



**MISIR (*Zea mays L.*) BİTKİSİNDE CİVA TOKSİSİTESİNİN
YATIŞTIRILMASINDA NİTRİK OKSİTİN (NO)
KORUYUCU ROLÜNÜN FİZYOLOJİK,
BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER
YAKLAŞIMLARLA ARAŞTIRILMASI**

Aykut KARAMAN

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Botanik Bilim Dalı
Prof. Dr. Ökkeş ATICI
2017
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MISIR (*Zea mays L.*) BİTKİSİNDE CİVA TOKSİSİTESİNİN
YATIŞTIRILMASINDA NİTRİK OKSİTİN (NO) KORUYUCU
ROLÜNÜN FİZYOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER
YAKLAŞIMLARLA ARAŞTIRILMASI

Aykut KARAMAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Botanik Bilim Dalı

ERZURUM
2017

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**MISIR (*Zea mays*) BİTKİSİNDE CİVA TOKSİSİTESİNİN
YATIŞTIRILMASINDA NİTRİK OKSİTİN (NO) KORUYUCU ROLÜNÜN
FİZYOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER YAKLAŞIMLARLA
ARAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Ökkeş ATICI danışmanlığında, Aykut KARAMAN tarafından hazırlanan bu çalışma, 30/06/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı - Botanik Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği** / ~~oy çokluğu~~ (...) ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

İmza :

Üye : Doç. Dr. Nevzat ESİM

İmza :

Üye : Doç. Dr. Özkan AKSAKAL

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 13.../.../2017 tarih ve 28.../.../29 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Tubitak 3001 projesi kapsamında desteklenmiştir.
Proje No:113Z929

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MISIR (*Zea mays* L.) BİTKİSİNDE CİVA TOKSİSİTESİNİN YATIŞTIRILMASINDA NİTRİK OKSİTİN (NO) KORUYUCU ROLÜNÜN FİZYOLOJİK, BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER YAKLAŞIMLARLA ARAŞTIRILMASI

Aykut KARAMAN

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

Bu araştırmada, mısır (*Zea mays* L., cv. Arifiye-2) bitkisinde civa ile oluşturulan toksisitenin iyileştirilmesinde, bitki antioksidan sisteminde önemli bir sinyal bileşik olan nitrik oksit (NO) etkileri fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler yaklaşımlarla araştırılmak istenmiştir. Bu amaç için mısır fidelerinde yaş-kuru ağırlık, bitki boy uzunluğu, bağlı su içeriği, reaktif oksijen türlerinin (ROS) miktarı, lipid peroksidasyon (MDA olarak) seviyesi, antioksidan enzimlerin aktivite ve izoenzim profilleri, enzimatik olmayan antioksidanların miktarı, bazı esas elementler ile içsel civa (Hg) içeriği, total protein, prolin ve fotosentetik pigment içeriği ve antioksidan enzimlerin gen ifadelerindeki değişim üzerine Hg ve NO'nun etkileri ayrı ayrı ve birlikte değerlendirildi. Yapılan ön deneylere göre, Hg kaynağı olarak 100 µM civa klorür (HgCl₂), NO kaynağı olarak 0.1 µM sodyum nitroprusid (SNP) kullanılması uygun bulundu. Hidroponik ortamda yetiştirilen bitkilerin kök ortamına 8. gün 0.1 µM SNP uygulanmış ve 24 saat sonra bitkiler 3 gün için 100 µM HgCl₂ stresine maruz bırakılmıştır. Hasat edilen bitkilerin kök ve yapraklarına ait örnekler, araştırma materyali olarak kullanılmıştır. Mısır kökleri yapraklara göre daha fazla civa biriktirmiş ve bunun sonucu olarak toksisitesinin etkileri kökte daha belirgin olarak ortaya çıkmıştır. Tek başına Hg uygulaması, kök ve yapraklarda ROS ve MDA seviyesini artırırken, genel olarak antioksidan enzimlerin (süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz ve glutatyon redüktaz) aktivitelerini, nonenzimatik metabolitlerin (glutatyon ve askorbat) seviyelerini, çözünebilir protein, klorofil (yaprakta) ve prolin içerikleri ile içsel element miktarlarını önemli ölçüde düşürmüştür. Fidelere Hg stresi öncesi uygulanan SNP ise kök ve yapraklarda Hg uygulaması ile artan ROS ve MDA seviyelerini düşürmüştür. Buna karşılık antioksidan enzimlerin aktivitelerini ve nonenzimatik antioksidanların miktarını artırmıştır. Bu bulgu antioksidan enzimlerin izoenzim profillerinin belirlendiği çalışmayla da desteklendi. İlave olarak, Hg stresi öncesi uygulanan SNP, kontrolüne göre, fizyolojik parametrelerde iyileşmelere neden olmuş ve ayrıca protein, prolin ve klorofil seviyelerini artırmıştır. Ayrıca, hem kök hem de yapraklarda antioksidan enzimleri kodlayan 5 genin ifade oranlarını anlamlı düzeyde etkilemiştir. Sonuç olarak, mısır bitkisinde civa stresine maruz kalmadan önce uygulanan NO'nun, fizyolojik, biyokimyasal ve gen seviyesinde cevap mekanizmalarını düzenleyerek bitki toleransının artırılmasına önemli katkı yaptığı belirlenmiştir.

2017, 109 sayfa

Anahtar kelimeler: Ağır metal, Antioksidan, Civa, Gen ifadesi, Mısır, Nitrik oksit, Oksidatif stres

ABSTRACT

MS Thesis

INVESTIGATION OF PROTECTIVE ROLE OF NITRIC OXIDE (NO) IN THE MITIGATION OF MERCURY TOXICITY IN MAIZE (*Zea mays* L.) BY PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND MOLECULAR APPROACHES

Aykut KARAMAN

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

Supervisor: Prof. Dr. Ökkeş ATICI

In this research, it was aimed to investigate the effects of nitric oxide (NO), which is an important signal compound in plant antioxidant system by physiological, biochemical and molecular approaches in the improvement of mercury-induced toxicity in maize (*Zea mays* L., cv. Arifiye-2). For this aim, effect of NO and Hg applications on fresh-dry weight, plant height, relative water content, amount of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation (LPO) level, activity and isoenzyme profile of antioxidant enzymes, and the contents of non-enzymatic antioxidants, total protein, proline, photosynthetic pigments and the change in gene expression of antioxidant enzymes were evaluated separately and together. It was used 100 μM of mercury chloride (HgCl_2) as Hg source, and 0.1 μM of sodium nitroprusside (SNP) as NO source, according to preliminary experiments realized. Eighth day, the SNP concentration was supplied at root environments of the plants grown in hydroponic medium, then 24 hour after, the plants were exposed to 100 μM HgCl_2 stress for 3 days and the samples of root and leaf of the harvested plants were used as research material. Maize roots accumulated more Hg than leaves and as a result of this effects of the toxicity appeared more prominently in roots. In roots and leaves, Hg application alone significantly decreased activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, peroxidase and glutathione reductase), level of nonenzymatic metabolites (glutathione and ascorbate), amount of essential elements, and the contents of soluble protein, chlorophyll (in leaf) and proline while increased the levels of ROS and LPO (as MDA). SNP applied to the seedlings before from Hg stress decreased ROS and LPO levels that were increased by the Hg application in the both tissues, in contrast, increased the activities of antioxidant enzymes and the amount of nonenzymatic antioxidants. This finding was supported by the work of identifying isoenzymes profiling of the antioxidant enzymes. In addition, SNP application before from Hg stress caused improvements in physiological parameters, and increased the levels of protein, proline, and chlorophyll as compared to control. It also significantly affected the expression rates of 5 genes encoding antioxidant enzymes. In result, it has been determined that NO applied before exposure to mercury stress in maize plant provides an important contribution to increase plant tolerance by regulating the response mechanisms at physiological, biochemical and gene level.

2017, 109 pages

Keywords: Antioxidant, Gene expression, Heavy metal, Maize, Mercury, Nitric oxide, Oxidative stress

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlanan bu araştırmanın büyük bir kısmı, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Fizyolojisi Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Tez çalışmalarım süresince çok büyük emeği olan her türlü bilgi, deneyim, tecrübesi ile çalışmalarına destek olan çok kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICIYA en içten teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımın yürütülmesinde ve yorumlanmasında çok büyük katkısı olan, desteğini hiç esirgemeyip yanımda olduğunu hissettirerek bana güç veren hocam Sayın Doç. Dr. Nevzat ESİM'e sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca, bilgilerinden yararlandığım ve birçok aşamada katkı sağlayan kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Yavuz DEMİR'e sonsuz teşekkür ederim. Moleküler çalışmalarım sırasında tecrübesi ile yardımcı olan ve tez yazma aşamasında bilgisine sürekli başvurduğum değerli hocam Sayın Doç. Dr. Özkan AKSAKAL'a da teşekkür ederim. Her türlü bilgi ve deneyimleri ile bana destek veren ve beni sürekli motive edip güvenimi kat ve kat arttıran saygı değer hocam Yrd. Doç. Dr. Derya EFE'ye çok teşekkür ederim.

Yüksek Lisans döneminin her aşamasında bana destek olan ve arkadaşlığı, dostluğu ve çalışkanlığı ile her zaman yanımda olduğunu hissettiren, Ebru GENÇ'e her türlü yardımından dolayı teşekkür ederim. Ekibimize sonradan katılan canla başla çalışarak her türlü yardımına koşan, çalışma arkadaşımız Sakineh Mohammadi Kohneh SHAHRI'ye, her türlü yardımı için değerli arkadaşım Özlem GÜLMEZ ve Dr. Deniz TİRYAKI'ya çok teşekkür ederim. Çalışmada kullanılan tohumları temin eden SAKARYA TARIMSAL ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ'ne de ayrıca teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım süresince gösterdikleri sonsuz sevgi, sabır ve anlayışları ile her an yanımda olup her türlü maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen çok kıymetli annem Ayfer KARAMAN, ağabeyim Erkut KARAMAN, ablam Sevim KESER, kardeşlerim Ertürk KARAMAN, Emre KARAMAN ve canım teyzem Ayten HINISLI'ya sonsuz teşekkür ederim.

Aykut KARAMAN

Haziran, 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	21
3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar.....	21
3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları.....	21
3.3. Yöntemler.....	26
3.3.1. Çimlenme deneyleri ve konsantrasyon belirleme çalışmaları.....	26
3.3.2. Fide Aşamasında Yapılan Çalışmalar	28
3.3.2.a. İçsel Civa, Makro ve Mikro Element Miktarlarının Belirlenmesi.....	28
3.3.2.b. Bitkilerin yetiştirilmesi ve HgCl ₂ ve SNP uygulamaları.....	28
3.3.2.c. Hücre zarındaki elektrolit sızıntı oranının belirlenmesi	30
3.3.2.d. Lipid peroksidasyonu seviyesinin (MDA olarak) belirlenmesi	30
3.3.2.e. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarının belirlenmesi.....	31
3.3.2.f. Süperoksit anyonu (O ₂ ⁻) miktarının belirlenmesi.....	31
3.3.3. Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi	32
3.3.4. Askorbat ve glutatyon tayini için ekstraksiyon yöntemi	35
3.3.5. Protein miktarının belirlenmesi	37
3.3.6. Prolin miktarının belirlenmesi.....	38
3.3.7. Klorofil miktarı tayini	39
3.3.8. Fenolik madde içeriğinin belirlenmesi	40
3.3.9. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE).....	40
3.3.10. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile izoenzimlerin belirlenmesi	41
3.3.11. Antioksidan Enzimlerin İzoenzim Profillerinin Belirlenmesi.....	42

3.3.12. Moleküler biyolojik testler	43
3.3.12.a. RNA izolasyonu	43
3.3.12.b. cDNA eldesi	44
3.3.12.c. Gerçek zamanlı PCR analizi (Real-Time PCR)	45
3.4. İstatistiksel Analiz	45
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	47
4.1. Çalışılan Civa ($HgCl_2$) ve Nitrik oksit (NO) Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	47
4.1.1. İçsel civa miktarı	47
4.1.2. Mısır bitkisine ait kök, gövde, yaş ağırlık ve nispi su içeriği verileri	48
4.1.3. Mısır bitkisine ait element içeriği bulguları	50
4.1.4. Lipid peroksidasyon seviyesi (MDA olarak) ve elektrolit geçirgenliği bulguları	52
4.1.5. Total protein ve prolin miktarı	53
4.1.6. Fotosentetik pigment içeriğine ait bulgular	54
4.1.7. Fenolik madde içeriği bulguları	55
4.2. Reaktif Oksijen Türleri seviyelerine ait bulgular	56
4.3. Lipid Peroksidasyon Seviyesi (MDA olarak) ve Elektrolit Geçirgenliği Bulguları	58
4.4. Antioksidan Enzimlerin Aktivitelerine Ait Bulgular	60
4.4.1. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ve izoenzim profili.....	60
4.4.2. CAT enzim aktivitesi ve izoenzim profili	63
4.4.3. POD enzim aktivitesi ve izoenzim profili bulguları.....	64
4.4.4. GR enzim aktivitesi ve izoenzim profili.....	66
4.4.5. Glutasyon ve askorbat içeriği bulguları	69
4.5. Antioksidan Genlerin Ekspresyonu.....	71
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	76
5.1. Tartışma.....	76
5.2. Sonuç	93
KAYNAKLAR	95
ÖZGEÇMİŞ	110

