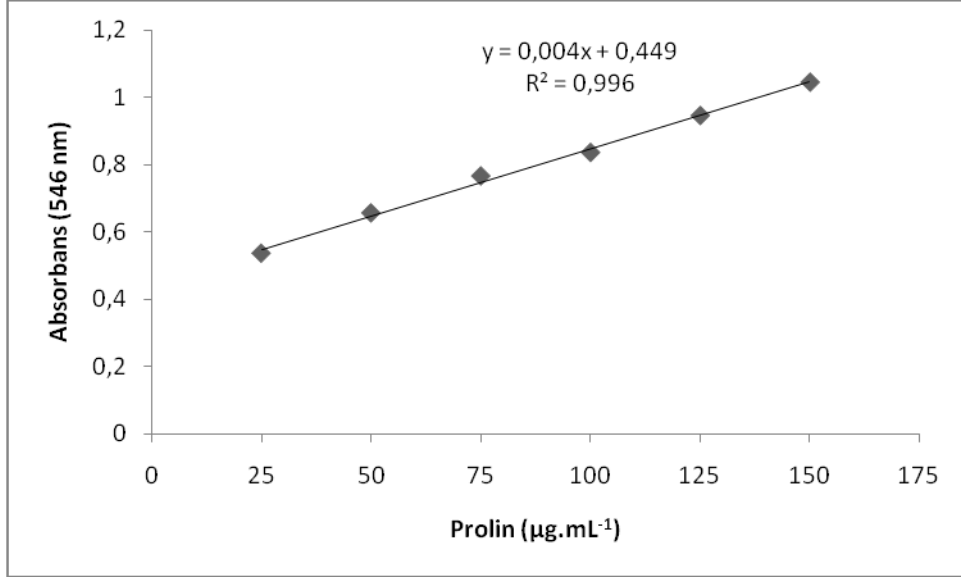
Standart olarak 1,1,3,3 tetrametoksiopropan kullanılmıştır. 400 nmol/mL stok çözeltilerden seyreltme yapılarak elde edilen 10, 20, 40, 60, 80 nmol/mL derişimlerdeki çözeltiler standart olarak kullanılmıştır. MDA miktarının ölçülmesinde kullanılan yöntem ile bunların absorbansları belirlenmiş ve derişim-absorbans grafiğı çizilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. MDA standart grafiğı

3.2.5. Prolinin Belirlenmesi

0,5 g taze yaprak cam tozu yardımıyla 5 mL %3'lük sülfosalisilik asit ile homojenize edilmiştir. Homojenat iki tabaka cam pamuğundan süzölmüş; filtrat analizler için kullanılmıştır. Test tüpünde 1mL filtrat, 1mL glasiyal asetil asit, 1mL asit-ninhidrin çözelitisi karıştırılmış ve ağız kapalı şekilde kaynar su banyosunda 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Tüpler oda sıcaklığındaki su banyosunda 5 dakika bekletilerek reaksiyon sonlandırılmış ve örneklerin absorbansı 546 nm dalga boyunda okunmuştur. Standart eğriden (Şekil 3.7) yararlanılarak prolin miktarı $\mu\text{g.g}^{-1}$ taze ağırlık şeklinde hesaplanmıştır (Claussen, 2005).



Şekil 3.7. Prolin standart grafiği

3.2.6. Protein Olmayan Tiyoil Gruplarının Belirlenmesi

0,5 g taze yaprak cam tozu yardımı ile 5 mL %5'lik metafosforik asitte homojenize edilip 10000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantın 140 µL'si, 700 µL 5 mM EDTA içeren 150mM'lık fosfat tamponu (pH 7,4) ve fosfat tamponunda hazırlanmış 140 µL DTNB (5-5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit) ile karıştırılmış; oda sıcaklığındaki 20 dakikalık inkübasyonun ardından 412 nm'de absorbanları okunmuştur (Çakmak ve Marschner, 1992).

3.2.7. Askorbik Asit Analizi

Askorbik asit analizi 3 bağımsız deney ve 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. 0,5 g taze yaprak cam tozu yardımı ile 5 mL %5'lik metafosforik asitte homojenize edilip 10000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatanttan 100 µL alınmış ve 250 µL fosfat tamponu (pH 7,4) ile karıştırılmıştır.

Toplam askorbatın belirlenmesi için;

- Hazırlanan örneklere 50 µL DTT eklenmiş ve 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- Daha sonra 50 µL NEM,
- 200 µL %10'luk TCA,
- 200 µL %44'lük orto-fosforik asit,
- 200 µL %4'lük 2'2' bipyridil,
- 100 µL %3'lük FeCl₃.6H₂O eklenmiştir.
- 40 °C'de 40 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

Redükte askorbatın belirlenmesi için;

- Hazırlanan örneklere 100 µL distile su,
- 50 µL NEM,
- 200 µL %10'luk TCA,
- 200 µL %44'lük orto-fosforik asit,
- 200 µL %4'lük 2'2' bipyridil,
- 100 µL %3'lük FeCl₃.6H₂O eklenmiştir.
- 40 °C'de 40 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sürecinin ardından 525 nm'de örneklerin absorbansı okunmuştur (Çakmak ve Marschner, 1992).

3.2.8. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

0,2 g taze yaprak cam tozu ve sıvı azot yardımı ile önceden soğutulmuş havanlarda 1 mM EDTA ve %0,1 PVPP içeren 2 mL 50 mM fosfat tamponu (pH 7,0) ile homojenize edilmiştir. +4 °C ve 15000 g'de 20 dakika santrifüj ile elde edilen

süpernatantlar enzim ve protein analizlerinde kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir (Drazkiewicz ve ark., 2004).

3.2.8.1. Süper Oksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini

0,1 mM EDTA, 13 mM methionin, 75 µM NBT, 0,2 µM riboflavin ve enzim ekstraktı içeren 50 mM K-fosfat tamponu (pH 7,8) kullanılarak SOD aktivitesi belirlenmiştir. Cam tüpler içindeki bu karışım 15 W floresan ışık kaynağına 20 cm mesafeden 30 dk. süreyle maruz bırakılmıştır. Işığın açılmasıyla reaksiyonlar başlamıştır. Işık görmeyen bir tüp içersindeki karışım ise kontrol olarak kullanılmıştır. Çözeltilerin absorbanı 560 nm'de ölçülmüştür. Işık ve riboflavin varlığında NBT'nin % 50'sinin inhibisyonunu sağlayan enzim miktarı SOD ünitesi olarak belirlenmiştir (Beauchamp ve Fridovich, 1971).

3.2.8.2. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini

Katalaz aktivitesi, % 30'luk H₂O₂ içeren 50 mM K-fosfat tamponu kullanılarak belirlenmiştir. Bu karışımın absorbanı 240 nm'de; 2 dk. boyunca 30 saniye aralıklarla ölçülmüş ve absorbandaki azalma belirlenmiştir. Bu azalmaya CAT varlığında H₂O₂'nin su ve oksijene parçalanması sebep olur. Enzim spesifik aktivitesi okside µmol H₂O₂ dk⁻¹ mg⁻¹ protein olarak ifade edilir (Aebi, 1984).

3.2.8.3. Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivite Tayini

0,2 mM askorbik asit, 0,1 mM EDTA, 20 µM H₂O₂ ve enzim ekstraktı içeren karışımın absorbanı 290 nm'de, 5 dk. süresince 1 dk. aralıklarla ölçülerek, H₂O₂ kaynaklı askorbat oksidasyonundaki azalma belirlenmiştir. Enzim aktivitesi µmol okside mg⁻¹ protein olarak ifade edilmiştir (Nakano ve Asada, 1981).

3.2.8.4. Guaiacol Peroksidaz (GPOX) Aktivite Tayini

Guaiacol peroksidaz aktivitesi guaiacolun oksidasyonuna bağlı olarak 20 mM guaiacol, 10 mM H₂O₂ ve enzim ekstraktı içeren 100 mM K-Fostat tamponun (pH 7,0) 290 nm'deki absorbansının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Enzimin spesifik aktivitesi redükte $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ dk}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein olarak tanımlanır (Polle ve ark., 1994).

3.2.9. İstatistiksel Analizler

Bu çalışmada tüm verilerin istatistiksel analizi için SPSS 16.00 programı kullanılmıştır. Uygulanan Cd derişimine bağlı olarak, *Eruca sativa* yapraklarındaki enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan aktivitelerindeki değişimlerin, yaprak ve köklerdeki Cd ve Fe, Cu, Zn içeriklerinin, bitki yaş ve kuru ağırlığının değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır. İstatistiksel olarak farklı grupları belirlemek için Tukey testi kullanılmış ve ortalamalar 0,05 önem seviyesinde karşılaştırılmıştır. Çizelgelerde aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, *Eruca sativa* fidelerine 75, 150, 300, 450 ve 600 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ derişimlerinde Cd çözeltileri uygulanmıştır. Uygulama sonucunda yapraklarda meydana gelen fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerdeki değişimler belirlenmiştir. Bitkinin kök kısımları sadece Cd ve bazı mikrobesein elementlerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Deneyler sonucunda elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiş; $p\leq 0,05$ 'e göre önem dereceleri belirlenmiştir.

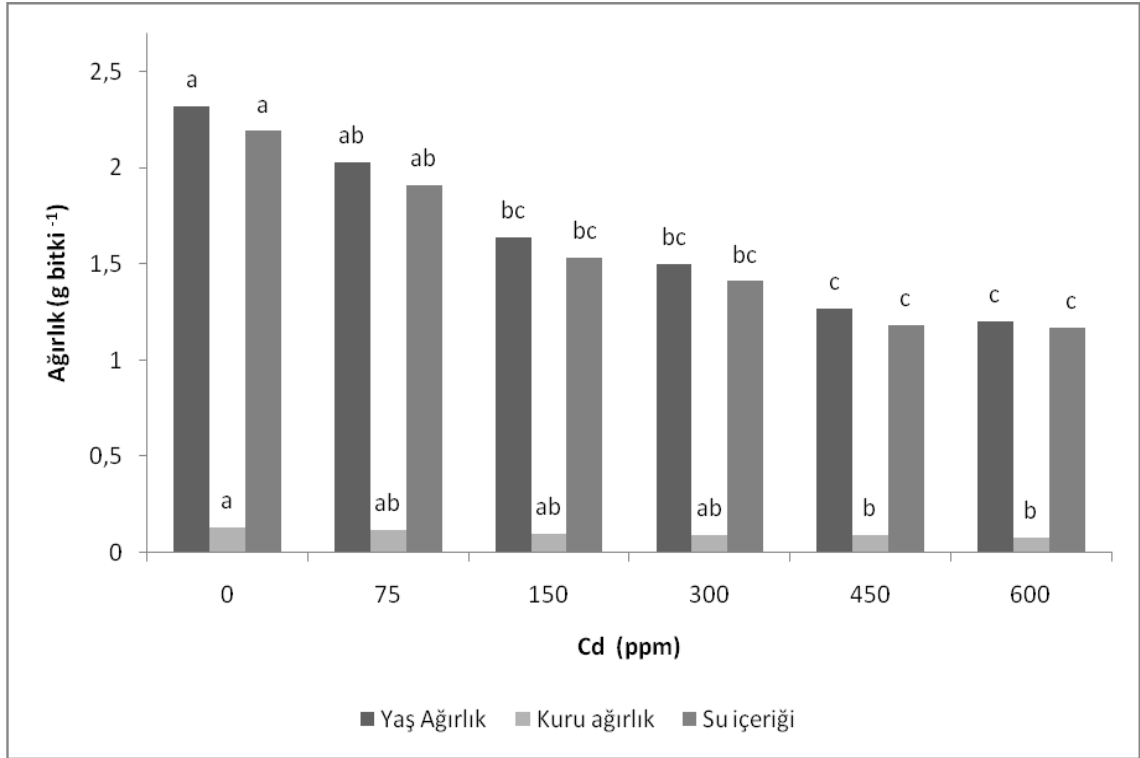
4.1. Su İçeriği, Yaş ve Kuru Ağırlık

Çizelge 4.1.'de verilen derişimlerde Cd'a maruz bırakılan *Eruca sativa* fidelerinde yaş ve kuru ağırlıklar belirlenmiştir. 150 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ve üzeri derişimlerde, bitkilerin yaş ağırlığında; 450 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ve üzeri Cd'a maruz kalan bitkilerin kontrol grubuna göre kuru ağırlığında azalma meydana geldiği görülmüştür. 150 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ve üzeri Cd uygulaması fidelerde su içeriğinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalmasına sebep olmuştur. 600 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Cd uygulaması sonucu ise su içeriği yaklaşık %50 oranında azalmıştır (Çizelge 4.1, Şekil 4.1).

