

**SALİSİLİK ASİDİN KADMIYUM TOKSİSİTESİ
ALTINDAKİ BUĞDAYLARDA APOPLASTİK
ANTİOKSİDATİF SİSTEM ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Deniz TİRYAKİ

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Ökkeş ATICI**

**2009
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SALİSİLİK ASİDİN KADMIYUM TOKSİSİTESİ ALTINDAKİ
BUĞDAYLARDA APOPLASTİK ANTİOKSİDATİF SİSTEM
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Deniz TİRYAKİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ERZURUM
2009**

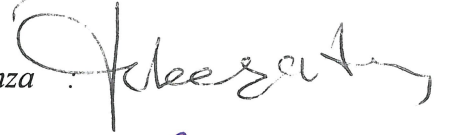
Her hakkı saklıdır

Doç. Dr. Ökkeş ATICI danışmanlığında Deniz TİRYAKİ tarafından hazırlanan bu çalışma 20/08/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Ökkeş ATICI

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Yusuf KAYA

İmza : 

Yukarıdaki sonucu onaylarım

(İmza)

Prof. Dr. Ömer AKBULUT

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SALİSİLİK ASİDİN KADMIYUM TOKSİSİTESİ ALTINDAKİ BUĞDAYLARDA APOPLASTİK ANTİOKSİDATİF SİSTEM ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Deniz TİRYAKİ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ökkeş ATICI

Bu araştırmada salisilik asit (SA) uygulamasının, kadmiyum (Cd) stresine maruz bırakılmış buğdayın (*Triticum aestivum* L.) iki farklı çeşidine (Bolal ve Doğu-88) ait yaprak ve köklerdeki apoplastik antioksidan enzim (katalaz, peroksidaz ve süperoksit dismutaz) aktiviteleri ile lipid peroksidasyonu ve hidrojen peroksit miktarı üzerine etkileri araştırılmıştır. Bitkiler 22/20°C’de toplam onsekiz gün büyütülmüşlerdir. Bitki yapraklarına onikinci gün farklı konsantrasyonlarda (0.01, 0.1, 1 mM) SA uygulanmış ve bundan 3 gün sonra, bitkilerin yetiştiği ortama farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 100 µM) Cd uygulanmıştır. On sekizinci gün bitki yaprak ve kökleri araştırmamızda deney materyali olarak kullanılmışlardır.

SA uygulamaları, katalaz (CAT) aktivitesini 50 ve 100 µM Cd’de Bolal yapraklarında artırırken, Doğu-88’de sadece 50 µM Cd’e maruz kalmış bitki yapraklarında artırmıştır. Köklerde ise, SA Bolal’da 25 µM Cd’de aktiviteyi artırmış, 100 µM’da düşürmüştür. SA, Doğu-88’de bütün Cd uygulamalarında CAT aktivitesini düşürmüştür. SA uygulamaları, POX aktivitesini 25, 50 ve 100 µM Cd’e maruz kalmış Bolal yapraklarında düşürürken, Doğu-88 ise artırmıştır. Kökte ise SA, 25 ve 50 µM Cd’de Bolal’da aktiviteyi artırırken, Doğu-88’de ise düşürmüştür. 100 µM Cd’de 0.01 ve 0.1 mM SA, Bolal’da aktiviteyi azaltırken, 1 mM SA artırmıştır. Ancak, SA uygulamalarının bütünü 100 µM Cd etkisi altındaki Doğu-88’de aktiviteyi düşürmüştür. SA uygulamalarının bütünü, 25 ve 50 µM Cd’e maruz kalmış Bolal ve Doğu-88 yapraklarında SOD aktivitesini genelde artırmıştır. Ancak, , 100 µM Cd’de Bolal yapraklarında aktiviteyi düşürürken, Doğu-88’de değiştirmemiştir. Kökte ise SA uygulamaları, 25 ve 50 µM Cd etkisine maruz kalmış Bolal’da aktiviteyi artırırken, Doğu- 88’de genelde düşürmüştür. Buna karşılık SA, 100 µM Cd’de Bolal’da aktiviteyi düşürürken, Doğu-88’de ise artırmıştır. SA uygulamaları, 25, 50 ve 100 µM Cd etkisi altındaki buğdayın Bolal çeşidinde lipid peroksidasyonunu (LPO) düşürürken, Doğu-88’de artırmıştır. SA uygulamaları H₂O₂ içeriğinde farklı bir etkiye sebep olmuştur. 25 µM Cd’de Bolal yapraklarında SA’nın 3 konsantrasyonunda H₂O₂ miktarını artırmıştır. Doğu-88 yapraklarında ise 0.1 mM SA H₂O₂ miktarında bir artış meydana getirmiştir. SA 50 µM Cd’de Bolal ve Doğu-88 yapraklarında H₂O₂ miktarını artırmıştır. 100 µM Cd’de Bolal yapraklarında 0.01 ve 0.1 mM SA uygulamaları aktiviteyi artırırken, 1 mM ise düşürmüştür. Doğu-88’de ise SA, aktiviteyi değiştirmemiştir. Sonuç olarak, bitkiler Cd stresine maruz kalmadan uygulanan SA, hem apoplastik antioksidatif enzimleri hem de LPO ve H₂O₂ miktarlarını düzenleyerek bir koruma sağlayabildiği görülmektedir. Ancak, buradan bu etkinin, bir türe ait çeşitler arasında farklı derecelerde olabileceği sonucu çıkmaktadır.

2009, 76 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Apoplast,, antioksidant enzim , katalaz, peroksidaz, süperoksit dismutaz.

ABSTRACT

MS Thesis

THE INVESTIGATION OF SALICYLIC ACID EFFECTS ON THE APOPLASTIC ANTIOXIDATIVE SYSTEM ON THE WHEAT UNDER CADMIUM TOXICITY

Deniz TİRYAKİ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ökkeş ATICI

In the study, the effects of salicylic acid (SA) application on apoplastic antioxidant enzymes (catalase, peroxidase, superoxide dismutase) activities with lipid peroxidation and hydrogen peroxide amount of two different kinds of (Bolal and Doğu-88) of wheat which were exposed to cadmium (Cd) stress were investigated. The plants were grown 22/20 °C for 18 days. The SA was applied on the plant leaves at 12th day in different concentrations (0.01, 0.1, 1mM) and after three days the different concentrations (25, 50, 100µM) of Cd were applied to the plants' growing media. The plants leaves and roots were used to as experiment material at 18th day. The SA applications increased the CAT (catalase) activity with the exposure of Cd at 50 and 100 µM for Bolal leaves while increasing only 50 µM of Cd for Doğu-88. However at the roots, SA increased at 25 µM of Cd at Bolal, decreased at 100 µM. SA decreased CAT activity for all of the Cd exposures. SA applications decreased the POX (peroxidase) activity at Bolal leaves which were exposed to 25, 50, 100 µM of Cd, while increased at Doğu-88. However the application of SA at the root, the exposure of Cd at 25 and 50 µM increased the activity at Bolal while decreased at Doğu-88. While 0.01, 0.1 mM of SA at the exposure of 100 µM Cd decreased the activity at Bolal, 1mM of SA increased. But, the whole applications of SA decreased the activity at Doğu-88 that were exposed of 100 µM Cd. All of the SA applications generally increased the SOD (superoxide dismutase) activity at Bolal and Doğu-88 leaves that were the exposure of 100 µM Cd didn't change the activity at Doğu-88, while decreased at Bolal leaves. The applications of SA at the roots, the exposure of 25 and 50 µM Cd generally decreased the activity at Doğu-88 while increased at Bolal. On the contrary this SA decreased the activity at Bolal for 100 µM Cd while increased Doğu-88. SA applications decreased the LPO (lipid peroxidation) at Bolal leaves which were exposed to 25, 50, 100 µM of Cd, while increased at Doğu-88. The SA applications caused a different effect on the concentration of H₂O₂ (hydrogen peroxide). At the exposure of 25 µM Cd the three concentration of SA also increased the H₂O₂ amount at Bolal leaves. However 0.1mM of SA application caused on increase at H₂O₂ amount at Doğu-88 leaves SA increased both of the Bolal and Doğu-88 leaves at the exposure of 50 µM Cd. While 0.01 and 0.1 mM SA applications increased the activity, 1 mM decrease at the exposure of 100 µM Cd. SA didn't change the activity at Doğu-88. As a result, it is seen that the SA applications to the plants without exposing to the Cd, could ensure a protection by regulating both of the apoplastic antioxidative enzymes and LPO and H₂O₂ amounts. But from this study there is a conclusion that, this effect could be at different grades among kinds belonging a species.

2009, 76 Pages

Keywords: Apoplast, antioxidant enzyme, catalase, peroxidase, superoxide dismutase.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada her an bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ökkeş ATICI'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında bölüm imkânlarından faydalanmamı sağlayan Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. Faruk ALGUR'a teşekkür ederim.

İlgi, yardım ve desteğini gördüğüm Salih MUTLU'ya, Sayın Arş. Gör. Özden CANLI'ya, Sayın Arş. Gör. Serkan ERDAL'a, Sayın Arş. Gör. Nevzat ESİM'e, Özkan KAYA'ya, tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca her an maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme şükranlarımı sunarım.

Deniz TİRYAKİ

Temmuz 2009

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	14
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	19
3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar	19
3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları	19
3.2.1. Kullanılan mikroorganizmanın izolasyonu ve identifikasyonu.....	23
3.3. Yöntemler	22
3.3.1. Bitkilerin büyütülmesi	22
3.3.2. Apoplastik proteinlerin ekstraksiyonu ve izolasyonu.....	23
3.3.3. Yaprak ve köklerde apoplastik antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi	24
3.3.3.a Katalaz aktivitesinin belirlenmesi	24
3.3.3.b. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi	25
3.3.3.c. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi	26
3.3.4. Kök ve yapraklarda hidrojen peroksit miktarının belirlenmesi.....	26
3.3.5. Kök ve yapraklarda lipid peroksidasyonunun belirlenmesi	27
3.4. İstatistik Analiz	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	29
4.1. Apoplastik Enzim Aktivitesi Sonuçları	29
4.1.1. Katalaz Aktivitesi Sonuçları.....	29
4.1.1.a. Bolal çeşidine ait yaprak ve köklerden elde edilen sonuçlar.....	29

4.1.1.b. Doğu-88 çeşidine ait yaprak ve köklerden elde edilen sonuçlar	33
4.1.2. Peroksidaz Aktivitesi Sonuçları	36
4.1.2.a. Bolal çeşidine ait yaprak ve köklerden elde edilen sonuçlar	36
4.1.2.b. Doğu-88 çeşidine ait yaprak ve köklerden elde edilen sonuçlar	39
4.1.3. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Sonuçları	42
4.1.3.a. Bolal çeşidine ait yaprak ve köklerden elde edilen sonuçlar.....	42
4.1.3.b. Doğu-88 çeşidine ait yaprak ve köklerden elde edilen sonuçlar	45
4.2. H ₂ O ₂ (Hidrojen peroksit) Miktarı Sonuçları.....	48
4.2.1. Bolal çeşidine ait yapraklardan elde edilen sonuçlar.....	48
4.2.2. Doğu-88 çeşidine ait yaprak ve köklerden elde edilen sonuçlar	50
4.3. Lipid Peroksidasyonu (LPO) Seviyesi Sonuçları.....	52
4.3.1. Bolal çeşidine ait yapraklardan elde edilen sonuçlar.....	52
4.3.2. Doğu-88 çeşidine ait yapraklardan elde edilen sonuçlar	54
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	56
5.1. Salisilik Asidin Apoplastik Katalaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	57
5.2. Salisilik Asidin Apoplastik Peroksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	59
5.3. Salisilik Asidin Apoplastik Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Üzerine Etkisi	60
5.4. Salisilik Asidin Hidrojen Peroksit Birikimi Üzerine Etkisi	62
5.5. Salisilik Asidin Lipid Peroksidasyonu Seviyesi Üzerine Etkisi.....	62
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	77

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

APX	:	Askorbat peroksidaz
CAT	:	Katalaz
EDTA	:	Etilendiamin tetra asetik asit
E.C	:	Enzim kod numarası
E.Ü	:	Enzim ünitesi
GR	:	Glutasyon redüktaz
kDA	:	Kilo dalton
mM	:	Milimolar
NBT	:	Nitroblue tetrazolium klorür
OH [·]	:	Hidroksil radikali
POX	:	Peroksidaz
PVP	:	Polivinilpirrolidon
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
rpm	:	Devir/dakika
SA	:	Salisilik asit
SOD	:	Süperoksit dismutaz
TBA	:	Tiobarbutirik asit
TCA	:	Trikloroasetik asit
<i>x g</i>	:	Yerçekimi ivmesinin katı
µL	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Düşük sıcaklığa maruz kalmış bir yaprakta simplastik bölgedeki suyun apoplastik bölgelere gönderilmesi ile apoplastik bölgede buz oluşumu	12
Şekil 3.1. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik	25
Şekil 4.1. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Bolal yapraklarında apoplastik katalaz aktivitesine etkileri.....	31
Şekil 4.2. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Bolal köklerinde apoplastik katalaz aktivitesi üzerine etkileri.....	32
Şekil 4.3. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Doğu-88 yapraklarında apoplastik katalaz aktivitesi üzerine etkileri.....	34
Şekil 4.4. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Doğu-88 köklerinde apoplastik katalaz aktivitesi üzerine etkileri.....	35
Şekil 4.5. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Bolal yapraklarında apoplastik peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri.....	37
Şekil 4.6. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Bolal köklerinde apoplastik peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri.....	38
Şekil 4.7. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Doğu-88 yapraklarında apoplastik peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri....	40
Şekil 4.8. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Doğu-88 köklerinde apoplastik peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri.....	41
Şekil 4.9. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Bolal yapraklarında apoplastik süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkileri.....	43
Şekil 4.10. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Bolal köklerinde apoplastik süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkileri.....	44
Şekil 4.11. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Doğu-88 yapraklarında apoplastik süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkileri	46

Şekil 4.12. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv Doğu-88 köklerinde apoplastik süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkileri	47
Şekil 4.13. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Bolal yapraklarında H ₂ O ₂ miktarı üzerine etkileri.....	49
Şekil 4.14. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Doğu-88 yapraklarında H ₂ O ₂ miktarı üzerine etkileri.....	51
Şekil 4.15. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Bolal yapraklarında lipid peroksidasyonu üzerine etkileri.....	53
Şekil 4.16. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Doğu-88 yapraklarında lipid peroksidasyonu üzerine etkileri.....	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Bitkiler için başlıca stres kaynakları	2
Çizelge 4.1. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Bolal yapraklarında apoplastik katalaz aktivitesi üzerine etkileri.....	31
Çizelge 4.2. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Bolal köklerinde apoplastik katalaz aktivitesi üzerine etkileri.....	32
Çizelge 4.3. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Doğu-88 yapraklarında apoplastik katalaz aktivitesi üzerine etkileri.....	34
Çizelge 4.4. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Doğu-88 köklerinde apoplastik katalaz aktivitesi üzerine etkileri.....	35
Çizelge 4.5. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Bolal yapraklarında apoplastik peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri.....	37
Çizelge 4.6. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Bolal köklerinde apoplastik peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri.....	38
Çizelge 4.7. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Doğu-88 yapraklarında apoplastik peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri.....	40
Çizelge 4.8. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Doğu-88. köklerinde apoplastik peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri	41
Çizelge 4.9. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Bolal. yapraklarında apoplastik süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkileri	43
Çizelge 4.10. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Bolal köklerinde apoplastik süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkileri.....	44
Çizelge 4.11. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Doğu-88 yapraklarında apoplastik süperoksit dismutaz. aktivitesi üzerine etkileri	46
Çizelge 4.12. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv. Doğu-88 köklerinde apoplastik süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkileri.....	47

Çizelge 4.13. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv	
Bolal yapraklarında H ₂ O ₂ miktarı üzerine etkileri	49
Çizelge 4.14. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv.	
Doğu-88 yapraklarında H ₂ O ₂ miktarı üzerine etkileri.....	51
Çizelge 4.15. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv.	
Bolal yapraklarında lipid peroksidasyonu	
üzerine etkileri.....	53
Çizelge 4.16. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış <i>T. aestivum</i> cv.	
Doğu-88 yapraklarında lipid peroksidasyonu	
üzerine etkileri.....	55

1. GİRİŞ

Bitkiler, yaşamlarının her döneminde yaşadıkları çevrelerde büyüme ve gelişme şanslarını kısıtlayıcı pek çok olumsuz şartlara maruz kalarak strese girebilirler. **Stres** ise bitki biyolojisinde tanımı güç olan kavramlardan biridir. Yapılan birçok tanımının yanında kısaca; bitkilerde zarar meydana getiren güç (potansiyel) olarak tanımlanmıştır. Bu zarar metabolizmanın bozulması sonucu açığa çıkar ve sonuçta; bir bitkinin veya bitki organlarının büyüme, gelişme ve hatta verimliliğinde azalmaya neden olur. Bitkiler streslere karşı, birçok mekanizmanın yanında, biyokimyasal ve fizyolojik mekanizmalarını devreye sokarak cevap verirler. Bu mekanizmaların tepkileri sınırlı olması hesabiyle, bitkiler bir veya daha fazla olumsuz şartlara karşı sınırlı bir cevap kapasitesine sahiptirler (Hale and Orcutt 1987; Kocaçalışkan 2004).

Canlıların stressiz bir ortamda yaşamaları nadir bir olaydır. Bu ancak laboratuvar koşullarında sağlanabilir. Bu durumda sıfır stres denilen bir olaydan söz edilir. **Sıfır stres**, canlılarda hasar meydana getirmeyen, verim ve kalitede bir azalmaya yol açmayan bir ortamda yaşamayla sağlanır. Bu durum bitkiler açısından büyüme için optimum şartlarla sağlanabilir. Bitkiler üzerinde stresin dereceleri geniş sınırlar içerisinde dağılım gösterir ve sıfır stresten, ılımlı ve şiddetli strese kadar çok değişken dereceleri bulunur. Stresin derecesi bitki türüne göre de değişebilmektedir. Yani bir bitki türünde yüksek derecede strese sebep olan bir faktör, diğer bitki türünde ılımlı strese sebep olabilir. Stres dayanıklılığı, bitkinin büyüme ve gelişme dönemine göre de değişebilir. Bazı durumlarda bir bitkinin bütünü veya bir kısmı strese karşı dirençli olabilirken, diğer bazı kısımları ise strese daha duyarlı olabilmektedir (Hale and Orcutt 1987; Salisbury and Ross 1992; Kocaçalışkan 2004). Birçok bitki, stresin öldürücü olmayan dozlarına maruz kaldıktan sonra strese daha dayanıklı olabilir. Bu olay **kuvvetlenme** (hardening) veya aklimasyon safhası olarak adlandırılır. Strese dayanıklılığın belli başlı iki tipinden birisi **sakınma** ve diğeri de **toleranstır**. **Sakınma**, dış çevrede stres oluşturabilecek koşullar olmasına rağmen, bitki hücrelerini stres altına sokmayan bir iç ortam sağlanmasıdır. **Tolerans** ise aşırı dış stres şartlarında işlevliğini

ya da canlılığını devam ettirme yani strese dayanma kapasitesidir. Bir bitki üzerinde stres oluşturan bir ortam diğeri için stres oluşturmaz. Örneğin; bezelye (*Pisum sativum*) ve soya fasulyesi (*Glycine max*) en iyi büyümeyi sırasıyla 20°C ve 30°C'lik sıcaklıklarda gösterirler. Sıcaklık arttıkça, ısı stresinin etkileri bezelyede soya fasulyesinden önce ortaya çıkar. Yani, soya fasulyesinin ısı stresine toleransı daha yüksektir (Kocaçalışkan 2004).

Bir ekosistemde bitkilere etkileyen pek çok stres kaynakları bulunabilir. Bunlar fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üç gruba ayrılabilir (Çizelge 1.1) (Kocaçalışkan 2004; Kadioğlu 2004).

Çizelge 1.1. Bitkiler için başlıca stres kaynakları

FİZİKSEL STRESLER	KİMYASAL STRESLER	BİYOLOJİK STRESLER
Kuraklık	Hava kirliliği	Rekabet
Sıcaklık	Allelokimyasallar	Allelopati
Radyasyon	Besinler (inorganik mad.)	Simbiyosis
Sel	Pestisitler, toksinler	İnsan tahribi
Makineler, elektrik	Tuzlar	Hastalık etkenleri
Manyetik alan, rüzgâr	Toprağın pH'sı	Böcekler

Dünya topraklarının %25'nin mineral eksikliği yönünden stres doğuracak durumda olduğu belirlenmiştir. Bu stresin etkisi bitkilerde mineral maddelerin eksikliği veya fazlalığı yüzünden ortaya çıkabilir. Doğadaki elementlerden 16 tanesinin bitkiler için esas element olduğu kabul edilmektedir. Bunlar bitki büyümesi için gerekli ve zorunlu olan elementlerdir. Bunların bir kısmı bitki dokularında bol miktarda bulunan makro

elementlerken (C, H, O, N, P, K, S, Ca, Mg), bir kısmı ise çok az miktarda bulunan mikro elementlerdir (B, Cu, Zn, Fe, Mn, Cl, Mo). Bu elementlerin eksikliğinde yetersiz beslenme yüzünden ve fazlalığında ise toksik etki yüzünden stres oluşur. Bitkilerde strese neden olan elementler daha çok topraktan alınanlardır. Bunların strese neden olmaları çeşitli faktörlere bağlıdır (Kadioğlu 1999; Kocaçalışkan 2001):

- 1- Minerallerin topraktaki miktarı (azlığı – fazlalığı),
- 2- Topraktaki formu (alınış formunun bulunamaması – eksiklik),
- 3- Minerallerin bitkilere faydalı olabilmesi için geçirecekleri kimyasal değişiklikler,
- 4- Toprak çözeltisinin su miktarı,
- 5- Toprağın pH'sı (elementlerin pH'ya göre çözünmesi),
- 6- Minerallerin absorpsiyonu ve taşınması.

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

Toksik bir ağır metal olan **kadmiyumun (Cd)** bitki metabolizmasında çok önemli zararlara ve oksidatif strese neden olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir (Schützendübel *et al.* 2001; Vitoria *et al.* 2001; Benavides *et al.* 2005; Gratao *et al.* 2005). Bitkilerde Cd çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik süreçleri bozar, hücre ölümüne ve büyümenin engellenmesine neden olur (Chaoui *et al.* 1997; Toppi and Gabrielli, 1999; Sandalio *et al.* 2001; Guo *et al.* 2009; Popova *et al.* 2009; Xu *et al.* 2009). Mısır, pirinç ve buğdayın Cd'e toleransları karşılaştırıldığında, mısırdaki Cd'nin diğer iki türden daha az biriktiği belirlenmiştir (Wojcik and Tukendorf 1999). Cd'nin doğrudan veya dolaylı olarak fotosentetik süreci engellediği de gösterilmiştir (Krupa and Baszynski 1995). Salisilik asit (SA), Cd toksisitesini arpa (Metwally *et al.* 2003), soya fasulyesi (Drazic and Mihailovic 2005) ve pirinç (Guo *et al.* 2007a) gibi bitki türlerinde

azaltabilmektedir. Ayçiçeğinde Cd süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) ve glutatyon redüktaz (GR) aktivitelerini azalttığı, lipid peroksidasyon sürecini başlattığı ileri sürülmüştür (Gallego *et al.* 1996). Lipit peroksidasyonunun başlaması Cd toksisitesi altındaki *Phaseolus vulgaris* ve *Phaseolus aureus*'da görülmüştür (Lozano-Rodriguez *et al.* 1997).