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
APX	: Askorbat peroksidaz
AsA	: Askorbik asit
CAT	: Katalaz
DHA	: Dehidroaskorbik asit
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: İndirgenmiş glutasyon
HgCl_2	: Civa klorür
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
NBT	: Nitroblue tetrazolium klorür
nmol	: Nano mol
NO	: Nitrik oksit
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
POD	: Peroksidaz
PVP	: Polivinilpirrolidon
ROT	: Reaktif oksijen türleri
rpm	: Devir/dakika
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SNP	: Sodyum nitroprussid
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiobarbutirik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
U	: Enzim ünitesi
x g	: Yerçekimi ivmesinin katı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Civa Biyokimyasal Döngüsü	6
Şekil 1.2. NO'nun biyosentez yolları.....	13
Şekil 3.1. Tohumların Çimlendirilme Aşaması	27
Şekil 3.2. Hidroponik ortamda yetiştirilen bitkiler	29
Şekil 3.3. Uygulama sonrası hasat işlemi	30
Şekil 3.4. Süperoksit anyon ($O_2^{\bullet-}$) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik	32
Şekil 3.5. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik	33
Şekil 3.6. Askorbik asit içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik.	36
Şekil 3.7. Glutasyon içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik.....	37
Şekil 3.8. Protein tayini için kullanılan standart grafik	38
Şekil 3.9. Prolin içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik	39
Şekil 3.10. Fenolik madde içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standart grafik	40
Şekil 4.1. Mısır bitkisinin yapraklarında klorofil içerikleri	55
Şekil 4.2. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarında H_2O_2 içerikleri.....	57
Şekil 4.3. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarında $O_2^{\bullet-}$ içerikleri.....	58
Şekil 4.4. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarına ait MDA bulguları	59
Şekil 4.5. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarına ait EL bulguları	59
Şekil 4.6. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarına ait SOD aktivitesi ($U.mg^{-1}$ protein).....	61
Şekil 4.7. Mısır bitkisi köklerinde SOD izoenzim profili.....	62
Şekil 4.8. Mısır bitkisi yapraklarında SOD izoenzim profili	62
Şekil 4.9. Mısır bitkisi yapraklarında CAT izoenzim profili	64
Şekil 4.10. Mısır bitkisi yapraklarında POD izoenzim profili	66
Şekil 4.11. Mısır bitkisinde kökte GR izoenzim profili.....	68
Şekil 4.12. Mısır bitkisi yapraklarında GR izoenzim profili	68
Şekil 4.13. Civa toksisitesi altındaki mısır bitkisinde GSH içeriği.....	70
Şekil 4.14. Civa toksisitesi altındaki mısır bitkisinde askorbat İçeriği.....	70
Şekil 4.15. Mısır köklerinde kontrole göre diğer tüm gruplarda antioksidan genlerin gerçek zamanlı ifade oranlarının değişimi	72

Şekil 4.16. Mısır köklerinde kontrole göre diğer tüm gruplarda antioksidan genlerin gerçek zamanlı ifade oranlarının değişimi	73
Şekil 4.17. Mısır yapraklarında kontrole göre diğer tüm gruplarda antioksidan genlerin gerçek zamanlı ifade oranlarının değişim diyagramı.	74
Şekil 4.18. Mısır yapraklarında kontrole göre diğer tüm gruplarda antioksidan genlerin gerçek zamanlı ifade oranlarının değişimi	75



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Civa toksisitesi altındaki mısır bitkisi köklerinde içsel civa miktarı üzerine nitrik oksit'in etkisi (ppb)	48
Çizelge 4.2. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarında yaş-kuru ağırlık, bitki uzunluğu ve bağıl su içeriğine ait bulgular.....	48
Çizelge 4.3. Farklı civa konsantrasyonlarının mısır tohumlarının çimlenme oranları üzerine etkileri	49
Çizelge 4.4. Farklı civa konsantrasyonlarının mısır tohumlarının kök-gövde uzunlukları (cm) üzerine etkileri.....	50
Çizelge 4.5. Mısır bitkisinin köklerinde esas elementlerin içeriğine ait bulgular	51
Çizelge 4.6. Mısır bitkisinin yapraklarında esas elementlerin içeriğine ait bulgular.....	52
Çizelge 4.7. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarında MDA ve EL bulguları	53
Çizelge 4.8. Protein ve prolin içeriği	54
Çizelge 4.9. Mısır bitkisinin yapraklarında klorofil miktarlarına ait bulgular.....	55
Çizelge 4.10. Civa toksisitesi altındaki mısır bitkisinde fenolik madde içeriği üzerine nitrik oksit'in etkisi ($\mu\text{g g}^{-1}$)	56
Çizelge 4.11. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarında H_2O_2 ($\mu\text{g.gr}^{-1}$) ve $\text{O}_2^{\cdot-}$ ($\mu\text{g.gr}^{-1}$) içerikleri.....	58
Çizelge 4.12. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarında MDA ve EL bulguları	60
Çizelge 4.13. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarında SOD aktivitesi (U.mg^{-1} protein)...	61
Çizelge 4.14. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarında CAT aktivitesi (U.mg^{-1} protein)...	64
Çizelge 4.15. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarında POD aktivitesi (U.mg^{-1} protein)...	65
Çizelge 4.16. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarında GR aktivitesi (U.mg^{-1} protein)	67
Çizelge 4.17. Civa toksisitesi altındaki mısır bitkisinde glutatyon (nmol.gr^{-1}) ve askorbat (nmol.gr^{-1}) içeriği	71

1. GİRİŞ

Bitkiler, ekosistemdeki fonksiyonları ve birincil üretici olmaları sebebiyle canlılığın devamı için vazgeçilmez unsurların başında yer almaktadır. Işık enerjisini kullanarak bulundukları ortamda su ve inorganik maddeleri alarak hem kendileri hem de diğer tüm canlılar için besin üretmektedirler. Bu işlemi gerçekleştirirken ekosistemin karbondioksit ve oksijen dengesini, azot ve fosfor döngülerinin ayarlanmasına da önemli katkıda bulunurlar. Bununla birlikte toprak kayması, sel ve erozyonu önleme, toprak için organik gübre olarak kullanılma, birçok canlıya ev ve besin oluşturma gibi görevleri de bulunmaktadır. Ayrıca; kimya, kozmetik, mobilya, ilaç, tarım gibi birçok sanayi sektöründe de hammadde olarak kullanılmaktadırlar (Mahajan and Tuteja 2005).

Bu kadar vazgeçilemez özelliğe sahip olan bitkilerin varlığını sürdürebilmeleri hayatın devamlılığı için şarttır. Ancak günümüzde giderek artan birçok olumsuz çevresel ve genetiksel birçok faktör, bu canlıların büyüme, gelişme ve verimliliklerini büyük oranda sınırlandırmaktadır (Gallego *et al.* 1996).

Tüm organizmalarda olduğu gibi bitkiler de büyüme ve gelişmelerini sürdürebilmeleri için ışık, ısı, nem ve sıcaklık gibi çevresel şartlara ihtiyaç duymaktadırlar. Optimum koşullar olarak adlandırılan bu koşulların altında veya üzerinde bitkiler normal büyüme ve gelişmelerini sürdüremez ve strese maruz kalır ve en sonunda ölmeye mahkum olurlar (Çulha and Çakırlar 2011). Bitkilerde zarar meydana getirerek onların biyolojik fonksiyonlarının bozulmasına ya da bu fonksiyonlarını aksatmasına neden olan böyle etkenler stres faktörleri olarak bilinir. Biyotik (rekabet, patojenler vb.) ve abiyotik (düşük ve yüksek sıcaklık, tuzluluk, kuraklık, ağır metaller vb.) olmak üzere iki gruba ayrılır (Büyük vd 2012).

Bitkiler gerek biyotik gerekse abiyotik stres faktörlerinden önemli oranda etkilenirler. Örneğin bu faktörler bitki hücre ve dokularında olumsuz yönde birçok fizyolojik ve

biyokimyasal değişime neden olarak onların genetik potansiyellerine ulaşmalarını engeller ve ürün verimliliklerini de dikkate değer bir şekilde azaltır.

Yeryüzünde ürün verimliliğinin düşük olmasının ana nedeni abiyotik stres faktörleridir. Bu faktörler ürünlerin ortalama verimini %50 ya da daha fazla oranda düşürürler (Bray *et al.* 2000). Günümüzde hızla gelişen sanayileşme, doğal afetler, değişen iklim koşulları ve insanların çevre bilinçsizliğinin doğal bir sonucu olarak giderek buna bağlı olarak diğer canlıların yanı sıra bitkilerin gelişimi ve verimliliği de ciddi zararlar görmektedir (Chopra and Selote 2007). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, dünya üzerinde ekilebilir alanların oranı giderek azalmakta, bununla beraber nüfus sayısı giderek artmakta olduğunu göstermiştir (Mahajan and Tuteja 2005). Gerek kötüleşen çevre koşulları, gerek azalan ekilebilir alanlar, gerekse artan nüfus oranı göz önüne alındığında; çok kısa bir zaman sonra insanların kıtlıkla karşı karşıya kalacağı gerçeği kaçınılmazdır. Zaten günümüzde dünya nüfusunun kayda değer bir bölümünün kronik açlıkla karşı karşıya olması, bu varsayımı oldukça kuvvetlendirmektedir (Tilman *et al.* 2011) Bu faktörler göz önüne alındığında, günümüzde bitki direncini ve verimliliğini artırmak amacıyla ciddi bilimsel çalışmaların yapılması kaçınılmaz bir hale gelmiştir.

Dünyada nüfusu 1900'lü yıllardan beri hızla artmakta ve günümüzde bu rakam 7 milyarı geçmiştir. Bu hızlı artışla 2050 yılına kadar dünya nüfusunun 10 milyara ulaşması tahmin edilmektedir (Ezeh *et al.* 2012). FAO (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu)'nun verilerine göre yeryüzündeki toplam işlenebilir tarımsal arazi alanları giderek azalmakta ve artan nüfusun gıda talebini karşılayamamaktadır. Bununla birlikte 2009 yılı FAO'nun istatistik verilerine göre ülkemiz topraklarının tarımsal amaçlı kullanımı %33,2'dir. Şimdilik herhangi bir kıtlık ile karşı karşıya gelinmemiş olsa da gelecek 50 yıl içerisinde artan abiyotik streslerden dolayı kullanılabilir tarım arazilerinin dejenerasyonu vasıtasıyla bu durum ile karşılaşma riski giderek artmaktadır (Esim 2011).

Dünya üzerindeki kullanılabilir tarım alanları, stres faktörlerine göre sınıflandırıldığında, doğal bir stres faktörü olan kuraklık stresi %26, bunu %20 ile

mineral stresi ve %15 ile soğuk ve don stresi takip etmektedir. Bunların dışında kalan diğer tüm stresler %29'luk bir pay alırken, yalnızca %10'luk bir alan herhangi bir çevresel stres faktörüne maruz kalmamaktadır (Blum 1986; Güler ve Çobanoğlu 1997).

Topraklarda ağır metal birikimi gıda güvenliği, fitotoksikite, bitki büyüme ve toprak organizmalarının çevre sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle tarımsal üretimde endişe kaynağıdır (Yadav 2009). Ağır metaller bitkilere karşı toksik etki gösterdiklerinden dolayı en büyük çevresel kirleticiler olarak değerlendirilirler. Ağır metaller; yoğunluğu 5 gr/cm^3 'ten yüksek olan, doğada var olan ve yok edilemeyen bileşiklerdir. Bakır, çinko, kurşun, krom, kadmiyum, civa gibi pek çok metal bu gruba dahildir (Bell *et al.* 2001; Schwartz *et al.* 2001; Passariello *et al.* 2002). Günümüzde giderek artan insanoğlunun sebep olduğu antropojenik etkiler; ağır metallerin ekosistemlerdeki konsantrasyonlarının artmasına ve dünya çapında en yaygın kirleticiler olmalarına sebep olmuştur. Termik santraller, demir-çelik sanayi, çimento ve cam üretimi yapan tesisler, kâğıt sanayi, gübre sanayi, yakma tesisleri ve buna benzer pek çok endüstriyel tesis, ağır metallerin çevreye yayılmalarına sebep olmaktadır. Aynı zamanda toprak yapısındaki ağır metaller de asit yağmurları sonucunda çözünmeyle sulara karışmaktadır. Bu metaller; suda, toprakta, sedimentte ve canlı organizmalarda birikme özelliğine sahiptir. Esansiyel olsun ya da olmasın, tüm metallerin biyolojik sistemdeki birikimleri, belli bir eşik değerinden sonra toksiktir (Israr *et al.* 2006).

Dünya üzerinde ekilebilir tarım arazilerinde ortalama civa seviyesi 39 kg/km^2 olduğu tahmin edilmektedir. Gelişmiş ve sucul bitkiler civayı bünyelerinde biriktirebilmektedirler. Civanın yüksek konsantrasyonları hücreler için güçlü bir fitotoksik etki ve gözle görülebilir fiziksel hasarlara yol açtığı rapor edilmiştir.

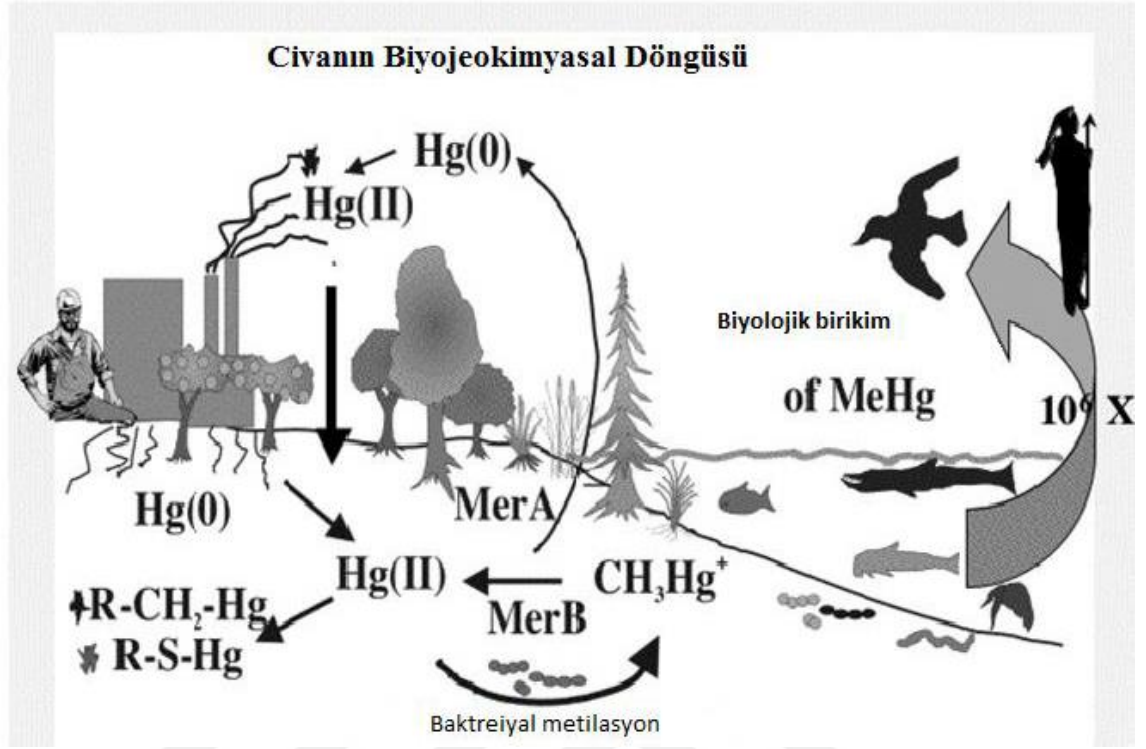
Çok eski çağlardan beri insanlığın bildiği bir metal olan civa elementi oda sıcaklığında sıvı halde bulunan bir ağır metaldir (Güven *vd.* 2004). Ayrıca, 14.06 g/cm^3 yoğunluğu ile ağır metaller grubunun bir üyesi olan civa periyodik cetvelin 2B grubunda bulunan bir geçiş elementidir. Civa atom numarası 80 olan, elektriği iyi ileten ama ısıyı iletmeyen, gümüş-beyaz bir metaldir (Bradl *et al.* 2005). Civa yer kabuğunun

oluşumuna katılan temel elementlerdendir. Çoğunlukla yüzeysel katmanlarda bulunur ve doğal dağılımla sürekli serbest hale geçtiği için insan dahil tüm canlılarda iz halinde bulunur (Baş ve Demet 1992; Vural 2005). Civa litosfer, hidrosfer, atmosfer ve biyosfer dahil olmak üzere çevremizdeki en zehirli ağır metallere biridir (Castro-Gonzalez and Mendez-Armenta 2008).