Çizelge 4.1. Farklı derişimlerde Cd uygulanan *Eruca sativa* fidelerinde su içeriği, yaş ve kuru ağırlıklar

Derişim ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Yaş Ağırlık (g bitki^{-1})	Kuru Ağırlık (g bitki^{-1})	Su içeriği (g bitki^{-1})
0	2,32 \pm 0,24 a	0,13 \pm 0,010 a	2,19 \pm 0,230 a
75	2,03 \pm 0,17 ab	0,12 \pm 0,010 ab	1,91 \pm 0,170 ab
150	1,64 \pm 0,47 bc	0,10 \pm 0,006 ab	1,53 \pm 0,110 bc
300	1,50 \pm 0,42 bc	0,09 \pm 0,007 ab	1,41 \pm 0,100 bc
450	1,27 \pm 0,47 c	0,09 \pm 0,009 b	1,18 \pm 0,100 c
600	1,25 \pm 0,50 c	0,08 \pm 0,007 b	1,17 \pm 0,110 c

Değerler aritmetik ortalama ve \pm standart hata olarak verilmiştir. Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir. ($P\leq 0,05$, $N=16$)



Şekil 4.1. Farklı derişimlerde Cd uygulanan *Eruca sativa* fidelerinde su içeriği, yaş ve kuru ağırlıklar. Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir.

4.2. Mikrobesein Elementi ve Kadmiyum İçeriği

Şekil 4.2, Çizelge 4.2’de *Eruca sativa* yapraklarındaki, Şekil 4.3, Çizelge 4.3’de ise köklerdeki Cd ve bazı mikrobesein elementi miktarları görülmektedir.

E. sativa’ya uygulanan Cd miktarındaki artışla orantılı olarak yapraklara taşınan Fe miktarı artarken taşınan Cu miktarında önemli oranda azalma görülmüştür. Yapraklara taşınan çinko 75, 150, 300 ve 450 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Cd uygulamalarında azalırken 600 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Cd’da kontrol grubuna göre önemli oranda artmıştır. Köklerde ise 600 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ da bakır, 300 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ da çinko en yüksek oranda birikmiştir. Demir ise 300 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ hariç diğer Cd derişimlerinde önemli oranda azalmıştır.

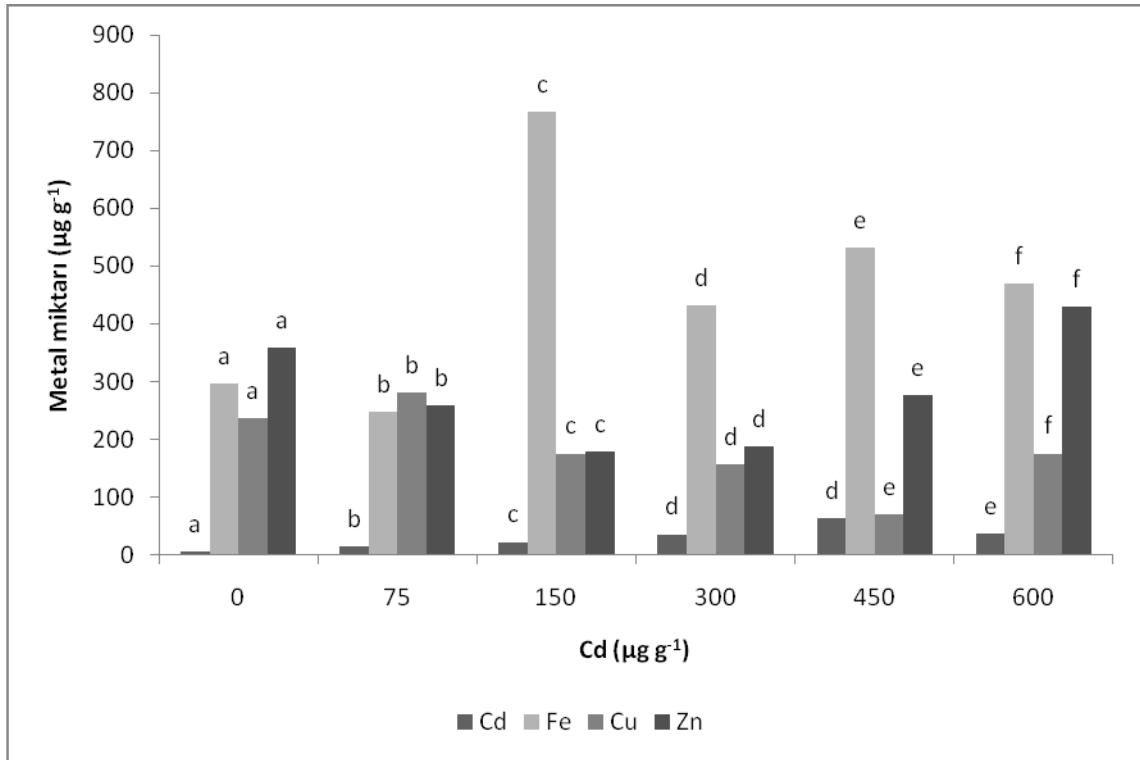
Bitkileri yetiştirmekte kullanılan torfun başlangıçtaki Cd miktarı 17,6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ’dır.

E. sativa'ya uygulanan bütün Cd derişimlerinde kök ve yapraklarda biriktirilen Cd miktarının kontrol ile karşılaştırıldığında önemli oranda arttığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı derişimlerde Cd'a maruz bırakılan *Eruca sativa* yapraklarında bazı mikrobesein elementi ve Cd miktarları

Derişim ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Cd ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Fe ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Cu ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Zn ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
0	6,17 \pm 0,005 a	296,80 \pm 0,002 a	237,89 \pm 0,031 a	358,71 \pm 0,003 a
75	15,87 \pm 0,008 b	247,33 \pm 0,011 b	281,95 \pm 0,017 b	260,06 \pm 0,011 b
150	22,93 \pm 0,008 c	766,73 \pm 0,012 c	176,20 \pm 0,007 c	179,35 \pm 0,005 c
300	36,17 \pm 0,005 d	432,83 \pm 0,002 d	157,71 \pm 0,002 d	188,32 \pm 0,006 d
450	63,51 \pm 0,011 d	531,77 \pm 0,023 e	70,48 \pm 0,028 e	278,00 \pm 0,023 e
600	37,05 \pm 2,378 e	469,93 \pm 0,045 f	176,22 \pm 0,006 f	429,55 \pm 0,017 f

Değerler aritmetik ortalama ve \pm standart hata olarak verilmiştir. Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir. ($P \leq 0,05$, $N=3$)

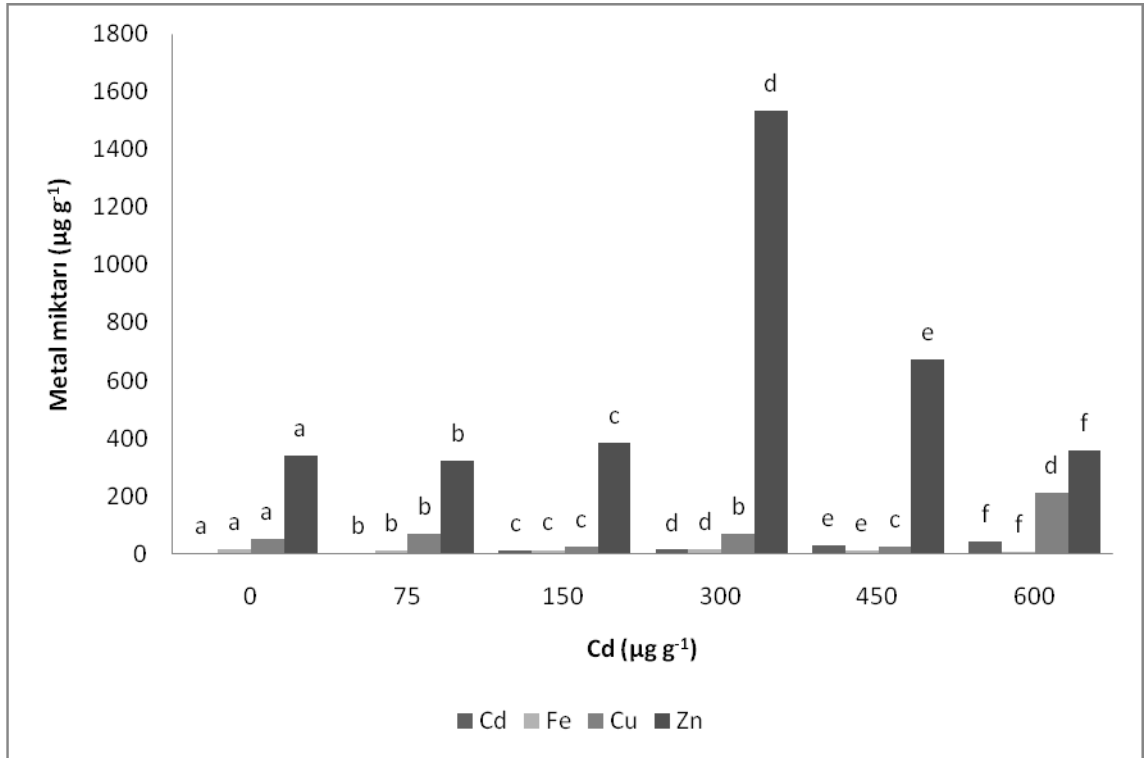


Şekil 4.2. Farklı derişimlerde Cd'a maruz bırakılan *Eruca sativa* yapraklarında bazı mikrobesein elementi ve Cd miktarları. Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir.