Çevresel streslerin bitki metabolizmasında ortaya çıkardığı en önemli sorunlardan birisi '**Reaktif Oksijen Türlerinin**' (ROS) oluşumuna sebep olmalarıdır. ROS yüksek derecede reaktiftir ve bitkiler için toksiktir ayrıca proteinler, lipitler, DNA ve karbohidratlara zarar vererek hücre ölümüne neden olabilir (Noctor and Foyer 1998; Apel and Hirt 2004; Banu *et al.* 2009; Guo *et al.* 2009). ROS, hücrelerdeki savunmaya bağlı genlerin indüksiyonu için yayılabilir bir sinyal olarak çalışır. ROS bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok reaktif moleküller olarak tanımlanabilir. Reaktif oksijen türleri (veya serbest radikaller) arasında hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) gibileri sayılabilir. Hidrojen peroksit, çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal süreçlere aracılık eder (Neill *et al.* 2002; Bright *et al.* 2006; McInnis *et al.* 2006). İlginç bir şekilde hidrojen peroksit, antioksidan enzimlerde çoğalmaya neden olur (Pastori and Trippi 1992; Sairam and Srivastava 2000). Bitkiler, hücrelerini oksidatif hasardan koruyan antioksidan sistemler ile birlikte, ROS'un seviyesini kontrol eden ve bunların normal formlarına dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimlere sahiptir. Süperoksit gruplarından hızlı bir şekilde oluşan singlet oksijen (1O_2), hücre zarlarının glikolipid, fosfolipid, sterol ve gliserid yapısındaki doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girerek peroksitler, aldehitler, hidroksi yağ asitleri ve pentan gibi çeşitli lipid peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Son derece aktif olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu ($O_2^{\cdot-}$), bakır içeren bir enzim olan süperoksit dismutaz enzimiyle H_2O_2 ve oksijene çevrilir. Süperoksit grubuna göre daha az etkili olan hidrojen peroksit (H_2O_2), oksijenin enzimatik olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyon tepkimeleri sonucu oluşur. Süperoksitin olduğu yerlerde (peroksizomlar, elektron taşıma zinciri, plazma membranı, ekstraselüler matriks) önemli miktarda H_2O_2 'de üretilir (Slesak *et al.* 2007).

Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz. H_2O_2 'nin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni demir ve bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalının öncülü olarak davranmasıdır. H_2O_2 özellikle proteinlerdeki *HEM* grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H_2O_2 'nin ortamdan uzaklaştırılması gerekir (Halliwell 1994; Güler 2008). Bu görevi katalaz ve peroksidaz gibi antioksidan enzimler su ve oksijen gibi ürünlere dönüştürerek yerine getirir. Oksidatif streslere tolerans sağlamada bitkilerin bu enzimlerin hücresel seviyelerini düzenlenmesi oldukça önemlidir (Gechev *et al.* 2002; Minibaeva and Gordon 2003a; Mutlu 2005).

Oksidatif stres, biyotik ve abiyotik stres koşullarında ortaya çıkan temel bir faktördür ve reaktif oksijen türleri ile antioksidan savunma arasında belirgin bir dengesizlik olduğu zaman meydana gelir (Foyer and Noctor 2000). Oksidatif stres, çeşitli bitkilerde düşük sıcaklık (Taşgın *et al.* 2006), kuraklık (Menconi *et al.* 1995; Sairam *et al.* 1998, 2001), yüksek sıcaklık (Davidson *et al.* 1996; Sairam *et al.* 2000) ve ağır metal (Schützendübel *et al.* 2001) streslerine bir cevap olarak ortaya çıktığı rapor edilmiştir.

Oksijen radikalleri içerisinde en aktif ve en toksik olanı **hidroksil radikali ($\cdot OH$)**'dir. Üretildiği her yerde birçok molekül ile reaksiyon verir. Hidroksil radikali, iyonlaştırıcı radyasyonun (x-ışınları) etkisiyle su moleküllerinin homolitik kırılması sonucunda olduğu gibi hidrojen peroksit molekülünün metaller ile reaksiyonu sonucunda eksik indirgenmesi ile de oluşabilir (Stahl and Sies 2002). Biyolojik sistemlerin tanıdığı en reaktif tür olan $\cdot OH$, su dahil rastladığı her molekülle tepkimeye girebilir. Bütün bu tepkimeler $\cdot OH$ 'in paylaşılmamış elektron içeren dış orbitaline elektron alma ilgisinden kaynaklanır (Halliwell 1994). Hidroksil radikalının sebep olduğu en önemli hasar, lipid peroksidasyonu olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonudur. $\cdot OH$ 'in başlıca hedefi doymamış yağ asitleridir ve zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozar

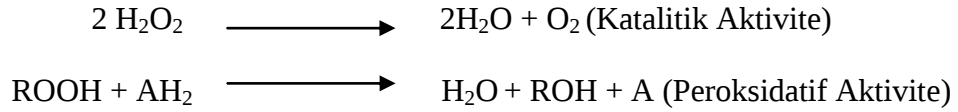
ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilir (Nishiyama *et al.* 1998; Güler 2008).

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

Lipid hidroperoksitlerinin yıkımı ile oluşan ve biyolojik olarak reaktif olan aldehitler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren (poliansature) yağ asitlerinin peroksidasyonunda, malondialdehid (MDA) meydana gelir (Yılmaz vd 2003). MDA yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir, fakat lipid peroksidasyonunun derecesi ile iyi bir korelasyon gösterir. Bu sebeple organizmada oluşan LPO düzeyini ölçmek için MDA seviyelerinin ölçümü sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) ile pembe

renkli bir kompleks oluşturmakta ve oluşan bu çözeltinin absorbans değerlerinden LPO'nun derecesi saptanabilmektedir (Yılmaz vd 2003; Kuru 2007).

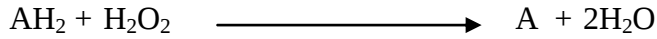
Bir antioksidan enzim olan **katalaz** (CAT) (Hidrojen Peroksit: Hidrojen Peroksit Oksidoredüktaz, E.C.1.11.1.6) yüksek konsantrasyondaki H_2O_2 'nin 2 elektronunu kullanarak su ve oksijene indirgenmesini katalizleyen demir porfirin içeren tetramerik ve yüksek molekül ağırlığına sahip bir enzimdir (McClung 1997; Chaudiere and Ferrari 1999). Aynı zamanda CAT, düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında alkoller, askorbat ve fenol içeren indirgenmiş substratları kullanarak peroksidatif aktivite gösterebilir (Chaudiere and Ferrari 1999). CAT'ın görev aldığı reaksiyonlar aşağıdaki gibi özetlenebilir.



CAT farklı bitki dokularında farklı oranlarda dağılım göstermektedir. CAT aktivitesi yulaf tanesi, arpa, domates yaprakları (Vanacker *et al.* 1998a,b, 1999; Patykowski and Urbanek 2003) ve soğan köklerinin (Cordoba- Pedregosa *et al.* 2003) apoplastik ve simplastik bölgesinde belirlenmiştir. Pek çok bitki hücresinde enzimin büyük bir kısmı, H_2O_2 'nin yüksek olduğu prokizomlarda bulunur. CAT çok az miktarda mitokondri matriksinde de belirlenmiştir. CAT'ın bitki dokusunda da H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Patykowski and Urbanek 2003).Yapılan çalışmalar sonucunda, CAT bitki yapraklarının apoplastlarında da bulunabildiği belirlenmiştir (Edwards *et al.* 1991; Wingsle *et al.* 1991; Vanacker *et al.* 1998; Taşğın *et al.* 2006; Mutlu *et al.* 2009). CAT, solunum zincirinde, oksijenin eksik indirgenmesinden oluşan H_2O_2 'yi O_2 'ye indirger (Chaudiere and Ferrari 1999). CAT'ın hücrelerdeki temel fonksiyonu, moleküler O_2 mevcudiyetinde metabolizmanın bazı kademelerinde üretilen, H_2O_2 'nin ve ROOH gibi bir peroksitin radikalliğini gidererek özellikle membranlarda oluşabilecek geri dönüşümsüz hasarları engellemektedir. Zira, H_2O_2 , singlet oksijen

($^1\text{O}_2$) ve hidroksil radikallerinin ($\text{OH}\cdot$) potansiyel kaynağıdır (Scandalios 1993; Chaudiere and Ferrari 1999).

Antioksidan enzimlerden bir diğeri **peroksidaz** (POX) (Hidrojen peroksit oksidoredüktaz, E.C.1.11.1.7) enzimidir. POX aktivitesi farklı zamanlarda farklı davranışlar gösterir. Apoplastik peroksidazlar hücre duvarında duvar sertleşmesinin düzenlenmesinde rol oynar (De Pinto and De Gara 2004). POX, H_2O_2 'yi kullanarak fenoller ve hidrokinonlar gibi çok sayıda aromatik bileşenlerin dehidrojenasyonunu katalizleyen (Bergmeyer and Grabl 1983) ve *HEM* prostetik grubuna sahip bir proteindir (Banci 1997; Kim *et al.* 2000). Çoklu moleküler formlara ve geniş bir hücre altı dağılımına sahip olan POX, bitkilerde büyük oranda bulunur. POX, elverişsiz çevresel faktörler altında üretilen zararlı oksijen radikallerinin seviyesini düzenler ve bitki hücresinin en önemli koruyucu enzimlerinden birisidir (Bakardjieva and Christov 1996). Molekül ağırlıkları 35-100 kDa arasında değişmektedir. POX'lar aşağıdaki reaksiyonu katalizlerler.



Bitkilerde bu reaksiyon sonucu;

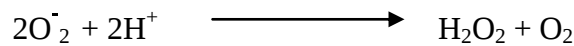
1. Serbest fenollerin oksidatif polimerizasyonu ile hücre duvarında lignin ve suberin biyosentezi gerçekleşir.
2. Hücre duvarına bağlı fenollerin oksidatif polimerizasyonu ile çapraz bağlanmalar olur ve hücre duvarı sertleşir. Sonuç olarak peroksidazlar hidrojen peroksidi kontrol altında tutarak hücre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

POX'ların spesifik aktivite, substrat ilgisi, kofaktörler, inhibitörlere hassasiyet ve optimum pH gibi biyokimyasal özellikleri farklı olan çok sayıda izoenzimleri bulunur. POX'lar organizmaya bağlı olmakla birlikte 3 sınıfa ayrılabilirler (Banci 1997).

1. Hücre içi (simplastik) peroksidazlar
2. Hücre dışı (apoplastik) peroksidazlar
3. Salgılanan bitki peroksidazları

Düşük sıcaklık, SO₂, tuzluluk, parazit enfeksiyonu, patojenler, UV-ışık tesirleri gibi çeşitli stres faktörlerinden yüksek seviyede etkilenen POX aktivitesi, bu enzimin stres enzimi olarak anılmasına sebep olmuştur (Kerby and Somerville 1992; Bakardjieva Christov 1996; Chanda and Singh 1997; Kim *et al.* 2000; Lee and Lin 1996a,b). Cd ile negatif ilişki POX aktivitesinde çoğalmaya neden olur (Metwally *et al.* 2005). Bitkisel POX; yapraklarda, yaralanan gövdelerde, kotiledon yapraklarda, çiçek saplarında belirlenmiş ve bu doku hücrelerinde nukleus, mitokondri, ribozom, hücre membranları ve hücre dışında (apoplast) lokalize olabilmektedir (Bergmeyer and Grabl 1983; Banci 1997; Hamed *et al.* 1998; Kim *et al.* 2000; Taşgın *et al.* 2006; Mutlu *et al.* 2009). POX enziminin çok sayıda fizyolojik olayda rol oynadığı ve birçok metabolik olayın gerçekleşmesine yardımcı olduğu açıktır. Bu yüzden bu kadar çok işlev ile bağdaştırılan POX enzimi ile ilgili araştırmalar yoğun bir şekilde sürdürülmektedir.

Bitki hücrelerinde bulunan diğer önemli bir antioksidan **süperoksid dismutaz (SOD)** (E.C.1.15.1.1) enziminin, süperoksid radikalini (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve moleküler oksijene çevirebildiği gösterilmiştir (Sairam and Srivastava 2000; Eyidoğan vd 2003; Minibaeva and Gordon 2003). Bu, aşağıdaki şekilde özetlenebilir.



SOD'un biri sitoplazmada diğeri mitokondride olmak üzere iki izoenzimi bilinmektedir. Ökaryotlardaki mitokondriyal SOD, karakteristik Mn⁺² muhtevası ve amino asit dizilişi bakımından birçok bakterininkine benzer. Buna karşılık sitoplazmadaki ise, tamamen

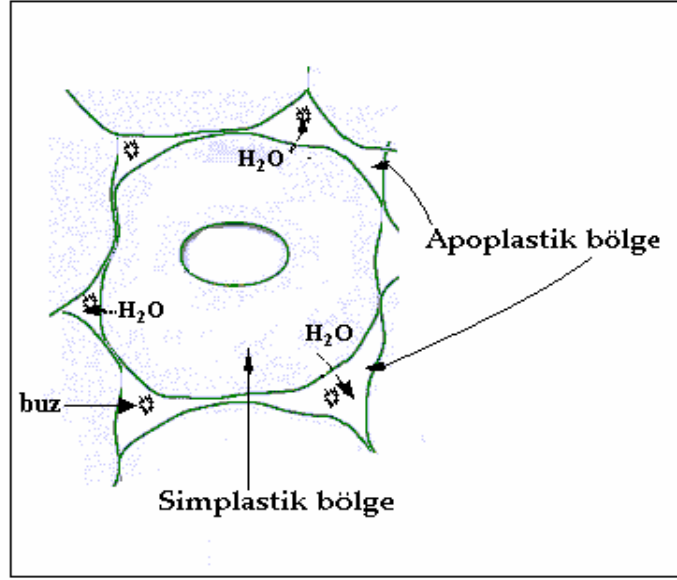
farklı yapıya sahiptir ve Cu^{+2} ile Zn^{+2} iyonu ihtiva eder. Bu enzim oldukça yüksek konsantrasyonda ve aktif bulunur. Çünkü mitokondride kullanılan oksijenin %1 ile 5 arası süperoksida dönüşmekte ve ancak yüksek bir SOD aktivitesi tarafından bertaraf edilebilmektedir. Birçok çevresel ve biyotik streslerde gerek apoplastik gerekse toplam hücrel SOD miktarının üretiminde artış olduğu belirlenmiştir (Hernandez *et al.* 2001; Minibaeva and Gordon 2003a; Eyidoğan vd 2003; Mutlu *et al.* 2009). Ağır metallerin de SOD aktivitesi üzerine etkileri vardır. Örneğin; Cd stresi farklı bitki türlerinde SOD aktivitesinde çoğalmaya neden olur (Sandalio *et al.* 2001; Milone *et al.* 2003; Guo *et al.* 2009).

Salisilik asit (SA) veya diğer adıyla orto-hidroksi benzoik asit, bitki fenolikleri grubundan bir bileşiktir. SA eskiden beri bilinen bir madde olup 1800'lü yıllardan sonra asetil-salisilik asit ilaç (aspirin) olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bütün bitkilerde bulunması, bitkide oldukça hızlı taşınabilmesi ve düşük konsantrasyolarda bazı fizyolojik etkiler oluşturmaları SA'nın bitki hormonu olabileceği varsayımını kuvvetlendirmektedir. SA bitkilerde sinnamik asitten şikimik asit yoluyla sentezlenir. Sentez yerleri genellikle yapraklardır. *Arum* bitkisinde erkek çiçekte SA alternatif solunumu teşvik ederek sıcaklık artışına sebep olur. Bu ısı artışının ortam sıcaklığından 14°C daha yukarıda olduğu ölçülmüştür. Bu yüzden SA'ya 'kalorigen' adı da verilmiştir. Bu sayede erkek çiçekteki kokulu amin ve indol bileşikleri buharlaşarak etrafa yayılır. Bu koku bitkideki tozlaşmadan sorumlu böcekleri çiçeğe çeker. (Kocaçalışkan 2004). SA'nın fizyolojik bir etkisi için ilk gösterge tütün hücre kültüründe çiçeklenme hareketini teşvik etmesi ve gonca oluşumunun keşfidir (Eberhard *et al.* 1989). SA'nın çiçeklenmedeki uyarıcı etkisi daha sonra başka bitki türlerinde gösterilmiş ve bu SA'nın çiçeklenmenin içsel bir düzenleyici olduğu önerisini güçlendirmiştir (Cleland and Ajami 1974). SA bitki patojenlerine cevapta da rol oynar (Alvarez 2000). SA'nın en yüksek seviyesi patojen istilasına uğramış bitki doku ve nekrozlarında belirlenmiştir (Raskin 1992a,b; Durner *et al.* 1997; Mauch-Mani and Metraux 1998). SA'nın abiyotik streslere cevapta da önemli bir rol oynadığı birçok araştırma tarafından rapor edilmiştir. Örneğin SA mısır bitkilerini donma hasarına karşı korumada rol aldığı (Janda *et al.* 1999, 2000), buğdayda kuraklık ve tuz stresinin

engelleyici etkisini azalttığı (Al-Hakimi and Hamada 2001; Hamada and Al-Hakimi 2001; Mutlu *et al.* 2009), fotosentezde paraquatın etkisini azalttığı (Ananieva *et al.* 2002), tuz ve osmotik stresin düzenlenmesine katıldığı (Borsani *et al.* 2001), fasulye ve domates bitkilerinde stres cevabının düzenlenmesinde önemli bir rol üstlendiği belirlenmiştir (Senaratna *et al.* 2000). SA hardal fidelerinin sonradan ortaya çıkan sıcak şoklarına karşı dayanıklılığını artırmış ve yüksek sıcaklık stresi esnasında içsel SA seviyesinin belirgin bir şekilde arttığı gözlenmiştir (Dat *et al.* 1998). Buna ilave olarak ozon ve UV ışığına maruz bırakılmış bitkilerde de SA'nın içsel seviyesinde bir artış belirlenmiştir (Yalpani *et al.* 1994; Sharma *et al.* 1996). Dışsal uygulanan SA antioksidan enzimlerin aktivitelerini düzenlediği ve abiyotik strese bitkilerin toleransını artırdığı gösterilmiştir (He *et al.* 2002). Dışsal uygulanan SA pirinçte membranlar üzerindeki ağır metallerin zararlı etkilerini azaltır (Mishra and Choudhuri 1999). SA *Cassia tora* (Yang *et al.* 2003) ve arpa (Metwally *et al.* 2003) fidelerinde ağır metal toksisitesini azaltmıştır. Cd stresi altında büyütülen arpa fideleri, SA ile muamele edildiğinde Cd stresine dayanma seviyesinde belirgin bir artış göstermiştir (Metwally *et al.* 2003). SA'nın antioksidant enzim aktiviteleri üzerine etkisi, H₂O₂ metabolizmasını düzenlemek ile ilişkili olduğu da ileri sürülmüştür (Janda *et al.* 2003).

Bu araştırmada, ağır metal stresi altında olan bitki hücrelerinin hücre içi (intraselular veya simplast) biyokimyasal değişmelerinden ziyade, hücre dışı (apoplast) (şekil1.1) bazı biyokimyasal değişmelerin incelenmesi tercih edilmiştir. Çünkü **apoplast** bitkinin içsel bir çevresidir. Bizim vücudumuz kan, lenf ve doku sıvısı gibi içsel bir çevreye sahip olduğu gibi, bitki hücreleri de apoplast adı verilen sıvı bir ortamla kuşatılır. Apoplast gelişme, beslenme, sinyal iletimi ve savunma gibi birçok olayın meydana geldiği dinamik bir bölgedir. Bizim vücudumuzdaki içsel çevrenin çok önemli fonksiyonlarına karşılık, apoplastın dinamik fonksiyonu da bitki hayatının devamında pek çok şeyden önce gelmektedir. Apoplastın birçok önemli fonksiyonları içerisinde şunlar sayılabilir (Sakurai 1998; Atıcı and Nalbantoğlu 2003; Chikov and Bakirova 2004; Mutlu *et al.* 2009).

1. Apoplastik enzimler aracılığı ile polisakkarit, protein ve lignin gibi hücre duvarı moleküllerinin sentezi, yıkımı ve düzenlenmesi.
2. Ozon, soğuk, tuz ve sülfür dioksit gibi zararlı çevresel streslere ve patojen saldırılarına karşı hücre içinin (simplast) korunması.
3. Sadece su gibi iyi taşınan moleküllerin değil, aynı zamanda inorganik ve organik bileşiklerin taşınmasının düzenlenmesi.
4. İyon dengesi, pH ve su içeriğini ayarlayarak içsel homeostasisin düzenlenmesi.



Şekil 1. 1. Düşük sıcaklığa maruz kalmış bir yaprakta simplastik bölgedeki suyun apoplastik bölgelere gönderilmesi ile apoplastik bölgede buz oluşumu (Taşğın 2004).

Görüldüğü gibi apoplast bitkilerde hücre canlılığının devamında ve çevresel streslere bitki cevabının düzenlenmesinde önemli görevleri olan bir bölgedir.

Bu çalışmada temel amaç Cd stresinin bitkilerde meydana getirdiği morfolojik, metabolik ve antioksidatif bozuklukların belirlenmesi değildir. Bu konuda literatürde oldukça bilgi bulunmaktadır. Cd stresi altında bitki cevabının belirlenmesinde simplastik bölgedeki biyokimyasal cevaplar yoğunlukla araştırılmasına rağmen, apoplastta meydana gelen antioksidatif cevapların incelenmesi ile ilgili literatür bilgisi

oldukça yetersiz olduğu gözlenmiştir. Artık günümüzde Cd'nin bitkilerde bir stres oluşturduğu bilimsel bir gerçektir. Yaptığımız literatür araştırmalarında SA'nın Cd stresine karşı bitkiyi koruyabildiği ve Cd stresi ile gerileyen bitki hücre içi (simplast) antioksidatif sistemi düzenleyebildiği çalışmada gösterilmiştir

Bunlara ilave olarak, SA'nın soğuk ve tuz stresi altındaki bitkilerde apoplastik proteinlerin seviyelerini ve apoplastik antioksidan enzim aktivitelerini düzenleyerek bir koruma sağlayabildiği de rapor edilmiştir (Taşgın *et al.* 2003, 2006; Mutlu *et al.* 2009).

Bu araştırmada ise bitkiye önceden uygulanan SA'nın, bitki Cd stresine maruz kaldığında, apoplastik antioksidatif sistemi düzenleyerek bitki cevabının düzenlenmesinde bir rol alabileceği hipotezi ileri sürülmüştür. Bu amaç için seçilen iki buğday varyetesine (biri hassas, biri toleranslı) ait fidelere SA uygulanmış ve uygulamadan belirli bir süre sonra bitkiler Cd stresine maruz bırakılmışlardır. Cd stresine maruz kalmış bitkilerin yaprak ve köklerindeki apoplastik antioksidan enzimlerin aktiviteleri belirlenmiştir. Bitki stresinin ve stresten korunmanın bir derecesini gösteren lipid peroksidasyonu ve H₂O₂ miktarı da ölçülmüştür.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Son on yılda özellikle stres altındaki bitkilerin apoplastik bölgelerinde bulunan bileşikler üzerine birçok araştırma yapılmış ve bitkinin çevresel streslere cevabında ve tolerans kazanmasında bu bölgenin önemine dikkat çekilmiştir (Atıcı and Nalbantoğlu 1999a,b; Michael *et al.* 1993; Duran-Carril and Bujan 1998, 2003; Wang *et al.* 2004; Mutlu *et al.* 2009). Birçok çalışmada antioksidan enzimlerin bitki hücrelerinin apoplast bölgesinde de yer aldığı ve çevresel streslere cevapta önemli rollerinin bulunduğu belirtilmiştir. Üçlü antioksidan sistem (katalaz, peroksidaz, süperoksid dismutaz), hücresel hasarların ilk başladığı apoplastik bölgede ROS bileşiklerinin sistemli bir şekilde uzaklaşmasını gerçekleştirirler.(Hernandez *et al.* 2000; Lin and Kao 2001; Minibaeva and Gordon 2003).