Civa fosil yakıtlarda da bulunur (Baş ve Demet 1992). Fosil yakıtların yanması, madencilik sektöründe civa içeren kayaçların kırılması, civa üretimi esnasında ve katı atık depolarından sızma, atık pillerin rastgele atılması, diş hekimliğinde kullanılan amalgam dolgular ve evde kullanılan civa içeren aletlerin kırılması civanın çevreye yayılması ile sonuçlanmaktadır (Bakar and Baba 2009). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından şehir alanlarında $0.1-5 \text{ ng.m}^3$, endüstriyel alanlarda $0.5-20 \text{ ng.m}^3$ ve kent alanı dışında $0.001-6 \text{ ng.m}^3$ olması gerektiği belirtilmektedir (Güler ve Çobanoğlu 1997). İnsan aktiviteleri, civanın normal topraktaki seviyesinden 200.000 kez daha fazla seviyede olmasına yol açmaktadır (Gupta 2007). Civa besin zinciri aracılığıyla biyolojik organizmalar tarafından olduğu kadar su ve hava tarafından da çevrede taşınmaktadır (WHO 2003). Civa çok düşük konsantrasyonlarda dahi etkili olduğu için, çevrede kısa süreli konsantrasyon artışları tüm canlıların metabolik faaliyetleri üzerinde ciddi etkilere sahip olabilirler (Çevre ve Orman Bakanlığı 2006).

Gübre, zirai ilaç, kireç gibi civa içeren bileşiklerin formları tarım yapılan topraklara önemli oranda civanın girmesini neden olur (Han *et al.* 2002). Toprakta pek çok civa formu oluşabilir. Bunlar; elemental (Hg), iyonik (Hg^{+2}), metil (MeHg), hidroksil ($\text{Hg}(\text{OH})_2$) ve sulfid (HgS) civa gibi formlardır. Fakat bu formlardan bitkiler için biyolojik ve en yaygın olanı Hg^2 formudur (Heaton *et al.* 2005; Han *et al.* 2006). Civa bitki kökleriyle kolaylıkla alınır ve ağırlıkla köklerde birikir. Genellikle köklerde biriken civa yapraklar, çiçekler ve diğer gelişmiş kısımlara taşınır (Sierra *et al.* 2009). Kök hücrelerine civa alınımı muhtemelen demir, bakır veya çinko kanalları boyunca olabileceği ileri sürülmüştür (Patra and Sharma 2000; Esteban *et al.* 2008). Bitkiler tarafından civa alınımı topraktaki diğer faktörler tarafından da etkilenir. Örneğin; arsenat'ın varlığı çeltik köklerinde civanın birikimini teşvik etmiştir (Du *et al.* 2005).

Arsenat'ın absorpsiyonu kök yüzeyleri üzerinde olumsuz değişime neden olmasından dolayı civanın emilimi artıyor olabilir (Chen and Yang 2012). Bitkilerde biriken civa büyük oranda köklerde kalır ve sadece az bir miktarda gövdeye geçer (Wang 2004). Köklerde tutulan civa'nın yaklaşık %80'i hücre duvarına bağlıdır (Wang and Greger 2004). Bunun muhtemel nedenleri şunlar olabilir. İyonik civa karbonat, sülfat ve fosfat gibi iyonik olmayan bileşiklerle kolaylıkla etkileşime girebilir. Hücre duvarı yüksek katyonik değişim kapasitesine sahip olduğundan civa iyonları bağlanabilir (Chen *et al.* 2009). Yapılan bir tarla çalışmasında; mısır ve buğdayın toprak üstü dokuları bir büyüme sezonu boyunca bol civalı kirli bir ortama maruz bırakılmış ve sonuç olarak bitkilerin yapraklarında biriken civanın topraktaki civa ile bağlantılı olmayıp doğrudan havada bulunan civa ile ilgili olduğu belirlenmiştir (Niu *et al.* 2011). Ancak papatyanın alt yapraklarında biriken civanın topraktan alınan civa ile bağlantılı olduğu belirtilmiştir (Millhollen *et al.* 2006). Yapraklar üzerinde civanın net birikim oranı atmosferik civa konsantrasyonları ile artmıştır (Ericksen and Gustin 2004). Civanın yapraklarda nasıl biriktiği ile ilgili mekanizma tam olarak daha belirlenememiş ancak stomalar yapraklarda gaz değişimi boyunca atmosferik civanın alınmasından sorumlu olabildiği ileri sürülmüştür (Chen and Yang 2012). Civa kaynaklı büyüme engellenmesi buğday (Ge *et al.* 2009), domates (Cho and Park 2000), salatalık (Cargnelutti *et al.* 2006), yonca (Zhou *et al.* 2007; Zhou *et al.* 2008) ve diğer bitkilerde (Israr *et al.* 2006; Gao *et al.* 2010; Costa *et al.* 2011) belirlenmiştir. Bitkiler üzerinde civanın büyümeyi engelleme etkisi ultrastrüktural hasar ile doğrudan bağlantılı olduğu da bildirilmiştir. Geçirimli elektron mikroskopuyla (TEM) yapılan analizlerde civaya maruz kalan bitkilerde hücre şeklinde kayıp, hücresel alanda azalma, yaprak damarlarında anormal değişimler ile sonuçlanmıştır (Chen *et al.* 2009; Shiyab *et al.* 2009). Civa muamelesi ayrıca klorofil miktarında azalmaya ve tilakoid zarlarının bozulmasına neden olmuştur. Civa stresi NADPH'in ve klorofilbiyosentezinden sorumlu protoklorofillid deosiredüktaz (POR) enziminin aktivitesini inhibe etmiştir (Lentietal 2002).



Şekil 1.1. Civa Biyokimyasal Döngüsü (Sengar *et al.* 2010)

Civanın bitkilerin büyüme, gelişme ve verimini olumsuz etkilemesinin temelinde, toksik civa konsantrasyonlarının hücrelerde redoks dengesini bozarak oksidatif zarara ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) fazla miktarda üretilmesine sebep olması yatar (Zengin ve Munzuroğlu 2006). Civanın bitkiler üzerinde neden olduğu tüm bu olumsuz etkilerinin giderilmesi bitki yaşamı, ekolojik denge, biyoçeşitlilik ve tarımsal üretim açısından son derece önemlidir. Bitkiler, hücrelerde oksijenin yüksek enerji potansiyelinin kullanıldığı metabolik yollarda üretilen ve reaktif oksijen türleri (ROT) olarak bilinen moleküllerin yıkıcı etkileriyle sürekli yüzleşmektedirler (Navrot *et al.* 2007). ROT'lar kolayca elektron alış-verişine giren, kısa ömürlü, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kararsız moleküller olarak da bilinir. Başlıca ROT'lar; (süperoksit molekülü ($O_2^{\cdot-}$), singlet oksijen (1O_2), hidroksil radikalleri ($\cdot OH$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2)) normal hücre metabolizması ürünleri olup, hücresel savunma mekanizmaları tarafından etkisiz hale getirilmeleri gerekir (Scandalios 2001). Örneğin, stres koşulları esnasında mitokondri ve kloroplasttaki elektron taşıma zincirindeki aksaklıklar, ROT üretimini aşırı derecede ürettiği en önemli kaynaklardır (Suzuki

and Mittler 2006). Özellikle düşük sıcaklık, tuzluluk, kuraklık, sel, patojen saldırılar, ağır metaller ve radyasyon gibi çevresel streslere maruz kalma sonucunda, hem kloroplast hem de mitokondride ROT üretimi büyük ölçüde artar. ROT'lar membran lipidlerinin peroksidasyonu, DNA zincirlerinin kırılmasına ve enzimlerin inaktivasyonu gibi daha pek çok hücresel hasara neden olurlar (Cheng and Song, 2006). Oksidatif stres boyunca, ROT'lar bitki hücresinin mitokondri, kloroplast, peroksizom ve nukleus gibi farklı kısımlarında oluşarak hücrede geri dönüşümsüz zarara sebep olup ölüme bile neden olabilmektedirler. Bununla birlikte düşük seviyelerdeki ROT'lar hücre içerisinde savunma mekanizması olan antioksidan sistemini harekete geçiren sinyal moleküller olarak görev alabilmektedirler (Siddiqui *et al.* 2010).

Singlet Oksijen (1O_2), yüksek enerjili O_2 'nin bir formudur. Oksijenin sahip olduğu elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi sonucu oluşabileceği gibi; süperoksit radikalinin nitrik oksit ile reaksiyonu ve hidrojen peroksitin hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir (Wright *et al.* 2002). Eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal özelliği yoktur, fakat güçlü bir oksidan özelliği vardır (Desikan *et al.* 2005).

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) moleküler oksijenin (O_2) bir elektronunu transfer etmesi oluşmaktadır. Süperoksit radikali enzimatik yolla ya da enzimatik olmayan reaksiyonlarla meydana gelebilir. Bu radikal en güçlü reaktiflerden biridir ve doymamış lipidler başta olmak üzere diğer biyomoleküllerin oksidasyonuna sebep olur. Ayrıca, lipid peroksidasyonu yanında, membran hasarı, hücresel toksisite ve DNA'daki tek zincir kırıklarına sebep olduğu belirtilmiştir (Fridovich 1995; Desikan *et al.* 2005; Asada 2006). Süperoksit radikali, hidrojen peroksitle reaksiyona girerek çok daha toksik bir molekül olan hidroksil radikalini üretebilir, ilave olarak nitrik oksit ile reaksiyona girerek daha az zararlı bir reaktif olan peroksinitriti oluşturabilir (Delledone *et al.* 2001; Desikan *et al.* 2005).

H_2O_2 ; orta derecede reaktif ve daha uzun ömürlü bir oksidatif ajandır. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz. Oksijenin enzimatik

olarak iki elektron ile indirgenmesiyle ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan tepkimeleri sonucu oluşur. Enzimlerin tiyol gruplarını okside ederek onları inaktif hale getirir. Bitkilerde özellikle Calvin döngüsü enzimleri, CuMg-SOD ile Fe-SOD enzimleri, H_2O_2 tarafından inaktive edilmektedir (Tsang *et al.* 1991).

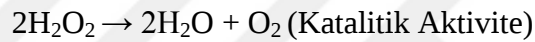
Hidroksil radikali ($\cdot OH$), oksijen radikalleri içerisinde en aktif ve en toksik olanıdır (Kehrer 2000). En reaktif radikal molekülü olan hidroksil radikali H_2O_2 'den metal katalizörlerin kullanıldığı HaberWeiss veya Fenton reaksiyonları ile oluşmaktadır. Tüm biyolojik moleküller ile reaksiyona girebilir ve fazla miktarda üretildiğinde ise hücrelerin ölümüne sebep olur (Halliwell and Gutteridge 1989). ROT'lar, lipid, protein, karbohidrat ve nükleik asitler gibi hücrelerin temel bileşenleri üzerinde etkili olurlar. Özellikle çift bağların bulunduğu doymamış yağ asitlerini içeren lipidler, ROT'lar ile kolayca reaksiyona girmektedirler (Blokhina *et al.* 2003; Halliwell 2006; Mittler 2006). Membran yapısı ve fonksiyonu üzerinde ROT'ların etkilerinin en çok araştırılanlarından birisi lipid peroksidasyonudur (Blokhina *et al.* 2003).

Bitki hücreleri ROT miktarını kontrol etmek ve stres koşullarında hücreleri artan ROT toksisitesinden korumak için bazı antiokasidanlar içermektedirler. Antiokasidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan (nonenzimatik) olarak iki gruptur. Antiokasidan enzimler olarak adlandırılan enzimatik grup, ROT'ları kademeli bir şekilde daha az toksik olan bileşiklere parçalayarak etkilerini azaltırlar veya ortadan kaldırırlar. Bu enzimlerin başlıcaları süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve peroksidazlardır (POD) (Halliwell 2006; Ahmad *et al.* 2008).

Süperoksid dismutaz (SOD; E.C.1.15.1.1) enzimi, süperoksid radikalının H_2O_2 ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen metal içeren bir enzimdir (Sairam and Srivastava 2000; Eyidoğan *et al.* 2003; Minibaeva and Gordon 2003). SOD'un bitki hücrelerinde farklı izoenzimleri olup, Fe-SOD kloroplast stromasında, Mn-SOD mitokondrilerde ve CuZn-SOD ise sitoplazma ve kloroplastlarda yer almaktadır (Alscher and Hess 1993). ROT'lara karşı antiokasidan savunma sisteminin ilk hattı olan

ve bütün aerobik organizmalarda bulunan bu enzimlerin çeşitli streslere cevap olarak arttığı ve bu artışın bitkiye direnç sağladığı belirlenmiştir (Apel and Hirt 2004).

Katalaz (CAT; E.C.1.11.1.6), hidrojen peroksiti etkisiz hale getirmek için bitkilerde önce bir ara ürün olarak H_2O_2 bileşiği oluşturan; ikinci basamak reaksiyonunda ise su ve oksijene indirgenmesini katalizleyen, demir porfirin içeren tetramerik ve yüksek molekül ağırlığına sahip bir enzimdir. Aynı zamanda CAT, düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında alkoller, askorbat ve fenol içeren indirgenmiş substratları kullanarak peroksidatif aktivite gösterebilir (Chaudiere and Ferrari 1999; Gechev *et al.* 2003). CAT'ın görev aldığı bazı reaksiyonlar aşağıdaki verilmiştir.