Çizelge 4.3. Farklı derişimlerde Cd'a maruz bırakılan *Eruca sativa* köklerinde bazı mikrobesein elementi ve Cd miktarları

Derişim ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Cd ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Fe ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Cu ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Zn ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
0	2,47 \pm 0,006 a	17,32 \pm 0,002 a	52,86 \pm 0,000 a	340,74 \pm 0,024 a
75	3,57 \pm 0,008 b	13,75 \pm 0,028 b	70,48 \pm 0,002 b	323,73 \pm 0,001 b
150	12,10 \pm 0,006 c	14,89 \pm 0,020 c	26,43 \pm 0,001 c	385,61 \pm 0,001 c
300	13,75 \pm 0,046 d	17,83 \pm 0,022 d	70,48 \pm 0,002 b	1533,50 \pm 0,019 d
450	28,31 \pm 0,009 e	11,51 \pm 0,016 e	26,43 \pm 0,001 c	672,60 \pm 0,023 e
600	41,79 \pm 0,049 f	8,21 \pm 0,016 f	211,46 \pm 0,001 d	358,73 \pm 0,026 f

Değerler aritmetik ortalama ve \pm standart hata olarak verilmiştir. Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir. ($P \leq 0,05$, $N=3$)



Şekil 4.3. Farklı derişimlerde Cd'a maruz bırakılan *Eruca sativa* köklerinde bazı mikrobesein elementi ve Cd miktarları. Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir.

4.2.1. Translokasyon Faktörü

Çizelgede 4.4.'de *Eruca sativa* fidelerindeki Cd translokasyon faktörleri görülmektedir. Translokasyon faktörleri 0,88-4,44 arasında değişim göstermektedir. 4,44 ile en büyük TF 75 $\mu\text{g.g}^{-1}$ Cd'da görülürken en düşük TF 0,88 ile 600 $\mu\text{g.g}^{-1}$ Cd'da görülmüştür.

Çizelge 4.4. Farklı derişimlerde Cd'a maruz bırakılan *Eruca sativa* fidelerinde Cd için translokasyon faktörleri

Derişim ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	TF
0	2,49
75	4,44
150	1,89
300	2,63
450	2,24
600	0,88

4.3. Lipit Peroksidasyonu

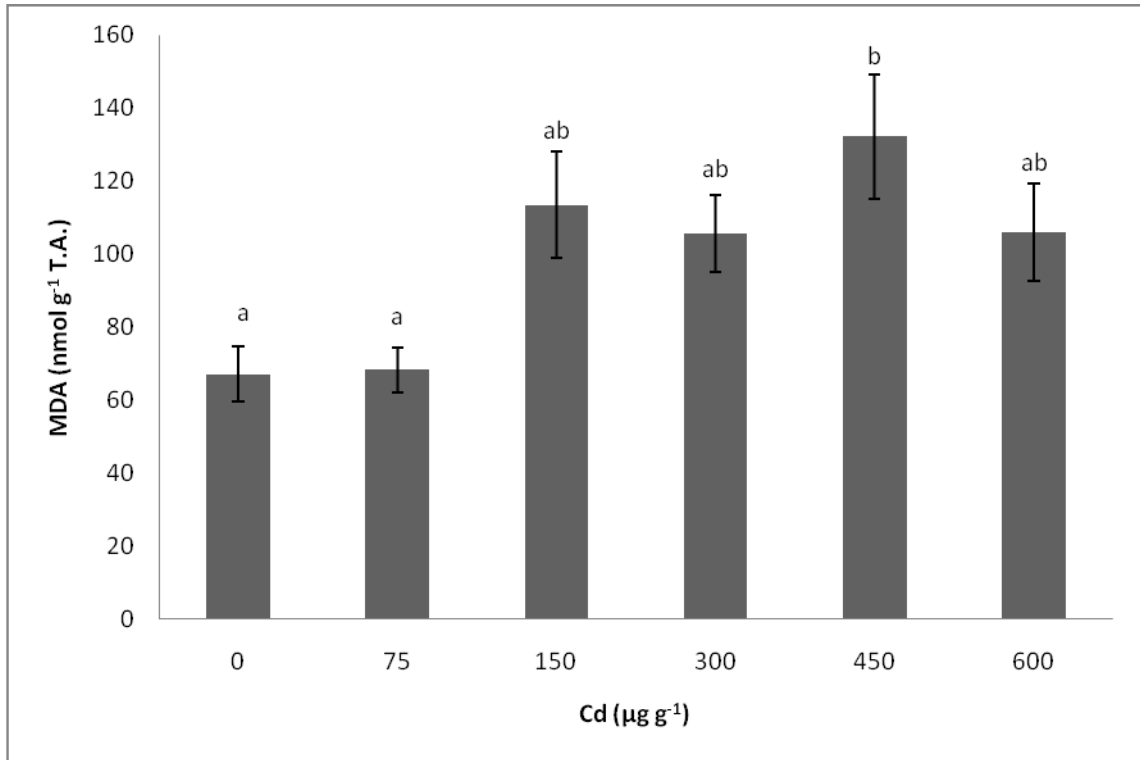
Eruca sativa yapraklarında meydana gelen lipit peroksidasyonu, malondialdehidin seviyesi ölçülerek belirlenmiştir.

150 $\mu\text{g.g}^{-1}$ ve üzeri derişimlerde Cd uygulanan bitkilerde lipit peroksidasyonu artış göstermiştir. 450 $\mu\text{g.g}^{-1}$ Cd'un lipit peroksidasyonunda dikkat çekici bir artışa sebep olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.5, Şekil 4.4).

Çizelge 4.5. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan *Eruca sativa* yapraklarında MDA miktarı

Derişim ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	MDA (nmol g^{-1} T.A.)
0	$67,01 \pm 7,58$ aa
75	$68,26 \pm 6,04$ aa
150	$113,36 \pm 14,57$ ab
300	$105,67 \pm 10,54$ ab
450	$132,11 \pm 17,19$ bb
600	$105,96 \pm 13,38$ ab

Değerler aritmetik ortalama ve \pm standart hata olarak verilmiştir (N=4) Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark önemsizdir ($P \leq 0,05$).



Şekil 4.4. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan *Eruca sativa* yapraklarında MDA miktarı. Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir.

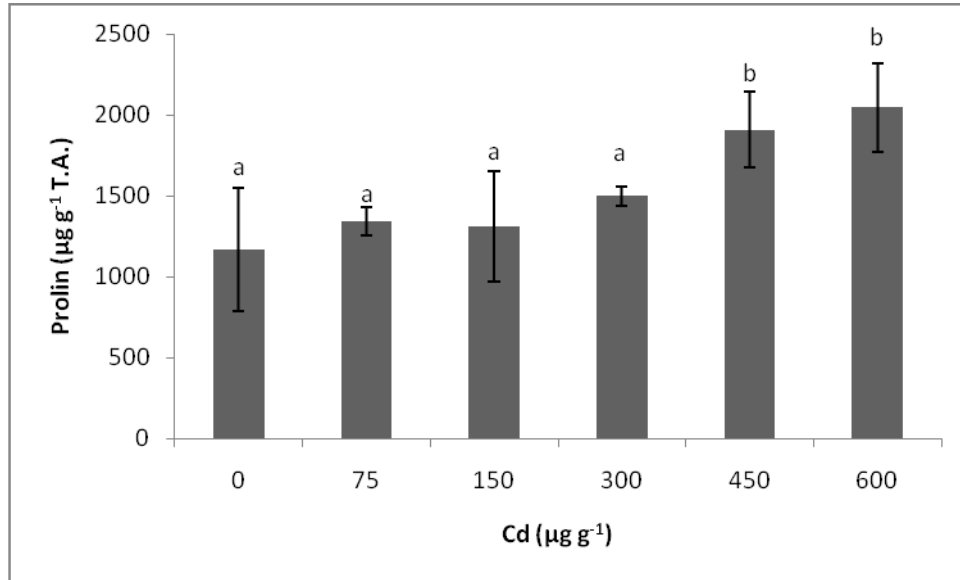
4.4. Prolin

E. sativa yapraklarındaki prolin miktarı $\mu\text{g.g}^{-1}$ T.A. olarak Çizelge 4.6. ve Şekil 4.5.'de verilmiştir. Prolin miktarının 450 ve 600 $\mu\text{g.g}^{-1}$ Cd'da kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığı görülmektedir.

Çizelge 4.6. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan *Eruca sativa* yapraklarında prolin miktarı

Derişim ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Prolin ($\mu\text{g.g}^{-1}$ T.A.)
0	1165,62 \pm 380,79 a
75	1341,87 \pm 88,070 a
150	1310,62 \pm 340,46 a
300	1496,25 \pm 57,090 a
450	1907,50 \pm 234,97 b
600	2045,62 \pm 276,00 b

Değerler aritmetik ortalama ve \pm standart hata olarak verilmiştir (N=4) Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark önemsizdir ($P \leq 0,05$).



Şekil 4.5. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan *Eruca sativa* yapraklarında prolin miktarı. Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir.

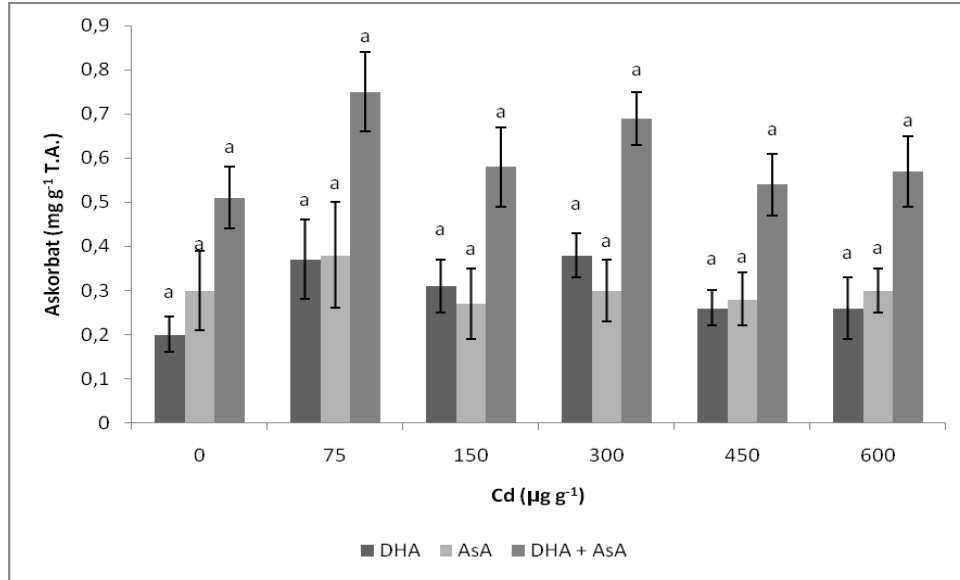
4.5. Askorbat

Dehidroaskorbat (DHA), askorbat (AsA) ve toplam askorbat içeriği (DHA+AsA) Çizelge 4.7 ve Şekil 4.6'da verilmiştir. Kadmiyum uygulamasının dehidroaskorbat, askorbat ve toplam askorbat içeriğinde dikkate değer değışikliğe sebep olmadığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.7. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan *Eruca sativa* yapraklarının dehidroaskorbat (DHA), askorbat (AsA) ve toplam askorbat (DHA+AsA) içerikleri

Derişim ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Toplam Askorbat (mg g^{-1} T.A.)	Askorbat (mg g^{-1} T.A.)	DehidroAskorbat (mg g^{-1} T.A.)
0	0,51 \pm 0,07 a	0,30 \pm 0,09 a	0,20 \pm 0,04 a
75	0,75 \pm 0,09 a	0,38 \pm 0,12 a	0,37 \pm 0,09 a
150	0,58 \pm 0,09 a	0,27 \pm 0,08 a	0,31 \pm 0,06 a
300	0,69 \pm 0,06 a	0,30 \pm 0,07 a	0,38 \pm 0,05 a
450	0,54 \pm 0,07 a	0,28 \pm 0,06 a	0,26 \pm 0,04 a
600	0,57 \pm 0,08 a	0,30 \pm 0,05 a	0,26 \pm 0,07 a

Değerler aritmetik ortalama ve \pm standart hata olarak verilmiştir (N=9) Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark önemsizdir ($P \leq 0,05$).