Bitkilerde **katalaz (CAT)** aktivitesine etki eden faktörler ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. CAT bitki yapraklarının apoplastında da belirlenmiştir (Edwards *et al.* 1991; Wingsle *et al.* 1991; Vanacker *et al.* 1998b; Taşgın *et al.* 2006; Mutlu *et al.* 2009). Bir çalışmada kışlık arpa yapraklarında apoplastik CAT aktivitesinin hücredeki seviyesine göre %18 olduğu bulunmuştur (Baet *et al.* 2000). İki domates türü ve arpa patojenlerle muamele edildiğinde, apoplastik CAT aktivitesinin yükseldiği tespit edilmiştir (Vanacker *et al.* 1998; Patykowski *et al.* 2003). Üç farklı yulaf çeşidi bir fungal patojeni ile muamele edildikten sonra, apoplastlarda 2 örnekte aktivitenin azaldığı, diğer örnekte yükseldiği gözlenmiştir (Vanacker *et al.* 1998). SA'nın birkaç bitki türünde CAT aktivitesinin temel bir bölgesini bloklamak suretiyle H₂O₂'nin birikimine neden olduğu ve bu nedenle enzimi inhibe ettiği ileri sürülmüştür (Raskin 1992a,b).

Kışlık buğday soğuk stresi ve salisilik aside (SA) maruz bırakıldığında, hem soğuk hem de SA yapraklarda apoplastik CAT aktivitesini düşürmüştür (Taşgın *et al.* 2006). Tuz stresi altındaki bitkilerde SA'nın CAT aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir (Mutlu *et al.* 2009). SA uygulanmış bezelye, tütün ve mantarda SA'nın CAT aktivitesini inhibe

ettiği belirlenmiştir (Aebi 1974; Martina *et al.* 1995; Willekens *et al.* 1997; Srivastava *et al.* 2001). Yine mısır fidelerinde 1 mM SA uygulandığında yapraklarda CAT aktivitesinin inhibe edildiği belirlenmiştir (Padu 1999; Horvath *et al.* 2002). Muz bitkisinde 0.5 mM ve 1 mM SA uygulaması, CAT aktivitesinin ilk günlerde düşüşüne, ilerleyen günlerde tekrar yükselmesine neden olmuştur (Srivastava *et al.* 2000). SA'nın türevi olan asetil SA'nın da mısır bitkisinde CAT aktivitesinde düşüşe neden olduğu gözlenmiştir (Westhuizen *et al.* 1998). Arpa ile yapılan çalışmada SA'nın CAT aktivitesini normale göre yükselttiği görülmüştür (Souza *et al.* 2001). Tuz stresi altında büyütülen bitkilerde hücrel CAT'la yapılan çalışmalarda da, CAT'ın düştüğü belirlenmiştir. Örneğin, tuz stresi altında büyütülen buğday, pirinç ve salatalık ile yapılan çalışmalarda, her üç bitkide de hücrel CAT aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir (Keleş and Öncel 2002; Shim *et al.* 2003). Görüldüğü gibi CAT'ın stres faktörlerine yanıtı, faktörlerin kullanımına ve bitki türlerine göre farklılık göstermektedir.

Cd stresi altında CAT aktivitesi *Phaseolus vulgaris* (Somashekaraiah *et al.* 1992), *Lemna minor* (Mohan and Hosetti 1997) ve biberde (Leon *et al.* 2002) azalma gösterdiği belirlenmiştir. Aksine CAT aktivitesi *Agropyron repens* (Brej 1998), *Raphanus sativus* (Vitoria *et al.* 2001) ve şeker kamışında (Fornazier *et al.* 2002a) çoğaldığı fakat soya fasulyesinde (Ferreira *et al.* 2002) değişmeden kaldığı gözlenmiştir. Yaptığımız dikkatli literatür taraması sonucunda Cd stresi altındaki bitkilerin apoplastik CAT aktivitesine ait herhangi bir veri bulunamamıştır.

Bitkilerde **peroksidaz (POX)** aktivitesine etki eden faktörlerle ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Ladin ağacı yapraklarının apoplastında POX aktivitesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (Otter *et al.* 1997), ancak kuraklık stresi ve ozon muamelesi uygulandığında hücrel ve apoplastik POX aktivitesinin düştüğü görülmüştür. (Kronfuss *et al.* 1996). Yüksek ve düşük nitrat uygulamalarında, genç ve olgun buğday bitkilerinin hücrel ve apoplastik POX aktiviteleri karşılaştırıldığında, her iki durumda da, hücrel POX aktivitesinin apoplastik POX aktivitesinden yüksek olduğu bulunmuştur (Padu 1999). Kışlık arpa yapraklarında apoplastik POX aktivitesinin hücrel aktiviteye göre oranının %394 olduğu belirlenmiştir (Baet *et al.* 2000). Chcory

(*Cichorium intybus* L. cv. Bea) bitkisi ile yapılan bir çalışmada ışık-karanlık periyodunda apoplastik POX aktivitelerinin düştüğü gözlenmiştir (Boeuf *et al.* 1999, 2001). Yulaf bir fungal patojen ile muamele edildiğinde, apoplastik bölgede POX aktivitelerinin düştüğü gözlenmiştir (Vanacker *et al.* 1998). Buna karşılık buğday, arpa ve domates patojenlerle muamele edildiğinde, bitkilerde apoplastik POX aktivitesinin yüksek olduğu gözlenmiştir (Bishop 2002; Patykowski *et al.* 2003).

Kışlık buğday, soğuk stresi ve SA'ya maruz bırakıldığında hem soğuk hem de SA yapraklarda apoplastik POX aktivitesini artırmıştır (Taşgın *et al.* 2006). Tuz stresi altındaki bitkilere SA uygulanması POX aktivitesini artırmıştır (Mutlu *et al.* 2009). Tuz stresi altındaki pamuk türlerinde de POX aktivitesinin çoğaldığı bildirilmiştir (Meloni *et al.* 2003). Mısır ve havyar bitkisinde yapılan çalışmalarda, SA uygulaması POX'un aktivitesini artırmıştır (Dat *et al.* 1998; Padu 1999; Horvath *et al.* 2002; Yee *et al.* 2002). Ancak *Cuscuta reflexa* ve bezelye bitkisinde ise SA'nın POX aktivitesini inhibe ettiği gözlenmiştir (Aebi 1974; Srivastava *et al.* 2001). Dışsal uygulanan SA mısırdaki POX'un aktivitesini artırmıştır (Janda *et al.* 1999). Görüldüğü gibi POX'un stres faktörlerine yanıtı, faktörlerin kullanımına ve bitki türlerine göre farklılık göstermektedir.

Cd uygulanınca bezelye yaprağında, *Phaseolus aureus*'da, havuç ve turpun köklerinde POX aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir (Sanita di Toppi and Gabrielli 1999; Liu and Yang 2000; Sandalio *et al.* 2001; Chen *et al.* 2003). Cd uygulanan ladin ağacı yapraklarının POX aktivitesi başlangıçta artarken, daha sonra düşmüştür (Radotic *et al.* 2000). Mısır yaprakları Cd'e maruz bırakılırsa POX aktivitesi çoğalmıştır (Lagriffoul *et al.* 1998; Kong *et al.* 1999). Yaptığımız literatür taraması sonucunda Cd stresi altında apoplastik POX ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bitkilerde **süperoksit dismutaz (SOD)** aktivitesine etki eden faktörlerle ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Oksidatif stres altındaki buğday genotiplerinde SOD aktivitesinde bir değişiklik gözlenmezken (Sairam and Srivastava 2000), yüksek

sıcaklık stresi veya tuz stresi altındaki buğday genotiplerinde önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir (Sairam *et al.* 2000; Eyidoğan vd 2003; Sakhabutdinova *et al.* 2004).

Su stresi altındaki buğdaylarda SOD aktivitesi yükselirken, SA uygulaması ile düştüğü belirlenmiştir (Singh and Usha 2003). Muz fideleriyle yapılan çalışmada ise SOD aktivitesi düşük sıcaklık ve SA uygulamasıyla artmıştır (Kang *et al.* 2003). Stres altındaki bitkilerde apoplastik SOD aktivitesi ile ilgili bilgi çok yetersizdir. Son yapılan bir çalışmada tuz stresi altındaki buğdaylarda, tuz ve SA apoplastik SOD aktivitesini artırmıştır (Mutlu *et al.* 2009).

Cd şeker kamışında SOD aktivitesini artırmıştır (Bonnet *et al.* 2000; Malecka *et al.* 2001; Fornazier *et al.* 2002; Jouili and El Ferjani 2004). Cd uygulanmasıyla bazı bitkilerde SOD aktivitesinin değişmediği de bulunmuştur (Sanita di Toppi and Gabrielli 1999).

Kadmiyum ile muamele edilmiş bezelye bitkilerinin kök ve sürgünlerinde **lipid peroksidasyon** ürünlerinin arttığı bildirilmiştir (Lozano-Rodriguez *et al.* 1997; Romero-Puertas *et al.* 2003). Cd tarafından lipid peroksidasyonunun artması *Phaseolus vulgaris* (Somashekaraiah, Padjama and Parasad 1992; Shaw 1995; Chaoui *et al.* 1997) ve *Helianthus annuus* (Gallego 1996; Benavides and Tomaro 1996) bitkilerinde belirlenmiştir. MDA konsantrasyonunun, tuzluluğa maruz bırakılmış mısırdaki SA uygulaması ile azaldığı görülmüştür (Gunes *et al.* 2007). Üzüm fideleri ile yapılan bir çalışmada, salisilik asit uygulaması ile fidelerin yapraklarında MDA içeriğinin azaldığı görülmüştür (LiJun *et al.* 2003). Tütünde, lipid peroksidasyonun SA sinyal iletiminde önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir (Yu *et al.* 1999). Mısır bitkilerine Cd uygulandıktan sonra MDA seviyesinin köklerde çoğaldığı fakat yapraklarda çoğalmadığı gözlenmiştir (Hong *et al.* 2008). Pirinç (*Oryza sativa*) köklerinde Cd stresi altında SA uygulandığında MDA konsantrasyonu düşmüştür (Guo *et al.* 2007).

Bitki hücrelerinde **Hidrojen peroksit (H₂O₂)** artışı genellikle *Arabidopsis thaliana* ve domates bitkilerinin Cu, Cd (Drazkiewicz *et al.* 2004; Romero-Puertas *et al.* 2004;

Maksymiec and Krupa 2006) ve Hg (Cho and Park 2000) muamelesinden sonra gözlenmiştir. SA'ya benzer şekilde H_2O_2 , 0,1-50 mM konsantrasyonda patates bitkilerinde yüksek sıcaklık toleransına cevapta artış göstermiştir (Lopez- Delgado *et al.* 1998). Mısır fidelerine H_2O_2 ve menadion (H_2O_2 den oluşmuş bileşik) enjekte edildiğinde fidelerin donma stresine karşı daha toleranslı hale geldiği belirlenmiştir (Prasad *et al.* 1994; Prasad 1996). Hidrojen peroksit buğday fidelerinde süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), katalaz (CAT) ve NADPH katalaz aktivitelerinde artışı tetiklemiştir. Hidrojen peroksit, ayrıca çilek kalluslarında morfogenik süreç ile bağlantılıdır ve SOD aktivitesinde değişikliğe neden olmuştur (Li *et al.* 2007, 2009).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

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

3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanmaları

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

1. Arnon ve Hogland besi çözeltisi: 1.02 g KNO_3 , 0.492 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.23 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.49 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.86 g H_3BO_3 , 1.81 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.08 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.22 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.6 mg FeSO_4 , 0.6 mg tartarik asit saf su içerisinde çözülerek toplam hacmi 1 litreye tamamlanmıştır.

2. 0.01 mM Salisilik asit çözeltisi: 0.001381 g salisilik asit 900 mL saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 6.5'e kadar titre edilmiş ve son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.
3. 0.1 mM Salisilik asit çözeltisi: 0.01381 g salisilik asit 900 mL saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 6.5'e kadar titre edilmiş ve son hacim saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.
4. 1 μ M CdCl₂ çözeltisi: 0.183 g CdCl₂ çözeltisi bir miktar saf suda çözülmüş ve son hacmi 1L'ye tamamlanmıştır.
5. 20 mM Askorbik asit + 20 mM CaCl₂ çözeltisi (Apoplastik proteinlerin ekstraksiyonu için kullanılan çözelti): 7.4 g askorbik asit ve 5.28 g CaCl₂ bir miktar saf suda çözülmüş ve hacim saf su ile 2 L'ye tamamlanarak hazırlanmıştır
6. 103.5 mM KH₂PO₄, pH: 7.5 (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 1.4 g KH₂PO₄, 80 mL saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 7.5'e kadar titre edilmiş ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.
7. 40 mM H₂O₂ çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 408 μ L %30'luk H₂O₂ hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
8. 5 mM H₂O₂ çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde standart grafik hazırlamak için kullanılmıştır): 41 μ L %30'luk H₂O₂ hacmi saf su ile 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
9. Peroksidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi: 15 μ L H₂O₂'dan (d=1.13 g/mol) alınarak 5 mM olacak şekilde 100 mL 0.1 M fosfat tamponu (pH: 5.5) içinde çözümlenerek hazırlanmıştır.
10. 0.1 M Na₂HPO₄, pH: 5.5 (Peroksidazın aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon çözeltisi): 3.55 g Na₂HPO₄ alınmış, 200 mL saf suda çözülmüş ve pH: 5.5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır.

- 11.** 50 mM K_2HPO_4 (pH: 7.8) (Süperoksit dismutaz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 2.9 g K_2HPO_4 200 mL saf suda çözölmüş ve son hacmi 250 mL'ye tamamlanmıştır.
- 12.** 13 mM metionin çözeltisi: 0.485 g metionin, 250 mL, 50 mM K_2HPO_4 (pH: 7.8) tamponu içerisinde çözölerek hazırlanmıştır.
- 13.** 75 μ M NBT (Nitroblue Tetrazolium Klorür): 0.015 g NBT, 250 mL, 50 mM K_2HPO_4 (pH: 7.8) tamponu içerisinde çözölerek hazırlanmıştır.
- 14.** 0.1 mM EDTA (Etilen Daimin Tetra Asetik asit): 0.075 g EDTA, 250 mL, 50 mM K_2HPO_4 (pH: 7.8) tamponu içerisinde çözölerek hazırlanmıştır.
- 15.** 2 μ M riboflavin: 0.038 g riboflavin, 1 L saf suda çözölmüştür. Bu çözeltiden 2 μ M oluşturmak için, bundan 60 μ L alınmış ve 3 mL'lik reaksiyon karışımına pipetlenmiştir.
- 16.** %5 lik TCA (trikloroasetik asit) : 100 ml saf su içerisinde 5 g TCA ilave edilir. TCA tam olarak çözölüne kadar karıştırılarak hazırlanmıştır.
- 17.** %0.5 lik TBA (tiobarbutirik asit): 100 ml saf su içine 20 gram TCA çözölmüş ve içerisinde 0.5 g TBA ilave edilir ve iyice karıştırılarak hazırlanmıştır.
- 18.** %5 lik $Ti(SO_4)_2$ (titanyum disölfat çözeltisi) (H_2O_2 miktarının belirlenmesinde kullanılır): 1 gram $Ti(SO_4)_2$ 20 mL saf suda çözölerek hazırlanmıştır.
- 19.** %19 luk NH_4OH (H_2O_2 belirlenmesinde kullanılan): 4.16 mL NH_3 20 mL saf suda çözölmesiyle hazırlanmıştır.
- 20.** 2 M'lık H_2SO_4 (H_2O_2 miktarının belirlenmesinde kullanılan): 40 mL %98'lik H_2SO_4 alınmış 160 mL saf su içerisinde ilave edildikten sonra 200 mL'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Bitkilerin büyütilmesi

Bu araştırmada, monokotil bir bitki olan buğdayın (*Triticum aestivum*) iki varyetesi (Bolal ve Doğu-88) kullanılmıştır. Bitkilere ait tohumlar, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nden temin edilmiştir. Tohum sterilizasyonu, kuru tohumlar birkaç kez çeşme suyu ile yıkandıktan sonra %10'luk ticari çamaşır suyunda 5 dk bekletilmiş ve en son saf su ile iyice yıkanarak yapılmıştır. Bitkiler kum kültüründe yetiştirilmiştir. Bunun için her bir saksıya eşit miktarda olacak şekilde kum konulmuş ve kum içeren saksılar önce suyla 5 kez, sonra 1N HCL ile ve en sonda saf su ile yıkanmıştır. Bu işlemle kum içindeki metal iyonlarının uzaklaştırılması sağlanmıştır. Her saksıya 25 g tohum ekilmiştir. Bitkiler bir iklim dolabında 22/20°C ve 12/12 saat ışık-karanlık periyodunda (20.000 lüks, %70 nem) onsekiz gün süreyle büyütmüşledir. Her saksı, onuncu güne kadar, günlük eşit miktarda çeşme suyu ile sulanmıştır. Onuncu günde bitkiler Hoagland besi çözeltisi ile sulanmıştır.

Çimlenmeden sonra onikinci günde bitki yapraklarına farklı konsantrasyonlarda salisilik asit (0.0, 10, 100, 1000 μ M pH: 6,5) bir atomizer yardımıyla püskürtülmüştür. İşleme bütün yaprakların yıkandığından emin oluncaya kadar devam edilmiştir. onbeşinci günde ise kadmiyum çözeltisi (25, 50, 100 μ M) her saksıya 50 mL olacak şekilde uygulanmıştır. Bu durumda bir bitki uygulaması için 24 saksı kullanılmış ve bunların kadmiyum ve salisilik asit uygulamaları aşağıdaki gibi olmuştur. Deneme hatalarını azaltmak için her bir gruba ait 5 saksı ekilmiştir.

1. 0.0 μ M SA + 25 μ M Cd
2. 0.0 μ M SA + 50 μ M Cd
3. 0.0 μ MSA + 100 μ M Cd
4. 10 μ M SA + 25 μ M Cd
5. 10 μ M SA + 50 μ M Cd
6. 10 μ M SA + 100 μ M Cd

7. 100 μ M SA + 25 μ M Cd
8. 100 μ M SA + 50 μ M Cd
9. 100 μ MSA + 100 μ M Cd
10. 1000 μ M SA + 25 μ M Cd
11. 1000 μ M SA + 50 μ M Cd
12. 1000 μ M SA + 100 μ M Cd

Yukarıdaki muameleler yapıldıktan sonra, apoplastik enzimlerin çalışılması için onsekizinci gün (Cd uygulamasından 3 gün sonra) bitki yapraklarından ve köklerinden örnekler alınmıştır.

3.3.2. Apoplastik proteinlerin ekstraksiyonu ve izolasyonu

Apoplastik proteinlerin ekstraksiyonu için, buğday yaprakları ve kökleri bir bisturiyle yaklaşık 1 cm uzunlukta dikkatlice kesilerek oluşturulan kesitler (7 g), en az 6 kez bol saf su ile iyice yıkanmıştır. Bu işlemle dokuların kesilen bölgelerinden gelebilecek hücresel protein kontaminasyonu önlenmiştir (Hon *et al.* 1994; Atıcı and Nalbantoğlu, 1999a,b). Hazırlanan 7 g yaprak kesiti, içerisinde 20 mM askorbik asit ve 20 mM CaCl_2 çözeltisi bulunan vakumlanabilir bir desikatöre yerleştirilmiş ve desikatör bir vakum pompası ile 20 dakika vakumlanmıştır. Vakumlanmış dokular 20 mL'lik enjektörlere dikkatlice yerleştirildikten sonra, enjektörler birer santrifüj tüpüne konulmuş ve 2000 $\times g$ 'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjlemenin bitiminde, tüplerin dip kısmında biriken apoplastik ekstrakt, apoplastik proteinlerin elde edilmesi için kullanılmıştır (Atıcı and Nalbantoğlu 1999a,b; Taşkın *et al.* 2003, 2006; Mutlu *et al.* 2009).

Apoplastik proteinlerin izolasyonu için, apoplastik ekstraktlara hacimlerinin 1.5 katı soğuk (-20°C) aseton ilave edilmiş ve karışım -28°C 'de 1 gece bekletilmiştir. İkinci gün, örnekler 3500 $\times g$ 'de 20 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra apoplastik protein peleti elde edilmiştir. Pelet, önce %96'lık sonra %70'lik etanol ile birer kez dikkatlice yıkanarak kurumaya bırakılmıştır. Tamamen kurumuş pelet

apoplastik enzim aktivitelerinin belirleneceği zamana kadar -28°C’de saklanmıştır (Hon *et al.* 1994; Atıcı and Nalbantoğlu 1999a,b; Taşgın vd 2003).

Enzim aktivitesi ölçümü yapılacağı zaman, apoplastik protein peletleri, 1 mL 0.2 M (pH: 7.5) sodyum fosfat tamponu içinde iyice çözülmüş ve apoplastik antioksidan enzim aktiviteleri ölçümü için hazır hale getirilmiştir. Ölçüm esnasında enzim çözeltileri buz içinde tutulmuşlardır.

3.3.3. Yaprak ve köklerde apoplastik antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

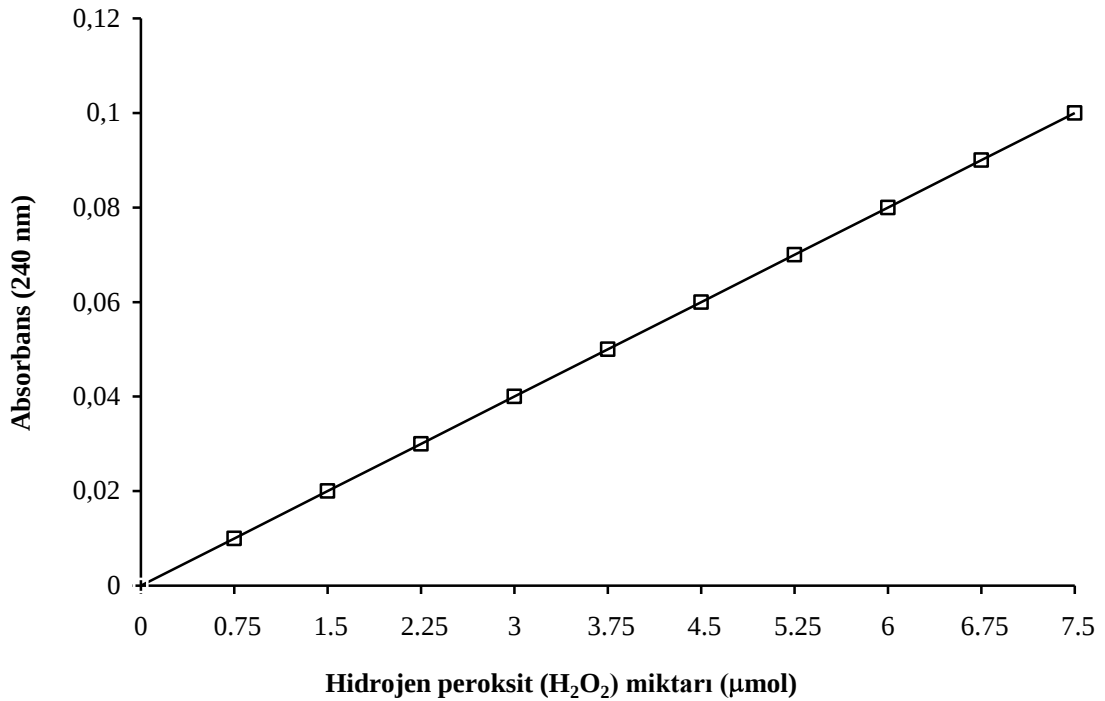
3.3.3.a. Katalaz aktivitesinin belirlenmesi

Katalazın (CAT) aktivite tayini için kullanılan yöntem, Luck (1965) ile Havir and Mchale’nin (1987) uyguladığı yöntemdir. Bu metotla aktivite ölçümü, CAT aktivite ölçüm ortamındaki H₂O₂’nin O₂ ve H₂O’ya dönüşümünü sağlarken meydana gelen absorbans azalmasının 240 nm’de izlenmesi esasına dayanmaktadır (Havir *et al.* 1987).