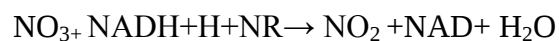


CAT, turnover sayısı çok yüksek olan enzimlerden biridir. Bir mol katalaz, bir saniyede milyonlarca hidrojen peroksit molekülünü su ve oksijene dönüştürür (Dhindsa *et al.* 1981; Scandalios 1994; Willekens *et al.* 1997). CAT'ın bitki dokusunda H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Patykowski and Urbanek 2003). CAT'ın temel fonksiyonu, moleküler O_2 mevcudiyetinde metabolizmanın bazı kademelerinde sentezlenen, radikal karakterli H_2O_2 'nin ve ROOH gibi bir peroksitin radikalliğini gidererek özellikle membranlarda oluşabilecek geri dönüşümsüz hasarları engellemektedir. Zira H_2O_2 , singlet oksijen (1O_2) ve $\cdot OH$ potansiyel kaynağıdır (Scandalios 1993; Chaudiere and Ferrari 1999). CAT kararlı bir enzim değildir. Yüksek ışık yoğunluğu ve strese maruz kalan bitki hücrelerinde oluşan H_2O_2 'nin yüksek konsantrasyonlarıyla inhibe edilebilir (Streb *et al.* 1993). Zayıf afinitesi ve sadece peroksizomlarda bulunması (çok az miktarda mitokondri matriksinde bulunurlar) CAT'ın etkinliğini azaltmaktadır (Asada 1992; Scandalios 1993).

Peroksidaz (POD; E.C.1.11.1.7), HEM prostetik grubuna sahip, hidrojen peroksiti kullanarak fenoller ve hidrokinonlar gibi çok sayıda aromatik bileşenlerin

dehidrojenasyonunu katalizleyen bir proteindir (Banci 1997; Kim *et al.* 2000). Peroksidazların pek çok fizyolojik olayla ilişkisi olduğu ve metabolizmada aktif bir rol oynadığı belirlenmiştir (Bunkelmann and Trelease 1996; Laloue *et al.* 1997; Erdei *et al.* 2002; Durmuş 2003). Stres altındaki bitkilerde peroksidaz aktivitesinin arttığı bilinmektedir (Asada 1992). POD, uygun olmayan çevresel faktörler altında üretilen zararlı oksijen radikallerinin seviyesini düzenler ve bitki hücresinin en önemli koruyucu enzimlerinden birisidir (Bakardjieva and Christov 1996; Dehon *et al.* 2002). POD'lar hidrojen vericisi olarak birçok organik (AH₂) ve inorganik substratı kullanarak hidrojen peroksiti ortadan kaldırır. Mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen, çeşitli stres faktörlerinden yüksek seviyede etkilenen POD aktivitesi, bu enzimin stres enzimi olarak anılmasına sebep olmuştur (Whetten *et al.* 1998; Amaya *et al.* 1999; Rout *et al.* 2000; Jaleel *et al.* 2008).

Bitkiler, toprak ve atmosferde inorganik formda bulunan temel ve iz elementleri gıda kaynağı olarak kullanırlar. Bu gıda kaynaklarından birisi de azottur. Çoğu bitki büyüebilmek için azotu topraktan nitrat (NO₃) ve amonyum (NH₄) iyonları formunda alır (Solomonson *et al.* 1990). Bitkiye alınan nitrat iyonlarının bitkide amonyuma indirgenmesi gerekir. Çünkü azotun organik maddelerin yapısına katılmasının yolu amonyumdan geçer. Nitrat indirgenmesinde iş gören anahtar enzim niteliğindeki nitrat redüktaz (NR) filavin adenin dinükleotid (FAD), Sitokrom (sit.) ve molibden içeren prostetik gruplara sahiptir (Pattanayak and Chatterjee 1999; Lea *et al.* 2004). Birkaç saatlik yarılanma süresine sahip olan enzim (Marschner 1995), yüksek bitkilerin sitoplazmasında lokalize olmuştur ve elektron verici olarak ya nikotin adenin dinükleotid (NADH) veya nikotin adenin dinükleotid fosfat [NAD(P)H]'a ihtiyaç gösterir (Haynes 1986; Solomonson and Barber 1990; Marschner 1995; Campbell 1999). Absorblanan nitrat (NO₃), nitrat redüktaz (NR) ve nitrit redüktaz (NiR) ile amonyuma indirgenir (Solomonson *et al.* 1990). NR (E.C. 1.6.6.1) NADH'dan 2 elektronu alarak nitratı nitrite (NO₂) ve NADH'ı da NAD⁺'ya dönüştürür. Bu reaksiyon aşağıda gösterildiği gibidir (Lea *et al.* 2004).



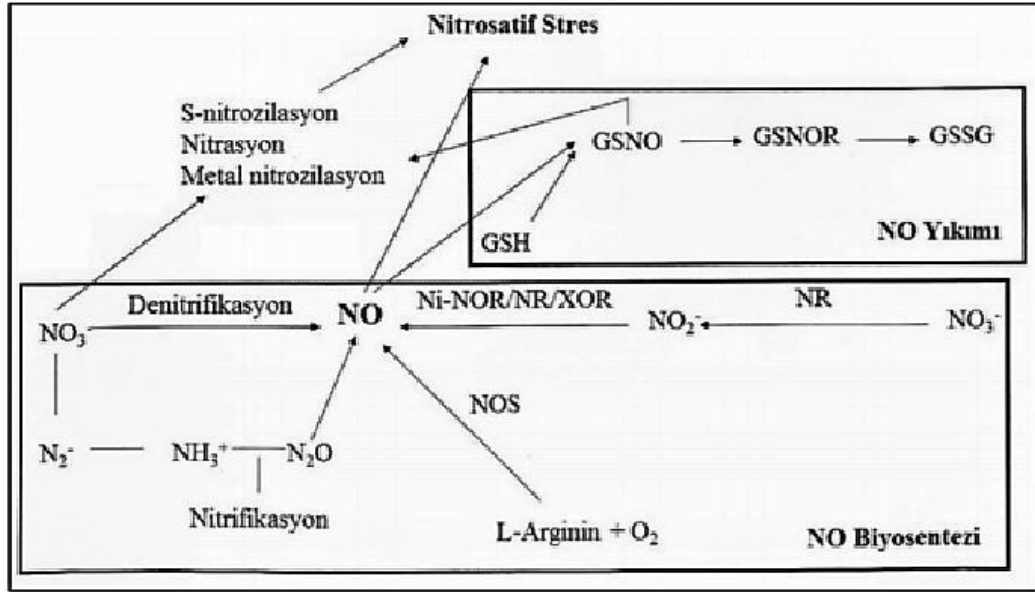
Bu reaksiyon sitosolde meydana gelmektedir. Daha sonra NO_2^- sitozolden, yapraklarda kloroplastlara ve köklerde proplastidlere gönderilir. Burada da NO_2^- , NİR ile amonyuma indirgenir (Solomonson *et al.* 1990; Oral 2003). Diğer taraftan, NR bitkilerde içsel olarak üretilen bir sinyal molekül olan nitrik oksit de enzimatik bir kaynağı olarak görev yaptığı bildirilmiştir (Yamasaki and Sakihama 2000; Rockel *et al.* 2002; Zhao *et al.* 2009). NR eksikliği olan mutant soya fasulyesi yapraklarında NO üretiminin olmadığı, ancak yabani tiplerde ise NO üretimi için anahtar enzim olarak NR'nin indüklendiği belirtilmiştir (Dean and Harper 1986).

Uzun yıllardan beri canlılarda varlığı bilinen nitrik oksit (NO: azot monoksit), son yıllarda hem memelilerde hem de bitkilerde anahtar haberci molekül olarak dikkatleri üzerine çekmiştir (Lamattina *et al.* 2003; Wendehenne *et al.* 2004; Unsal and Arısan 2009). 1992 yılında Amerikan Bilim Gelişimi Kuruluşu tarafından ABD'de yılın molekülü seçilmiştir (Neill *et al.* 2003). 1998 yılında ise Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro, Ferid Murad isimli araştırmacıların “kardiyovasküler sistemde bir sinyal molekül olarak nitrik oksit” konulu araştırmaları ile fizyoloji ve tıp alanında nobel ödülünü kazanmışlardır (Nobelprize.org 2016). Aynı yıl, NO'nun bitki savunma sinyali olarak da tanımlanmasından sonra, NO ve bitki biyolojisi ile ilgili çalışmalarda kayda değer bir artış olmuştur (Durner and Klerissig 1999; Beligni and Lamattina 2001; Wendehenne *et al.* 2001; Neill *et al.* 2002b, 2003).

NO, normal koşullarda bitki hücrelerinde az miktarda sentezlenip salınmaktadır (Wildt *et al.* 1997). NO sentezi bitki türüne, dokusuna, içinde bulunduğu yetişme koşullarına bağlı olarak değişmektedir (Barroso *et al.* 1999; Pedroso *et al.* 2000a). Bitkilerde NO enzimatik ve enzimatik olmayan iki farklı metabolik yolak ile sentezlenmektedir. Bitki hücrelerinde NO üretim yeri sitozol, nukleus, peroksizom matriksi ve kloroplastlardır (Aytamka 2005). Enzimatik yollardan biri olan ve memelilerdeki nitrik oksit sentaz (NOS) enzimine benzeyen ancak henüz tam olarak tanımlanmamış bir enzim ile bitki hücrelerinde L-argininin katalizlenmesi sonucu NO oluştuğu kabul edilmektedir (Ninneman and Maier 1996; Neill *et al.* 2003; Zhao *et al.* 2009; Unsal and Arısan 2009). Bitkilerde NOS'un kloroplast ve peroksizomlarda bulunduğu da rapor edilmiştir

(Barroso *et al.* 1999; Pedroso *et al.* 2000b). Kuo *et al.* (1995) fare NOS antikorlarını kullanarak buğday tohumlarında NOS varlığını göstermişlerdir. Ayrıca bu yöntem kullanılarak bezelye, buğday ve mısır bitkilerinde de NOS varlığı ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (Sen and Cheema 1995; Riberio *et al.* 1999). Ninneman and Maier (1996) tarafından yüksek bitkilerde işaretlenmiş sitrullin oluşumunun gösterilmesinin yanı sıra, L-NNA (NG-nitro-L-arjinin) ve L-NAME (NW-nitro-L-arjinin metil ester) gibi inhibitörler kullanılarak NOS aktivitesinin varlığı kanıtlanmıştır. Bütün bu verilere rağmen, bazı bitkilerin yaprak ekstratlarında ve dokunulmamış dokularda NOS inhibitörlerinin, NO sentezi üzerine hiçbir etkisi olmadığını savunan araştırmacılar da bulunmaktadır (Clarke *et al.* 2000; Rockel *et al.* 2002).

Diğer bir enzimatik yolak ise yüksek bitkilerde nitrat asimilasyonu için anahtar enzim olan ve nitratın nitrite dönüşümünü katalizleyen nitrat redüktaz (NR), nitritten NO'yu oluşturabilir. NR'nin siyanüre duyarlı olduğu, optimum pH 6,75'de nitritten NAD(P)H'ı kullanarak *in vitro* ve *in vivo* koşullarda NO'yu ürettiği kanıtlanmıştır (Harper 1981; Dean and Harper 1986; Yamasaki and Sakihama 2000). NO'nun başka bir enzimatik üretim yolu ise ksantin oksiredüktaz (XOR) enzimi aracılığıyla üretilmesidir (Harrison 2002). XOR bir katalitik reaksiyon oluşturarak serbest radikal üretir. Moleküler oksijen ve NO üretimi özelliği sayesinde XOR, bitki hücrelerinde sinyal moleküllerin kaynağı olarak önemli bir rol oynar (Corpas *et al.* 2004; Unsal and Arısan 2009). Enzimatik olmayan yolda asidik pH'da askorbat, dehidroaskorbik asit ve NO'yu sentezlemek üzere nitröz asitle reaksiyona girer (Weitzberg and Lundberg 1998). Apoplastik alanlarda ve kloroplastlarda meydana geldiği bilinen NO'nun varlığı, enzimatik olmayan yol ile askorbik asitle (pH: 3-6) kimyasal olarak indirgenmesi sonucu arpa alevron hücrelerinde gösterilmiştir (Henry *et al.* 1997; Horemans *et al.* 2000; Stöhr and Ullrich 2002). Ayrıca NO, karotenoidler tarafından ışığa bağımlı yolla indirgenmesi ile de oluşabilir (Cooney *et al.* 1994).



Şekil 1.2. NO'nun biyosentez yolları (Nineman and Moyer 1996; Unsal and Arisan 2009).

NO, düşük molekül ağırlıklı, lipofilik özellikte olduğundan dolayı hücre membranlarından kolayca difüzyona uğrayabilen, renksiz ve gaz yapısında bir moleküldür (Lamattina *et al.* 2003; Shi *et al.* 2007). Ayrıca eşlenmemiş elektron taşıması nedeniyle serbest radikal olarak kabul edilen NO, başka moleküllerle kuvvetli reaksiyonlara girebilen, birkaç saniye yarı ömrü olan “fizyolojik haberci molekül” olarak tanımlanmaktadır (Durner and Klessig 1999; Neill *et al.* 2002a). NO, tek başına yüksek konsantrasyonlarda dahi hücrelere zarar vermez ancak hücrelerde kontrolsüz üretim ile artan NO, süperoksit anyonları ile reaksiyona girerek peroksinitriti meydana getirmesi sonucunda toksik etki göstermektedir (Pryor and Squadrito 1995; Yamasaki *et al.* 1999; Stöhr and Ullrich 2002; Kerkütlüoğlu 2007). NO'nun reseptör molekülleri aktive etmediği, bunun yerine birkaç farklı mekanizma yolu ile hedef moleküllere kovalent olarak bağlanmak suretiyle hücrelerin yaşaması için temel biyokimyasal süreçlerden biri olan mitokondrilerdeki solunumu baskıladığı, demir sülfür içeren enzimlerle ilişkiye girerek bunların etkinliğini engellediği ve DNA'da yıkımlara yol açtığı da bilinmektedir (Van der Viet *et al.* 1996; Stöhr and Ullrich 2002).