Şekil 4.6. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan *Eruca sativa* yapraklarının dehidroaskorbat (DHA), askorbat (AsA) ve toplam askorbat (DHA+AsA) içerikleri. Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir.

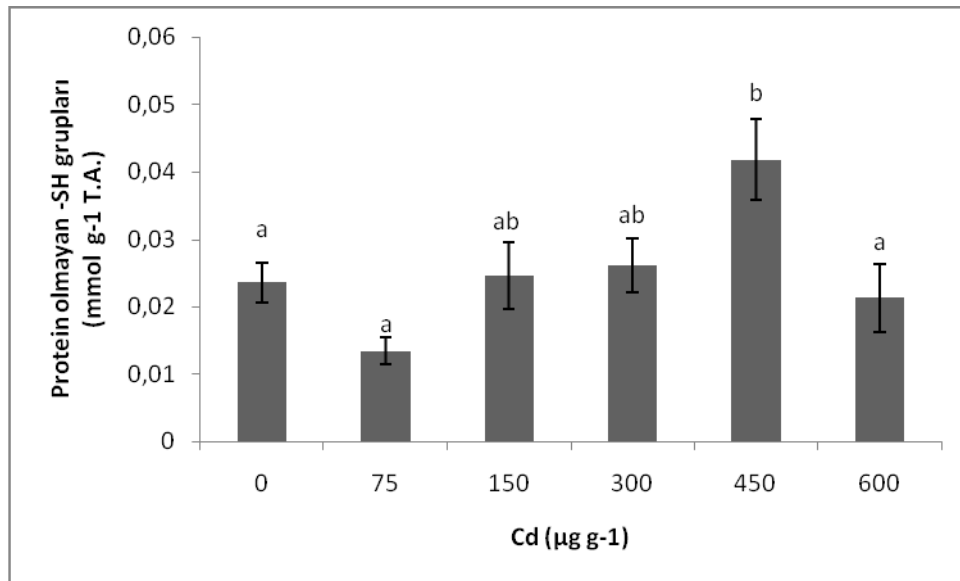
4.6. Protein Olmayan TiyoL Grupları

Protein olmayan -SH gruplarının miktarları Çizelge 4.8 ve Şekil 4.7'de verilmiştir. 450 $\mu\text{g.g}^{-1}$ Cd uygulaması sonucu protein olmayan -SH gruplarının miktarında önemli ölçüde artış gözlemlendiği halde diğer uygulamalarda önemli bir fark bulunmamaktadır.

Çizelge 4.8. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan *Eruca sativa* yapraklarının protein olmayan -SH grubu içerikleri

Derişim ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	Protein olmayan -SH miktarı (mmol g^{-1} T.A.)
0	0,02 \pm 0,003 a
75	0,01 \pm 0,002 a
150	0,02 \pm 0,005 ab
300	0,03 \pm 0,004 ab
450	0,04 \pm 0,006 b
600	0,02 \pm 0,005 a

Değerler aritmetik ortalama ve \pm standart hata olarak verilmiştir (N=9) Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark önemsizdir ($P \leq 0,05$).



Şekil 4.7. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan *Eruca sativa* yapraklarının protein olmayan -SH grubu içerikleri Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir.

4.7. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

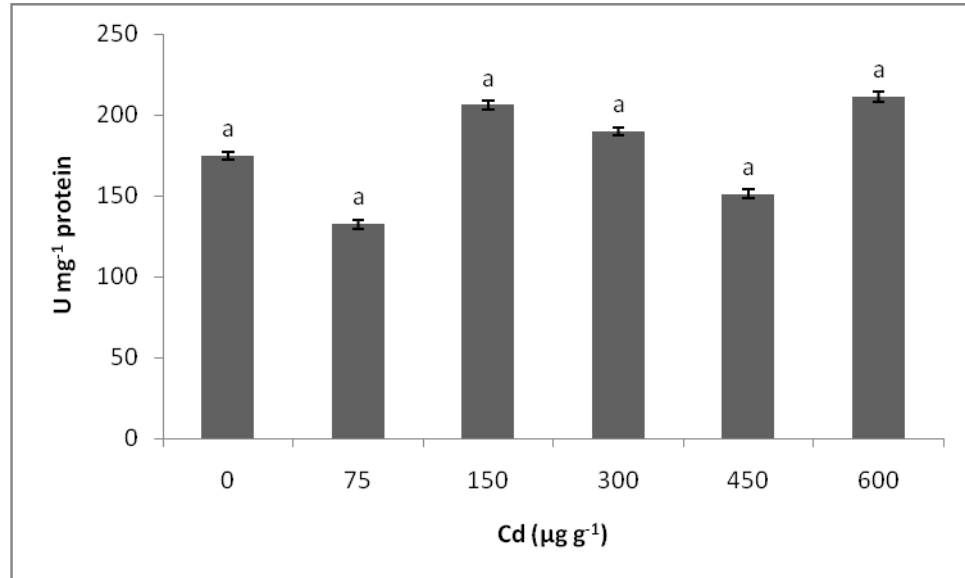
SOD aktiviteleri aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.9, Şekil 4.8).

Sonuçlara göre SOD aktivitesinde bazı değişiklikler görülse de bu değişimlerin istatistiksel olarak önemli olmadığı tesbit edilmiştir.

Çizelge 4.9. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan *Eruca sativa* yapraklarında SOD aktivitesi

Derişim ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	SOD (U mg^{-1} protein)
0	174,78 \pm 2,57 a
75	132,56 \pm 2,70 a
150	206,04 \pm 2,47 a
300	190,00 \pm 2,48 a
450	151,16 \pm 3,03 a
600	211,27 \pm 2,86 a

Değerler aritmetik ortalama ve \pm standart hata olarak verilmiştir (N=9) Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark önemsizdir ($P \leq 0,05$).



Şekil 4.8. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan *Eruca sativa* yapraklarında SOD aktivitesi. Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir.

4.8. Katalaz Aktivitesi

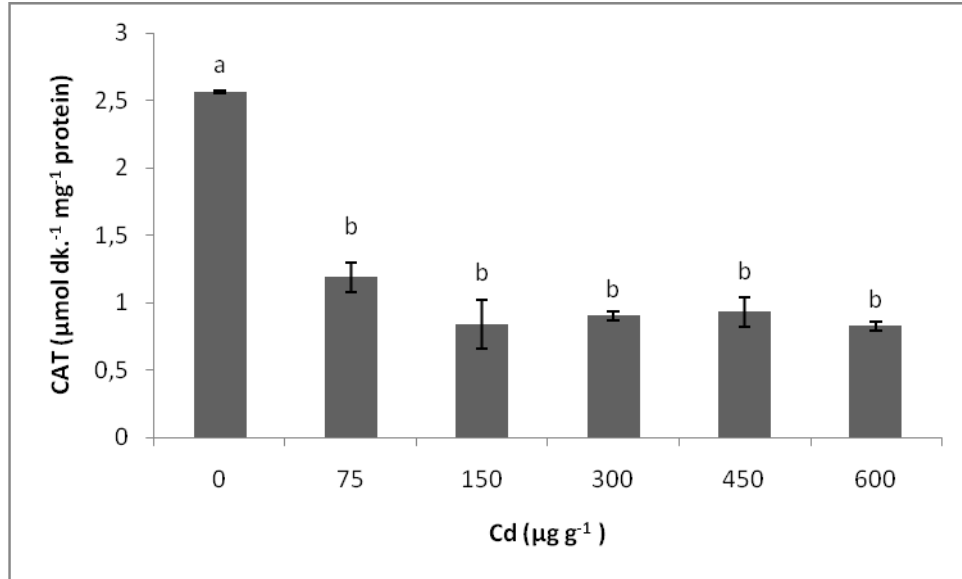
CAT aktivitesindeki değişiklikler Çizelge 4.10, Şekil 4.9'da görölmektedir.

Sonuçlara göre CAT aktivitesinde kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalma olduğu ortaya konmuştur. 75 $\mu\text{g.g}^{-1}$ Cd, %55, 600 $\mu\text{g.g}^{-1}$ Cd ise % 67 oranında azalmaya neden olmuştur.

Çizelge 4.10. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan *Eruca sativa* yapraklarında CAT aktivitesi

Derişim ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	CAT ($\mu\text{mol dk.}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)
0	2,56 \pm 0,01 a
75	1,19 \pm 0,11 b
150	0,84 \pm 0,18 b
300	0,90 \pm 0,03 b
450	0,93 \pm 0,11 b
600	0,83 \pm 0,03 b

Değerler aritmetik ortalama ve \pm standart hata olarak verilmiştir (N=6) Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark önemsizdir ($P \leq 0,05$).



Şekil 4.9. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan *Eruca sativa* yapraklarında CAT aktivitesi. Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir.

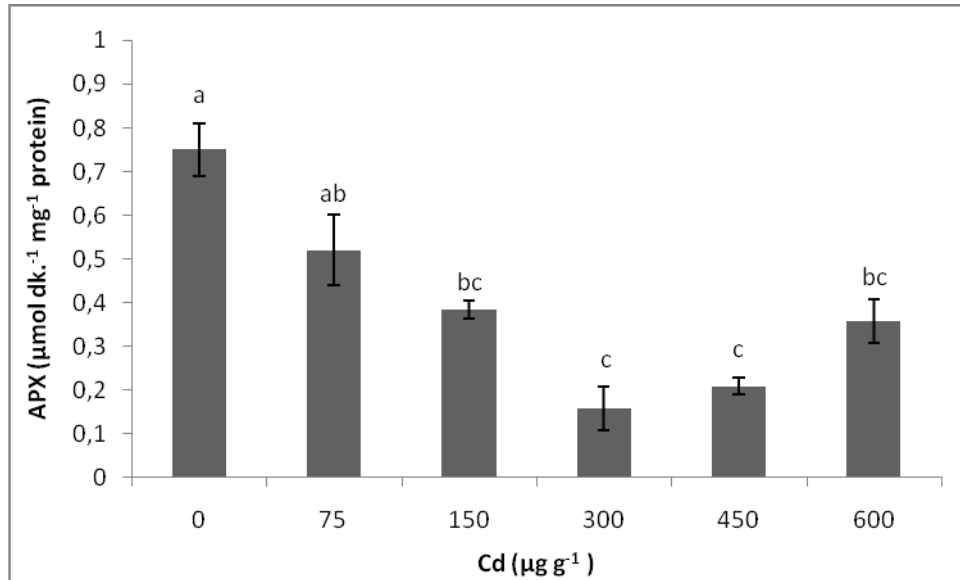
4.9. Askorbat Peroksidaz Aktivitesi

Çizelge 4.11, Şekil 4.10'da görülen sonuçlara göre, 75 ve 150 $\mu\text{g.g}^{-1}$ Cd, APX aktivitesinde kontrol grubuna göre istatistiki olarak önemli oranda azalmasına neden olmuştur. Uygulanan bütün Cd derişimlerinde APX aktivitesi kontrol grubundan daha düşüktür.