Reaksiyonda azalan H₂O₂ miktarını belirlemede kullanılacak olan H₂O₂ standart grafiği önceden hazırlanmıştır. Bunun için, 5 mM H₂O₂ çözeltisinden 3 mL’lik spektrofotometre tüplerine sırasıyla; 0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 0.9, 1.05, 1.2, 1.35 ve 1.5 mL konulmuştur. Tüpün hacmi saf su ile 1.5 mL’ye tamamlanmış ve her tüpe 1.47 mL, 103.5 mM KH₂PO₄ ve 30 µL saf su ilave edilmiştir. Küvet spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 240 nm’de absorbans belirlenmiştir. Absorbans değerlerine karşılık gelen µM H₂O₂ değerleri kullanarak bir standart grafik elde edilmiştir (Şekil 3.1).

CAT aktivite ölçümü için 3 mL’lik spektrofotometre küvetine, 103 mM KH₂PO₄ tamponundan 1.475 mL ve 40 mM’lık H₂O₂ substrat çözeltisinden 1.5 mL konulduktan sonra, 25 µL enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Küvet spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 240 nm’de 3 dakika boyunca 0,5 dakika aralıklarla köre karşı absorbansı

okunmuştur. Ölçümlerde absorbansın doğrusal olarak azaldığı aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplanmıştır. Bu ortalama absorbans değerleri, standart grafik yardımıyla μmol cinsinden H_2O_2 miktarına dönüştürülmüştür. 25°C 'de, 1 dakika içinde, absorbansı 1 μmol azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar g yaprak başına düşen enzim ünitesi olarak sunulmuştur (Gong *et al.* 2001).



Şekil 3.1 Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik

3.3.3.b. Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Peroksidaz (POX) aktivite tayini, guaikol ve H_2O_2 'nin substrat olduğu reaksiyonun ürünü olan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm 'de izlenmesi esasına dayanmaktadır (Angelini *et al.* 1989).

Aktivite ölçümü için spektrofotometre küvetine; 100 mL 0.1 M, NaH_2PO_4 (pH: 5.5) ve 5 mM guaikol içeren substrat çözeltisinden 3 mL konulduktan sonra, üzerine 10 μL enzim ekstraktı ilave edilmiştir. 470 nm 'de 5 dakika boyunca absorbans artışı 1 dakika

aralıklarla kaydedilmiş ve absorbansın doğrusal olarak arttığı kısımdaki absorbans artışı 1 dakikaya oranlanmıştır. 25°C’de 1 dakikada, absorbansı 0.01 artıran enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve sonuçlar g doku başına düşen enzim ünitesi (EU/g doku) olarak sunulmuştur (Yee *et al.* 2002).

3.3.3.c. Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, nitro blue tetrazoliumun (NBT) fotokimyasal indirgenmesinin inhibisyonunu, spektrofotometrik olarak belirleme esasına dayanır (Agarwal and Pandey 2004; Yordanova *et al.* 2004).

Reaksiyon karışımı (3 mL); 50 mM KH₂PO₄ (pH: 7.8), 13 mM metiyonin, 75 µM NBT, 2 µM riboflavin ve 0.1 mM EDTA içermektedir.

Aktivite ölçümü için 3 mL spektrofotometre küvetine yukarıdaki riboflavin içermeyen reaksiyon karışımından 2.84 ml alınmış ve üzerine 100 µL enzim ekstraktı pipetlenmiştir. Reaksiyon, tüp üzerine 100 µM’lık riboflavin çözeltisinden 60 µL pipetlenip karıştırıldıktan hemen sonra, beyaz bir ışık kaynağı önüne yerleştirmek suretiyle başlatılmıştır. Tüp, ışık kaynağının karşısında 15 dk. tutulmuş ve reaksiyon ışık kaynağının kapatılmasıyla durdurulmuştur. 15 dk. içerisinde NBT’nin renk açılma yoğunluğu 560 nm’de köre karşı okunmuştur. Kör, Aynı işlemin enzimsiz örneğinden oluşmaktadır. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nm’de gözlenen NBT indirgenmesinin % 50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilmiş ve değerler EU/g doku olarak sunulmuştur.

3.3.4. Kök ve yapraklarda hidrojen peroksit miktarının belirlenmesi

H₂O₂’nin miktar tayini için kullanılan yöntem Mukherjee and Choudhuri (1983) tarafından kullanılmıştır.

Hidrojen peroksit miktarının belirlenmesi için taze bitki dokusu (2 gram) 2 mL soğuk aseton ile homojenize edilmiş ve bulamaç 10.000 xg 'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantın 1 mL si %5 $Ti(SO_4)_2$ ve 0.2 mL amonyak ile karıştırılmıştır. Çökelti biçimlendikten sonra reaksiyon karışımı 10.000 xg 'de 10 dk santrifüj edilmiş, sonra pelet 2M H_2SO_4 te eritilmiş ve 415 nm'de absorbansı okunmuştur.

H_2O_2 miktarını belirlemede kullanılan H_2O_2 standardı için, 5mM H_2O_2 çözeltisinden ephendorf tüpüne sırasıyla; 0.15, 0.3, 0.45, 0.6, 0.75, 0.9, 1.05, 1.2, 1.35 ve 1.5 mL konulmuştur. Tüpün hacmi aseton ile 1.5 mL'ye tamamlanmış ve her tüpe 0.15 mL %5'lik $Ti(SO_4)_2$ ve %19'luk NH_4OH ilave edilmiştir. Çökelek oluştuktan sonra karışım 10.000 xg 'de 5 dk daha santrifüj edilmiştir. Tüpün süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen pelet 3 ml 2 M'lık H_2SO_4 içinde çözülmüş ve küvet spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 415 nm'de absorbans köre karşı okunmuştur. Absorbans değerlerine karşılık gelen μM H_2O_2 değerleri kullanılarak standart grafik elde edilmiştir.

3.3.5. Kök ve yapraklarda lipid peroksidasyonunun belirlenmesi

Lipid peroksidasyonunun belirlenmesi için kullanılan yöntem Heath and Packer (1968) tarafından kullanılmıştır.

Bunun için yaklaşık 200 mg taze bitki materyali %10'luk TCA (trichloro-acetic acid) 10 mL %25'lik 2-TBA (thiobarbituric acid) ile homojenize edilmiştir. Homojenat buz banyosunda 95°C de 30 dk inkübe edilmiş ve sonra 10.000 xg 'de 10 dk santrifüj edilmiştir, 532 nm'de absorbans değerleri okunduktan sonra 600 nm deki non-spesifik absorbsiyon için belirlenen absorbans değeri çıkarılır.

Lipid peroksidasyonunun hesaplanması: 1 mL çözeltideki MDA (nmol/ ml):[(A532-A600)/155000] $\times 10^6$ formülüyle hesaplanır. Sonuçlar MDA (nmol/ gram doku) şeklinde verilir.

3.4. İstatistik Analizi

Tez içerisinde sunulan sonuçlar, her bir uygulamadan üç örnek (3 paralel) ve her bir örnekten 3 tekerrür yapıldıktan sonra elde edilen 9 değerin ortalamasıdır. Sonuçların karşılaştırılması, SPSS 15.0 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmış ve istatistik anlamlar, 0.05 hata seviyesinde Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu bölümde buğdayın (*Triticum aestivum*) yaprak ve köklerindeki apoplastik katalaz, peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzim aktivitelerinin sunumunda, her bir enzim için, önce Bolal ve sonra Doğu-88 çeşitlerine ait bulgular verilmiştir. Bulgular çizelgelerle ayrıntılı olarak verilmiş, ayrıca farklı yaklaşımların ve değerlendirmelerin yapılabilmesi için şekillerle de sunulmuştur. Bitkilere ekim gününe göre onikinci gün 3 farklı (0.01, 0.1 ve 1 mM) konsantrasyonlarda SA (salisilik asit) uygulanmıştır. 3 gün sonra (onbeşinci gün) SA uygulanmış bitkiler ve uygulanmamış olanlar (kontrol grubu) 3 farklı (25, 50, 100 µM) konsantrasyondaki Cd (kadmiyum) stresine maruz bırakılmışlardır. Bitkiler stresin 3. gününde (onsekizinci gün) yapılacak deneyler için materyal olarak kullanılmıştır.

4.1. Apoplastik Enzim Aktivitesi Sonuçları

4.1.1. Katalaz Aktivitesi Sonuçları

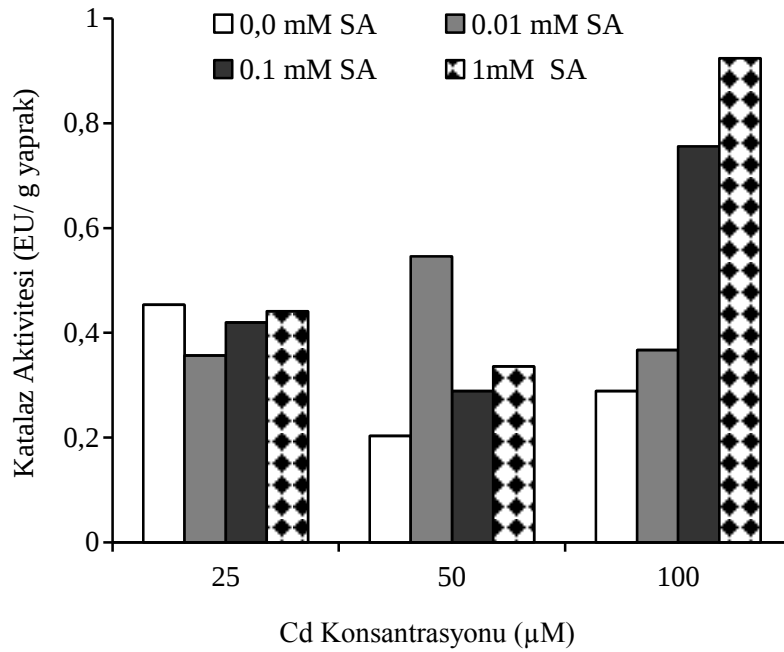
4.1.1.a. Bolal çeşidine ait yaprak ve köklerden elde edilen sonuçlar

0.01, 0.1 ve 1 mM SA uygulamasından sonra farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 100 µM) Cd stresine maruz bırakılmış bitki yapraklarında apoplastik CAT aktivitesinde önemli sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.1). 25 µM Cd etkisi altındaki bitki yapraklarında SA'nın 3 konsantrasyonu da (0.01, 0.1, 1 mM) CAT aktivitesinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır ($p>0.05$). Ancak, 50 ve 100 µM Cd stresindeki bitkilerde, SA'nın üç konsantrasyonu da CAT aktivitesinde önemli ($p<0.05$) bir artışa sebep olmuştur. Hatta 100 µM Cd'de CAT aktivitesindeki artış SA konsantrasyonu artışı ile paralel olarak artmıştır. Bu Cd konsantrasyonunda CAT aktivitesindeki artışlar 0.01, 0.1, 1 mM SA uygulamalarında kontrole göre (sadece 100 µM Cd uygulanmış) sırasıyla %27, %161, %220 gibi önemli oranda yüksek bulunmuştur.

Aynı bitkinin köklerinden elde edilen apoplastik CAT aktivitesine ait sonuçlar Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2’de sunulmuştur. SA uygulamaları 25 μ M Cd uygulanmış bitki köklerinde CAT aktivitesini önemli ölçüde artırmıştır ($p<0.05$). CAT aktivitesi artışı en fazla 0.1 mM SA ile elde edilmiştir. 50 μ M Cd altındaki bitkilerde SA uygulamaları CAT aktivitesini değiştirmemiştir ($p>0.05$). Bu sonuçlara karşılık 100 μ M Cd’de ise ilginç sonuçlar elde edilmiştir. Tek başına 100 μ M Cd uygulaması, tek başına 25 ve 50 μ M Cd uygulamalarına göre, CAT aktivitesini artırmıştır. Fakat SA’nın üç konsantrasyonu 100 μ M Cd’e maruz kalmış bitki köklerinde aktiviteyi önemli ölçüde düşürmüştür ($p<0.05$). Örneğin tek başına 100 μ M Cd’e göre, 0.01, 0.1, 1 mM SA uygulamaları CAT aktivitesini sırasıyla, %46, %64 ve %64 düşürmüştür.

Çizelge 4.1. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Bolal yapraklarında apoplastik katalaz aktivitesi üzerine etkileri. Aynı harfi bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir ($P>0.05$)

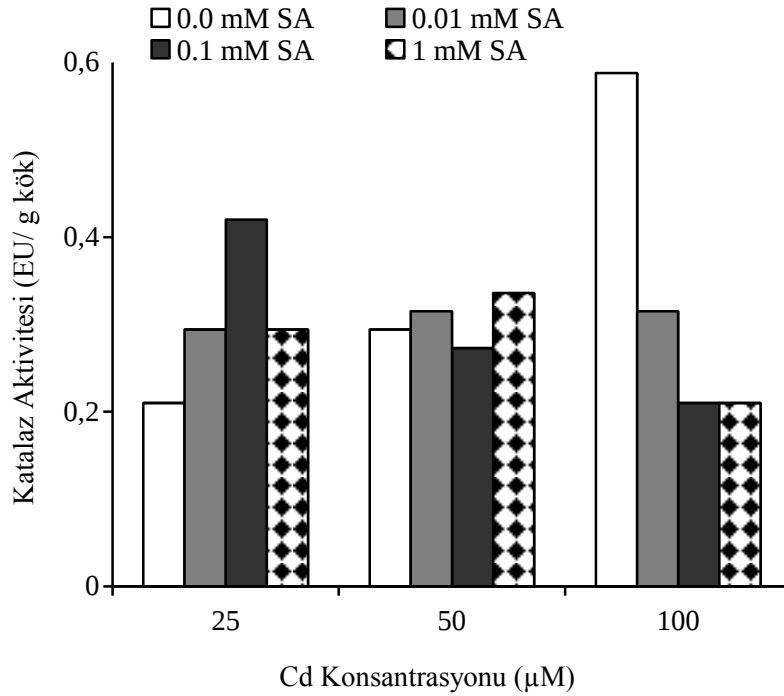
Cd (μM)	SA (μM)	Ortalama Absorbans azalışı (ΔA_{240})/50 μL	Ortalama EU /50 μL (abs x75)	EU/g yaprak ($\times 2.8$)
25	0.0	0,00216	0,1620	0,4536 d
	10	0,0017	0,1275	0,3570 de
	100	0,0020	0,1500	0,4200 d
	1000	0,0021	0,1575	0,4410 d
50	0.0	0,0096	0,0725	0,203 g
	10	0,0026	0,1950	0,5460 c
	100	0,00137	0,1031	0,2888 f
	1000	0,0016	0,1200	0,3360 e
100	0.0	0,00137	0,1031	0,2888 f
	10	0,0017	0,0018	0,3675 de
	100	0,0036	0,2700	0,7560 b
	1000	0,0044	0,3300	0,9240 a



Şekil 4.1. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Bolal yapraklarında apoplastik katalaz aktivitesine etkileri.

Çizelge 4.2. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Bolal köklerinde apoplastik katalaz aktivitesi üzerine etkileri. Aynı harfı bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir ($P>0.05$).

Cd (μM)	SA (μM)	Ortalama Absorbans azalışı (ΔA_{240})/50 μL	Ortalama EU /50 μL (abs x75)	EU/g kök ($\times 2.8$)
25	0.0	0,0010	0,075	0,210 e
	10	0,0014	0,105	0,294 dc
	100	0,0020	0,150	0,420 b
	1000	0,0014	0,105	0,294 dc
50	0.0	0,0014	0,105	0,294 dc
	10	0,0015	0,112	0,315 c
	100	0,0013	0,097	0,273 d
	1000	0,0016	0,120	0,336 c
100	0.0	0,0028	0,210	0,588 a
	10	0,0015	0,112	0,315 c
	100	0,0010	0,075	0,210 e
	1000	0,0010	0,075	0,210 e



Şekil 4.2. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Bolal köklerinde apoplastik katalaz aktivitesi üzerine etkileri.

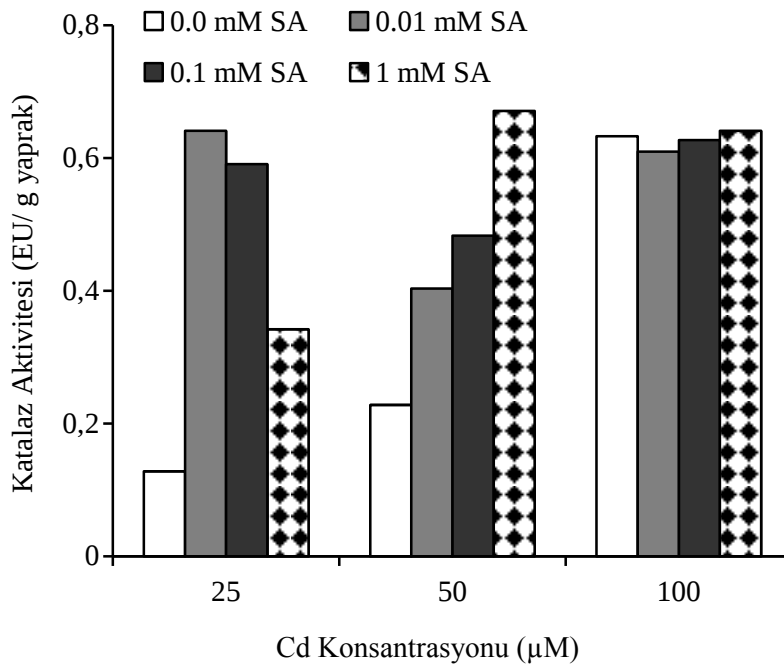
4.1.1.b. Doğu-88 çeşidine ait yaprak ve köklerden elde edilen sonuçlar

SA uygulamalarından (0.01, 0.1, 1 mM) sonra farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 100 μ M) Cd stresine maruz bırakılmış bitki yapraklarında, apoplastik CAT aktivitesinde önemli sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.3, Şekil 4.3). 25 μ M Cd stresine maruz bırakılmış bitki yapraklarında SA'nın üç konsantrasyonu (0.01, 0.1, 1 mM) CAT aktivitesini önemli derecede artırmıştır. Özellikle 0.01 ve 0.1 mM SA konsantrasyonlarında bu artış 1 mM SA'dan daha yüksek bulunmuştur. 50 μ M Cd altındaki bitkilerde de SA CAT aktivitesini artırmıştır. Bu artış SA konsantrasyonları artışına paralel olarak gerçekleşmiştir. Örneğin tek başına 50 μ M Cd'e göre 0.01, 0.1, 1 mM SA uygulamaları CAT aktivitesini sırasıyla %76, %111, %181 oranında artırmıştır. 100 μ M Cd etkisine maruz kalmış bitkilerde SA'nın üç konsantrasyonu CAT aktivitesinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır ($p>0.05$). Tek başına 100 μ M Cd uygulaması, diğer Cd uygulamalarına göre ise CAT aktivitesini önemli derecede artırmıştır.

Köklerden elde edilen apoplastik CAT aktivitesine ait sonuçlar Çizelge 4.4, Şekil 4.4'te sunulmuştur. 25 μ M Cd etkisine maruz kalmış bitki köklerinde SA'nın üç konsantrasyonu (0.01, 0.1, 1 mM) CAT aktivitesinde önemli bir düşüş göstermiştir. 0.1 ve 1 mM SA uygulamalarında bu düşüş eşit olmuştur. 50 ve 100 μ M Cd uygulamalarında SA'nın üç konsantrasyonunda CAT aktivitesini düşürmüştür. 100 μ M Cd uygulanmış bitkilerde 0.1 ve 1 mM SA uygulamalarında CAT aktivitesindeki düşüş eşit olmuştur. Örneğin tek başına 100 μ M Cd'e göre 0.01, 0.1, 1 mM SA uygulamaları CAT aktivitesini sırasıyla, %23, %61, %61 düşürmüştür.

Çizelge 4.3. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Doğu-88 yapraklarında apoplastik katalaz aktivitesi üzerine etkileri. Aynı harfi bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir ($P>0.05$)

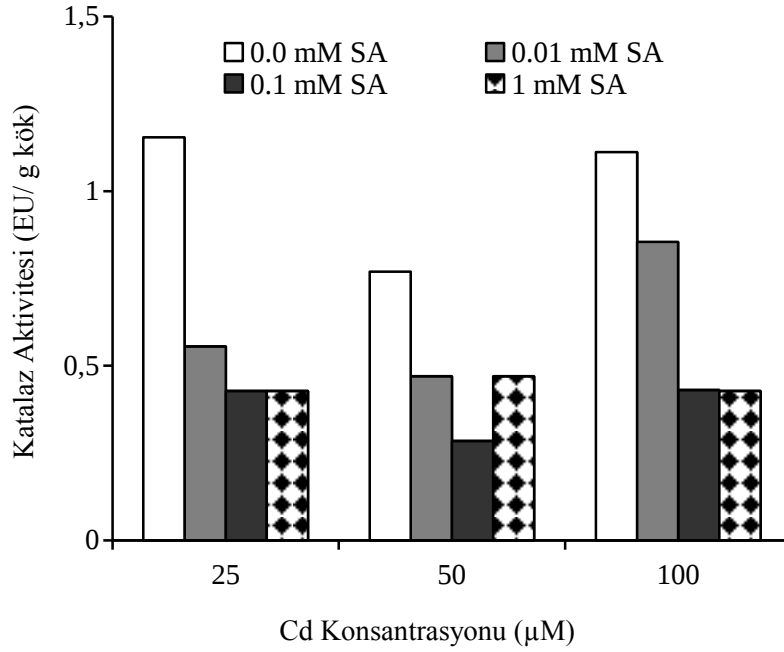
Cd (μM)	SA (μM)	Ortalama Absorbans azalışı (ΔA_{240})/25 μL	Ortalama EU /25 μL (abs x75)	EU/g yaprak ($\times 5,7$)
25	0.0	0,0003	0,0225	0,1282 h
	10	0,0015	0,1125	0,6412 a
	100	0,00138	0,1037	0,5910 b
	1000	0,0008	0,06	0,3420 f
50	0.0	5,333	0,004	0,2280 g
	10	9,4433	0,7075	0,4032 e
	100	0,00113	0,0847	0,4830 d
	1000	0,00157	0,1177	0,6711 a
100	0.0	0,00148	0,111	0,6327 ba
	10	0,0014	0,107	0,6099 c
	100	0,0014	0,110	0,6270 ba
	1000	0,0015	0,1125	0,6412 ba



Şekil 4.3. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Doğu-88 yapraklarında apoplastik katalaz aktivitesi üzerine etkileri.

Çizelge 4.4. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Doğu-88 köklerinde apoplastik katalaz aktivitesi üzerine etkileri. Aynı harfi bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir ($P>0.05$)

Cd (μM)	SA (μM)	Ortalama Absorbans azalışı (ΔA_{240})/25 μL	Ortalama EU /50 μL (abs x75)	EU/g kök ($\times 5,7$)
25	0.0	0,0027	0,2025	1,1542 a
	10	0,0013	0,0975	0,5557 d
	100	0,001	0,075	0,4275 e
	1000	0,001	0,075	0,4275 e
50	0.0	0,0018	0,135	0,7695 c
	10	0,0011	0,0825	0,4702 c
	100	6,666	0,005	0,285 f
	1000	0,0011	0,0825	0,4702 c
100	0.0	0,0026	0,195	1,1115 a
	10	0,002	0,15	0,855 b
	100	8,888	0,0755	0,4306 e
	1000	0,001	0,075	0,4275 e



Şekil 4.4. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Doğu-88 köklerinde apoplastik katalaz aktivitesi üzerine etkileri.