Birçok biyolojik süreçte görev alan NO, hem bitki savunma mekanizmasında bir sinyal molekül hem de büyüme ve gelişmede hormonal özelliklere sahip bir bileşik olarak rol oynamaktadır (Leshem and Haramaty 1996; Beligni and Lamattina 1997; Delledonne *et al.* 1998; Beligni and Lamattina 1999a). Bitki büyümesi üzerine NO'nun etkilerinde konsantrasyonun son derece önemli olduğu vurgulanmıştır (Anderson and Mansfield 1979; Leshem *et al.* 1997; Pedrosso *et al.* 2000b; Zottini *et al.* 2002). NO'nun yüksek konsantrasyonlarının (40-80 ppm) domates, marul ve bezelye bitkisinde büyümeyi inhibe ettiği, düşük konsantrasyonlarının (0-20 ppm) ise büyümeyi teşvik ettiği ileri sürülmüştür (Hufton *et al.* 1996; Leshem and Haramaty 1996). Eksojen olarak uygulanan NO veya NO donörlerinin, patojen (Durner *et al.* 1998; Delledonne 2005), ışık (Beligni and Lamattina 2001), yerçekimi (Pedrosa and Durzan 2000) ve oksidatif strese (Beligni and Lamattina 1999b, 2001; Huang *et al.* 2002; Xing *et al.* 2004; Zhao *et al.* 2004; Shi *et al.* 2007; Zhao *et al.* 2009) karşı bitki cevaplarını etkilemektedir. Stres koşulları altında sinyal iletim yolunda görev alan NO reaktif oksijen türleri ile karşılıklı etkileşim halindedir. NO tarafından lipid peroksidasyonunun inhibisyonu, NO'nun potansiyel antioksidan rolünü işaret etmektedir (Beligni and Lamattina 1999a; Boveris *et al.* 2000; Vranova *et al.* 2002; Siddiqui *et al.* 2010). Eksojen olarak uygulanan NO, antioksidan enzimlerin aktivitelerine etki ederek süperoksit anyonunu elimine eder ve bitkiyi oksidatif zarardan korur (Shi *et al.* 2007). Son yıllarda antioksidan özelliği bilinen ve bitkilerde önemli bir haberci molekül olduğu kabul edilen NO'nun, pek çok fizyolojik ve biyokimyasal olayda rol oynadığı bilinmesine rağmen, etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. İlave olarak, literatür incelemelerinde biyotik ve abiyotik stres faktörleri ve NO arasında bir ilişkinin olduğu bilinmekle birlikte, bitkilerde civa stresi cevabında NO'nun antioksidatif cevap mekanizmaları üzerinde oynadığı rol ile ilgili çalışmalar hakkında çok sınırlı sayıda bilgi bulunmaktadır.

Günümüzde ağır metallere karşı bitki toleransını artırmaya yönelik çalışmalar giderek artmaktadır. Bunun için bazı bitki sinyal moleküllerin etkisi olabileceği ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Bu sinyal moleküllerden (bitki büyüme düzenleyicilerden) biri de antioksidan özelliği olan NO'dur. Ancak, civa toksisitesine karşı NO'nun rolü ile ilgili herhangi bir çalışma yoktur. Yukarıdaki bilgiler ışığında, mevcut araştırmada NO

uygulamasının civa stresine maruz kalan mısır bitkisinde fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler mekanizmalar üzerine etkileri araştırılmak istenmiştir. Şu ana kadar yapılan çalışmalardan farklı olarak, mevcut araştırmada eksojen olarak uygulanan SNP'in NO vericisi olarak, ekonomik öneme sahip olan mısır bitkilerinin civa toleransı üzerine etkileri araştırılarak etki mekanizması büyük ölçüde aydınlatılmaya çalışılacaktır. Civa toksisitesine karşı NO'nun rolü ile ilgili herhangi bir çalışma yoktur. Mevcut çalışma bu konuda bir ilk olma özelliğini taşımaktadır.

İnsanoğlunun kültüre aldığı en eski tarla bitkilerinden biri olan mısır (*Zea mays* L.), dünyada yaygın olarak yetiştirilen *Poaceae* (*Gramineae*) familyasından önemli bir tahıl bitkisidir (Kaya 2008). Monokotillerden, bir yıllık, dayanıklı tahıl ve kültür bitkisi olan mısırın radikuladan gelişen ana kök ve çok sayıdaki yan köklerden oluşan iyi gelişmiş, kalın ve bol saçaklı, ağsı yapıda bir kök sistemi vardır. Tahıl bitkileri içerisinde buğday ve arpadan sonra en geniş ekim alanı ve üretime sahip olan mısır 585 bin ha ekim alanı, 2.5 milyon ton üretim ve 425 kg/da ortalama tane verimi ile Türkiye tarımında önemli bir yere sahiptir ve özellikle Marmara ve Karadeniz Bölgeleri'nde yaygın olarak yetiştirilmektedir (Süzer 2004). Günümüzde çok sayıda kullanım alanı olan ve önemi giderek artan mısır, yüksek verim alınabilen bir tarla bitkisi olarak diğerlerinden farklılık göstermektedir. Mısır sahip olduğu zengin besin maddeleri nedeniyle hem insan, hem de hayvan beslenmesi bakımından çok değerli ve kullanım çeşitliliği olan bir üründür. Gerek dünyada ve gerekse Türkiye'de bitkisel kökenli proteinlerin yeterli ve ekonomik üretimi için büyük önem taşıyan mısır tanesinden elde edilen nişasta, glukoz ve mısırözü yağı ekonomide hammadde olarak kullanılmaktadır (Süzer 2004). Mısır tarımı için en uygun toprak tipi; su tutma ve besin maddesi depolama kapasitesi iyi olan, kolay islenir, iyi drenaj ve havalanma özelliği dolayısıyla milli-killi topraklardır (Süzer 2004).

Bu araştırmada, mısıır (*Zea mays* L. cv. Arifiye-2) bitkisinde civa ile oluşturulan toksisitenin iyileştirilmesinde, bitki antioksidan metabolizmasında önemli bir sinyal bileşik olan nitrik oksitin (NO) etkileri fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler yaklaşımlarla araştırılmak istenmiştir. Bu amaç için mısıır fidelerine ait kök ve yaprak örneğinde yaş-kuru ağırlık, boy uzunluğu, bağlı su içeriği, reaktif oksijen türlerinin miktarı (ROS), lipid peroksidasyon seviyesi (MDA), antioksidan enzimlerin (katalaz, peroksidaz ve süperoksid dismutaz) aktiviteleri ve izoenzim profilleri, enzimatik olmayan antioksidanların miktarı, bazı esas elementler ve içsel civa (Hg) içeriği, total protein ve prolin içeriği, fotosentetik pigment içeriği, antioksidan enzimlerden sorumlu genlerin ifade oranlarının değişimi üzerine civa ve nitrik oksitin etkileri ayrı ayrı ve birlikte değerlendirilmiştir. Civa kaynağı olarak civa klorür (HgCl_2), NO kaynağı olarakta sodyum nitroprusid (SNP) kullanılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Toksik civa çevre üzerinde zararlı etkilerinden dolayı küresel bir problem oluşturur. Bitkilerde biriken civa sadece bitkilere zarar vermez aynı zamanda besin zinciri yoluyla insan ve çevre sağlığını da tehdit eder. Aşırı civa bitkilerde pek çok biyolojik sürece zarar verir. Bu yüzden, toksik ağır metallere toksikolojik ve uyum yanıtları incelemek çok önemlidir. Pek çok ağır metal kaynaklı fitotoksitesinin iyileştirilmesi üzerine NO, SA, H₂S ve CO gibi sinyal molekülleriyle iyileştirmesi üzerine araştırmalar yapılmıştır. Çalışmamızın yürütülmesinde faydalanan kaynakların genel özetleri aşağıda sunulmuştur.

Civa stresi reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini önemli oranda teşvik ettiği belirlenmiştir (Meng *et al.* 2011). Süperoksit anyonu (O₂⁻) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) stres şartları altındaki bitkilerde aşırı miktarda üretilen iki önemli ROS türüdür (Gill and Tuteja 2010). Farklı civa konsantrasyonlarına maruz bırakılan yonca yapraklarında O₂⁻ ve H₂O₂ miktarlarının doza bağlı olarak arttığı belirlenmiştir (Zhou *et al.* 2007). O₂⁻ stres şartları altında en erken oluşan ROS türüdür. Üretimi yağ ve protein gibi büyük moleküllerin peroksidasyonuna neden olan hidroksil iyonu, aktif oksijen gibi daha aktif ROS türlerinin üretimine neden olur (Gill and Tuteja 2010). Civa teşvikli ROS üretimi lipid peroksidasyonu ve zar geçirgenliğinin bozulması olarak ifade edilen oksidatif hasar ile doğrudan bağlantılıdır (Zhou *et al.* 2007; Meng *et al.* 2011). Civa tarafından tetiklenen ROS birikimi ve oksidatif hasar hassas histokimyasal-tabanlı algılama ile bitkilerde toksisiteyi belirlemek için biyolojik markırlar olarak kullanılabilir. Hint hardalı ve yonca'y'a ek olarak pek çok başka bitki türlerinin de civa stresine yanıt olarak oksidatif hasar rapor edilmiştir (Ali *et al.* 2000; Cargnelutti *et al.* 2006; Cho and Park 2000; Israr *et al.* 2006; Ortega-Villasante *et al.* 2007; Zhou *et al.* 2007; Zhou *et al.* 2008; Shiyab *et al.* 2009; Chen *et al.* 2009; Wang *et al.* 2009). Buna rağmen civanın oksidatif stres üzerindeki etki mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır.

Genom transkripsiyon analizleri ağır metaller tarafından düzenlenen özel genlerin belirlenmesi için güçlü bir araçtır (Becher *et al.* 2004; Weber *et al.* 2004; Herbette *et al.*

2006; Van de Mortel *et al.* 2008; Gorfer *et al.* 2009; Yamaguchi *et al.* 2010; Ding *et al.* 2011). Suppression subtraktif hybridizasyon (SSH) kullanarak bezelye (*Pisum sativum*) köklerinde civa tarafından güçlü bir şekilde düzenlenen 6 gen (PsSAMT, PsI20H, PsNDA, PsAPSR, PsPOD, PsHMIP6B) belirlenmiştir (Savenstrand and Strid 2004). Bu genlerin ayrıca biyolojik savunma sisteminde salisilik asit, izoflavonoidlerin biyosentez yolu, antioksidant reaksiyonlar, sülfür metabolizması ve hücre duvarı sertliği ile de ilgili olduğu tespit edilmiştir (Chen and Yang 2012). Civa stresine maruz bırakılan *Arabidopsis thaliana* transkripsiyon profil analizinde civa teşvikli genleri kodlayan proteinler, klorofil sentezi, hücre duvar metabolizması ve sekonder metabolitlerin P450-aracılıklı biyosentezi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Heidenreich *et al.* 2001). Özellikle civa tarafından teşvik edilen bazı genler ayrıca diğer ağır metaller tarafından da teşvik edilir (Yamaguchi *et al.* 2010). Varsayılan metalothionin tip 2 proteini (SdMT2) ve oksine cevap proteini (SdARP) için kodlanan iki tam uzunluktaki cDNAs civa stresi altındaki ağır metal hiperakümülatörü *Sesbania drummondii* de tanımlanmıştır. SdARP'nın aşırı ifade olması civa stresi altındaki *Sesbania* bitkilerinin canlı kalmasına katkıda bulunabilir. SdMT2 ise civa toksisitesinin iyileştirilmesi ile ilgili olabilir (Venkatachalam *et al.* 2009). Buna ek olarak, civa toleransı ya da birikiminden sorumlu birçok gen tespit edilmiştir (Rugh *et al.* 1998; Hsieh *et al.* 2009; Ruiz *et al.* 2011; Shen *et al.* 2011; Wei *et al.* 2011). Gen ifadesinin düzenlenmesi ayrıca post-transkripsiyonel ve translasyonel seviyelerinde de elde edilebilir. Son zamanlarda, çevresel streslere cevap ve bitki büyümesi için bir grup microRNA (miRNAs) tarafından düzenlenen post-transkripsiyonel genlerin mevcudiyeti keşfedilmiştir (Jones-Rhoades *et al.* 2006; Phillips *et al.* 2007).

Nitrik oksit (NO) bitki büyüme, gelişme ve hücresel mekanizmadaki multifonksiyonel yönlerinden dolayı bitki biliminde önemli bir yer edinmiştir. NO, düşük molekül ağırlıklı, lipofilik özellikte olduğundan dolayı hücre membranlarından kolayca difüzyona uğrayabilen, renksiz ve gaz yapısında bir molekül olup başka moleküllerle kuvvetli reaksiyonlara girebilen, birkaç saniye yarı ömrü olan 'fizyolojik haberci molekül' olarak tanımlanmaktadır (Durner and Klessig 1999; Neill *et al.* 2003; Lamattina *et al.* 2003; Shi *et al.* 2007). Son zamanlarda abiyotik streslere bitki

toleransında NO'nun rolü ile ilgili pek çok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalar, NO'nun abiyotik stres altında ROS süpürücü enzimleri aktive etmede bir sinyal molekül ve antioksidan özelliğe sahip olduğu ile ilgili sonuçlar elde edilmiştir. Dışsal NO bitki kalluslarında sıcaklık stresinin neden olduğu toksik etkiyi iyileştirdiği bu etkiyi H₂O₂ ve MDA içeriklerini azaltarak ve SOD, CAT, APX ve POD aktivitelerini artırarak yaptığı ileri sürülmüştür (Song *et al.* 2006). NO'nun tuzluluk (Zhao *et al.* 2007), sıcaklık (Song *et al.* 2006), kuraklık (Garcia-Mata and Lamattina 2001) ve ağır metal (Hu *et al.* 2007; Cui *et al.* 2010; Chen *et al.* 2010) kaynaklı oksidatif stres üzerine pozitif etkisi belirlenmiştir. NO'nun tohum dormanisini kırdığı ve çimlenmeyi artırdığı ayrıca rapor edilmiştir (Beligni and Lamattina 2000; Kopyra and Gwozdz 2003). NO ayrıca ağır metallerin toksisitesinin giderilmesi ve antioksidant enzimlerin aktiviteleri artırmada önemli bir rol oynar. Dışsal olarak uygulanan NO çeltik yapraklarında bakır toksisitesini ve amonyum birikimini azaltmıştır. Aynı çalışmada NO inhibitörü olan c-PTIO dışsal olarak uygulandığında ise herhangi bir iyileştirme etkisinin görülmediği belirtilmiştir. NO tarafından bakır toksisitesi ve amonyum birikiminin azalması, onun ROS toplama yeteneğinin bir sonucu olabilir (Yu *et al.* 2005). Ağır metal stresi altındaki *Lupinus luteus* 'da O₂⁻ kaynaklı özel floresansı, NO ön uygulaması tarafından azaltıldığı ayrıca belirtilmiştir (Kopyra and Gwozdz 2003). Bu çalışma da elde edilen sonuçlara göre O₂⁻'nin toplanması ve süperoksid anyonunun azalması NO'nun antioksidan özelliğini göstermektedir. Bakır ve kadmiyum stresi altındaki soya hücre kültürlerinde NO'nun antioksidatif ve toksisiteyi giderme özelliği ayrıca bulunmuştur (Singh *et al.* 2008). Bununla birlikte NO'nun *Hibiscus moschetoos* bitkilerinin kök uzamasını inhibe eden alüminyumun toksisitesini azalttığı belirtilmiştir (Tian *et al.* 2006). Uygulanan NO; ROS süpürücü enzimlerin aktivitelerini artırdığı, birikimini azalttığı, plazma membranı ve tonoplastlarda aktive ettiği ve ayrıca domates bitkilerinde kaynaklı büyüme inhibisyonunu iyileştirdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, dışsal NO'nun domates fidelerinde bakır toksisitesine karşı fizyolojik ve biyokimyasal süreçleri düzenlediğine ve ağır metal stres altında normal büyümeyi ve temel metabolik kapasitenin devamını sağladığına işaret eder sağlar (Cui *et al.* 2010). NO ön muamelesi buğday tohumlarında çimlenme ile SOD ve CAT enzimlerinin aktivitelerini artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca lipogenaz aktivitesi ile MDA sentezini azaltarak bakır stresine ve

bunun sonucunda ortaya çıkan oksidatif strese karşı iyileştirme etkisi gösterdiği de bildirilmiştir (Hu *et al.* 2007).