Çizelge 4.11. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan *Eruca sativa* yapraklarında APX aktivitesi

Derişim ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	APX ($\mu\text{mol dk.}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)
0	0,75 \pm 0,06 a
75	0,52 \pm 0,08 ab
150	0,38 \pm 0,02 bc
300	0,15 \pm 0,05 c
450	0,20 \pm 0,02 c
600	0,35 \pm 0,05 bc

Değerler aritmetik ortalama ve \pm standart hata olarak verilmiştir (N=6) Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark önemsizdir ($P \leq 0,05$).



Şekil 4.10. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan *Eruca sativa* yapraklarında APX aktivitesi. Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir.

4.10. Guaiacol Peroksidaz Aktivitesi

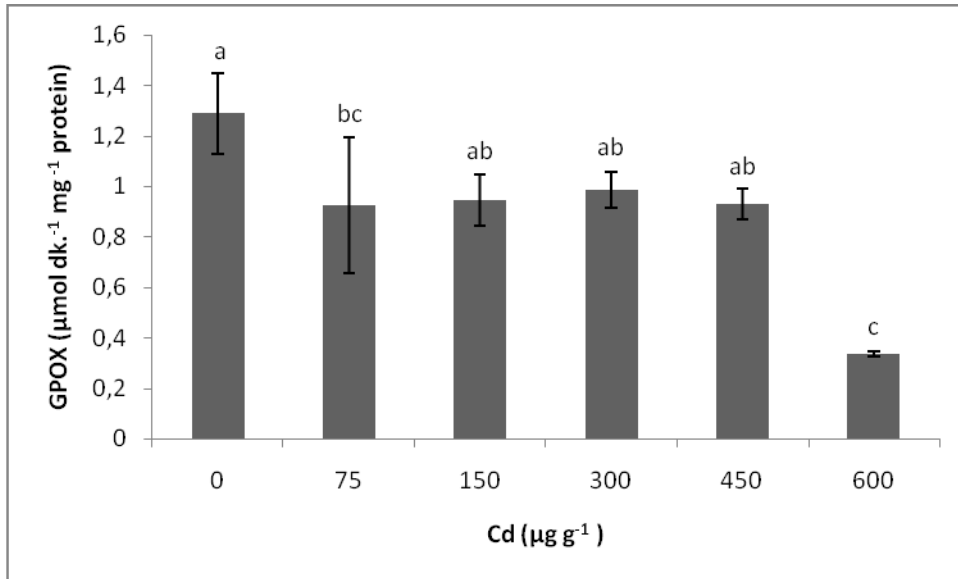
Farklı derişimlerde Cd uygulaması sonucu *Eruca sativa*'nın yapraklarındaki GPOX aktiviteleri aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.12, Şekil 4.11).

Bütün uygulamalarda GPOX aktivitesinin kontrol grubuna göre azaldığı 75 ve 600 $\mu\text{g.g}^{-1}$ Cd uygulamalarındaki azalmanın istatistiki olarak önemli olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.12. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan *Eruca sativa* yapraklarında GPOX aktivitesi

Derişim ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	GPOX ($\mu\text{mol dk.}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$)
0	1,29 \pm 0,16 a
75	0,92 \pm 0,27 bc
150	0,95 \pm 0,10 ab
300	0,99 \pm 0,07 ab
450	0,93 \pm 0,06 ab
600	0,94 \pm 0,01 c

Değerler aritmetik ortalama ve \pm standart hata olarak verilmiştir (N=6) Aynı sütunda aynı harfi taşıyan değerler arasındaki fark önemsizdir ($P \leq 0,05$).



Şekil 4.11. Farklı Cd derişimlerine maruz bırakılan *Eruca sativa* yapraklarında GPOX aktivitesi. Aynı harfi taşıyan ortalamalar arasındaki fark önemsizdir.

5. TARTIŞMA

Kadmiyum toksisitesi bitkilerde büyüme ve gelişmeyi engeller, klorozise neden olur. Esasi elementlerden bazılarının alımını etkiler (Das ve ark., 1998). Ayrıca Cd enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan aktivitelerinde de değişikliklere sebep olabilir (Ci ve ark., 2010).

Bu çalışmada, Cd'a maruz bırakılan *Eruca sativa* fidelerinin yapraklarındaki enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar, lipid peroksidasyonu, yaprak ve köklerdeki Cd ve bazı mikro besin elementi içerikleri araştırılmıştır.

5.1. Su İçeriği, Yaş ve Kuru Ağırlık

Bitkilerde su içeriği üç faktöre bağlıdır; su alımı, su iletimi ve su kaybı. Kadmiyum plazma mebranının su geçirgenliğini azaltarak su alımını engeller. Ayrıca stomaların kapanmasına neden olarak su kaybının önüne geçer. Böylece su iletimini de engelleyerek bitkinin su dengesinde bozulmaya yol açar. (Poschenrieder ve ark., 1989; Barcelo ve Poschenrieder, 1990; Milone ve ark., 2003; Benavides ve ark., 2005; Hasan ve ark., 2008). Das ve ark. (1998)'nin de belirttiği gibi kadmiyum toksisitesi su alınmasını engelleyerek bitkilerde kuraklık stresine benzer semptomların ortaya çıkmasına neden olur (Das ve ark., 1998). *E. sativa*'nın kadmiyuma maruz kalması sonucu elde edilen veriler, bu verilerle uyumludur. Zira araştırmamızda da Cd derişimindeki artışa bağlı olarak *Eruca sativa*'nın su içeriği önemli oranda azalmıştır.

Bitki büyüme ve gelişmesi birçok fizyolojik olayın koordineli bir şekilde meydana gelmesini gerektiren karmaşık bir süreçtir. Cd stresi gibi stres şartları altında bu koordinasyon bozulabilir ya da fotosentez gibi gerekli bazı fizyolojik olaylar engellenebilir. Bu durum sonucunda büyüme ve gelişme durabilir (Vassilev ve ark., 1998). Bitkilerin büyüme ve gelişme durumlarının belirlenebileceği en pratik parametre, taze ve kuru ağırlık ölçümleridir. Araştırmamızın sonucunda görülmüştür ki, artan derişimlerde kadmiyum uygulaması sonucu *Eruca sativa*'nın yaş ve kuru ağırlığında kontrol grubuna göre yaklaşık iki kat oranında azalmaya sebep olmuştur.

5.2. Kadmiyum ve Bazı Mikrobesein Elementi İçerikleri ve Taşınmaları

Kadmiyum birikimi türler ve aynı türün farklı organlarında bile değişebilmektedir. Örneğin çimlerde bitkide bulunan toplam Cd miktarının %65 – 90'ı köklerde bulunurken, marulda bu oran sadece %50'dir. Bitkiler Cd'u köklerde depo etme eğilimindedirler ve böylece üretken organ ve dokulardaki Cd seviyesini düşük tutarlar. Bu, bitkilerin Cd stresine karşı aldıkları ilk önlemdir (Wu ve ark., 2005). Buna rağmen bazı bitkilerde toprak üstü kısımlara da taşınır. Kadmiyum yapraklarda, kloroplastlarda birikmeyi tercih eder (Lagriffoul ve ark., 1998).

Metal biriktiren bitkilerde, metal alımına bağlı olarak köklerden yapraklara yüksek metal taşınımı görülür (Masarovicova ve ark., 2010). Köklerden yapraklara metal taşınma oranı TF ile belirlenir. Translokasyon faktörü 1'den büyük olan bitkiler biriktirici olarak sınıflandırılır (Wei ve Chen, 2006).

Eruca sativa'da da Cd yapraklarda biriktirilme eğilimi göstermiştir. Translokasyon faktörü (TF), uygulanan bütün Cd derişimlerinde 0,8 ile 4,4 arasında değişmektedir. Özellikle $600 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 'dan daha düşük Cd uygulamalarında TF'nün 1'den büyük olmasına dayanarak *E. sativa*'yı Cd biriktiricisi olarak aday gösterebiliriz.

Bitkilerde, Cd toksisitesi besin elementlerinin alımını, taşınmasını etkileyebilir. Cd bu elementlerin alınmasını arttırabilir ya da azaltabilir. Kadmiyum, Zn ile hem antogostik hem de sinerjik ilişki gösterir. Kadmiyum *Oryza sativa*'da Zn ile sinerjik bir ilişki gösterirken *Linum usitatissimum* bitkisinde Zn ile antogonist bir ilişki gösterir (Yang ve ark., 1996). Bu veriler, Cd ve diğer besin elementlerinin alımı arasındaki etkileşimin bitki türüyle de ilişkili olduğunu göstermektedir. Araştırmamızdan elde edilen bulgular da *Eruca sativa*'da kadmiyumun kökler tarafından alımını ve yapraklara taşınmasını arttırdığını göstermiştir. Kadmiyumun bitkilerde bakır alımı ve içeriği üzerine etkileri Zn'da olduğu gibidir. Bazı bitkilerde Cu alımını arttırırken bazılarında azaltır (Yang ve ark., 1996). Kadmiyum uygulaması, bakırın köklerde biriktirilip yapraklara taşınmasını azaltmıştır.

Demir en önemli besin elementlerinden biridir. Bitkiler demiri iki yolla alırlar. Bunlardan ilki, Fe^{3+} formunda kökler tarafından alınmadan önce Fe^{2+} ya indirgenmesidir. Fe^{3+} kök hücre duvarında bulunan demir redüktazlar tarafından indirgenir. İkinci yol ise Fe^{3+} 'in siderefor kompleksleri şeklinde alınması ve kök içinde Fe^{2+} 'e indirgenmesidir. İkinci yol ilkinde göre daha etkilidir ve bu yolla Fe alan bitkiler, Fe eksikliğine diğer bitkilerden daha az duyarlıdır (Siedlecka ve Krupa, 1999). Cd, demir redüktazların aktivitelerini engeller ve demir eksikliğine neden olabilir (Sanita di Toppi ve Gabbrielli, 1999). Bazı türlerde ise Fe miktarını artırır. Kadmiyum hiperakümülatörü olan *Salsola kali* bitkisinde Cd uygulaması, bu bitkinin yapraklarındaki Fe miktarını önemli ölçüde arttırmıştır (Rosa ve ark., 2004). Birçok türü metal hiperakümülatörü olan Brassicaceae familyasının bir türü olan *Eruca sativa*'da Cd uygulaması $150 \mu g.g^{-1}$ 'dan itibaren, yapraklardaki Fe içeriğini yaklaşık olarak iki kat artırırken, köklerde birikimin azalmasına sebep olmuştur.