4.1.2. Peroksidaz Aktivitesi Sonuçları

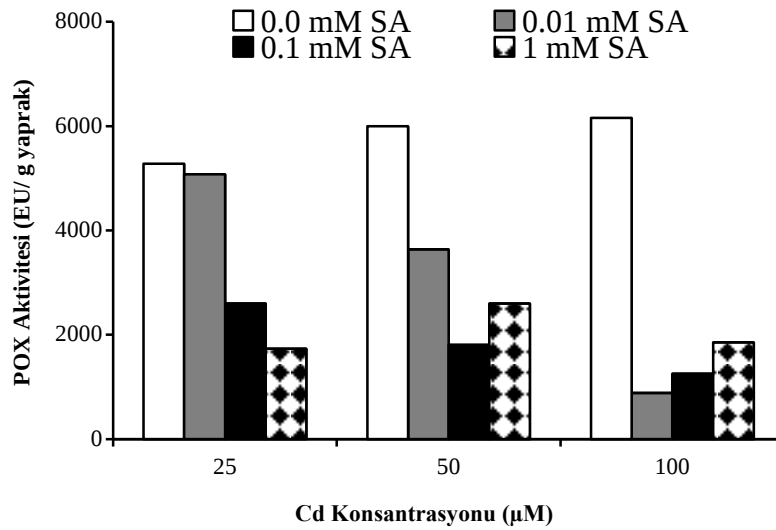
4.1.2.a. Bolal çeşidine ait yaprak ve köklerden elde edilen sonuçlar

Farklı konsantrasyonlarda (0.01, 0.1, 1 mM) SA uygulamalarından sonra, 25, 50, 100 μ M Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında apoplastik POX aktivitesinden elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5, Şekil 4.5'te gösterilmiştir. 25 μ M Cd'e maruz kalmış bitkilerde 0.01 mM SA uygulaması POX aktivitesini değiştirmezken, 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları POX aktivitesini önemli derecede düşürmüştür ($p < 0.05$). Örneğin tek başına 25 μ M Cd'e göre 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları POX aktivitesini %31, %67 düşürmüştür. 50 ve 100 μ M Cd stresindeki bitkilerde SA'nın üç konsantrasyonu POX aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. Diğer taraftan tek başına Cd uygulamaları Cd konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak POX aktivitesini artırmıştır ve en fazla artış 100 μ M Cd'de gözlenmiştir.

Köklerden de elde edilen apoplastik POX aktivitesine ait sonuçlar Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6'da sunulmuştur. 25 μ M Cd etkisine maruz kalmış bitkilerde 0.01 ve 0.1 mM SA uygulamaları POX aktivitesini değiştirmezken, 1 mM SA konsantrasyonu POX aktivitesini önemli ölçüde artırmıştır. 50 μ M Cd stresi altındaki bitkilerde SA'nın üç konsantrasyonunda POX aktivitesini artırmış yine bu Cd konsantrasyonunda da en fazla artış 1 mM SA uygulamasında gözlenmiştir. 100 μ M Cd'de 0.01 ve 0.1 mM SA konsantrasyonları POX aktivitesini azaltırken 1 mM SA uygulaması artırmıştır.

Çizelge 4.5. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Bolal yapraklarında apoplastik peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri. Aynı harfi bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir ($P>0.05$)

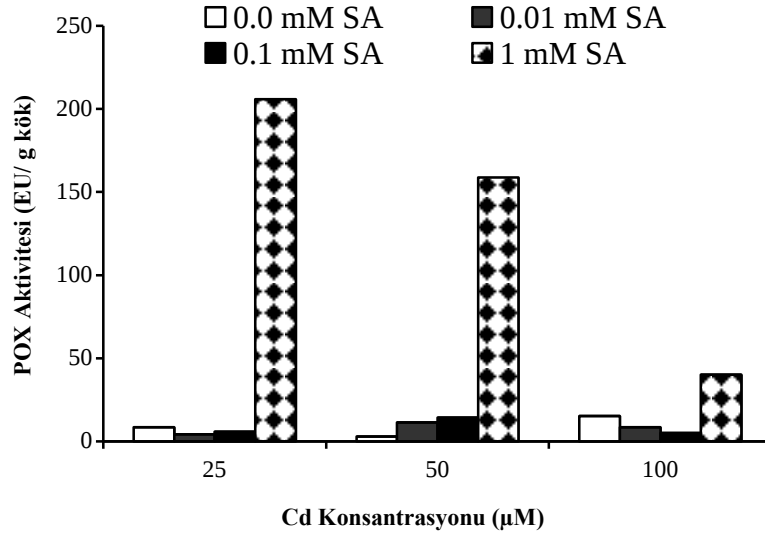
Cd (μM)	SA (μM)	Ortalama Absorbans artışı (ΔA_{470})/ $1\mu\text{L}$	Ortalama EU / $1\mu\text{L}$ (abs x100)	EU/g yaprak ($\times 143$)
25	0.0	0,3690	36,90	5276,7 b
	10	0,3548	35,48	5073,6 b
	100	0,1818	18,18	2599,7 d
	1000	0,1210	12,10	1730,5 c
50	0.0	0,4194	41,94	5998,2 a
	10	0,2542	25,42	3635,6 c
	100	0,1261	12,61	1804,2 c
	1000	0,1818	18,18	2599,7 d
100	0.0	0,4306	43,60	6157,5 a
	10	0,0615	6,157	880,45 d
	100	0,0877	8,77	1254,5 d
	1000	0,1298	12,98	1856,7 c



Şekil 4.5. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Bolal yapraklarında apoplastik peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri.

Çizelge 4.6. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Bolal köklerinde apoplastik peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri. Aynı harfi bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir ($P>0.05$)

Cd (μM)	SA (μM)	Ortalama Absorbans artışı (ΔA_{470})/ $1\mu\text{L}$	Ortalama EU / $1\mu\text{L}$ (abs x100)	EU/g kök ($\times 143$)
25	0.0	0,0006	0,06	8,58e
	10	0,0003	0,03	4,29f
	100	0,0004	0,04	5,72f
	1000	0,0053	0,53	75,79a
50	0.0	0,0002	0,02	2,86g
	10	0,0008	0,08	11,44d
	100	0,001	0,1	14,3d
	1000	0,0041	0,41	58,63b
100	0.0	0,00106	0,106	15,15d
	10	0,0006	0,06	8,58e
	100	0,00035	0,035	5,005f
	1000	0,0028	0,28	40,04c



Şekil 4.6. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Bolal köklerinde apoplastik peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri.

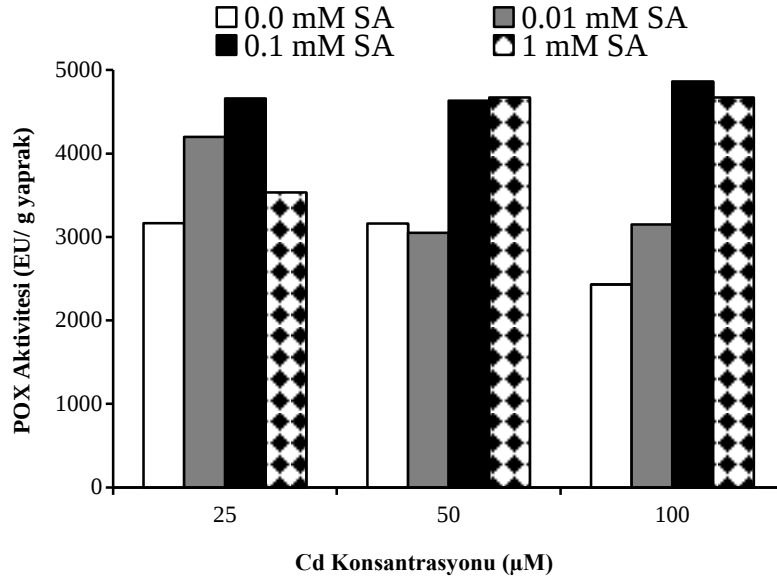
4.1.2.b. Doğu-88 çeşidine ait yaprak ve köklerden elde edilen sonuçlar

0.01, 0.1 ve 1 mM SA uygulamalarından sonra 25, 50, 100 μ M Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında, apoplastik POX aktivitesinde önemli sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.7, Şekil 4.7). 25 μ M Cd stresine maruz kalmış bitkilerde SA'nın üç konsantrasyonu da (0.01, 0.1, 1 mM) POX aktivitesini artırmıştır. En fazla POX artışı 0.1 mM SA uygulamasında gözlenmiştir. 50 μ M Cd'e maruz kalmış bitkilerde de SA'nın üç konsantrasyonu POX aktivitesini artırmıştır, özellikle de 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları. 100 μ M Cd'de de SA'nın üç konsantrasyonu POX aktivitesini önemli ölçüde artırmıştır. Örneğin, bu Cd konsantrasyonunda POX aktivitesindeki artışlar 0.01, 0.1 ve 1 mM SA uygulamalarında kontrole göre (sadece 100 μ M Cd uygulanmış) sırasıyla %29, %100, %92 gibi önemli oranda yüksek bulunmuştur.

Köklerden elde edilen apoplastik POX aktivitesine ait sonuçlar Çizelge 4.8 ve Şekil 4.8'de sunulmuştur. 25 μ M Cd'e maruz kalmış bitkilerde, SA'nın üç konsantrasyonu da (0.01, 0.1, 1 mM) POX aktivitesini önemli ölçüde ($p < 0.05$) düşürmüşlerdir. Örneğin, bu Cd konsantrasyonunda kontrole göre (sadece 25 μ M Cd uygulanmış) POX aktivitesindeki azalışlar 0.01, 0.1 ve 1 mM SA uygulamalarında sırasıyla %68, %79, %74 olarak belirlenmiştir. 50 μ M Cd'de de SA'nın üç konsantrasyonunda POX aktivitesini düşürmüştür, üstelik 0.01 ve 0.1 mM SA uygulamalarında bu düşüş eşit olmuştur. 100 μ M Cd uygulamasında ise SA'nın üç konsantrasyonunda eşit miktarda POX aktivitesini düşürmüşlerdir. Tek başına 50 ve 100 μ M Cd uygulamaları tek başına 25 μ M Cd uygulamasına göre POX aktivitesini düşürmüştür.

Çizelge 4.7. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Doğu-88 yapraklarında apoplastik peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri. Aynı harfi bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir ($P>0.05$).

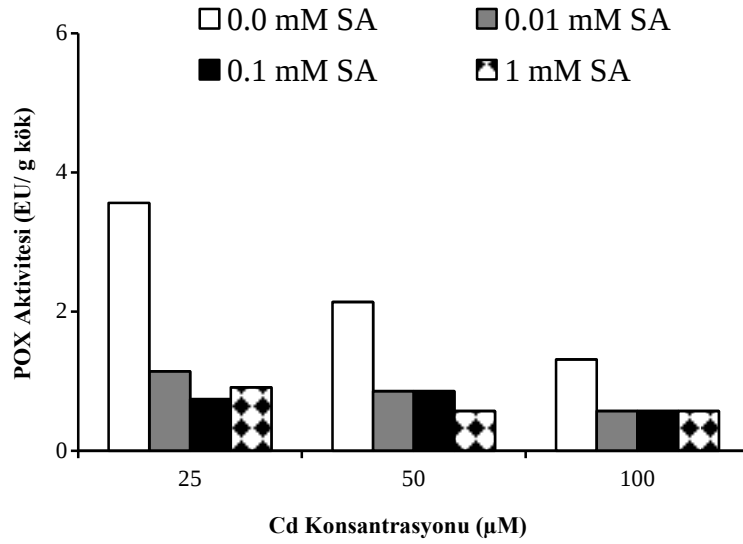
Cd (μM)	SA (μM)	Ortalama Absorbans artışı (ΔA_{470})/1 μL	Ortalama EU /1 μL (abs x100)	EU/g yaprak ($\times 143$)
25	0.0	0,2212	22,12	3163,16 d
	10	0,2935	29,35	4197,05 b
	100	0,32597	32,597	4661,37 a
	1000	0,247	24,7	3532,1 c
50	0.0	0.2209	22.09	3160.20 d
	10	0.2132	21.32	3050.18 d
	100	0,32402	32,402	4633,48 a
	1000	0,32664	32,664	4670,95 a
100	0.0	0,1699	16,99	2429,9 e
	10	0,2202	22,02	3148,86 d
	100	0,34024	34,024	4865,43 a
	1000	0,32662	32,662	4670,66 ba



Şekil 4.7. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Doğu-88 yapraklarında apoplastik peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri.

Çizelge 4.8. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Doğu-88 köklerinde apoplastik peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri. Aynı harfi bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir ($P>0.05$)

Cd (μM)	SA (μM)	Ortalama Absorbans artışı (ΔA_{470})/5 μL	Ortalama EU /5 μL (abs x100)	EU/g kök ($\times 28,5$)
25	0.0	0,00125	0,125	3,5625 a
	10	0,0004	0,04	1,14 d
	100	0,00026	0,026	0,741 e
	1000	0,00032	0,032	0,912 e
50	0.0	0,00075	0,075	2,1375 b
	10	0,0003	0,03	0,855 e
	100	0,00030	0,03	0,855 e
	1000	0,0002	0,02	0,57 f
100	0.0	0,00046	0,046	1,311 c
	10	0,0002	0,02	0,57 f
	100	0,00035	0,035	0,9975 f
	1000	0,0002	0,02	0,57 f



Şekil 4.8. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Doğu-88 köklerinde apoplastik peroksidaz aktivitesi üzerine etkileri.

4.1.3. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Sonuçları

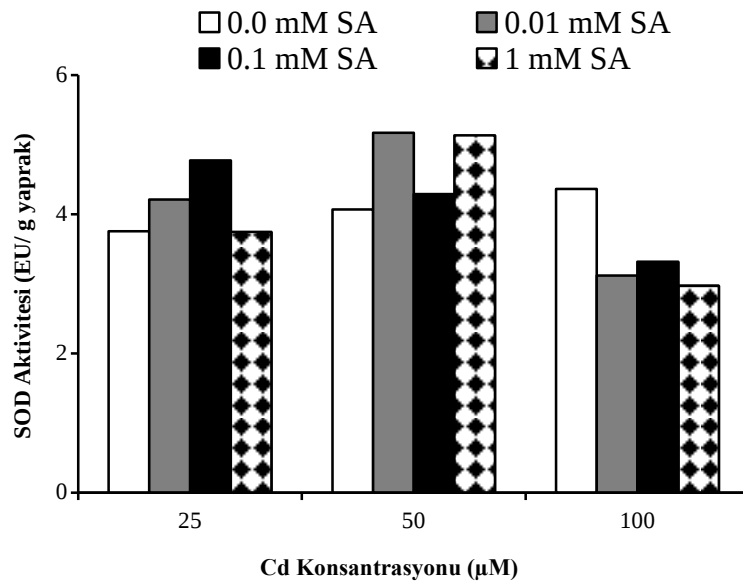
4.1.3.a. Bolal çeşidine ait yaprak ve köklerden elde edilen sonuçlar

Farklı konsantrasyonlarda (0.01, 0.1 ve 1 mM) SA uygulamasından sonra, 25, 50, 100 μM Cd stresine maruz bırakılmış bitki yapraklarında, apoplastik SOD aktivitesinde önemli sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.9, Şekil 4.9). 25 μM Cd'e maruz bırakılmış bitkilerde SA'nın iki konsantrasyonu (0.01, 0.1 mM) SOD aktivitesinde artışa neden olmuştur ($p < 0.05$). Ancak 1 mM SA uygulaması SOD aktivitesinde önemli değişikliğe neden olmamıştır ($p > 0.05$) 50 μM Cd'e maruz bırakılmış bitkilerde SA'nın üç konsantrasyonunda SOD aktivitesini artırmıştır. 25 ve 50 μM Cd uygulamalarının aksine 100 μM Cd etkisine maruz kalmış bitkilerde SA'nın üç konsantrasyonunda SOD aktivitesini düşürmüştür. Örneğin, tek başına 100 μM Cd'e göre 0.01, 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları SOD aktivitesini sırasıyla, %28, %23, %31 düşürmüştür.

Köklerde de apoplastik SOD aktivitesine ait önemli sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.10, Şekil 4.10). 25 μM Cd'e maruz bırakılmış bitkilerde SA'nın iki konsantrasyonu SOD aktivitesini artırmıştır. 50 μM Cd stresi altındaki bitkilerde de SA'nın her üç konsantrasyonu SOD aktivitesini artırmıştır ($p < 0.05$), hatta bu Cd konsantrasyonunda en fazla artış 1 mM SA uygulamasında görülmüştür. 100 μM Cd'de ise diğer Cd konsantrasyonlarının (25, 50 μM) aksine SA'nın her üç uygulamasıda SOD aktivitesini azaltmıştır ($p < 0.05$), en fazla azalma ise 1 mM SA uygulamasında gözlenmiştir. Örneğin tek başına 100 μM Cd'e göre 0.01, 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları SOD aktivitesini sırasıyla, %17, %50, %54 düşürmüştür. Bu sonuçlara karşılık tek başına 100 μM Cd uygulaması, 25 ve 50 μM Cd uygulamalarına göre SOD aktivitesini önemli derecede artırmıştır.

Çizelge 4.9. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Bolal yapraklarında apoplastik süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkileri. Aynı harfi bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir ($P>0.05$)

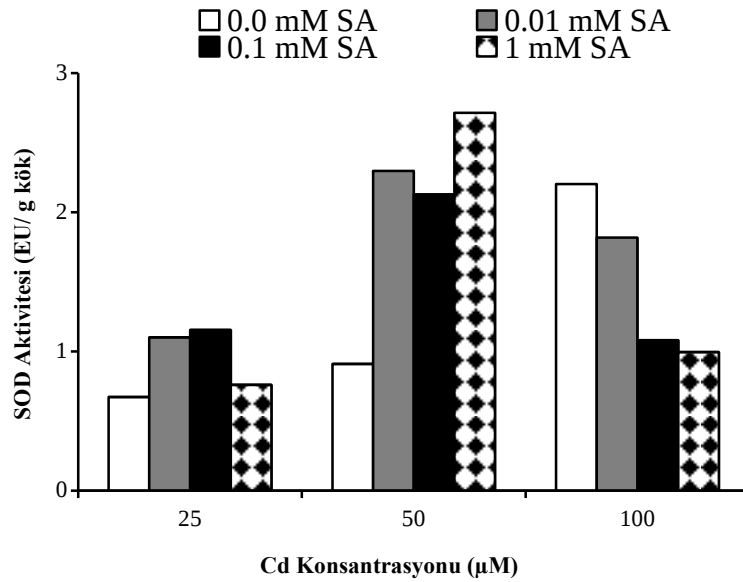
Cd (μM)	SA (μM)	Ortalama Absorbans artışı (ΔA_{560})25 μL	Ortalama EU /1 μL (abs /0.525)	EU/g yaprak ($\times 5.72$)
25	0.0	0,345	0,657	3,758 e
	10	0,387	0,737	4,215 dc
	100	0,438	0,834	4,775 b
	1000	0,344	0,655	3,747 e
50	0.0	0,374	0,712	4,072 d
	10	0,474	0,904	5,172 a
	100	0,394	0,750	4,290 c
	1000	0,471	0,897	5,135 a
100	0.0	0,401	0,763	4,364 c
	10	0,286	0,545	3,121 f
	100	0,304	0,580	3,318 f
	1000	0,273	0,520	2,974 f



Şekil 4.9. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Bolal yapraklarında apoplastik süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkileri.

Çizelge 4.10. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Bolal köklerinde apoplastik süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkileri. Aynı harfi bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir ($P>0.05$).

Cd (μM)	SA (μM)	Ortalama Absorbans artışı (ΔA_{560}) 25 μL	Ortalama EU / 1 μL (abs / 0.525)	EU/g kök ($\times 5.72$)
25	0.0	0,0617	0,117	0,672 g
	10	0,101	0,192	1,100 e
	100	0,106	0,201	1,154 e
	1000	0,2095	0,399	0,760 g
50	0.0	0,0835	0,159	0,909 f
	10	0,211	0,401	2,298 b
	100	0,1955	0,372	2,130 b
	1000	0,2492	0,474	2,715 a
100	0.0	0,2022	0,385	2,203 b
	10	0,167	0,318	1,819 c
	100	0,099	0,189	1,081 d
	1000	0,0916	0,174	0,995 d



Şekil 4.10. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Bolal köklerinde apoplastik süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkileri.

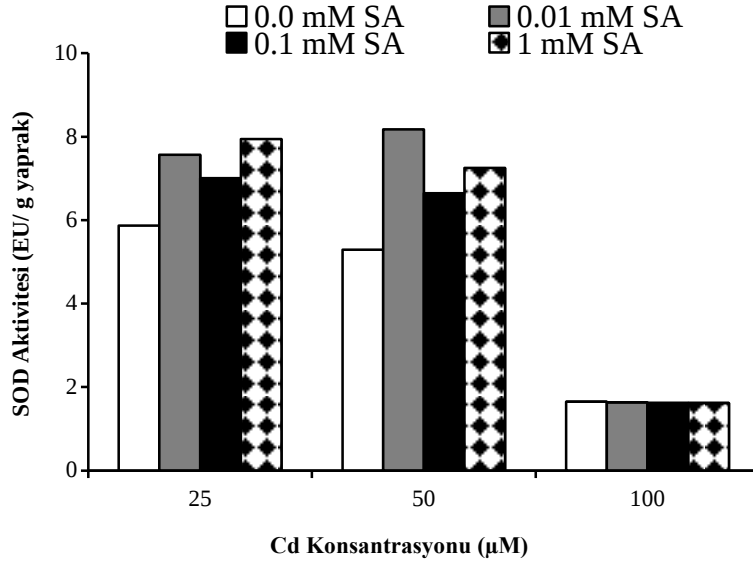
4.1.3.b. Doğu-88 çeşidine ait yaprak ve köklerden elde edilen sonuçlar

0.01, 0.1 ve 1 mM SA uygulamasından sonra, 25, 50, 100 μ M Cd konsantrasyonlarına maruz bırakılmış bitki yapraklarında apoplastik SOD aktivitesinde önemli sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.11, Şekil 4.11). 25 μ M Cd stresine maruz kalmış bitkilerde her üç SA konsantrasyonları (0.01, 0.1, 1 mM) SOD aktivitesini artırmıştır. 50 μ M Cd'e maruz kalmış bitkilerde de SA'nın konsantrasyonları SOD aktivitesini artırmış ($p < 0.05$), hatta en fazla artış 0.01 mM SA uygulamasında görülmüştür. Örneğin, tek başına 50 μ M Cd'e göre 0.01, 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları SOD aktivitesini sırayla, %54, %25, %37 artırmıştır. 100 μ M Cd uygulamasında ise SA'nın üç konsantrasyonunda SOD aktivitesini değiştirmemiştir. Tek başına Cd uygulamalarını incelediğimizde, SOD aktivitesi Cd konsantrasyonu artışıyla önemli bir inhibisyona uğradığı görülmektedir.

Köklerden elde edilen apoplastik SOD aktivitesine ait sonuçlar Çizelge 4.12 ve Şekil 4.12'de sunulmuştur. 25 μ M Cd'e maruz bırakılmış bitki köklerinde SA konsantrasyonları SOD aktivitesini düşürmüştür, ancak SA uygulamaları arasında önemli bir fark belirlenmemiştir ($p < 0.05$). 50 μ M Cd uygulamasında 0.01 mM SA SOD aktivitesini önemli ölçüde ($p > 0.05$) değiştirmezken, 0.1 ve 1 mM SA SOD aktivitesini düşürmüştür ($p < 0.05$). 100 μ M Cd, 25 ve 50 μ M Cd uygulamalarının aksine SA'nın üç konsantrasyonu da SOD aktivitesini artırmıştır ($p < 0.05$). Örneğin, tek başına 100 μ M Cd'e göre 0.01, 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları SOD aktivitesini sırasıyla, %71, %66, %137 artırmıştır. Tek başına Cd uygulamalarını incelediğimizde, SOD aktivitesi Cd konsantrasyonu artışıyla önemli bir inhibisyona uğradığı görülmektedir.