H₂O₂ detoksifikasyonu ile ilişkili antioksidan enzimlerin (CAT, POD ve APX) aktivitelerin değişiminde, hücrel redoks bileşikler kontrol altına almada ve özellikle non-protein tiyol, askorbat gibi antioksidan moleküllerin miktarı ve redoks durumlarında NO'nun önemli oranda etkili olduğu belirtilmiştir (Tewari *et al.* 2008). NO ayrıca bakır uygulanmış hücrelerde prolin miktarını 1.5 kat artırdığı ve bu etkinin NO inhibitörü olan c-PTIO uygulandığında görülmediği belirtilmiştir (Zhang *et al.* 2008). Bakır ve NO Δ-prolin-5-karboksilat sentetaz (P5CS) aktivitesini teşvik ettiği belirlenmiştir. P5CS prolin biyosentezinden sorumlu enzim olup bakır uygulanmış alglerde ifadesinin arttığı bulunmuştur. Bu sonuçlar bakıra duyarlı prolin sentezinin *Chlamydomonas reinhardtii*'de NO üretimi ile açıkça ilişkili olduğunu ve ağır metal stresi altında prolin metabolizmasında NO düzenleme fonksiyonu olduğunu göstermektedir. NO bitkileri oksidatif strese karşı koruduğu ve köklerde birikiminde azalma ile kök uzaması arasında iyi bir kolerasyon sağladığı belirtilmiştir (Wang and Yang 2005). Stresi altındaki buğday bitkilerine uygulanan NO antioksidan enzimlerden SOD, CAT, APX aktivitelerini ve protein miktarını artırdığı buna karşın MDA miktarlarını azalttığı belirlenmiştir (Zhang *et al.* 2008). Ayrıca son bir çalışma NO'nun kadmiyum toksisitesini iyileştirdiğini ve bu etki atomik absorpsiyon spektrofotometresinde elde edilen sonuçlara göre yaprakların hem hücre duvarında hem de çözülebilir fraksiyonlarında kadmiyum miktarının azaltıldığını, buna rağmen çeltik kök hücre duvarlarında ise kadmiyum birikiminin açık bir şekilde arttığını gösterilmiştir (Gallego *et al.* 2012). Besin çözeltilisindeki NO'nun çeltik yapraklarında transpirasyon oranı üzerinde az bir etki yaptığı, pektin ve hemisellüloz içeriğini artırdığı ve kök hücre duvarlarında önemli oranda selüloz miktarını azalttığı rapor edilmiştir (Xiong *et al.* 2009). Literatürde civanın bitkiler üzerindeki olumsuz etkilerini gösteren pek çok çalışma mevcuttur. Ancak NO'nun toksik civa üzerindeki iyileştirme etkisi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Mevcut çalışmanın bu açıdan literatürdeki önemli bir boşluğu dolduracağını düşünülmektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik
Derin dondurucu (-30°C)	: Arçelik
Derin dondurucu (-80°C)	: Nuaire
Elektroforez	: Bio- Rad
Hassas terazi	: Shimadzu AY2206
Homojenizatör	: Wiggen Hauser D- 500
İklim dolabı	: Sanyo, Japonya ve Jeno Tech, Kore
Karıştırıcı	: Fisons Whirlmixer
Manyetik karıştırıcı	: Chiltern HS31
Masa santrifüjü	: Hettich EBA 21
Otomatik pipetler	: Ependhof, Axigen
PCR	: Qiagen-Rotor Gene
pH metre	: WTW unilab pH metre
Soğuk su banyosu	: Huber Polystat CC1
Soğutmalı santrifüj	: Hettich Micro 22 R
Spektrofotometre	: Shimadzu UVmini-1240
Western blot cihazı	: Bio-Rad Semi Dry Blotting
Western blot görüntileme cihazı	: Fusion Fx Vilber Lourmat

3.2. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışları

Çalışmada kullanılan çözeltilerin kullanıldığı yerler ve hazırlanış şekilleri aşağıda belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Sigma-Aldrich şirketlerinden temin edilmiştir.

1. Arnon ve Hogland besi çözeltisi: 1,02 gr KNO_3 , 0,492 gr $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,23 gr $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,49 gr $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,86 gr H_3BO_3 , 1,81 gr $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 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 hacmi 1 litreye tamamlanmıştır.
2. 0,1 M KH_2PO_4 (pH: 6,75) (Protein tayini için) : 3,4 g KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH kullanılarak pH 6,5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
3. BCA reaktifi (protein tayini için): 15 ml Bicionchonic asit 0,3 ml FeCl_3 ile karıştırılır.
4. 0,1 M KH_2PO_4 (pH: 6,75), %1 PVP, 1 mM EDTA (antioksidan enzimlerin homojenizasyon tamponu): 3,4 g KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüş ve 1 N NaOH kullanılarak pH: 6,75'e ayarlandıktan sonra üzerine 2,5 g PVP ve 0,073 g EDTA ilave edilmiş ve son hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
5. 103,5 mM KH_2PO_4 , pH: 7,5 (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon): 1,41 g KH_2PO_4 , 70 ml saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 7,5'e ayarlanmış ve hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.
6. 40 mM H_2O_2 çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 346 μl %35'lik H_2O_2 alınıp hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
7. 5 mM H_2O_2 çözeltisi (Katalaz aktivitesi ölçümünde standart grafik hazırlamak için kullanılan): 43 μl %35'luk H_2O_2 alınıp hacmi saf su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
8. 0,1 M Na_2HPO_4 , pH: 5,5 (Peroksidazın aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon çözeltisi): 3,55 gr Na_2HPO_4 alınarak 200 ml saf suda çözülmüş ve pH: 5,5'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.
9. Peroksidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi (5 mM guaikol + 5 mM H_2O_2): 54 μl quaikol ve 15 μl H_2O_2 'dan (d: 1,13 gr/mol) 5 mM olacak şekilde 100 ml 0,1 M fosfat tamponu (pH: 5,5) içinde çözülerek hazırlanmıştır.
10. 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7,8) (SOD için tampon çözelti): 1,7 gr KH_2PO_4 200 ml saf suda çözülmüş, pH: 7,8'e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.

11. 13 mM metionin çözeltisi (SOD reaksiyon karışımı için): 0,586 gr metionin alınır, 10. maddede hazırlanmış olan 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek hacmi 250 ml'ye tamamlanır.
12. 63 μM NBT-Nitroblue Tetrazolium Klorür (SOD reaksiyon karışımı için): 0,0128 gr NBT alınır, 10. maddede hazırlanmış olan 250 ml 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
13. 0,1 mM EDTA-Etilen Diamin Tetra Asetik asit (SOD reaksiyon karışımı için): 0,073 gr EDTA alınır, 10. maddede hazırlanmış olan 250 ml 50 mM KH_2PO_4 tamponu içerisine ilave edilerek çözülür.
14. Riboflavin çözeltisi (SOD aktivitesi için): 0,019 gr riboflavin, 500 ml saf suda çözülmüştür. 3 ml'lik reaksiyon karışımının 13 μM riboflavin içermesi için üzerine 390 μL riboflavin pipetlenmiştir.
15. %0,1'lik TCA - trikloroasetik asit (Lipid peroksidasyon için homojenizasyon çözeltisi) : 80 ml saf su içerisinde 0,1 gr TCA çözüldükten sonra son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.
16. %0,5'lik TBA-tiobarbutirik asit (Lipid peroksidasyon için reaksiyon çözeltisi): 80 ml ml saf su içinde 20 gram TCA çözülür ve daha sonra içerisine 0,5 gr TBA ilave edilmiş ve son hacim 100 ml'ye tamamlanır.
17. Akrilamid/bis) çözeltisi (%30 akrilamid, %2,7 BİS): 29,2 gr akrilamid 75 ml saf suda çözülür, çözeltiye 0,8 gr Bis katılıp çözülür. Son hacim 100 ml'ye tamamlanır.
18. Ayırma jeli tamponu (1,5 M Tris, pH: 8,8) : 18,15 gr Tris 50 ml saf suda çözülür. HCl ile pH: 8,8'e ayarlanır. Saf su ile 100 ml'ye tamamlanır.
19. Yükleme jeli tamponu (0,5 M Tris, pH: 6,8) : 3 gr tris 40 ml saf suda çözülür. HCl ile pH 6,8'e ayarlanır. Saf su ile 50 ml'ye tamamlanır.
20. %10 SDS: 1g SDS son hacim 10 ml olacak şekilde saf suda çözülür.
21. %10 Amonyum persülfat (polimerizasyon başlatıcı) : 0,05 gr amonyum persülfat son hacim 500 μl olacak şekilde saf suda çözülür.
22. Numune tamponu (0,125 M Tris, %4 SDS, %20 gliserol, %10 2-merkaptetanol, %0,2 bromfenol mavisi pH: 6,8): 2,5 ml yükleme jeli tamponu, 4 ml %10 SDS, 2 ml gliserol, 1 ml 2-merkaptetanol alınıp son hacim 10 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanır, pH: 6,8'e ayarlanır. Karışıma 0,02 gr bromfenol mavisi katılarak karıştırılır. Kullanılacak hacimlere bölünüp -20°C'de saklanır.

23. Yürütme tamponu (0,025 M Tris, 0,192 M glisin, %0,1 SDS, pH: 6,8) : 3 gr Tris, 14,4 gr Glisin, 1 gr SDS alınır, 900 ml saf suda çözülerek pH 6,8'e ayarlanır. Son hacim 1000 ml'ye saf su ile tamamlanır.
24. Boyama substrat çözeltisi (SOD izoenzimleri için) (0,24 mM NBT, 33,2 μ M riboflavin, %0,2 TEMED, 1 mM EDTA, 0,05 M KH_2PO_4 pH 7,8): 0,0098 gr NBT, 100 μ l TEMED, 0,147 gr EDTA, 0,345 gr KH_2PO_4 40 ml saf suda çözülüp pH: 7,8'e ayarlanır. 1 ml saf su içerisinde 0,0062 gr riboflavin çözülür ve 100 μ l'si boyama substrat çözeltisine katılır. Çözeltinin son hacmi 50 ml'ye saf su ile katılır.
25. 1 mM EDTA, 0,05 M KH_2PO_4 pH 7,8(SOD izoenzimleri için): 0,147 gr EDTA, 0,345 gr KH_2PO_4 40 ml saf suda çözülüp pH 7,8'e ayarlandıktan sonra son hacim 50 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanır.
26. 2 mM askorbik asit, 50 mM Na_2HPO_4 (APX izoenzimleri için): 0,0352 gr askorbik asit, 1,34 gr Na_2HPO_4 80 ml saf suda çözülür ve pH 7,0'a ayarlanır. Son hacim 100 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanır.
27. 4 mM askorbik asit, 2 mM H_2O_2 : 50 mM Na_2HPO_4 (APX izoenzimleri için): 2 mM askorbik asit çözeltisinden 50 ml alınır üzerine 0,0176 gr askorbik asit ve 10 μ l %35 H_2O_2 katılıp iyice karıştırılır.
28. 28 mM TEMED, 2,4 mM NBT, içeren 50 mM Na_2HPO_4 (pH 7,8) tamponu (APX izoenzimleri için) : 105 μ l TEMED, 0,0491 gr NBT, 0,335 gr Na_2HPO_4 20 ml saf suda çözülerek pH 7,8'e ayarlandıktan sonra son hacim 25 ml'ye saf su ile tamamlanır.
29. 0,25 mM NADPH çözeltisi hazırlamak için (GR aktivitesi için): 0,0022 gr NADPH 10 ml saf su içerisinde çözülür.
30. 1 mM oksitlenmiş glutatyon (GSSG) (GR aktivitesi için): 0,0061 gr GSSG, 10 ml saf su içerisinde çözülür.
31. 0,5 mM EDTA (GR aktivitesi için): 0,0014 gr EDTA 10 ml saf su içerisinde çözülür.
32. 50 mM Tris-HCl (GR aktivitesi için): 0,06 gr Tris bir miktar saf su içerisinde çözülür, sonra pH:7,8'e ayarlanır ve son hacim 10ml'ye tamamlanır.
33. %5'lik TCA (homojenizasyon için): 0,5 gr TCA 5 ml saf su içerisinde çözünüp hacmi 10 ml'ye tamamlanır.
34. 200 mM Na_2HPO_4 (GSH içeriği belirlemek için): 0,238 gr Na_2HPO_4 bir miktar saf su içerisinde çözülür ve pH:7,5'e ayarlanır. Son hacim 10 ml ye tamamlanır.