Bu çalışmada uygulanan kadmiyum ile üç temel besin elementinin alımı arasındaki etkileşime dayanılarak da *Eruca sativa*'nın aktif bir Cd biriktiricisi olduğunu ifade edebiliriz.

5.3. Lipit Peroksidasyonu

Ağır metaller birkaç yolla ROT üretimini artırır. Bu yollardan en iyi bilineni redoks aktif metallerin varlığında Haber-Weiss reaksiyonları ile ROT üretimidir. Cd gibi redoks aktif olmayan metallerin varlığında da ROT seviyesi artar (Pinto ve ark., 2003). Reaktif oksijen türlerinin hücrelerdeki en zarar verici etkilerinden biri lipit peroksidasyonudur (Chaoui ve ark., 1997). Lipit peroksidasyonu örneklerdeki MDA miktarı ölçülerek belirlenir (Halliwell ve Chirico, 1993).

$150 \mu g.g^{-1}$ ve üzeri derişimlerde Cd'a maruz kalan *Eruca sativa*'da lipit peroksidasyonunda artış gözlenmiştir. $75 \mu g.g^{-1}$ Cd'a maruz kalan *Eruca sativa* bitkisinin yapraklarında meydana gelen lipit peroksidasyonu kontrol grubuna göre önemli bir artış göstermemiştir.

Kadmiyuma maruz kalan *Lactuca sativa*'da (Monteiro ve ark., 2009), *Oryza sativa*'da (Shah ve ark., 2001) ve *Pisum sativum*'da (Sandalio ve ark., 2001) lipit peroksidasyonunun arttığı belirlenmiştir.

5.4. Prolin

Uzun zamanlar boyunca, prolinin sadece hücre sel yapıları ve makro molekülleri osmotik stresin zarar verici etkilerinden koruyan bir osmolit olduğu düşünülmüştür. Oysa son on yılda yapılan çalışmalar, prolinin önemli antioksidan özellikleri olduğunu ortaya çıkarmıştır. Prolin, ROT'ni temizleyen antioksidan olmasının yanı sıra enzimatik antioksidanları dengede tutar ve alternatif detoksifikasyon mekanizmalarını uyarır. Değişik ağır metal uygulamalarının sebep olduğu oksidatif stres altındaki bitkilerde de prolin birikiminde artış gözlenmiştir (Szabados ve Savoure, 2009).

Bu araştırmada kadmiyum stresi altında *Eruca sativa* yapraklarında prolin birikimi olduğu belirlenmiştir. 450 ve 600 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Cd uygulanan fidelerde prolin miktarı kontrol grubuna göre önemli ölçüde artış göstermiştir.

Yapılan bazı çalışmalarda, Cd uygulamasının pirinç köklerinde (Shah ve Dubey, 1997), Cd biriktiricisi olan *Solanum nigrum*'un kök ve yapraklarında prolin miktarında artış görülmektedir (Sun ve ark., 2007).

5.5. Askorbat İçeriği

Askorbat (AsA), bitki hücrelerinde H_2O_2 detoksifikasyonu için en önemli indirgeyici substrattır. APX, H_2O_2 'i suya indirgemek için iki molekül askorbat kullanır. Bu reaksiyon sırasında AsA, MDHA'a dönüşür. Monodehidroaskorbat kısa yarılanma ömrüne sahip bir radikaldir. Monodehidro askorbat tilakoid zarında ya da plazmalemmada doğrudan AsA'a indirgenebilir. Dehidroaskorbat ise yapraklarda veya diğer dokularda AsA'ın oksitlenmesi sonucu oluşur. DHA, DHA redüktaz tarafından AsA'a indirgenir. DHA redüktaz substrat olarak GSH kullanır ve glutatyon disülfid (GSSG) oluşturur.

GSSG glutasyon redüktaz tarafından katalizlenen reaksiyonla NADPH tarafından GSH'a indirgenir. Sonuçta askorbat-glutasyon döngüsü olarak bilinen seri reaksiyonlar sonucunda H₂O₂ temizlenir. Bu döngü sayesinde NADPH'dan elde edilen elektron ile H₂O₂, H₂O 'ya dönüştürülür ve hücrede AsA ya da GSH tükenmez (Noctor ve Foyer, 1998).

Bu çalışmada Cd' maruz bırakılan *Eruca sativa*'nın AsA, DHA ve bunların toplamı olan toplam AsA seviyelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir artış görülmemiştir. AsA tarafından, H₂O₂'nin temizlenmesinde bazıları antioksidan olan birçok molekül rol oynamaktadır. Bu nedenle Cd'a maruz kalan bitkilerdeki AsA seviyesinin kontrol grubu ile aynı kalması hakkında kesin bir yargıda bulunmak zordur.

5.6. Protein Olmayan Tiyol Grupları

Protein olmayan tiyol grupları birçok bitki, mikroorganizma ve memelide bulunur. Protein olmayan -SH grupları bitkilerde, glutasyon, homoglutasyon ve polimerize peptitler, fitoşelatinler ya da homofitoşelatinler şeklinde bulunur. Bu moleküller glutasyonun enzimatik polimerizasyonu ile sentezlenirler ve redoks dengesinin korunmasında kilit rol oynarlar (Ferrat ve ark., 2003).

Kadmiyum stresine maruz kalan bazı bitkilerde protein olmayan tiyol miktarı artış göstermiştir (Mishra ve ark. 2006; Tiryakioğlu ve ark. 2006) . Bu çalışmada Cd'a maruz bırakılan *Eruca sativa*'da protein olmayan tiyol miktarı 450 µg.g⁻¹ Cd uygulaması dışındaki diğer Cd uygulamalarında kontrol grubundan önemli bir farklılık göstermemiştir. 450 µg.g⁻¹ Cd çözeltisi verilen *Eruca sativa*'nın protein olmayan tiyol grubu seviyesi istatistiki olarak önemli oranda artmıştır.

5.7. Antioksidan Enzim Aktiviteleri

Antioksidan savunma sistemi, detoksifikasyon fonksiyonları yanında Cd toksisitesinin duyarlı bir hedefidir. Cd toksisitesinde, antioksidan yanıtlar bu antioksidan enzimlerin Cd toksisitesine olan duyarlılıkları ile ilgilidir (Iannelli ve ark., 2002).

Redoks aktif olmayan Cd, geçiş metalleri gibi Fenton reaksiyonları ile ROT oluşumunu sağlamaz. Cd, lipid peroksidasyonu, ROT oluşumunu kontrol altında tutan enzimlerin inaktivasyonu gibi dolaylı yollardan ROT üretimini artırır ve oksidatif strese neden olur (Sandalio ve ark., 2001; Schützendübel ve ark., 2001; Smeets ve ark., 2005).

Cd, *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus aureus* ve *Helianthus annuus*'da lipid peroksidasyonu arttırmış ve enzimatik antioksidan aktivitelerinde değişikliğe sebep olmuştur (Somashekaraiah ve ark., 1992; Shaw, 1995; Gallego ve ark., 1996).

5.7.1. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

SOD en etkili enzimatik antioksidanlardan birisidir ve $O_2^{\cdot-}$ 'in O_2 ve daha az reaktif olan H_2O_2 'e dismutasyonunu katalizler (Valko ve ark., 2006). SOD hücrede ROT'ne karşı ilk savunma hattını oluşturur (Alscher ve ark., 2002).

Farklı kadmiyum derişimlerine maruz kalan *Eruca sativa*'nın SOD aktivitelerinde kontrol grubuna göre önemli bir değişiklik görülmemiştir.

SOD aktivitesindeki değişiklikler oksidatif stresi belirtir (Zbigniew ve Wojciech, 2006).

Kadmiyuma maruz kalan *Cucumis sativus* fidelerinde SOD aktivitesi artış gösterirken *Vigna mungo* köklerinde azalmıştır (Gonçalves ve ark., 2007; Molina ve ark., 2008).

5.7.2. Katalaz Aktivitesi

Katalaz H_2O_2 'i, H_2O ve O_2 'e parçalayarak hücreyi bu radikalin zararlı etkilerinden korur (Gill ve Tuteja, 2010). Bu enzim mitokondri ve peroksizomlarda bulunur ve O_2 'e duyarlıdır. Cd stresinin, O_2 ' üretiminde artışa neden olması, CAT inaktivasyonuna neden olabilir. *Bacopa monnieri* L'de Cd'a maruz kalma sonucunda kök ve yapraklarda CAT aktivitesinde azalma gözlenmiştir (Mishra ve ark., 2006).

Kadmiyuma maruz bırakılan *Eruca sativa*'nın yapraklarında CAT aktivitesinde önemli ölçüde azalma görülmüştür. CAT aktivitesindeki azalma, Cd stresi altında hücrelerde O_2 ' derişiminin artması fakat bu radikali süpüren SOD enziminin aktivitesinde artış görülmemesi sonucu kontrol dışına çıkan O_2 ' seviyesinin CAT enzimini inhibe etmesine bağlanabilir.

5.7.3. Askorbat Peroksidaz Aktivitesi

Askorbat peroksidaz H_2O_2 'i iki molekül H_2O 'e indirgeyerek detoksifikasyonu sağlar (Noctor ve Foyer, 1998). APX kloroplastlarda askorbat-glutasyon döngüsünde görevlidir.

Kadmiyum stresi altında *Cucumis sativus* fidelerinde APX aktivitesi önemli ölçüde azalmıştır. $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ Cd'a maruz bırakılan fidelerde APX aktivitesinde %61, $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ Cd'a maruz bırakılan fidelerde APX aktivitesinde %85, $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ Cd'a maruz bırakılan fidelerde APX aktivitesinde %79 azalma görülmüştür (Gonçalves ve ark., 2007).

Araştırmamızda ise kadmiyum stresi altında *Eruca sativa* yapraklarında APX aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir. $75 \mu\text{g.g}^{-1}$, $150 \mu\text{g.g}^{-1}$, $300 \mu\text{g.g}^{-1}$, $450 \mu\text{g.g}^{-1}$ ve $600 \mu\text{g.g}^{-1}$ Cd'a maruz bırakılan *Eruca sativa* yapraklarındaki APX aktivitesi sırasıyla %30,6, %49,3, %80, %73,3 ve %53,3 azalmıştır.

Kadmiyum stresi altında APX aktivitesindeki azalma GSH'un tükenmesine bağlı olarak askorbat glutasyon döngüsünün detoksifikasyon kapasitesindeki düşmeden kaynaklanıyor olabilir. GSH kadmiyum iyonları ile kompleks oluşturarak onları şelatlar.

Bitkide Cd iyon derişimi ile GSH tüketimi doğru orantılıdır (Gomes-Junior ve ark., 2006).

5.7.4. Guaiacol Peroksidaz Aktivitesi

Guaiacol peroksidaz, çeşitli stresler şartları altında detoksifikasyonda rol oynamasının yanı sıra etilen biyosentezi, meyve gelişimi gibi bazı biyokimyasal ve fizyolojik süreçlerde de rol oynar. Yaklaşık olarak 50 kDa ağırlığa sahip bu enzimin bitkilerde birçok izoformu mevcuttur. Fakat bu izoenzimlerinin fonksiyonları kesin olarak bilinmemektedir (Jebara ve ark., 2005).