Çizelge 4.11. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Doğu-88 yapraklarında apoplastik süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkileri. Aynı harfi bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir ($P>0.05$)

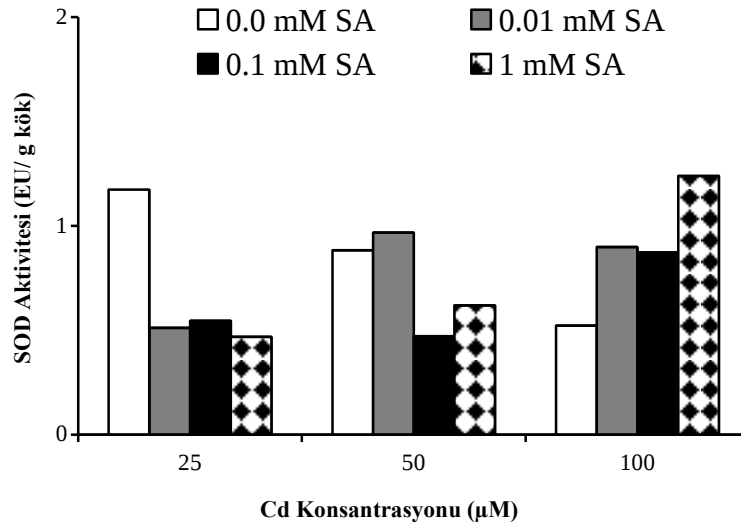
Cd (μM)	SA (μM)	Ortalama Absorbans artışı (ΔA_{560})25 μL	Ortalama EU /1 μL (abs /0.525)	EU/g yaprak ($\times 5.72$)
25	0.0	0,5385	1,0257	5,8670 e
	10	0,6946	1,3230	7,5678 b
	100	0,6431	1,2249	7,0067 c
	1000	0,7290	1,3885	7,9426 ba
50	0.0	0,4856	0,9249	5,2907 f
	10	0,7505	1,4295	8,1768 a
	100	0,6101	1,1620	6,6471 dc
	1000	0,6656	1,2678	7,2518 b
100	0.0	0,1516	0,2887	1,6517 g
	10	0,1497	0,2853	1,6320 g
	100	0,1486	0,2832	1,6200 g
	1000	0,1488	0,2835	1,6218 g



Şekil 4.11. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Doğu-88 yapraklarında apoplastik süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkileri.

Çizelge 4.12. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Doğu-88 köklerinde apoplastik süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkileri. Aynı harfi bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir ($P>0.05$)

Cd (μM)	SA (μM)	Ortalama Absorbans artışı (ΔA_{560})25 μL	Ortalama EU /1 μL (abs /0.518)	EU/g kök ($\times 5.72$)
25	0.0	0,1063	0,2052	1,1741 a
	10	0,0463	0,0894	0,5116 dc
	100	0,0493	0,0952	0,5447 dc
	1000	0,0424	0,0818	0,4678 d
50	0.0	0,08	0,1544	0,8833 b
	10	0,0876	0,1692	0,9680 b
	100	0,0426	0,0823	0,4711 d
	1000	0,056	0,1081	0,6183 c
100	0.0	0,0473	0,0913	0,5226 dc
	10	0,0813	0,1570	0,8981 b
	100	0,079	0,1525	0,8723 b
	1000	0,1123	0,2168	1,2404 a



Şekil 4.12. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Doğu-88 köklerinde apoplastik süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine etkileri.

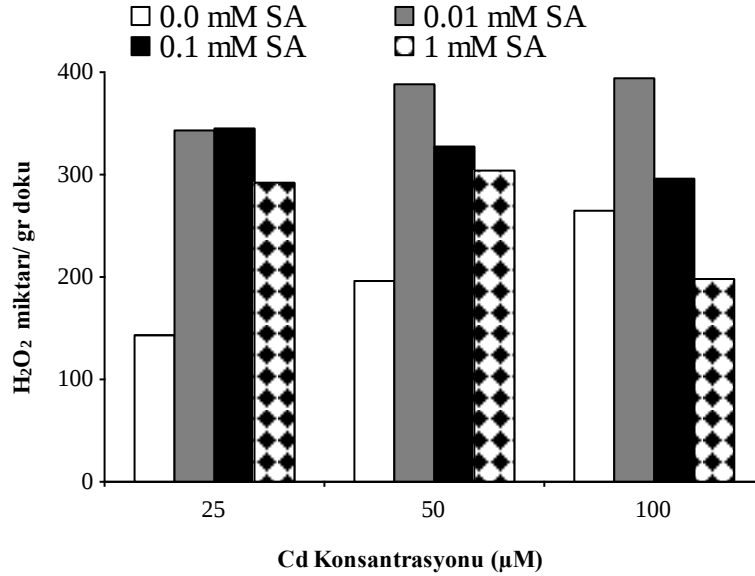
4.2. H₂O₂ (Hidrojen peroksit) Miktarı Sonuçları

4.2.1. Bolal çeşidine ait yapraklardan elde edilen sonuçlar

0.01, 0.1 ve 1 mM SA uygulamasından sonra farklı konsantrasyonlarda (25, 50 ve 100 μ M) Cd stresine maruz bırakılmış bitki yapraklarında, H₂O₂ miktarında önemli sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.13, Şekil 4.13). 25 μ M Cd'e maruz bırakılmış bitki yapraklarında, SA'nın 3 konsantrasyonu da (0.01, 0.1, 1 mM) H₂O₂'de önemli bir artışa neden olmuştur. Hatta en fazla artış 0.01 ve 0.1 mM SA uygulamalarında gözlenmiştir. 50 μ M Cd'de SA'nın 3 konsantrasyonu da H₂O₂ miktarını artırmıştır, en fazla artış 0.01 mM SA'da gözlenmiştir. Örneğin, tek başına 50 μ M Cd'e göre 0.01, 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları H₂O₂ miktarını sırasıyla %98, %67 ve %55 artırmıştır. 100 μ M Cd'de 0.01 ve 0.1 mM SA uygulamaları H₂O₂ miktarını artırırken, 1 mM SA ise düşürmüştür.

Çizelge 4.13. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Bolal yapraklarında H_2O_2 miktarı üzerine etkileri. Aynı harfi bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir ($P>0.05$).

Cd (μ M)	SA (μ M)	ABS(415 nm)	H_2O_2 miktarı 1.5 ml deki (ABS/0.009)	H_2O_2 miktarı/gram doku ($\times 15.9$)
25	0.0	0.0816	9.066	144.149 f
	10	0.1946	21.62	343.758 b
	100	0.1956	21.73	345.507 b
	1000	0.1652	18.35	291.765 d
50	0.0	0.1107	12.3	195.57 e
	10	0.2202	24.46	388.914 a
	100	0.1854	20.6	327.54 c
	1000	0.1725	19.16	304.644 d
100	0.0	0.1502	16.68	265.212 dc
	10	0.2230	24.77	393.843 a
	100	0.1681	18.67	296.853 d
	1000	0.1121	12.45	197.955 e



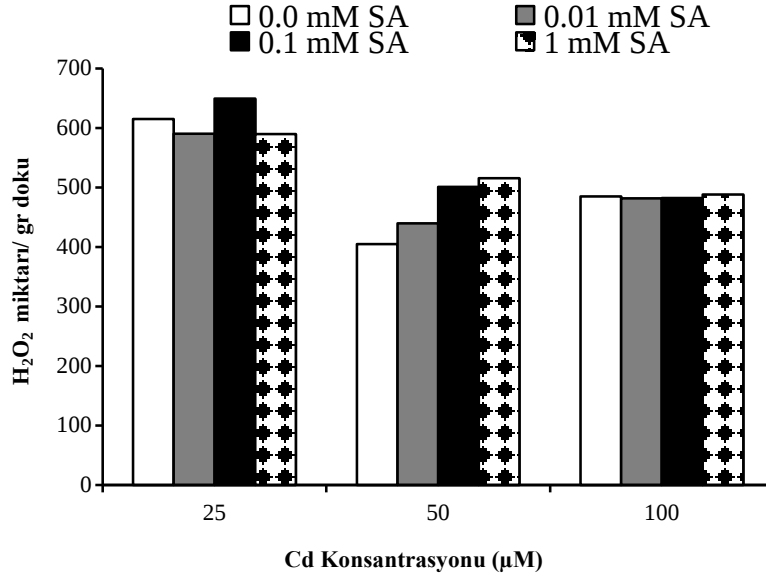
Şekil 4.13. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Bolal yapraklarında H_2O_2 miktarı üzerine etkileri.

4.2.2. Doğu-88 çeşidine ait yapraklardan elde edilen sonuçlar

SA uygulamalarından (0.01, 0.1 ve 1 mM) sonra, farklı konsantrasyonlarda (25, 50 ve 100 μ M) Cd stresine maruz kalmış bitki yapraklarında H_2O_2 miktarında önemli sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.14, Şekil 4.14). 25 μ M Cd stresine maruz bırakılmış bitki yapraklarında 0.1 mM SA uygulaması H_2O_2 miktarında bir miktar artış gösterirken, diğer SA uygulamaları (0.01 ve 1 mM) H_2O_2 miktarını değiştirmemiştir. 50 μ M Cd'de SA'nın 3 konsantrasyonu da H_2O_2 miktarını artırmıştır. Hatta bu Cd konsantrasyonundaki H_2O_2 artışı, SA konsantrasyonu artışı ile paralel olarak artmıştır. Bu Cd konsantrasyonundaki H_2O_2 miktarındaki artışlar 0.01, 0.1 ve 1 mM SA uygulamalarında kontrole göre sırasıyla, %8, %23 ve %27 olmuştur. 100 μ M Cd'de SA'nın 3 konsantrasyonunda H_2O_2 miktarını değiştirmemiştir.

Çizelge 4.14. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Doğu-88 yapraklarında H₂O₂ miktarı üzerine etkileri. Aynı harfi bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir (P>0.05).

Cd (μM)	SA (μM)	ABS(415 nm)	H ₂ O ₂ miktarı 1.5 ml deki (ABS/0.009)	H ₂ O ₂ miktarı/gram doku (x15.9)
25	0.0	0.3482	38.68	615.012 b
	10	0.3342	37.13	590.420 b
	100	0.3680	40.88	649.992 a
	1000	0.3341	37.12	590.208 b
50	0.0	0.2292	25.47	404.973 f
	10	0.2491	27.67	440.076 e
	100	0.2836	31.51	501.009 c
	1000	0.2920	32.44	515.796 c
100	0.0	0.2746	30.51	485.109 d
	10	0.2727	30.30	481.77 d
	100	0.2730	30.34	482.406 d
	1000	0.2765	30.72	488.448 d



Şekil 4.14. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Doğu-88 yapraklarında H₂O₂ miktarı üzerine etkileri.

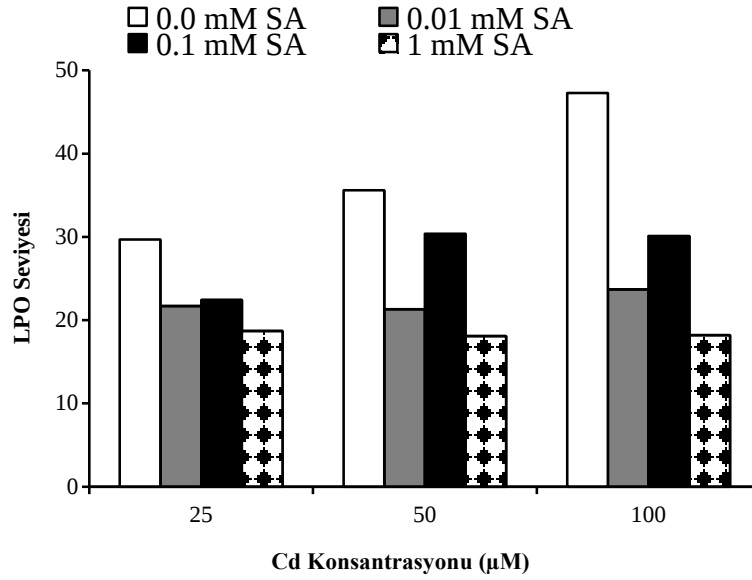
4.3. Lipid Peroksidasyonu (LPO) Seviyesi Sonuçları

4.3.1. Bolal çeşidine ait yapraklardan elde edilen sonuçlar

Farklı konsantrasyonlarda (0.01, 0.1 ve 1 mM) SA uygulamasından sonra, 25, 50, 100 μ M Cd stresine maruz bırakılmış bitki yapraklarında lipid peroksidasyonunda (LPO) önemli sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.15, Şekil 4.15). 25 μ M Cd stresine maruz bırakılmış bitkilerde 0.01 ve 1 mM SA lipid peroksidasyonu düşürürken, 0.1 mM SA değiştirmemiştir. 50 μ M Cd'de 0.01 ve 0.1 mM SA uygulamaları lipid peroksidasyonunu artırmıştır ancak, 1 mM SA ise düşürmüştür. 100 μ M Cd'de SA'nın 3 konsantrasyonunda lipid peroksidasyonunu düşürmüştür. Örneğin, tek başına 100 μ M Cd'e göre 0.01, 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları lipid peroksidasyonunu sırasıyla, %49, %36, %61 oranında düşürmüştür.

Çizelge 4.15. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Bolal yapraklarında lipid peroksidasyonu üzerine etkileri. Aynı harfi bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir ($P>0.05$)

Cd (μM)	SA (μM)	A532 - A600	(A532 - A600) / 155000 X 10^6	MDA/ gram yaprak (x 12)
25	0.0	0.384	2.477	29.724 c
	10	0.281	1.812	21.744 d
	100	0.290	1.870	22.440 d
	1000	0.242	1.561	18.732 e
50	0.0	0.460	2.967	35.604 b
	10	0.276	1.780	21.360 d
	100	0.393	2.539	30.468 c
	1000	0.235	1.516	18.192 e
100	0.0	0.612	3.948	47.376 a
	10	0.307	1.980	23.760 d
	100	0.390	2.516	30.192 c
	1000	0.236	1.522	18.264 e



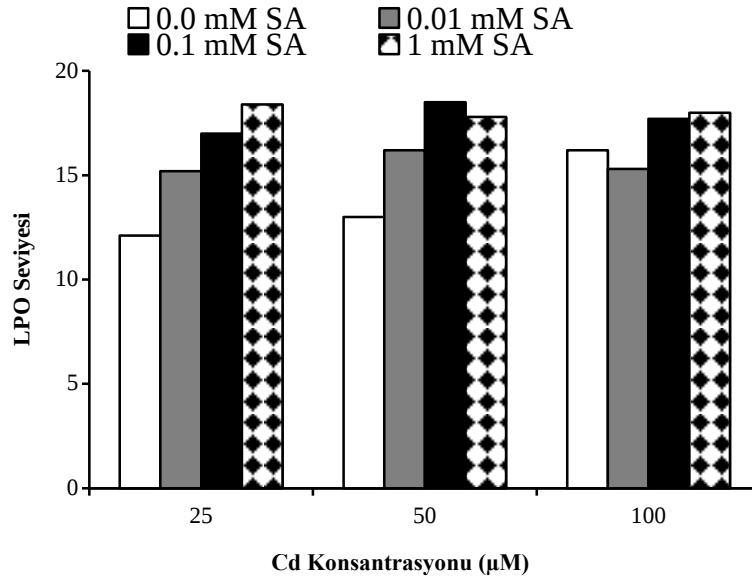
Şekil 4.15. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Bolal yapraklarında lipid peroksidasyonu üzerine etkileri.

4.3.2. Doğu-88 çeşidine ait yapraklardan elde edilen sonuçlar

SA uygulamalarından (0.01, 0.1 ve 1 mM) sonra farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 100 μ M) Cd stresine maruz bırakılmış bitki yapraklarında lipid peroksidasyonunda önemli sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.16, Şekil 4.16). 25 μ M Cd stresine maruz kalmış bitkilerde SA'nın 3 konsantrasyonu da lipid peroksidasyonunu artırmıştır, hatta en fazla artış 1 mM SA uygulamasında gözlenmiştir. 50 μ M Cd'de de SA'nın 3 konsantrasyonu lipid peroksidasyonunu artırmıştır. Örneğin tek başına 50 μ M Cd'e göre 0.01, 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları lipid peroksidasyonunu sırasıyla, %24, %42 ve %36 artırmıştır. 100 μ M Cd'de 0.01 mM SA uygulaması, lipid peroksidasyonunda önemli bir değişiklik meydana getirmezken, 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları lipid peroksidasyonunu artırmıştır.

Çizelge 4.16. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Doğu-88 yapraklarında lipid peroksidasyonu üzerine etkileri. Aynı harfi bulunduran gruplar arasındaki fark önemsizdir ($P>0.05$).

Cd (μM)	SA (μM)	A532 - A600	(A532 - A600) / 155000 X 10^6	MDA/ gram yaprak (x 12)
25	0.0	0.157	1.012	12.144 e
	10	0.197	1.270	15.240 d
	100	0.220	1.419	17.028 b
	1000	0.238	1.535	18.420 a
50	0.0	0.169	1.090	13.080 d
	10	0.210	1.354	16.248 c
	100	0.240	1.548	18.576 a
	1000	0.231	1.490	17.880 b
100	0.0	0.210	1.354	16.248 c
	10	0.198	1.277	15.324 d
	100	0.230	1.483	17.796 b
	1000	0.233	1.503	18.036 a



Şekil 4.16. SA muamelesinin Cd stresine maruz bırakılmış *T. aestivum* cv. Doğu-88 yapraklarında lipid peroksidasyonu üzerine etkileri.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Canlılar için toksik bir ağır metal olan kadmiyumun (Cd), bitkilerin büyüme ve gelişmesi üzerine de çok fazla olumsuzluklara sebep olduğu birçok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Schützendübel *et al.* 2001; Vitoria *et al.* 2001 Benavides *et al.* 2005; Gratao *et al.* 2005). Bitki hücrelerinde Cd birikimi, çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik süreçleri bozar ve özellikle oksidatif stresi artırarak hücre ölümüne ve büyümenin engellenmesine neden olur (Chaoui *et al.* 1997; Toppi and Gabrielli 1999; Sandalio *et al.* 2001; Xu *et al.* 2009; Guo *et al.* 2009; Popova *et al.* 2009). Ağır metal stresini de içine alan abiyotik stresler altındaki bitkilerde oksidatif stresin bir sonucu olarak hücrede reaktif oksijen türlerinin (serbest radikaller) hızlı bir artışı meydana gelir. Bu reaktif oksijen bileşikleri (ROS), biyolojik membranlar, nükleik asitler, proteinler, lipidler ve diğer birçok biyomolekülleri etkileyerek hücrede metabolizmanın bozulmasına sebep olurlar. Böyle bir durumda meydana gelebilecek hasarı azaltmak için ROS bileşiklerinin katalaz (CAT), peroksidaz (POX), süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan enzimlerce hızlı bir şekilde zararsız hale getirilmesi gerekir. Son yıllarda, stresli çevrelere direncin artırılması için bitki hücrelerinde antioksidatif savunma sistemini harekete geçiren doğal sinyal moleküller üzerinde araştırmalar yapılmaktadır. Salisilik asit (SA) de gerek normal koşullarda gerekse stres altındaki bitkilerde, antioksidan sistemi ve enzimleri etkileyen önemli bir sinyal molekülüdür (Sakhabutdinova *et al.* 2004; Hayat and Ahmad 2007).

Bu çalışmada, bitkiye önceden uygulanan SA'nın bitki Cd stresi ile karşılaştığı bir durumda stresten koruyabilme potansiyeli araştırılmıştır. Bu amaç için özellikle apoplastik antioksidan enzimler (CAT, POX ve SOD) üzerine yoğunlaşmıştır. Çünkü bitki hücrelerinin strese ilk cevap bölgeleri apoplasttır. Literatürde Cd stresi altındaki bitkiler için SA'nın koruyucu rolü ile ilgili olarak bu anlamda herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu yüzden, çalışma sonuçlarımız başka araştırmacıların daha çok hücrel antioksidan enzimlerle elde ettikleri sonuçlarıyla kıyaslanmıştır. Bazı çalışmalarda SA uygulamasının bitkiyi Cd stresinden koruyabildiği ile ilgili bilgiye rastlanılmaktadır. Ancak bu bilgiler yetersiz ve kısıtlıdır. Araştırmamızda ayrıca SA

uygulamasından sonra stresten korunma derecesini farklı bir açıdan gösteren lipid peroksidasyon ve hidrojen peroksit seviyeleri de belirlenmiştir. Hücrelerde lipid peroksidasyon artışı hemen tüm çevresel stresler için karakteristiktir. Stres esnasında hücrelerde artan ROS bileşikleri hücre membranlarına saldırarak fosfolipidlerin oksidasyonunu artırır ve böylece hücrelerde hasar oluşur. Bu oksidasyon derecesini ölçmek, stresten bitkinin korunabildiği ile ilgili fikir vermektedir. Hücre membranlarındaki fosfolipidlerin oksidasyon ürünü karakteristik olarak malondialdehittir (MDA). Bu bileşiğin seviyesi ölçülerek lipid peroksidasyon derecesi belirlenebilmektedir. Diğer taraftan, çalışmamızda salisilik asidin aynı bitki türünün farklı çeşitlerinde etkisini gözlemlemek için buğdayın (*Triticum aestivum*) farklı iki çeşidi (Bolal ve Doğu-88) kullanılmıştır. Cd uygulamaları için 25, 50, 100 μM ; SA uygulamaları için 0.01, 0.1, 1 mM'lık konsantrasyonlar kullanılmıştır. Bu konsantrasyonlar, yapılan ön denemeler ve literatür bilgilerine göre belirlenmiştir. Aşağıda araştırmamızdan elde edilen sonuçların yorumlanması ve diğer araştırmacıların sonuçları ile karşılaştırmalı değerlendirmeleri yapılmıştır.

5.1. Salisilik Asidin Apoplastik Katalaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

SA uygulamasından (0.01, 0.1 ve 1 mM) sonra farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 100 μM) Cd stresine maruz bırakılmış buğdayın **Bolal** çeşidine ait yapraklarda apoplastik CAT aktivitesinde önemli sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.1). 25 μM Cd etkisine maruz kalmış bitki yapraklarında SA uygulamaları CAT aktivitesinde önemli bir değişikliğe neden olmazken, 50 ve 100 μM Cd stresindeki bitkilerde CAT aktivitesini artırmıştır. Aynı bitkinin köklerinden elde edilen sonuçlara baktığımızda, SA uygulamaları 25 μM Cd'e maruz kalmış bitki köklerinde CAT aktivitesini artırmıştır. Ancak, aynı SA uygulamaları 50 μM Cd altındaki bitkilerde CAT aktivitesini etkilemezken, 100 μM Cd'e maruz kalmış bitki köklerinde aktiviteyi düşürmüştür (Şekil 4.2).

Diğer taraftan, buğdayın **Doğu-88** çeşidine ait sonuçlar Bolal çeşidinden daha farklı bir durum sergilemiştir (Şekil 4.3). Örneğin, 25 ve 50 μM Cd stresine maruz bırakılmış Doğu-88 yapraklarında SA'nın üç konsantrasyonu CAT aktivitesini önemli derecede

artırmıştır, hatta bu artış 50 μM Cd’de artan SA konsantrasyonlarına paralel olarak gerçekleşmiştir. 100 μM Cd etkisine maruz kalmış bitki yapraklarında ise SA, CAT aktivitesi üzerinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. Aynı bitkinin köklerinden elde edilen sonuçlara baktığımızda, 25, 50 ve 100 μM Cd etkisine maruz kalmış bitki köklerinde SA’nın üç konsantrasyonu CAT aktivitesini önemli ölçüde azaltmıştır (Şekil 4.4).