- 35.** 50 mM Na₂-EDTA (GSH içeriği belirlemek için): 0,186 gr Na₂-EDTA 10 ml saf su içerisinde çözülür.
- 36.** 2 mM β-NADPH (GSH içeriği belirlemek için): 0,016 gr 10 ml saf su içerisinde çözülür.
- 37.** 6 mM DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) (GSH içeriği belirlemek için): 0,023 gr saf su içerisinde çözülür.
- 38.** 60 mM KH₂PO₄ (süperoksit metodu için homojenizasyon çözeltisi): 0,081 gr KH₂PO₄ bir miktar suda çözülür. pH 7,8'e ayarlanır ve son hacim 10 ml'ye tamamlanır.
- 39.** 10 mM hidroksilamin (süperoksit içeriği için): 0,0069 gr hidroksilamin 10 ml saf su içerisinde çözülür.
- 40.** 17 mM sülfamid (süperoksit içeriği için): 0,029 gr sülfamid 10 ml saf suda çözülür.
- 41.** 7 mM naftilamin (süperoksit içeriği için): 0,01 gr naftilamin 10 ml saf su içerisinde çözülür.
- 42.** %3'lük sülfosalisilik asit (prolin metodu için homojenizasyon çözeltisi): 0,3 gr sülfosalisilik asit 10 ml saf su içerisinde çözülür.
- 43.** Asit ninhidrin çözeltisi (prolin içeriği için): 1,25 gr ninhidrin 30 ml asetik asit ve 20 ml fosforik asit içerisinde çözülür.
- 44.** 3 M Sodyum asetat çözeltisi: 40,8 gr sodyum asetat (NaOAc.3H₂O) 80 ml saf suda iyice çözünür ve pH: 5,2'ye glasiyel asetik asitle tamamlanır. Son hacim 100 ml'ye tamamlanır ve otoklavlanır.
- 45.** Ekstraksiyon Tamponu Hazırlama (50 ml için): 1 gr toz CTAB çok az suda hafif ısıtılarak çözünür, üzerine 0,5 gr Na₂S₂O₃ (sodyum bisülfid) konur ve çözünür. 5 ml Tris-HCl, 14 ml 5M NaCl, 2 ml EDTA konur. Son hacim 50 ml'ye tamamlanır. 100°C'de sıcak su banyosuna konur. Çalışma yapılacağı an 0,1 ml β-Merkaptoetanol konur.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Çimlenme deneyleri ve konsantrasyon belirleme çalışmaları

Çalışmamızda Sakarya Mısır Araştırma İstasyonu'nun tescilli çeşidi olan mısır (*Zea mays* L. cv. Arifiye-2) bitkisinin tohumları ilgili istasyon müdürlüğünden temin edilerek kullanılmıştır. Mısır bitkisine ait tohumlar, ekimden önce etanol (%96) ile kısa süreli hızlıca yıkanmış ve %5'lik sodyum hipoklorit içerisinde 5 dk yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Tohumlar, daha sonra 5 kez saf su ile yıkanarak çalışmanın birinci aşaması olan uygun civa ve SNP konsantrasyonlarının seçimi için kullanılmıştır. Çimlenme deneyleri, cam petri kaplarında 25°C'de ve %70 nem ortamı şartlarında bir etüvde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Civa uygulamaları için civa klorür ($HgCl_2$), nitrik oksit uygulamaları için sodyum nitroprussid (SNP) kullanılmıştır. Çalışılacak $HgCl_2$ konsantrasyonunu belirlemek amacıyla; 0, 1, 5, 10, 20, 40, 50, 100, 200, 500 ve 1000 μM $HgCl_2$ konsantrasyonları içerisinde tohumlar çimlendirilmiştir. Çimlenme oranları, yaş-kuru ağırlık ve bitki boy uzunluğu parametreleri değerlendirilerek ortalama %50 inhibisyona neden olan 100 μM $HgCl_2$ konsantrasyonu belirlenmiş ve çalışmanın bundan sonraki aşamalarında bu konsantrasyon kullanılmıştır. SNP konsantrasyonlarını belirlemek için ise 0, 0.1, 1, 10, 50, 100, 200 ve 500 μM hazırlanan SNP hem normal şartlardaki fidelere (kontrol) hemde civa stresinamaruz kalan fidelere uygulanmıştır. Daha sonra yaş-kuru ağırlık ve bitki boy uzunluğu parametreleri değerlendirilerek çalışmada 0.1 μM SNP'nin (NO vericisi olarak) kullanılması uygun bulunmuştur.



Şekil 3.1. Tohumların Çimlendirilme Aşaması

3.3.2. Fide Aşamasında Yapılan Çalışmalar

3.3.2.a. İçsel Civa, Makro ve Mikro Element Miktarlarının Belirlenmesi

Bitki kısımları hava sirkülasyonlu etüvde 70 °C’de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulmuşlardır. Kuruyan bitki örneklerinin ağırlıkları belirlendikten sonra tungsten kaplı bitki öğütme değirmeninde öğütülmüşlerdir. Polietilen kavanozlara konulan öğütülmüş bitki örnekleri analizde kullanılmadan önce 70 °C’de sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutma dolabında bırakılmış ve kavanozların kapakları sıkıca kapatılmıştır. Kurutulan ve öğütülen bitki örneklerinden 0.2 gr tartılmış 10 ml HNO₃+ 4 ml H₂O₂ ile yüksek sıcaklık (210 °C) ve yüksek basınç (200 PSI) altında mikrodalga cihazında (CEM Mars 5) çözündürülmüştür. Daha sonra örnekler 25 ml’lik balonjoje’ye aktarılıp soğutulmuş, deiyonize su ile derecesine tamamlanmıştır. Bu süzükler hemen ince gözenekli (Whatman No:42 veya mavibant) filtre kağıdı ile süzülerek 25 ml’lik polietilen şişelere aktarılmış ve süzükte element içerikleri ICP-AES (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer) (VarianVista, axiel) cihazı ile belirlenmiştir (Hamurcu *et al.* 2015).

3.3.2.b. Bitkilerin yetiştirilmesi ve HgCl₂ ve SNP uygulamaları

Steril edilmiş mısır tohumları, yukarıda belirlenen civa ve SNP konsantrasyonlarında (100 µM HgCl₂ ve 0.1 µM SNP) hidroponik bitki kültürü ortamında çimlendirmeye ve fide gelişimine bırakılmıştır (Şekil 3.2). Hidroponik ortamda destek ortamı olarak hidroton yani genleştirilmiş kil ve bitki büyüme ortamı olarak ¼ gücünde Hoagland besi çözeltisi kullanılmıştır. Çimlendirme ve fide gelişimi, ışık (12000 lüks ışık yoğunluğu), sıcaklık (20/25°C; gece/gündüz ve 16 s fotoperiyot) ve nem (%65) seviyesi ayarlanabilir bir bitki büyütme kabininde gerçekleştirilmiştir. Çimlenme sonrası fideler 2 yapraklı evreye geldiğinde (8. gün) Hoagland çözeltisine 0.1 µM SNP ilave edilmiştir. Bu uygulamadan 24 saat sonra, hidroponik sisteme 100 µM HgCl₂ ilave edilmiştir. Çalışmada; kontrol, tek başına civa uygulaması, tek başına SNP uygulaması ve civa+ SNP uygulama grupları oluşmuştur. Civa uygulaması yapıldıktan 3 gün sonra (3

yapraklı evre-12. gün), fidelerin kök ve gövde kısımları ayrı ayrı hasat edilerek çalışmalarımızda deney materyali olarak kullanılmıştır (Şekil 3.2). Bazı deneyler için hasat edilen taze örnekler hemen kullanılırken, diğer deneyler için ise artan örnekler sıvı azotta dondurulduktan sonra -86°C'deki bir dipfrizde muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2. Hidroponik ortamda yetiştirilen bitkiler



Şekil 3.3. Uygulama sonrası hasat işlemi

3.3.2.c. Hücre zarındaki elektrolit sızıntı oranının belirlenmesi

Tüm gruplar için 6 deney tüpünün her birine saf sudan geçirilmiş 0.1 gr taze bitki numunesi (2 cm ebatlarında yaprak ve kök) konulur. Tüplere 4 ml steril saf su ilave edilerek 4°C’de 24 saat 100 rpm hızında çalkalanır. Daha sonra tüplerin içerisindeki saf suya geçen iyon miktarı, bir elektrik kondüktivimetre ile ölçülerek elektrolit sızıntısı S/cm cinsinden belirlenmiştir (Griffith *et al.* 1992)

3.3.2.d. Lipid peroksidasyonu seviyesinin (MDA olarak) belirlenmesi

Çalışmada, 0.5 gr bitki numunesi, %5’lik TCA içinde homojenize edildikten sonra, elde edilen homojenat 10.000 x g’de 15 dakika santrifüj edilir. Tüpün süpernatant kısmından 4ml alınarak üzerine 1ml %0.5’lik TBA çözeltisi (%20 TCA içinde

hazırlanmış) ilave edilir. Reaksiyon karışımı kaynar suda 30 dakika inkübe edilir ve reaksiyon tüplerin buz banyosuna alınmasıyla durdurulmaktadır. Örnekler tekrar 10000xg'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant kısmı alınarak absorbansı 532 nm'de okunur ve daha sonra 600 nm'deki non-spesifik absorpsiyon için absorbans değeri belirlenmektedir. Lipid peroksidasyonun hesaplanması için; 532 nm'de ölçülen absorbans değerinden 600 nm'de belirlenen nonspesifik absorpsiyon değeri çıkarılır ve 1 ml çözeltideki MDA (nmol/ml): $[(A_{532}-A_{600})/155000] \times 106$ formülüyle hesaplanmaktadır. Sonuçlar MDA (nmol/gram doku) şeklinde verilmektedir (Ananieva *et al.* 2002).

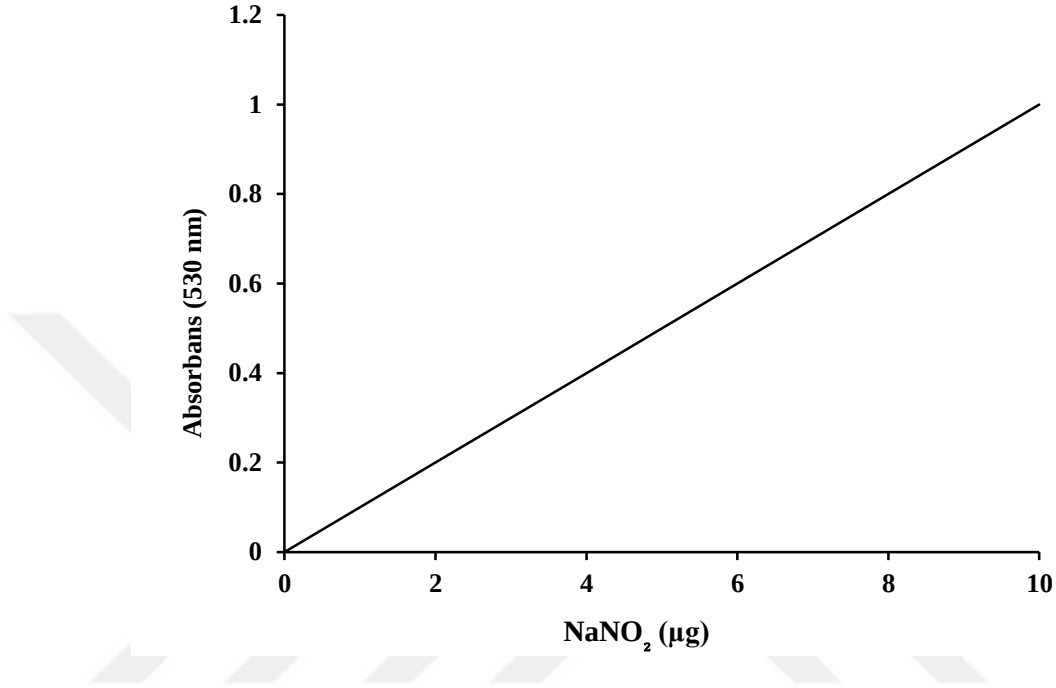
3.3.2.e. Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi

Bunun için 0.5 gr bitki numunesi alınarak 10ml soğuk aseton içinde homojenize edildikten sonra, homojenat 10.000 x g'de 10 dakika santrifüj edilir. Daha sonra elde edilen süpernatantın 1.5 ml'si 0.15ml %5'lik Ti(SO₄)₂ (titanyum disülfat) ve 0.3 ml %19'luk NH₄OH (amonyumhidroksit) ile karıştırılır. Çökelek oluştuktan sonra karışım 10.000 x g'de 10 dakika daha santrifüj edilir. Tüpün süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen pelet 3 ml 2 M'luk H₂SO₄ içinde çözülür ve 415 nm'de absorbansı ölçülerek kaydedilir. Bu ortalama absorbans değerleri, daha önceden hazırlanmış standart grafik yardımıyla nanogram cinsinden H₂O₂ miktarına dönüştürülmektedir. Sonuçlar gr doku başına düşen H₂O₂ miktarı (ng/g doku) olarak sunulmaktadır (Velikova *et al.* 2000; Wahid *et al.* 2007).

3.3.2.f. Süperoksit anyonu (O₂⁻) miktarının belirlenmesi

Bu çalışma için 0.5 gr doku 2 ml 65 mM soğuk fosfat tamponunda (pH:7.8) homojenize edilir. Homojenat 5000 x g'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatanttan 1 ml alınır üzerine 0.9 ml fosfat tamponu ve 0.1 ml 10 mM hydroxylamine hydrochloride eklenir. Çözelti karıştırılır ve 20 dakika 25°C'de inkübe edilir. Daha sonra karışımdan 1 ml alınır üzerine 1 ml 17 mM aminobenzene sulfonic acid ve 1 ml 17 mM 1-naphtylamine karıştırılır ve 20 dakika 25°C'de inkübe edilir. Karışıma 3 ml n-butyl alcohol

eklendikten sonra spektrofotometrede 530 nm’de ölçülür. Standart grafik için farklı miktardaki HNO_2 ’nin 530 nm’deki absorbans kullanılmıştır (Liu *et al.* 2007).



Şekil 3.4. Süperoksit anyon ($\text{O}_2^{\cdot-}$) miktarını belirlemede kullanılan standart grafik

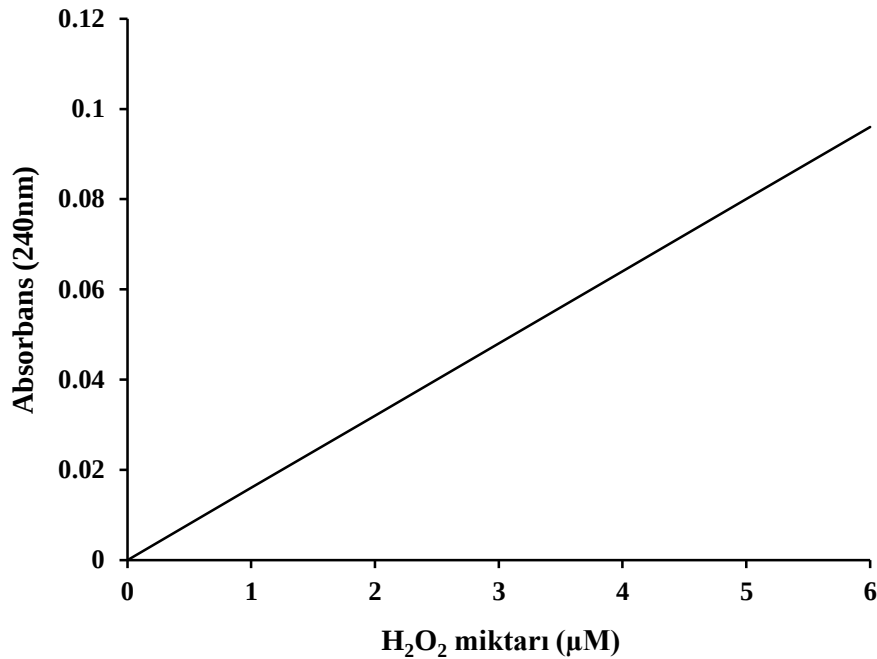
3.3.3. Antioksidan enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Ekstraksiyon için 0.5 gr doku porselen havanda sıvı azot ile iyice homojenize edildikten sonra üzerine 5ml soğuk homojenat tamponu (%1 PVP ve 1 mM EDTA ihtiva eden 0.1 M KH_2PO_4 pH: 7.0) ilave edilir ve karışım bir santrifüj tüpüne aktararak 15000 x g ve $+4^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika santrifüj edilir. Santrifüj işlemi sonucunda elde edilen süpernatant antioksidan enzimlerin aktivite ölçümleri için kaynak olarak kullanılmıştır (Angelini *et al.* 1990).