Kadmiyuma maruz bırakılan *Eruca sativa* yapraklarındaki GPOX aktivitelerinde azalma gözlenmiştir. 75 ve 600 $\mu\text{g.g}^{-1}$ Cd'a maruz bırakılan bitkilerde, GPOX aktivitesi kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalmıştır. 150, 300 ve 450 $\mu\text{g.g}^{-1}$ Cd'a maruz bırakılan bitkilerin GPOX aktiviteleri ile kontrol grubu ve 75 $\mu\text{g.g}^{-1}$ Cd uygulanan bitkilerin GPOX aktiviteleri arasında önemli bir fark yoktur. Diğer bazı araştırmacıların bulguları da araştırmamızdan elde ettiğimiz bulgularla uyumludur. Örneğin, *Pisum sativum*'da (Sandalio ve ark., 2001), *Hirschfeldia incana*'da (Aygün ve ark. 2011), *Picea abies* yapraklarında (Radotic ve ark., 2000), kadmiyum stresi GPOX aktivitesinin azalmaya sebep olmuş ya da önemli değişiklik olmamıştır. GPOX, hücre duvarına bağlı bir enzimdir (Mishra ve ark., 2006). *Eruca sativa* yapraklarında GPOX aktivitesindeki azalma görülmesinin sebebi yapraklarda fazla miktarda Cd birikmesi olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kadmiyum lipit peroksidasyonu dolaylı yollarla ROT üretimini arttırır ve oksidatif strese neden olur (Smeets ve ark., 2005).

Bu araştırmada *Eruca sativa* fideleri 75, 150, 300, 450 ve 600 $\mu\text{g.g}^{-1}$ Cd'a maruz bırakılmıştır. Uygulama sonucunda Cd'un yapraklardaki bazı fizyolojik ve biyokimyasal olaylar üzerine etkileri incelenmiştir.

Kadmiyum uygulaması yapraklardaki AA, DHA ve toplam AA miktarı ve SOD aktivitesinde değişikliğe neden olmamıştır. CAT, APX, GPOX aktivitelerinde, bitki su içeriğinde, taze ve kuru ağırlığında azalmaya neden olmuştur. Prolin, protein olmayan -SH grupları miktarı ve lipit peroksidasyonunda artışa neden olmuştur.

Kadmiyum, yaprak kıvrılması dışında morfolojik bir toksisite belirtisi göstermemiştir. Yapraklarda biriken Cd miktarı, köklerde tespit edilen Cd miktarından daha fazladır. Kökler vasıtasıyla alınan Cd yapraklara taşınmış ve bu organlarda biriktirilmiştir. TF'nün 600 $\mu\text{g.g}^{-1}$ Cd haricindeki uygulamalarda 1'den büyük olduğu belirlenmiştir. TF göz önüne alındığında bu bitkinin Cd biriktiricisi olduğu iddia edilebilir.

Son yıllarda topraklarda ağır metal kirliliği artış göstermiştir. Fitoremediasyon ile en tehlikeli ağır metallere biri olarak kabul edilen Cd'un topraklardan temizlenmesinde *Eruca sativa* kullanılmasını önerebiliriz.

İleride yapılacak çalışmalarda Cd'un yapraklara taşınma mekanizması, askorbat-glutatyon döngüsünün Cd detoksifikasyonundaki rolü ve Cd toksisitesine karşı bitkinin tolerans mekanizmasında rol oynaması muhtemel proteinlerin belirlenmesi yönünde araştırmalar devam etmelidir.

7. KAYNAKLAR

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymology*, 105, 121-126.
- Alscher, R. G., Erturk, N., Heath, L. S. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1331-1341.
- Apel, K. ve Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.
- Asada, K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol*, 141, 391-396.
- Aygun, S. F., Ozdener, Y., Aydin, B., Demir, E., Ustaosman, B. C. 2011. Copper effects on the antioxidative responses of copper-tolerant *Hirschfeldia incana* (L.) leaves. *Fresenius Environ. Bull.*, 20(8), 2050-2058
- Barcelo, J. ve Poschenrieder, C. 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: A review. *Journal of Plant Nutrition*, 13, 1-37.
- Bartosz, G. 1997. Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 49(1), 47-64.
- Beauchamp, C. ve Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44, 276-287.
- Benavides, M. P., Gallego, S. M., Tomara, M. L. 2005. Cadmium Toxicity in Plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, 17(1), 21-34.
- Bhattacharjee, S. 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science*, 89(7), 1113-1121.
- Britt, A. B. 1999. Molecular genetics of DNA repair in higher plants. *Trends in Plant Science*, 4(1), 20-25.
- Cataldo, D. A., Garland, T. R., Wildung, R. E. 1978. Nickel in plants; II. distribution and chemical form in soybean plants. *Plant Physiol*, 62, 566-570.
- Chaney, R. L., Malikz, M., Li, Y. M., Brown, S. L., Brewer, E. P., Angle, J. S., Baker, A. J. 1997. Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology*, 8, 279-284.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M. H., Ferjani, E. E. 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science*, 127, 139-147.
- Cho, U.-H. ve Seo, N.-H. 2005. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science*, 168, 113-120.

- Ci, D., Jiang, D., Wollenweber, B., Dai, T., Jing, Q., Cao, W. 2010. Cadmium stress in wheat seedlings: growth, cadmium accumulation and photosynthesis. *Acta Physiol Plant*, 32, 365-373.
- Claussen, W. 2005. Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Science*, 168, 241-248.
- Clemens, S., Palmgren, M. G., Krämer, U. 2002. A long way ahead: Understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science*, 7(7), 309-315.
- Colzi, I., Doumett, S., Bubba, M. D., Fornaini, J., Arnetalli, M., Gabrielli, R., Gonnelli, C. 2011. On the role of the cell wall in the phenomenon of copper tolerance in *Silene paradoxa* L. *Environmental and Experimental Botany*, 72, 77-83.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B., del Río, L. A. 2001. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science*, 6, 145-150.
- Çakmak, I. ve Marschner, H. 1992. Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathion reductase in bean leaves. *Plant Physiol*, 98, 1222-1227.
- Das, P., Samantaray, S., Rout, G. R. 1998. Studies on cadmium toxicity in plants: A review. *Environmental Pollution*, 98(1), 29-36.
- Davey, M. W., Montagu, M. V., Inze, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Fletcher, J. 2000. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J Sci Food Agric*, 80, 825-860.
- Davies, K. J. A. 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50, 279-289.
- de Knecht, J. A., Schat, H., Verkelij, J. A. C. 1995. Synthesis and degradation of phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Science*, 106(1), 9-18.
- Deckert, J. 2005. Cadmium toxicity in plants: Is there any analogy to its carcinogenic effect in mammalian cells? *BioMetals* 18, 475-481.
- del Rio, L. A., Corpas, F. J., Sandalio, L. M., Palma, J. M., Gomez, M., Barroso, J. B. 2002. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1255-1272.
- del Rio, L. A., Sandalino, L. M., Altomare, D. A., Zilinskas, B. A. 2003. Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*, 54(384), 923-933.
- Demirevska-Kepova, K., Smova-Stoilova, L., Stoyanova, Z., Hölzer, R., Feller, U. 2004. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environmental and Experimental Botany*, 52, 253-266.

- Drazkiewicz, M., Skorzynska-Polit, E., Krupa, Z. 2004. Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *BioMetals*, 17, 379-387.
- Duffus, J. H. 2002. "Heavy metals"—a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 74(5), 793-807.
- El-Jaoual, T. ve Cox, D. A. 1998. Manganese toxicity in plants. *Journal of Plant Nutrition*, 21(2), 353-386.
- Ferrat, L., Gnassia-Barelli, M., Pergent-Martini, C., Romeo, M. 2003. Mercury and non-protein thiol compounds in the seagrass *Posidonia oceanica*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 134, 147-155.
- Ferreira, R. R., Fornazier, R. F., Vitória, A. P., Lea, P. J., Azevedo, R. A. 2002. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. *Journal of Plant Nutrition*, 25(2), 327-342.
- Gallego, S. M., Benavides, M. P., Tomaro, M. L. 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science*, 121(2), 151-159.
- Garg, N. ve Manchanda, G. 2009. ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosys.*, 143, 8-96.
- Genestra, M. 2007. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling*, 19, 1808-1819.
- Giehl, R. F., Meda, A. R., Wiren, N. V. 2009. Moving up, down, and everywhere: signaling of micronutrients in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 320-327.
- Gill, S. S. ve Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Gisbert, C., Clemente, R., Navarro-Avino, J., Baixauli, C., Giner, A., Serrano, R., Bernal, M. P. 2004. Tolerance and accumulation of heavy metals by Brassicaceae species grown in contaminated soils from Mediterranean regions of Spain. *Environmental and Experimental Botany*, 56, 19-27.
- Gomes-Junior, R. A., Moldes, C. A., Delite, F. S., Pompeu, G. B., Gratao, P. L., Mazzafera, P., Azevedo, R. A. 2006. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere*, 65, 1330-1337.
- Gonçalves, J. F., Becker, A. G., Cargnelutti, D., Tabaldi, L. A., Pereira, L. B., Battisti, V., Schetinger, M. R. C. 2007. Cadmium toxicity causes oxidative stress and induces response of the antioxidant system in cucumber seedlings. *Braz. J. Plant Physiol.*, 19(3), 223-232.

- Greger, M. 1999. Metal availability, uptake, transport and accumulation in plants. *In Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems*. (Editörler: M. N. V. Prasad), s: 1-27, Springer-Verlag, Berlin.
- Gür, N., Topdemir, A., Munzurluoğlu, Ö., Çobanoğlu, D. 2004. Ağır Metal İyonlarının (Cu^{++} , Pb^{++} , Hg^{++} , Cd^{++}) *Clivia* sp. Bitkisi Polenlerinin Çimlenmesi ve Tüp Büyümesi Üzerine Etkileri. *F. Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(2), 177-182.
- Hall, J. L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 1-11.
- Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141, 312-322.
- Halliwell, B. ve Chirico, S. 1993. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 57(suppl), 715S-735S.
- Hasan, S. A., Hayat, S., Ali, B., Ahmad, A. 2008. 28-Homobrassinolide protects chickpea (*Cicer arietinum*) from cadmium toxicity by stimulating antioxidants. *Environmental Pollution*, 151, 60-66.
- Heath, R. L. ve Packer, K. 1968. Leaf senescence; correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 32, 93-101.
- Heath, R. L. ve Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys*, 125, 180-198.
- Hsu, Y. T. ve Kao, C. H. 2004. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, 42, 227-238.
- Iannelli, M. A., Pietrini, F., Fiore, L., Petrilli, L., Massacci, A. 2002. Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 40, 977-982.
- Jebara, S., Jebara, M., Limam, F., Aouani, M. E. 2005. Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Journal of Plant Physiology*, 162, 929-936.
- Kadioğlu, A. 2011. *Bitki Fizyolojisi*. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi-Biyoloji Bölümü, 419s, Trabzon.
- Kafadar, F. N. ve Saygideger, S. 2010. Gaziantep ilinde organize sanayi bölgesi atık suları ile sulanan bazı tarım bitkilerinde kurşun (Pb) miktarlarının belirlenmesi. *Ekoloji*, 19(75), 41-48.
- Kehrer, J. P. 2000. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149, 43-50.