İki bitkiyi karşılaştırdığımızda SA, CAT aktivitesini 50 ve 100 μM Cd etkisine maruz Bolal yapraklarında artırırken, Doğu-88’de ise sadece 50 μM Cd’e maruz kalmış bitki yapraklarında artırmıştır. Bu sonuçlara göre Cd stresine maruz kalmadan önce buğday fidelerine uygulanan SA, bitki Cd stresine girdiğinde, yapraklardaki apoplastik CAT aktivitesini artırabilmektedir. *Oryza sativa* yapraklarında yapılan bir çalışmada SA muamelesi hücrel CAT aktivitesini artırmıştır (Panda *et al.* 2007). Bu sonuç bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir. Mısır (*Zea mays*) bitkileri ile yapılan bir çalışmada ise SA ile muamele hücrel CAT aktivitesini azaltmıştır. Bu sonucun bizim sonucumuz ile örtüşmemesinin nedeni, uygulanan konsantrasyonların farklı olmasına bağlanabilir. Köke geldiğimizde, SA sadece 25 μM Cd etkisine maruz kalmış Bolal köklerinde CAT aktivitesini artırmış, 100 μM ’da ise düşürmüştür. Doğu-88 köklerinde ise SA, 25, 50 ve 100 μM Cd’de CAT aktivitesini düşürmüştür. Görüldüğü gibi bir bitkinin farklı dokuları bir strese farklı cevap verebilmektedir. Bizim sonuçlarımızda SA, her iki buğday çeşidinde yapraklarda apoplastik CAT aktivitesini genelde artırırken, köklerde ise özellikle Doğu-88’de belirgin bir şekilde düşürmüştür. Bu sonuç alınan bir ağır metalin bitkide taşınabilmesi ile alakalı olabilir. Doğu-88 bitkilerinde köklerde CAT’ın düşmesinin sebebi, bu bitkinin Cd’yi köklerde biriktirmesi ile alakalı olabilir. Bunun açıklığa kavuşması için daha detaylı araştırmalara gerek vardır. Pirinç (*Oryza sativa*) köklerinde yapılan bir çalışmada Cd stresi altında SA ile muamele hücrel CAT aktivitesini artırmıştır (Guo *et al.* 2007). Bu deneyde 10 μM SA ve 50 μM Cd uygulanmıştır. Bizim sonucumuz ile bu sonuçlarının farklı olmasının nedeni uygulanan SA konsantrasyon farklılığı veya çalışılan enzimlerin bulunduğu bölge farklılığından kaynaklanabilir.

5.2. Salisilik Asidin Apoplastik Peroksidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Farklı konsantrasyonlarda (0.01, 0.1, 1 mM) SA uygulamalarından sonra, 25, 50, 100 μ M Cd stresine maruz kalmış **Bolal** çeşidine ait yapraklarda apoplastik POX aktivitesinden önemli sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.5). 25 μ M Cd'e maruz kalmış bitkilerde 0.01 mM SA uygulaması POX aktivitesini değiştirmezken, 0.1 ve 1 mM SA uygulaması POX aktivitesini önemli derecede düşürmüştür. 50 ve 100 μ M Cd stresindeki bitkilerde SA'nın üç konsantrasyonu POX aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. Aynı bitkinin köklerinden elde ettiğimiz sonuçlara baktığımızda 25 μ M Cd etkisine maruz kalmış bitkilerde 0.01 ve 0.1 mM SA uygulamaları POX aktivitesini değiştirmezken, 1 mM SA konsantrasyonu POX aktivitesini önemli ölçüde artırmıştır. 50 μ M Cd stresi altındaki bitkilerde SA'nın üç konsantrasyonunda POX aktivitesini artırmıştır. 100 μ M Cd'de 0.01 ve 0.1 mM SA konsantrasyonları POX aktivitesini azaltırken 1 mM SA uygulaması artırmıştır.

Buğdayın **Doğu-88** çeşidine ait sonuçlar Bolal çeşidinden farklılık göstermiştir (Şekil 4.7). 25, 50 ve 100 μ M Cd stresine maruz kalmış bitkilerde SA'nın üç konsantrasyonu POX aktivitesini önemli ölçüde artırmıştır. Aynı bitkinin köklerinden elde ettiğimiz sonuçlara baktığımızda 25, 50 ve 100 μ M Cd etkisine maruz kalmış bitkilerde SA uygulamaları POX aktivitesini düşürmüştür (Şekil 4.8).

İki bitkiyi karşılaştırdığımızda, 25 μ M Cd'e maruz kalmış Bolal yapraklarında 0.1 ve 1 mM SA POX aktivitesini önemli derecede düşürmüştür. Doğu-88 yapraklarında ise SA'nın 3 konsantrasyonu da POX aktivitesini artırmıştır. Bolal yapraklarında 50 ve 100 μ M Cd'de SA uygulamaları POX aktivitesini azaltırken, Doğu-88 yapraklarında artırmıştır. Burada görüldüğü gibi buğdayın farklı varyeteleri strese farklı cevap verebilmektedir. Bolal'da Cd stresine girmeden önce uygulanan SA, POX aktivitesini düşürmüş, Doğu-88'de ise artırmıştır. Pirinç yaprakları ile yapılan çalışmada Cd stresi altında SA muamelesi POX aktivitesini artırmıştır (Panda *et al.* 2007). Bu çalışma buğdayın Doğu-88 varyetesi ile paralellik gösterir. *Brassica sinensis* ile yapılan bir çalışmada ise SA uygulaması POX aktivitesini azaltmıştır (Mba *et al.* 2007). Bu çalışma

buğdayın Bolal çeşidiyle benzer sonuçlar göstermektedir. Kökte ise 1 mM SA 25 μ M Cd etkisine maruz kalan Bolal köklerinde POX aktivitesini artırmıştır. Doğu-88 köklerinde ise SA'nın 3 konsantrasyonunda POX aktivitesini önemli ölçüde düşürmüştür. 50 μ M Cd'de SA uygulamaları Bolal köklerinde POX aktivitesini artırmış, ancak Doğu-88 köklerinde düşürmüştür. 100 μ M Cd'de ise 0.01 ve 0.1 mM SA Bolal köklerinde POX aktivitesini azaltırken, 1 mM SA artırmıştır. Doğu-88 köklerinde ise SA'nın 3 konsantrasyonunda eşit miktarda POX aktivitesini düşürmüşlerdir. Burada bitkinin farklı dokularının strese farklı cevap verebildiği görülmektedir. Ayrıca buğdayın farklı iki varyetesinde strese farklı cevap verebildiği görülmüştür. Pirinç kökleri ile yapılan çalışmada SA'nın POX aktivitesini artırdığı belirlenmiştir (Guo *et al.* 2007). Bu deney bizim Bolal varyetesi ile benzer durum göstermektedir. Doğu-88'den elde edilen sonuçlar ile uyuşmamaktadır.

5.3. Salisilik Asidin Apoplastik Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Farklı konsantrasyonlarda (0.01, 0.1 ve 1 mM) SA uygulamasından sonra, 25, 50, 100 μ M Cd stresine maruz bırakılmış **Bolal** yapraklarında apoplastik SOD aktivitesinde önemli sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.9). 25 μ M Cd'e maruz bırakılmış bitkilerde SA'nın iki konsantrasyonu (0.01, 0.1 mM) SOD aktivitesinde artışa neden olmuştur. SA 50 μ M Cd'e maruz bırakılmış bitkilerde SOD aktivitesini artırmıştır ancak 100 μ M Cd etkisine maruz kalmış bitkilerde SOD aktivitesini düşürmüştür. Aynı bitkinin köklerinde ise SA, 25 ve 50 μ M Cd'e maruz bırakılmış bitkilerde SOD aktivitesini artırmıştır. 100 μ M Cd'de ise SA uygulamaları SOD aktivitesini azaltmıştır (Şekil 4.10).

SA uygulamalarından sonra, 25, 50, 100 μ M Cd konsantrasyonlarına maruz bırakılmış **Doğu-88** yapraklarında apoplastik SOD aktivitesinde önemli sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.11). 25 ve 50 μ M Cd stresine maruz kalmış bitkilerde SA uygulamaları SOD aktivitesini artırmıştır. 100 μ M Cd uygulamasında ise SA'lar SOD aktivitesini değiştirmemiştir. Aynı bitkinin köklerinden elde ettiğimiz sonuçlara baktığımızda, 25 μ M Cd'e maruz bırakılmış bitkilerde her üç SA konsantrasyonu da SOD aktivitesini

düşürmüştür. 50 μM Cd uygulamasında 0.1 ve 1 mM SA SOD aktivitesini düşürmüştür. 100 μM Cd'de ise SA'nın üç konsantrasyonu da SOD aktivitesini artırmıştır. (Şekil 4.12).

İki bitki kıyaslandığında, 25 μM Cd'e maruz kalmış Bolal yapraklarında 0.01 ve 0.1 mM SA SOD aktivitesinde artışa neden olurken, 1 mM SA uygulaması SOD aktivitesinde önemli değişikliğe neden olmamıştır. Doğu-88 yapraklarında ise SA'nın 3 konsantrasyonu da SOD aktivitesini artırmıştır. SA, 50 μM Cd'de Bolal ve Doğu-88 yapraklarında SOD aktivitesini artırmıştır. 100 μM Cd'de Bolal yapraklarında SA, SOD aktivitesini düşürmüştür ancak Doğu-88'de ise SOD aktivitesini değiştirmemiştir. Çalışmamızda her iki buğday varyetesinde de SA'nın SOD aktivitesini genelde artırdığını görmekteyiz. Mısır bitkileri ile yapılan bir çalışmada, Cd etkisine maruz kalan mısırdaki SA muamelesi hücrel SOD aktivitesini artırmıştır (Krantev *et al.* 2008). Bizim çalışmamızda da her iki buğday varyetesine ait sonuçlar bu çalışma ile paralellik göstermektedir. *Brassica sinensis* ile yapılan bir başka çalışmada da SA'nın Cd stresi altında SOD aktivitesini artırdığı belirlenmiştir (Mba *et al.* 2007). *Oryza sativa* ile yapılan bir çalışmada da SA SOD aktivitesini artırmıştır (Panda *et al.* 2007). Bu sonuçlara göre, Cd etkisi ile düşen SOD aktivitesini, SA uygulaması tekrar artırarak bitkinin strese toleransını sağlamada bir katkı yaptığı yorumlanabilir. Köke baktığımızda ise, 25 μM Cd etkisinde kalmış Bolal köklerinde SA SOD aktivitesini artırmıştır ancak, Doğu-88 köklerinde ise düşürmüştür. 50 μM Cd'de Bolal köklerinde SA'nın 3 konsantrasyonu SOD aktivitesini artırmıştır, Doğu-88'de ise 0.01 mM SA SOD aktivitesini artırırken, 0.1 ve 1 mM SA düşürmüştür. SA, 100 μM Cd'de Bolal köklerinde SOD aktivitesini azaltmıştır, Doğu-88 köklerinde ise SOD aktivitesini artırmıştır. Bolal'ın yaprak ve köklerinde benzer durumlar görülürken, Doğu-88'de ise tam tersi bir durum görülmektedir. Bu durum bitkilerin alınan ağır metali dokularında biriktirme veya taşıma kapasiteleriyle alakalı olabilir.

5.4. Salisilik Asidin Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Birikimi Üzerine Etkisi

SA uygulamalarından sonra farklı konsantrasyonlarda (25, 50 ve 100 µM) Cd stresine maruz bırakılmış **Bolal** yapraklarında, H₂O₂ miktarında önemli sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.13). SA, 25 ve 50 µM Cd'e maruz bırakılmış bitki yapraklarında, H₂O₂ miktarında önemli bir artışa neden olmuştur. 100 µM Cd'de 0.01 ve 0.1 mM SA uygulamaları H₂O₂ miktarını artırırken, 1 mM SA ise düşürmüştür.

SA uygulamalarından sonra, farklı konsantrasyonlarda (25, 50 ve 100 µM) Cd stresine maruz kalmış **Doğu-88** yapraklarında H₂O₂ miktarında önemli sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.14). SA, H₂O₂ miktarı üzerinde 25 ve 100 µM Cd stresine maruz bırakılmış bitki yapraklarında önemli bir değişikliğe neden olmazken, 50 µM Cd'de artırmıştır.

İki bitkiyi karşılaştırdığımızda ise SA uygulamaları, Cd stresleri (25, 50, 100 µM) altındaki Bolal yapraklarında H₂O₂ miktarını genelde artırmıştır. Doğu-88 yapraklarında ise SA sadece 50 µM Cd'da H₂O₂ aktivitesini artırırken, diğer iki Cd konsantrasyonunda değiştirmemiştir. Bizim sonuçlarımızda SA, özellikle Bolal çeşidinde H₂O₂ miktarını artırmıştır. Doğu-88'de ise tam tutarlı bir durum sergilememiştir. Pirinç ile yapılan çalışmada SA ile muamele H₂O₂ aktivitesini düşürdüğü görülmüştür (Guo *et al.* 2007). Bu sonucun bizimki ile farklılık göstermesinin nedeni farklı konsantrasyonların uygulanması olabilir.

5.5. Salisilik Asidin Lipid Peroksidasyonu Seviyesi Üzerine Etkisi

Farklı konsantrasyonlarda (0.01, 0.1 ve 1 mM) SA uygulamasından sonra, 25, 50, 100 µM Cd stresine maruz bırakılmış **Bolal** yapraklarında lipid peroksidasyonu (LPO) seviyesinde önemli sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.15). 25 µM Cd stresine maruz bırakılmış bitkilerde 0.01 ve 1 mM SA lipid peroksidasyonunu düşürmüştür. 50 µM Cd'de 0.01 ve 0.1 mM SA uygulamaları lipid peroksidasyonunu artırmıştır ancak, 1 mM SA ise düşürmüştür. SA 100 µM Cd'de lipid peroksidasyonunu düşürmüştür.

SA uygulamalarından (0.01, 0.1 ve 1 mM) sonra farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 100 μ M) Cd stresine maruz bırakılmış **Doğu-88** yapraklarında lipid peroksidasyonu seviyesinde önemli sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 4.16). 25 ve 50 μ M Cd stresine maruz kalmış bitkilerde SA'nın 3 konsantrasyonunda lipid peroksidasyonunu artırmıştır. 100 μ M Cd'de 0.01 mM SA uygulaması, lipid peroksidasyonunda önemli bir değişiklik meydana getirmezken, 0.1 ve 1 mM SA uygulamaları lipid peroksidasyonunu artırmıştır.

25 μ M Cd'de Bolal yapraklarında 0.01 ve 1 mM SA lipid peroksidasyonunu düşürürken, 0.1 mM SA değiştirmemiştir. Doğu-88 yapraklarında ise SA'nın 3 konsantrasyonu da lipid peroksidasyonunu artırmıştır. 50 μ M Cd'de Bolal yapraklarında 0.01 ve 0.1 mM SA lipid peroksidasyonunu artırmış, 1 mM SA ise düşürmüştür. Doğu-88 yapraklarında ise SA'nın 3 konsantrasyonu da lipid peroksidasyonunu artırmıştır. 100 μ M Cd'de Bolal yapraklarında SA'nın 3 konsantrasyonu lipid peroksidasyonunu düşürmüştür, Doğu-88 yapraklarında ise 0.01 mM SA lipid peroksidasyonunda önemli bir değişiklik meydana getirmezken, 0.1 ve 1 mM SA lipid peroksidasyonunu artırmıştır. Sonuç olarak, SA Cd stresi altındaki buğdayın Bolal çeşidinde LPO seviyesini düşürürken, enteresan olarak Doğu-88'de ise artırmıştır. Bu sonuç bize bitkiye dışarıdan yapılacak uygulamalarda varyete seçimin ne denli önemli olduğunu göstermektedir. Çalıştığımız iki bitkiyi kıyasladığımızda, Doğu-88'in Bolal'a göre çevresel streslere daha dayanıklı olduğunu görmekteyiz. Dayanıklı bir çeşitte SA'nın Cd stresi altında LPO seviyesini artırması, bitkinin içsel SA miktarıyla alakalı olabilir. Bazı çalışmalarda içsel SA miktarının strese cevapta önemli olduğu belirtilmiştir. Dayanıklı çeşitte zaten içsel SA miktarı yüksekse, bu durumda dışarıdan verilen SA miktarı fazla gelip ters bir etki yapabilir. Çünkü bitki büyüme düzenleyicileri (PGR) uygun konsantrasyondan fazla olduklarında, tam ters etki yaptıkları bilinen bir gerçektir. Pirinç ile yapılan bir çalışmada, SA muamelesinin lipid peroksidasyonu seviyesini düşürdüğü görülmüştür (Guo *et al.* 2007). Pirinçte strese hassas olan bir bitki olarak bizim Bolal çeşidiyle elde edilen sonuçlar ile uyum göstermektedir. Daha ileri çalışmalarda içsel SA miktarının belirlenmesi ve sonuçların bu açıdan da yorumlanmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

Bu araştırmadan elde edilen önemli sonuçlar

1. Cd stresine maruz kalmış buğdaylarda SA uygulaması, apoplastik antioksidan enzimlerin aktivitelerini direk veya dolaylı olarak etkileyebilir.
2. SA uygulamaları, katalaz (CAT) aktivitesini Bolal yapraklarında genelde artırırken, Doğu-88'de ise sadece 50 μM Cd'de aktiviteyi artırmıştır. Bu sonuçlara göre Cd stresine maruz kalmadan önce uygulanan SA, bitki Cd stresine girdiğinde, yapraklardaki CAT aktivitesini artırabilmektedir. Köklerde ise SA Bolal'da 25 μM Cd'de aktiviteyi artırmış, 100 μM 'da düşürmüştür. SA; Doğu-88'de CAT aktivitesini düşürmüştür. Köklerde aktivitenin düşme nedeni alınan ağır metalin bitkide taşınabilmesi ile alakalı olabilir.
3. SA uygulamaları peroksidaz (POX) aktivitesini Bolal yapraklarında düşürürken, Doğu-88'de ise artırmıştır. Köklerde ise SA uygulamaları Bolal'da genelde aktiviteyi artırırken, Doğu-88'de ise düşürmüştür.
4. SA uygulamaları süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini Bolal ve Doğu-88 yapraklarında genelde artırmıştır. Kökte ise SA uygulamaları SOD aktivitesini Bolal'da genelde artırırken Doğu-88'de ise genelde düşürmüştür. Bu durum bitkilerin alınan ağır metali dokularında biriktirme veya taşıma kapasiteleri ile alakalı olabilir.
5. SA uygulamaları, Cd stresi altında Bolal'da lipid peroksidasyonu (LPO) seviyesini düşürürken, Doğu-88'de ise artırmıştır. Bu sonuçlardan Doğu-88'in Bolal'a göre çevresel streslere daha dayanıklı olduğunu görmekteyiz. Dayanıklı bir çeşitte SA'nın Cd stresi altında LPO seviyesini artırması, bitkinin içsel SA miktarıyla alakalı olabilir.
6. SA uygulamaları, Cd stresleri altındaki Bolal'da H_2O_2 miktarını genelde artırmıştır. Doğu-88'de ise SA sadece 50 μM Cd'de H_2O_2 miktarını artırmıştır.

SA'nın her iki bitkide de genelde H_2O_2 miktarını artırması bitkinin içsel SA miktarı ile alakalı olabilir.

KAYNAKLAR

- Aebi, H., 1974. Catalase, in: H.U. Bergmeyer (Ed), Methods of enzymatic analysis, Varley, Chemie/ Academic Pres, Weinheim/ New York, pp.680.
- Agarwal, S. and Pandey V., 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologia Plantarum*, 48(4), 555-560.
- Akkuş, İ., 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza yayınları. Konya.
- Al-Hakimi, A.M., Hamada, A.M., 2001. Counteraction of salinity stress on wheat plants by grain soaking in ascorbic acid, thiamine or sodium salicylate. *Biol. Plant*, 44, 253-261.
- Alvarez, M.E., 2000. Salicylic acid in the machinery of hyper-sensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol. Biol.* 44, 429-442.
- Ananieva, E.A., Alexieva, V.S., Popova, L.P., 2002. Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. *J.Plant Physiol*, 159, 685-693.
- Ananieva, E.A., Christov, K.N., and Popova, L.P., 2004. Exogenous treatment with salicylic acid leads to increased antioxidant capacity in leaves of barley plants exposed to paraquat. *Journal of Plant Physiology*, (161), 319-328.
- Angelini, R. and Federico R., 1989. Histochemical evidence of polyamine oxidation and generation of hydrogen peroxide in the cell wall. *J.Plant Physiol*, (135), 212-217.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.*, 55, 373-99.
- Atıcı, Ö., Nalbantoğlu B., 1999a. Effect of apoplastic proteins on freezing tolerance in leaves. *Phytochemistry*, (50), 755-761.
- Atıcı, Ö. and Nalbantoğlu B. 1999b. Apoplastic proteins associated with the cold acclimation process in leaves. *Bio-Sci. Res. Bull*, (15), 55-60.
- Atıcı, Ö., and Nalbantoğlu, B., 2003. Antifreeze proteins in higher plants *phytochemistry*, (64), 1187-1196.
- Baet, S.H., Kwan I.S., Part T.I., Yun S.J., Kim J.K. and Chai K.G., 2000. Activities and isozyme profiles of antioxidant enzymes in intercellular compartment of overwintering barley leaves. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 33(5), 385-390.
- Bakardjieva, N., and Christov, K., 1996. Effect of calcium and zinc ions on the sensitivity of peroxidase from mosses (*Mnium* sp) and ferns (*Polydium vulgare*) to high temperature. *Can. J. Bot.*, (74), 1665-1670.
- Banci, L., 1997. Structural properties of peroxidase. *J. Biotech.*, (53), 253-263.
- Banu, M.N.A., Hoque M.A., Watanabe-Sugimoto, M., Matsuoka, K., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., *et al.* 2009. Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. *J.Plant Physiol*, 166, 146-56.
- Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M.L., 2005. Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, (17), 21-34.
- Bergmeyer, J., and Grabl, M., 1983. *Methods of Enzymatic Analysis* (Third Edition), pp. 190-302, Germany.

- Bishop, D.L., 2002. Gene expression of vakuolar peroxidase with stress-induced pathogenesis in wheat sheaths. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, (61), 65-71.
- Boeuf, G., Legnard B. and Rambour S., 1999. Influence of light conditions on development, apoplastic peroxidase activities and peroxidase activities and peroxidase isoenzymes in chicory root explants. *Physiol. Plant*, (106), 331-336.
- Boeuf, G., Legnard B. and Rambour S., 2001. Effect of NAA on the development, apoplastic peroxidase activities, and peroxidase isoenzymes in chicory root explants. *J. Plant Physiol*, (158), 963-969.
- Bonnet, M., Oliver, C., and Veisseire, P., 2000. Effects of zinc and influence of *Acremonium lolii* on growth parameters, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activities of ryegrass. *Journal of Experimental Botany*, 51(346), 945-953.
- Borsani, O., Valpuesta, V., Botella, M.A., 2001. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol*, 126, 1024-1030.
- Brej, T., 1998. Heavy metal tolerance in *Agropyron repens*(L.) P.Bauv. Populations from the *Legnica copper* smelter area, Lower Silesia. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, (67), 325-333.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S., Neill, S.J., 2006. ABA-induced no generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J.*, 45, 113-122.
- Chanda, S.V., and Singh, V.D., 1997. Changes in peroxidase and IAA oxidase activities during wheat grain development. *Plant Physiol.Biochem.*,(35), 245-250.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M.H., El Ferjani E., 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Sci.*, 127, 139-47.
- Chaudiere, J., and Ferrari-Iliou R., 1999. Intracellular antioxidants from chemical to biochemical mechanism. *Food Chem. Toxicol.*, (37), 949-962.
- Chen, Y.X., He, Y.F., Luo, Y.M., Yu, Y.L., Lin, Q., Wong, M.H., 2003. Physiological mechanism of plant roots exposed to cadmium. *Chemosphere*, 50(6), 789-793.
- Chikov, V.I., Bakirova, G.G., 2004. Role of apoplast in the control of assimilate transport, photosynthesis, and plant productivity. *Rus. J. of Plant Physiology*, 51(3), 420-431.
- Cho, U.H., Park, J.O., 2000. Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Sci.*, 156, 1-9.
- Cleland, F.C., and Ajami, A., 1974. Identification of the flower- inducing factor isolated from aphid honey dew as being salicylic acid. *Plant Physiol.*, (54), 904-906.
- Cordoba-Pedragosa, M.C., Cordoba, F., Villalba, J.M., Gonzales-Reyes, J.A., 2003. Zonal changes in ascorbate and hydrogen peroxide contents, peroxidase and ascorbate-related enzyme activities in onion roots. *Plant Physiol.*, 131, 696-706.
- Dat, R.S., Foyer C.H. and Scott I.M., 1998. Changes in salicylic acid antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. *Plant Physiol.*, (118), 1455-1461.
- Davidson, J.E., Whyte, B., Bissinger, P.H., Schiesti, R.H., 1996. Oxidative stress in involved in heat induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 93, 5116-5121.