- Kerkeb, L. ve Kramer, U. 2003. The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*. *Plant Physiology*, 131, 716-724.
- Khattab, H. 2004. Metabolic and oxidative responses associated with exposure of *Eruca sativa* (rocket) plants to different levels of selenium. *International journal of agruculture & biology*, 6(6), 1101-1106.
- Kishor, P. B. K., Sangam, S., Amrutha, R. N., Laxmi, P. S., Naidu, K. R., Rao, K. R. S. S., Sreenivasulu, N. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, 88(3), 424-438.
- Kliebenstein, D. J., Dietrich, R. A., Martin, A. C., Last, R. L. 1999. LSD1 regulates salicylic acid induction of copper zinc superoxide dismutase in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(11), 1022-1026.
- Kranner, I. ve Colville, L. 2011. Metals and seeds: Biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, 72, 93-105.
- Lagriffoul, A., Mocquot, B., Mench, M., Vangronsveld, J. 1998. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). *Plant and Soil*, 200, 241-250.
- Leita, L., Contin, M., Maggioni, A. 1991. Distribution of cadmium and induced Cd-binding proteins in roots, stems and leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Science*, 77(2), 139-147.
- León, A. M., Palma, J. M., Corpas, F. J., Gómez, M., Romero-Puertas, M. C., Chatterjee, D., Sandalio, L. M. 2002. Antioxidative enzymes in cultivars of pepper plants with different sensitivity to cadmium. *Plant Physiol. Biochem.*, 40, 813-820.
- Leyval, C., Turnau, K., Haselwandter, K. 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: Physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza*, 7, 139-153.
- Liu, J., Qian, M., Cai, G., Yang, J., Zhu, Q. 2007. Uptake and translocation of Cd in different rice cultivars and the relation with Cd accumulation in rice grain. *Journal of Hazardous Materials*, 143, 443-447.
- Masarovicova, E., Kralova, K., Kummerova, M. 2010. Principles of classification of medicinal plants as hyperaccumulators or excluders. *Acta Physiol Plant*, 32, 823-829.
- McDowell, J. M. ve Dangel, J. L. 2000. Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem. Sci*, 25, 79-82.

- Milone, M. T., Sgherri, C., Clijsters, H., Navari-Izzo, F. 2003. Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, 50, 265-276.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathia, R. D., Govindarajan, R., Kuriakose, S. V., Prasad, M. N. V. 2006. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, 25-37.
- Mobin, M. ve Khan, N. A. 2007. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *Journal of Plant Physiology*, 164, 601-610.
- Molina, A. S., Nievas, C., Chaca, M. a. V. n. P. r., Garibotto, F., Gonza'lez, U., Marsa, S. M., Zirulnik, F. 2008. Cadmium-induced oxidative damage and antioxidative defense mechanisms in *Vigna mungo* L. *Plant Growth Regulation*, 56, 285-295.
- Møller, I. M., Jensen, P. E., Hansson, A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 459-481.
- Monteiro, M. S., Santos, C., Soares, A. M. V. M., Mann, R. M. 2009. Assessment of biomarkers of cadmium stress in lettuce. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 811-818.
- Montillet, J.-L., Chammonpol, S., Rusterucci, C., Dat, J., Cotte, B. v. d., Agnel, J.-P., Triantaphylides, C. 2005. Fatty acid hydroperoxides and H₂O₂ in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 138, 1516-1526.
- Nakano, Y. ve Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22, 867-880.
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., Jacquot, J.-P. 2007. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 129, 185-195.
- Noctor, G. ve Foyer, C. H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49, 249-279.
- Nriagu, J. O. 2010. Global metal pollution: Poisoning the biosphere? *Environment: Science and Policy for Sustainable Development*, 32(7), 7-33.
- Ozdener, Y. ve Kutbay, H. G. 2009. Toxicity of copper, cadmium, nickel, lead and zinc on seed germination and seedling growth in *Eruca sativa*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 18(1), 26-31.
- Pinto, E., Sigaud-Kutner, T. C. S., Leitao, M. A. S., Okamoto, O. K., Morse, D., Colepicolo, P. 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.*, 39, 1008-1018.

- Polle, A., Otter, T., Siefert, F. 1994. Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiol*, 106, 53-60.
- Poschenrieder, C., Gunse, B., Barcelo, J. 1989. Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance, and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiol*, 90, 1365-1371.
- 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.
- Rascioa, N. ve Navari-Izzo, F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*, 180, 169-181.
- Riesena, O. ve Feller, U. 2005. Redistribution of nickel, cobalt, manganese, zinc, and cadmium via the phloem in young and maturing wheat. *Journal of Plant Nutrition*, 28(3), 421-430.
- Rivetta, A., Negrini, N. ve Cocucci, M. 1997. Involvement of Ca²⁺ calmodulin in Cd²⁺ toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant, Cell & Environment*, 20, 600-608.
- Rosa, G. d. I., Peralta-Videa, J. R., Montes, M., Parsons, J. G., Cano-Aguilera, I., Cano-Aguilera, I. 2004. Cadmium uptake and translocation in tumbleweed (*Salsola kali*), a potential Cd-hyperaccumulator desert plant species: ICP/OES and XAS studies. *Chemosphere*, 55, 1159-1168.
- Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gomez, M., Romero-Puertas, M. C., Rio, L. A. d. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*, 54, 2115-2126.
- Sanita di Toppi, L. ve 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.
- Schützendübel, A. ve Polle, A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1351-1365.
- Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D. L., Polle, A. 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. *Plant Physiology*, 127, 887-898.
- Shah, K. ve Dubey, R. S. 1997. Effect of cadmium on proline accumulation and ribonuclease activity in rice seedlings: role of proline as a possible enzyme protectant. *Biologia Plantarum*, 40(1), 121-130.

- Shah, K., Kumar, R. G., Verma, S., Dubey, R. S. 2001. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science*, 161, 1135-1144.
- Sharma, S. S. ve Dietz, K. J. 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in Plant Science*, 14(1), 43-50.
- Shaw, B. P. 1995. Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedlings of *Phaseolus aureus*. *Biologia Plantarum*, 13(4), 587-596.
- Shaw J., 1989. *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*. CRC Press, 268 s, Florida
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamoi, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., Yoshimura, K. 2002. Regulation and function ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1305-1319.
- Siedlecka, A. ve Krupa, Z. 1999. Cd/Fe interaction in higher plants - its consequences for the photosynthetic apparatus. *Photosynthetica*, 36(3), 321-331.
- Singh, S., Khan, N. A., Nazar, R., Anjum, N. A. 2008. Photosynthetic traits and activities of antioxidant enzymes in blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) under cadmium stress. *Am. J. Plant Physiol*, 3, 25-32.
- Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., Laere, A., ve JacoVangronsveld. 2005. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 437-444.
- Smirnoff, N., 2005. *Antioxidants And Reactive Oxygen Species In Plants*. Blackwell Publishing, 317 s, Chennai.
- 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 peroxides in chlorophyll degradation. *Physiologia Plantarum*, 85(1), 85-89.
- Sun, R.-L., Zhou, Q.-X., Sun, F.-H., Jin, C.-X. 2007. Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd-hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 468-476.
- Szabados, L. ve Savoure, A. 2009. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15(2), 89-97.
- Tu, C. ve Ma, L. Q. 2002. Effects of arsenic concentrations and forms on arsenic uptake by the hyperaccumulator ladder brake. *J. Environ. Qual.*, 31, 641-647.
- Tuteja, N., Ahmad, P., Panda, B. B., Tuteja, R. 2009. Genotoxic stress in plants: Shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutation Research*, 681, 134-149.

- Tuteja, N., Singh, M. B., Misra, M. K., Bhalla, P. L., Tuteja, R. 2001. molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 36(4), 337-397.
- Uraguchi, S., Mori, S., Kuramata, M., Kawasaki, A., Arao, T., Ishikawa, S. 2009. Root-to-shoot Cd translocation via the xylem is the major process determining shoot and grain cadmium accumulation in rice. *Journal of Experimental Botany*, 60(9), 2677-1688.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1-40.
- Vassilev, A., Tsonev, T., Yordanov, I. 1998. Physiological response of barley plants (*Hordeum vulgare*) to cadmium contamination in soil during ontogenesis. *Environmental Pollution*, 103, 287-293.
- Vatamaniuk, O. K., Marl, S., Lu, Y.-P., Rea, P. A. 2000. Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase. *The Journal Of Biological Chemistry*, 276, 31451-31459.
- Verkleij, J. A. C., Koevoets, P., Riet, J. V. t., Bank, R., Nijdam, Y., Ernst, W. H. O. 1990. Poly(γ -glutamylcysteinyl)glycines or phytochelatins and their role in cadmium tolerance of *Silene vulgaris*. *Plant, Cell & Environment*, 13(9), 913-921.
- Villamil, J. M. P., Perez-Garcia, F., Martinez-Laborde, J. B. 2002. Time of seed collection and germination in rocket, *Eruca vesicaria* (L.) Cav. (Brassicaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 45, 47-51.
- Vögeli-Lange, R., Wagner, G. J. 1996. Relationship between cadmium, glutathione and cadmium-binding peptides (phytochelatins) in leaves of intact tobacco seedlings. *Plant Science*, 114(1), 11-18.
- Vranova, E., Atichartpongkul, S., Villarreal, R., Montagu, M. V., Inze, D., Inze, D. 2002. Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. *PNAS*, 99(16), 10870-10875.
- Waters, E. R., Lee, G. J., Vierling, E. 1996. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany*, 47, 325-338.
- Wei, C.-Y. ve Chen, T.-B. 2006. Arsenic accumulation by two brake ferns growing on an arsenic mine and their potential in phytoremediation. *Chemosphere*, 63, 1048-1053.
- Wise, R. R. ve Naylor, A. W. 1987. Chilling-enhanced photooxidation. Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant Physiol*, 83, 278-282.

- Wiseman, H. ve Halliwell, B. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.*, 313, 17-29.
- Wu, F.-B., Dong, J., Qian, Q. Q., Zhang, G.-P. 2005. Subcellular distribution and chemical form of Cd and Cd-Zn interaction in different barley genotypes. *Chemosphere*, 60, 1437-1446.
- Xiong, Z.-T. 1998. Lead uptake and effects on seed germination and plant growth in a Pb hyperaccumulator *Brassica pekinensis* Rupr. *Environmental Contamination and Toxicology*, 60, 285-291.
- Yang, X., Baligar, V. C., Martens, D. C., Clark, R. B. 1996. Cadmium effects on influx and transport of mineral nutrients in plant species. *Journal of Plant Nutrition*, 19, 643-656.
- Zbigniew, T., Wojciech, P. 2006. Individual and combined effect of anthracene, cadmium, and chloridazone on growth and activity of SOD izoformes in three *Scenedesmus* species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65, 323-331.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ahmet SAĞIROĞLU

Doğum Yeri : İstanbul

Doğum Tarihi : 06.09.1988

Medeni Hali : Bekâr

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu :

- Plevne Lisesi- (2002–2005)
- Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü – (2005–2009)
- Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü – (2010-)

İletişim Bilgileri :

GSM Tel : 0 555 639 05 42

e-mail : a.sagiroglu@hotmail.com.tr

Adres : Ulugazi Mahallesi Dar Sokak No:14 İlkadım / SAMSUN