- De Pinto, M.C., De Gara, L., 2004. Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *J. Exp. Bot.*, 55, 2559-2569.
- Drazic, G., Mihailovic, N., 2005. Modification of cadmium toxicity in soybean seedlings by salicylic acid. *Plant Sci*, 168, 511-7.
- Drazkiewicz, M., Skorzynska-Polit, E., Krupa, Z., 2004. Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *Bio. Metals*, 17, 379-387.
- Duran-Caril, M.V. and Bujan C.R., 1998. Antioxidant system in the leaf apoplast compartment of *Pinus pinaster* Ait. and *Pinus radiata* D. Don plants exposed to SO₂. *Annal. of App. Biology*, 133(3), 455-466.
- Durner, J., Shah, J., and Klessig, D.F., 1997. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends In Plant Science*, 2(7), 266-274.
- Eberhard, S., Doubrova, N., Marta, V., Mohnen, D., Southwick, A., Darviell, A., and Albersheim, P., 1989. Pectic cell wall fragments regulate tobacco thin-cell layer explant morphogenesis. *Plant Cell*, (1), 747-755.
- Edwards, R., Blount J.W., Dixon R.A., 1991. Glutathione and elicitation of the Phytoalexin response in legume cell cultures. *Planta*, (184), 403-409.
- Eyidoğan, F.İ., Öktem, H.A., Yücel, M., 2003. Superoxide dismutase activity in salt stressed wheat seedlings. *Acta Physiologia Plantarum*, (25), 263-269.
- Ferreira, R.R., Fornazier, R.F., Vitoria, A.P., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2002. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. *Journal of Plant Nutrition*, (25), 327-342.
- Fornazier, R.F., Ferreira, R.R., Vitoria, A.P., Molina, S.M.G., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2002. Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities in sugar cane. *Biologia Plantarum*, 45(1), 91-97.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2000. Oxygen processing in photosynthesis; regulation and signalling. *New Phytologist*, 146, 359-388.
- Gallego, S.M., Benavides, M.P., Tomaro, M.L., 1996. Effect of heavy metal ions on sunflower leaves evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Sci.*, 121, 151-159.
- Gechev, T., Gadjiev, I., Van Breusegem, F., Inze, D., Dukiandjiev, S., Taneve, V., and Minkov, I., 2002. Hydrogen peroxide protect tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *CMLS*, (59), 708-714.
- Gong, Y., Toivonen P.M.A., Lau O.L. and Wiersma P.A., 2001. Antioxidant system level in 'Braeburn' apple in related to its browning disorder. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, (42), 259-264.
- Gratao, L.P., Polle, A., Lea, P., and Azevedo, A., 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, 32, 481-494.
- Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Bagci, E.G., Cicek, N., 2007b. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *J. Plant Physiol*, 164, 728-736.
- Guo, B., Liang, Y.C., Zhu, Y.G., Zhao, F.J., 2007a. Role of salicylic acid in alleviating oxidative damage in rice roots (*Oryza sativa*) subjected to cadmium stress. *Environ. Pollut.*, 147, 743-749.

- Guo, B., Liang, Y., Zhu, Y., 2009. Does salicylic acid regulate antioxidant defense systems, cell death, cadmium uptake and partitioning to acquire cadmium tolerance in rice? *J. Plant Physiol*, 166, 20-31
- Güler, N.S., 2008. *Ctenanthe setosa* 'da yaprak kıvrılması sırasında apoplastik ve simplastik alanlarda antioksidan sistemde meydana gelen değişimler. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Hale, M.G., Orcutt, D.M., 1987. The physiology of plants under stress, John Wiley and, New York, 206p.
- Halliwell, B. 1994. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutri. Rev.* 52, 253-265.
- Hamada, A.M., Al-Hakimi, A.M.A., 2001. Salicylic acid versus salinity-drought induced stress on wheat seedlings. *Rost Vyr*, 47, 444-450.
- Hamed, R.R., Maharem, T.M., Fatah, M.M.A., and Ataya, F.S., 1998. Purification of peroxidase isoenzymes from Turnip roots. *Phytochemistry*, (48), 1291-1294.
- Havir, E.A. and Mchale N.A., 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol*, (84), 1291-1294.
- Hayat, S., and Ahmad, A., 2007. Salicylic Acid: A Plant Hormone. Published by Springer. Dordrecht, The Netherlands pp. 396.
- He, Y.L., Liu, Y.L., Chen, Q., Bian, A.H., 2002. Thermotolerance related to antioxidation induced by salicylic acid and heat hardening in tall fescue seedlings. *J. Plant Physiol. Mol. Biol*, 28, 89-95.
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 25, 189-198.
- Hernandez, J.A., Jimenez A., Mullineaux P.M., Sevilla F., 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses. *Plant Cell Environ*, (23), 853-862.
- Hernandez, J.A., Ferrer, M.A., Jimenez, A., Barcelo, A.R., and Sevilla, F., 2001. Antioxidant systems and O₂/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology*, (127), 817-831.
- Hon, W.-C., Griffith M., Chong P., Yang D.S.C., 1994. Extraction and isolation of antifreeze protein from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *Plant Physiol*, (104), 971-980.
- Hong, W., ShiCheng, Z., WenJian, X., XiuBin, W., HongLi, F., Wei, Z., 2008. Effect of cadmium stress on photosynthesis, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 14, 36-42.
- Horvath, E., Janda T., Szalai G. and Paldi E., 2002. In vitro salicylic acid inhibition of catalase activity in maize: differences between the isozymes and a possible role in the induction of chilling tolerance. *Plant Sci.*, (163), 1129-1135.
- Janda, T., Szalai, G., Tari, I., Paldi, E., 1999. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta*, (208), 175-180.

- Janda, T., Szalai, G., Antunovics, Zs., Horvath, E., Paldi, E., 2000. Effect of benzoic acid and aspirin on chilling tolerance and photosynthesis in young maize plants. *Maydica*, 45, 29-33.
- Janda, T., Szalai, G., Rios-Gonzales, K., Veisa, O., and Paldi, E., 2003. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Science*, (164), 301-306.
- Jouili, H., and El Ferjani, E., 2004. Effects of copper excess on superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in sunflower seedlings (*Helianthus annuus* L.). *Acta Physiologia Plantarum*, 26(1), 29-35.
- Kadioğlu, A., 1999. Bitki Fizyolojisi. Trabzon.
- Kadioğlu, A., 2004. Bitki Fizyolojisi. Trabzon.
- Kang, G., Wang C., Sun G., Wang Z., 2003. Salicylic acid changes activities of H_2O_2 metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedlings. *Environ. Exp. Bot.*, (00), 1-7.
- Keleş, Y. and Öncel I., 2002. Response of antioxidative defence system to temperature and water stress combinations in wheat seedlings. *Plant Science*, (163), 783-790.
- Kerby, K., and Somerville, S.C., 1992. Purification of an infection-related, extracellular peroxidase from barley. *Plant Physiol.*, (100), 397-402.
- Kim, K.Y., Kwon, S.Y., Lee, H.S., Hur, Y., Bang, C.W., Choi, K.S., and Kwak., 2000. Differential expression of four sweet potato peroxidase genes in response to abscisic acid and ethaphon. *Phytochemistry*, (54), 19-22.
- Kocaçalışkan, İ., 2001. Bitki Fizyolojisi. Kütahya.
- Kocaçalışkan, İ., 2004. Bitki Fizyolojisi. Kütahya.
- Kong, X.S., Guo, X.P., Zhang, M.X., 1999. Effect of cadmium stress on the growth and phytochemistry of maize seedlings. *J. Huazhong Agric Univ.*, 18, 111-113.
- Krantev, A., Yordanova, R., Janda, T., Szalai, G., Popova, L., 2008. Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *Journal of Plant Physiology*, 165, 920-931.
- Kronfuss, G., Wieser G., Havranek W.M. and Polle A., 1996. Effects of ozone and mild drought stress on total apoplastic guaiacol and lipid peroxidation in current-year needles of young Norway Spruce (*Picea abies* L., Karst.). *J. Plant Physiol.*, (148), 203-206.
- Krupa, z., Baszynski, T., 1995. Some aspects of heavy-metals toxicity towards photosynthetic apparatus-direct and indirect effects on light and dark reaction. *Acta Physiol Plant* 17, 177-190.
- Kuru, H.İ., 2007. Arseniğin insan ve bazı canlılarda oksidatif enzimler üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Kütahya
- Lagriffoul, A., Mocquart, B., Mench, M., Vangronsveld, 1998. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.) *Plant Soil* 200, 241-250.
- Lee, T.M., and Lin, Y.H., 1996a. Peroxidase activity in ethylene-induced rice (*Oryza sativa* L.) coleoptile elongation. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 37(4), 239-245.
- Lee, T.M., and Lin, Y.H., 1996b. Peroxidase activity in ethylene-, ABA-, or MeJA, treated rice (*Oryza sativa* L.) roots. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, (37), 201-207.
- Leon, A.M., Palma, J.M., Corpas, F.J., Gomez, M., Romero-Puertas, M.C., Chatterjee, D., Mateos, R.M., del Rio, I.A., Sandalio, L.M., 2002. Antioxidative enzymes in

- cultivars of peppers plants with different sensitivity to cadmium. *Plant Physiology and Biochemistry*, (40), 813-820.
- Li, S.W., Xue, L.G., Xu, S.J., Feng, H.Y., An, L.Z., 2007. Hydrogen peroxide involvement in formation and development of adventitious roots in cucumber. *Plant Growth Regul.*, 57, 173-180
- Li, S.W., Xue, L.G., Xu, S.J., Feng, H.Y., An, L.Z., 2009. Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings. *Environ. Exp. Bot.*, 65, 63-71.
- LiJun, W., Wei Dong, H., JiaYong, L., 2003. Effects of salicylic acid on the peroxidation of membrane- lipid of leaves in grape seedlings. *Scientia Agricultura Sinica*, 36, 1076-1080
- Lin, C.C., and Kao C.H., 2001. Abscissic acid induced changes in cell wall peroxidase activity and hydrogen peroxide level in roots of rice seedlings. *Plant Science*, (160), 323-329.
- Liu, P., and Yang, Y.A., 2000. Effects of molybdenum and boron on membrane lipid peroxidation and endogenous protective systems of soybean leaves. *Acta Botanica Sinica*, 42(5), 461-466
- Lopez-Delgado, H., Dot, J.F., Foyer, C.H., & Scott, I.M., 1998. Induction of thermotolerance in potato microplants by acetyl salicylic acid and H₂O₂. *Journal of Experimental Botany*, 49, 713-720.
- Lozano-Rodriguez, E., Hernandez, L.E., Bonay, P., Carpena-Ruiz, R.O., 1997. Distribution of Cd in shoot and root tissues of maize and pea plants: physiological disturbances. *J.Exp. Bot.*, 48, 123-128.
- Luck, H., 1965. Catalase in: *Methods of Enzymatic Analysis* (Ed. H. Bergmeyer). pp. 885-895.
- Maksymiec, W., Krupa, Z., 2006. The effects of short term exposition to Cd stress excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Exp. Bot.* 57, 187-194.
- Malecka, A., Jarmuszkiewicz, W., Tomaszewska, B., 2001. Antioxidative defense of lead stress in subcellular compartments of pea root cells. *Acta Biochemica Polonica*, 48(3), 687-698.
- Martina, R., Steipe B. and Zenk M.H., 1995. Evidence against specific binding for salicylic acid to plant catalase. *FEBS Lett.*, (377), 175-180.
- Mauch-Mani, B., and Metraux, J.P., 1998. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany*, (82), 535-540.
- Mba, F.O., Zhi-Ting, X., and Hai-Jie, Q., 2007. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in Chinese cabbages (*Brassica chinensis*). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10 (18), 3065-3071.
- Mc Clung, C.R., 1997. Regulation of catalases in *Arabidopsis*. *Free Radical Bio. Med.*, (23), 489-496.
- McInnis, S.M., Desikan, R., Hancock, J.T., Hiscock, S.J., 2006. Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: potential signalling crosstalk? *New Phytol.*, 172, 221-228.
- Meloni, D.A., Oliva, M.A., Martinez, C.A., Cambraia, J., 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathion reductase in cotton under salt stress. *Environ. Exp. Bot.*, 49, 67-76.

- Menconi, M., Sgherri, C.L.M., Pinzino, C., Navari-Izzo, F., 1995. Activated oxygen production and detoxification in wheat plants subjected to a water deficit programme. *J.Exp.Bot.*, 46, 1123-1130.
- Metwally, A., Finkemeier, I., Georgi, M., Dietz, K.J., 2003. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol*, 132, 272-281.
- Metwally, A., Safranov, V.I., Belimov, A.A., Dietz, K.J., 2005. Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L. *J. Exp. Bot.*, 56, 167-78.
- Michael, W.F.L., Takahama, U., and Heber, u., 1993. Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Physiol.*, (101), 969-976.
- Milone, M.T., Sgherri, C., Clijsters, H., Navari-Izzo, F., 2003. Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environ Ex. Bot.*, 50, 265-76.
- Minibaeva, F.V., and Gordon, L. Kh., 2003. Superoxide production and the activity of extracellular peroxidase in plant tissues under stress conditions. *Russ. J. of Plant Physiology*, 50 (3), 411-416.
- Mishra, A., Choudhuri, M.A., 1999. Effects of salicylic acid on heavy metal-induced membrane deterioration mediated by lipoxygenase in rice. *Biol. Plant*, 42, 409-415.
- Mohan, B.S., and Hosetti, B.B., 1997. Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in sewage stabilization ponds. *Environmental pollution*, (898), 233-238.
- Mukherjee, S.P., Choudhuri, M.A., 1983. Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiologia Plantarum*, 58, 166-170.
- Mutlu, S., 2005. Tuz stresi ve salisilik asitin buğday yapraklarında apoplastik ve simplastik antioksidan enzimler üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Mutlu, S., Atıcı, Ö., and Nalbantoğlu, B., 2009. Effect of salicylic acid and salinity on apoplastic antioxidant enzymes in two wheat cultivars differing in salt tolerance. *Biologia Plantarum*, 53 (2), 334-338.
- Neill, S.J., Desikan, R., Hancock, J.T., 2002. Hydrogen peroxide signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5, 388-395.
- Nishiyama, Y., Ikeda, H. ve Haramaki, N., 1998. Oxidative stress is related to exercise in tolerance in patients with heart failure, *Am. Heart. J.*, 135, 115.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione; keeping active oxygen under control. *Annu Rev. Plant Physiol Plant Mol.Biol.*, 49, 249-79.
- Otter, T. and Polle A., 1997. Characterisation of acidic and basic apoplastic peroxidases from needles of Norway Spruce (*Picea abies* L., Karsten) with respect to lignifying substrates. *Plant Cell Physiol.*, 38(5), 595-602.
- Padu, E., 1999. Apoplastic peroxidases, ascorbat and lignification in relation to nitrate supply in wheat stem. *J. Plant Physiol.*, (154), 576-583.
- Panda, S.K., Patra, H.K., 2007. Effect of salicylic acid potentiates cadmium-induced oxidative damage in *Oryza sativa* L. Leaves. *Acta Physiol. Plant*, 29, 567-575.
- Pastori, G.M., Trippi, V.S., 1992. Oxidative stress induces high rate of glutathione reductase synthesis in a drought resistant maize strain. *Plant Cell Physiol.*, 33, 957-996.

- Patykowski, J., and Urbanek, H., 2003. Activity of enzymes related to H₂O₂ generation and metabolism in leaf apoplastic fractions of tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *J. Phytopathol.*, (151), 153-161.
- Popova, L.P., Maslenkova, L.T., Yordanova, R.Y., Ivanova, A.P., Krantev, A.P., Szalai, G., 2009. Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. *Plant Physiol Biochem*, 47, 224-31.
- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A., Stewart, C.R., 1994. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell*, 6, 65-74.
- Prasad, T.K., 1996. Mechanism of chilling induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings; changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *Plant Journal*, 10, 1017-1026.
- 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.
- Raskin, I., 1992a. Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, (43), 439-463.
- Raskin, I., 1992b. Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiol.*, (99), 799-803.
- Rodriguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., Zabalza, A., Corpas, F.J., Gomez, M., del Rio, L.A. *et al.* 2006. Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant Cell Environ.*, 29, 1532-44.
- Romero-Puertas, M.C., Zabalza, A., Rodriguez Serrano, M., Gomez, M., del Rio, L.A., & Sandalio, L.M., 2003. Antioxidative response to cadmium in pea roots. *Free Radical Research*. 37-44
- Sairam, R.K., Desmukh, P.S., Saxena, D.C., 1998. Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biol. Plant*, 41, 384-394.
- Sairam, R.K., Srivastava, G.C., Saxena, D.C., 2000. Increased antioxidant activity under elevated temperatures; a mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes. *Biol. Plant*, 43, 245-251.
- Sairam, R.K., Srivastava, G.C., 2000. Induction of oxidative stress and antioxidant activity by hydrogen peroxide treatment in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, 43(3), 381-386.
- Sairam, R.K., Chandrasekhar, V., Srivastava, G.C., 2001. Comparison of hexaploid and tetraploid cultivars in their response to water stress. *Biol. Plant*, 44, 89-94.
- Sakhabutdinova, A.R., Fatkhutdinova, D.R., and Shakirova, F.M., 2004. Effect of salicylic acid on the activity of antioxidant enzymes in wheat under conditions of salination. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40(5), 501-505.
- Sakurai, N., 1998. Dynamic function and regulation of apoplast in the plant body. *Journal of Plant Resources*, 111(1101), 133-148.
- Salisbury, F.B. and Ross C.W., 1992. *Plant Physiol.* Wadsworth Publishing Company. California, USA, Pp. 682
- Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gomez, M., Romero-Puertas, M.C., del Rio, L.A., 2001. Cadmium induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*, (52), 2115-2126.

- Sanita di Toppi, L., and Gabrielli, R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 41, 105-130.
- Scandalios, J.G., 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*, (101), 7-12.
- Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D.L., Polle, A., 2001. Cadmium-induced changes in antioxidants systems, hydrogen peroxide content and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiology*, (127), 887-898.
- Senaratna, T., Touchell, D., Burn, E., Dixon, K., 2000. Acetyl salicylic acid (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regul.*, 30, 157-161.
- Sharma, Y.K., Leon, J., Raskin, J., Davis, K.R., 1996. Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*; the role of salicylic acid in the accumulation of defence related transcripts and induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 5099-5104.
- Shaw, B.P., 1995. Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidant enzymes in seedlings of *Phaseolus aureus*. *Biol. Plant*, 37, 587-596.
- Shim, I.S., Momose, Y., Yamamoto, A., Kim, D.W., Usui, K., 2003. Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. *Plant Growth Regul.*, 39, 285-292.
- Singh, B., and Usha, K., 2003. Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. *Plant Growth Regulation*, (39), 137-141.
- Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S. ve Miszalski, Z., 2007. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses, *Acta Biochim. Pol.*, 54, 39-50.
- Somashekaraiah, B.V., Padmaja, K., Prasad, A.R.K., 1992. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxidase in chlorophyll degradation. *Physiologica Plantarum*, (85), 85-89.
- Souza, I.R.P. and McAdam J.W., 2001. Gibberellic acid dwarfism effect on the growth dynamics of b73 maize (*Zea mays* L.) leaf blades; a transient increase in apoplastic peroxidase activity precedes cessation of cell elongation. *J. Exp. Bot.*, 52(361), 1673-1682.
- Spiteller, G., 2001. Peroxidation of linoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases", *Mechanisms of Ageing and Development*, Vol.122, 617-657.
- Srivastava, S. and Dwivedi U.N., 2000. Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. *Plant Science*, (158), 87-96.
- Srivastava, S. and Dwivedi U.N., 2001. Plant regenerations from callus *Cuscuta reflexa* an angiospermic parasite and modulation of catalase and peroxidase activity by salicylic acid and naphthalene acetic acid. *Plant Physiology*, (39), 529-538.
- Stahl, W. ve Sies, H., 2002. Introduction: Reactive oxygen species, research monographs, 1-2.
- Şimşek, F., 1999. Free radicals, antioxidants and lipid peroxidation. *Türkiye Klinikleri. J. Pediatr*, 8, 42-47.

- Taşğın, E., Atıcı, Ö., and Nalbantoğlu, B., 2003. Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Plant Growth Regulation*, (41), 231-236.
- Taşğın, E., 2004. Düşük sıcaklık ve salisilik asidin kışlık buğday yapraklarındaki donma toleransı oksidatif enzim aktiviteleri ve apoplastik proteinler üzerine etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Taşğın, E., Atıcı, Ö., Nalbantoğlu, B., Popova, P.L., 2006. Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. *Phytochemistry*, (67), 710-715.
- Toppi, L.S.D., Gabrielli, R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.*, 41, 105-30.
- Vanacker, H., Carver T.L.W. and Foyer, C.H., 1998a. Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiology*, (117), 1103-1114.
- Vanacker, H., Harbinson, J., Ruisch, J., Carver, T.L.W., Foyer, C.H., 1998b. Antioxidant defences of the apoplast. *Protoplasma*, 205, 129-140.
- Vanacker, H., Foyer, C.H., Carver, T.L.W., 1999. Changes in apoplastic antioxidants induced by powdery mildew attack in oat genotypes with race non-specific resistance. *Planta*, 208, 444-452.
- Vitoria, A.P., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2001. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry*, (57), 701-710.
- Wang, Y.X., Stass A. and Horst W.J., 2004. Apoplastic binding of aluminum is involved in silicon-induced amelioration of aluminum toxicity in maize. *Plant Physiology*, 136 (3), 3762-3770.
- Westhuizen A.J., Olan X-M. and Botha A-M., 1998. Differential induction of apoplastic peroxidase and chitinase activities in susceptible and resistant wheat cultivars by Russian wheat aphid infestation. *Plant Cell Rep.*, (18), 132-137
- Willekens, H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C. and Van Montagu, M., 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO Journal*, (16), 4806-4818.
- Wingsle, G., Gardestrom P., Hallgren and Karpinski S., 1991. Isolation, purification and subcellular localisation of isozyme of superoxide dismutase from Scot pine (*Pinus sylvestris* L.) needles. *Plant Physiol.*, (95), 21-28.
- Wojcik, M., Tukendorf, A., 1999. Cd tolerance of maize, rye and wheat seedlings. *Acta Physiol Plant*, 21, 99-107.
- Xu, J., Yin, H.X., Li, x., 2009. Protective effects of proline against cadmium toxicity in micropropagated hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. *Plant Cell Rep.*, 28, 325-33.
- Yalpani, N., Enyedi, A.J., Leon, J., Raskin, I., 1994. Ultraviolet-light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus-resistance in tobacco. *Planta*, 193, 372-376.
- Yang, Z.M., Wang, J., Wang, S.H., Xu, L.L., 2003. Salicylic acid-induced aluminium tolerance by modulation of citrate efflux from roots of *Cassia tora* L. *Planta*, 217, 168-174.
- Yee, Y., Tam N.F.Y., Wong Y.S. and Lu C.Y., 2002. Growth and physiological responses of two mangrove species (*Bruguira gymnorhiza* and *Kandelia candel*) to waterlogging. *Environ. Exp. Bot.*, 1-13.

- Yılmaz, S. and Ozan, T. S., 2003. Meme kanserli hastalarda lipid peroksidasyonu ve bazı enzim aktiviteleri arasındaki ilişki, *Türk Biyokimya Dergisi*, 28, (4), 252-256.
- Yordanova, R.Y., Christov K.N. and Popova L.P., 2004. Antioxidative enzymes in barley plants subjected to soil flooding. *Environ. and Exp. Botany*, (51), 93-101.
- Yu, D.Q., Cen, C.A., Yang, M.L., Li, B.J., 1999. Studies on the salicylic acid induced lipid peroxidation and defence gene expression in tobacco cell culture. *Acta Botanica Sinica*, 41, 977-983.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Erzurum’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2002 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2006 yılında birincilikle mezun oldu. Aynı yıl başladığı Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.