3.3.3.a. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Belirlenmesi

CAT aktivite ölçümü, ortamındaki H_2O_2 'nin O_2 ve H_2O 'ya dönüşümünde meydana gelen absorbans azalmasının 240 nm'de izlenmesi esasına dayanır. CAT aktivite tayini

aşağıda belirtildiği şekilde yapılır. Aktivite ölçümü için 3ml'lik spektrofotometre küvetine, 103 mM KH_2PO_4 tamponundan 1.475 ml ve 40 mM'luk H_2O_2 substrat çözeltisinden 1.5 ml konulduktan sonra, 25 μl enzim ekstraktı ilave edilir. Küvet spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 240 nm'de 3 dakika boyunca 1 dakika aralıklarla köre karşı absorbansı okunur. Ölçümlerde absorbansın doğrusal olarak azaldığı aralıktan dakika başına absorbans azalması hesaplanır. Ortalama absorbans değerleri, standart grafik yardımıyla μmol cinsinden H_2O_2 miktarına dönüştürülür. 25°C'de, 1 dakikada içinde, absorbansı 1 μmol azaltan enzim miktarı 1 enzim ünitesi olarak kabul edilir ve sonuçlar gr yaprak başına düşen enzim ünitesi ($\text{U.mg}^{-1}\text{protein}$) olarak sunulur (Asada 1992).



Şekil 3.5. Katalaz aktivitesi ölçümünde kullanılan standart grafik

3.3.3.b. Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Peroksidaz (POD) 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.* 1990). Aktivite ölçümü için spektrofotometre

küvetine; 0.1 M, NaH_2PO_4 (pH: 5.5) ve 5 mM guaikol içeren substrat çözeltisinden 3ml konulduktan sonra, üzerine 10 μl enzim ekstraktı ilave edilir. 470 nm’de 5 dakika boyunca absorbans artışı 1 dakika aralıklarla kaydedilir ve absorbansın doğrusal olarak arttığı kısımdaki absorbans artışı 1 dakikaya oranlanır. 25 de 1 dakikada, absorbansı 0.01 artıran enzim miktarı 1 EU olarak kabul edilir ve sonuçlar enzim ünitesi ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein) olarak sunulur.

3.3.3.c. Süperoksid Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Süperoksid Dismutaz (SOD) aktivitesi, nitro blue tetrazoliumun (NBT) süperoksit radikalleri ile mavi renkli formazona fotokimyasal indirgenmesi reaksiyonunun SOD enzimi tarafından engellenmesinin spektrofotometrik olarak belirleme esasına dayanır. Reaksiyon karışımı (3ml); 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7.8), 13 mM metiyonin, 63 μM NBT, 13 μM riboflavin ve 0.1 mM EDTA içermektedir. Aktivite ölçümü için 3ml spektrofotometre küvetine yukarıdaki riboflavin içermeyen reaksiyon karışımından 2,58ml alınmış ve üzerine 30 μl enzim ekstraktı pipetlenmiştir. Reaksiyon, tüp üzerine 13 μM lık riboflavin çözeltisinden 390 μl pipetlenip karıştırıldıktan hemen sonra, beyaz bir ışık kaynağı önüne yerleştirmek suretiyle başlatılır. Tüp, ışık kaynağının karşısında 15 dk tutulur ve reaksiyon ışık kaynağının kapatılmasıyla durdurulur. 15 dk içerisinde NBTnin renk açılma yoğunluğu 560 nm’de köre karşı okunur. Kör; aynı işlemin enzimsiz örneğinden oluşmaktadır. SOD aktivitesinin 1 ünitesi, 560 nmde gözlenen NBT indirgenmesinin %50 inhibisyonuna neden olan enzim miktarı, 1 enzim ünitesi olarak kabul edilir ve sonuçlar mg protein başına düşen enzim ünitesi ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein) olarak sunulur (Agarwal and Pandey 2004).

3.3.3.d. Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi spektrofotometrik olarak Foyer ve Halliwell (1976)’e göre belirlenmiştir. Substrat olarak 0,25 mM NADPH ve 1 mM oksitlenmiş glutasyon (GSSG) kullanılır. Oksitlenmiş glutasyonun enzim tarafından indirgenmesi için indirgeyici ajan olarak NADPH kullanılır. Aktivite tayini için, 200 μl 0,5 mM

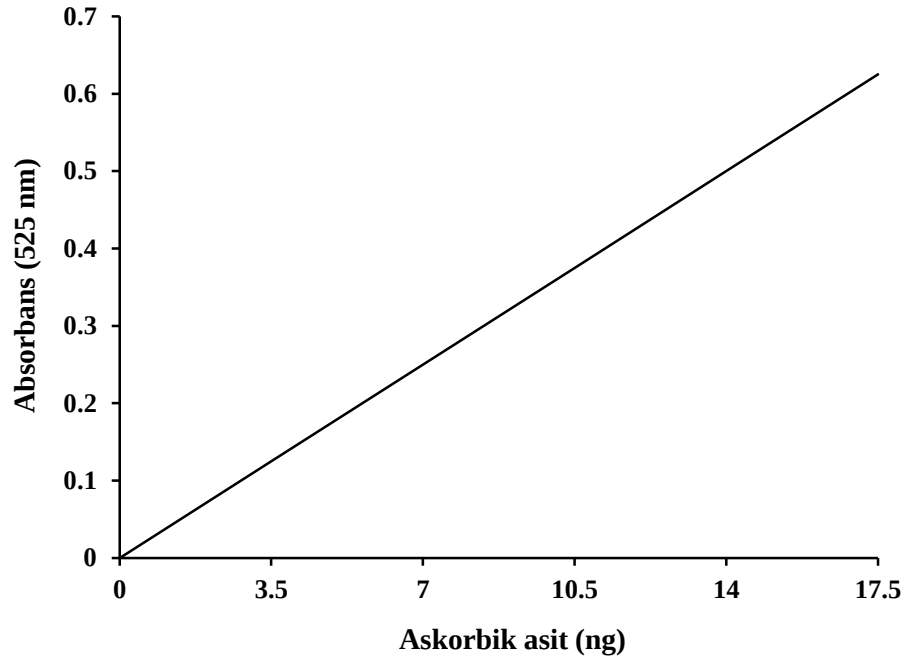
EDTA, 250 µl XX mM GSSG ve 500 µl XX mM NADPH ihtiva eden 2,95 µl 50 mM Tris-HCl (pH 7,8) tamponuna 50 µl enzim ekstraktı ilave edilir. NADPH'nin oksidasyonu 340 nmde 5 dakika boyunca aktivitedeki azalmanın ölçülmesiyle belirlenir.

3.3.4. Askorbat ve glutatyon tayini için ekstraksiyon yöntemi

Örneklerdeki askorbat ve glutatyon tayini için ekstraksiyon işlemi, Noctor ve Foyer (1998)'e göre yapılmıştır. Bu yöntemde bitki dokularına ait 100 mg örnek sıvı azotta iyice ezilir ve işleme 5 ml ekstraksiyon tamponu ile örnek tamamıyla homojenize olana kadar devam edilir. Örnekler, 1 ml 0.2 N HCl bulunan eppendorf tüpleri içerisine alınarak iyice vortekslenir. Homojenat +4 °C'de 16000xg devirde 10 dk santrifüjlenir. Supernatantın 0.5 ml'si 50 µl 0.2 M NaH₂PO₄ (pH 5.6) ve 0.46 ml 0.2 M NaOH ile nötralize edilir. Elde edilen homojenat askorbat ve glutatyon tayini için kaynak olarak kullanılır.

3.3.4.a Askorbat (Askorbik asit) Tayini

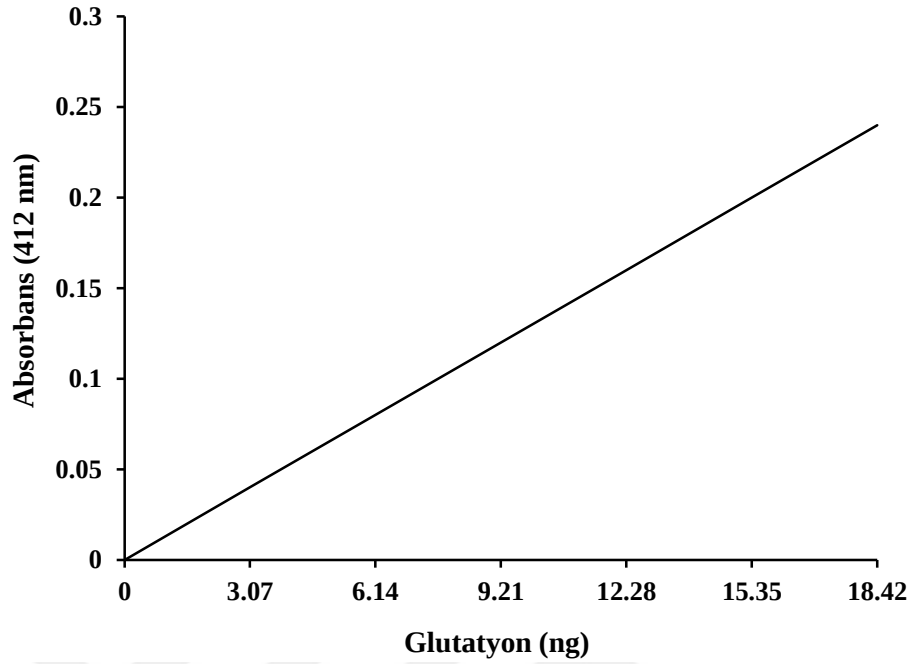
Askorbat ölçümü için 1.5 ml ependorf tüpünün içerisine 200 µl 0.2 M NaH₂PO₄ (pH 5.6), 150 µl saf su ve 40 µl nötralize süpernatant ilave edilip tüp iyice karıştırılır. Buradan 195 µl reaksiyon karışımı alınır ve üzerine 5 µl askorbat oksidaz (40 U/ml) ilave edilir. Solüsyon karıştırılır ve 265 nm deki absorbans değeri 5dk boyunca ölçülür. Aynı yolla ticari olarak sağlanan askorbattan hazırlanan standart grafik kullanılarak askorbat miktarı belirlenir (Noctor and Foyer 1998).



Şekil 3.6. Askorbik asit içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik.

3.3.4.b. Glutasyon (GSH) Tayini

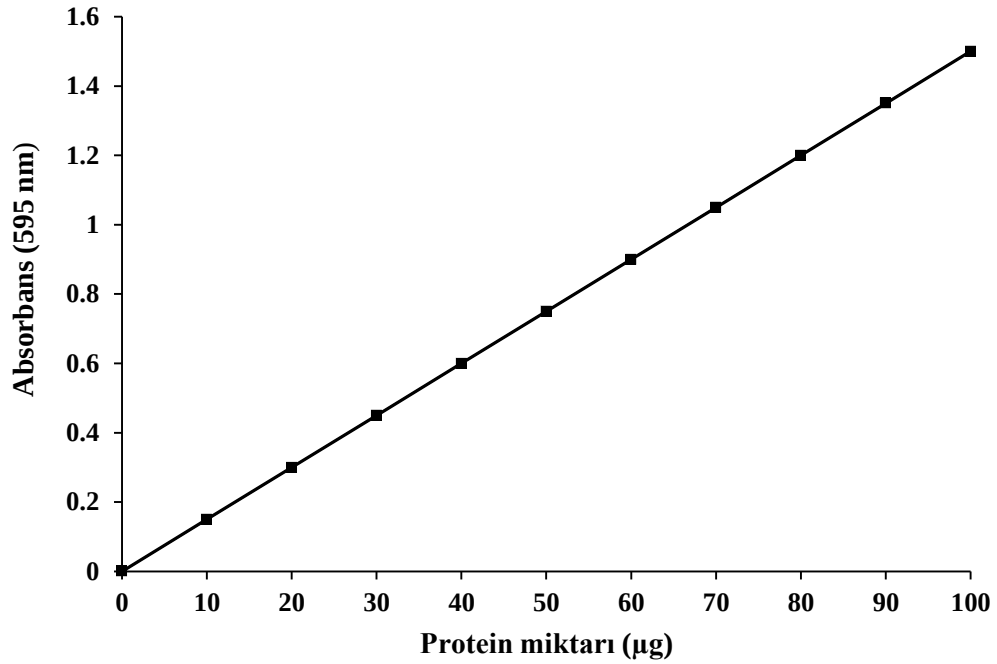
Bu metotta örneklerdeki glutasyon tayini 5-5'-dithiobis (2-nitro-benzoik asit) (DTNB)'nin glutasyon redüktaza bağlı indirgenmesinin 412 nm'de izlenmesi esasına dayanır. Total glutasyon miktarını belirlemek için içerisinde toplam 1 ml hacimde 120 mM NaH_2PO_4 (pH 7.8), 0.6 mM DTNB, 6 mM EDTA ve 0.1 mM NADPH bulunan spektrofotometre küvetine 20 μl nötralize edilmiş süpernatant ve son olarak da 5 μl (0.6 U) glutasyon redüktaz enzimi ilave edilerek başlatılan reaksiyondaki değişim 5 dk boyunca takip edilir. Ticari olarak sağlanan indirgenmiş glutasyon (GSH) ile hazırlanan standart grafikten yola çıkılarak örnekteki toplam glutasyon miktarı hesaplanır. Örneklerdeki, yükseltgenmiş glutasyon, glutasyon disülfid (GSSG), miktarını belirlemek için ise 0.2 ml nötralize süpernatant 1 μl 2-Vinylpyridine (VPD) ile oda şartlarında 30 dk inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında artık VPD'yi ortamdan uzaklaştırmak için örnekler iki kez santrifüjlenir ve 20 μl süpernatant alınarak yukarıda ifade edilen deneysel aşamalar tekrarlanır. Hazırlanmış olan standart GSSG grafiğinden faydalanılarak örneklerdeki yükseltgenmiş glutasyon miktarları belirlenir (Noctor ve Foyer 1998).



Şekil 3.7. Glutatyon içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.5. Protein miktarının belirlenmesi

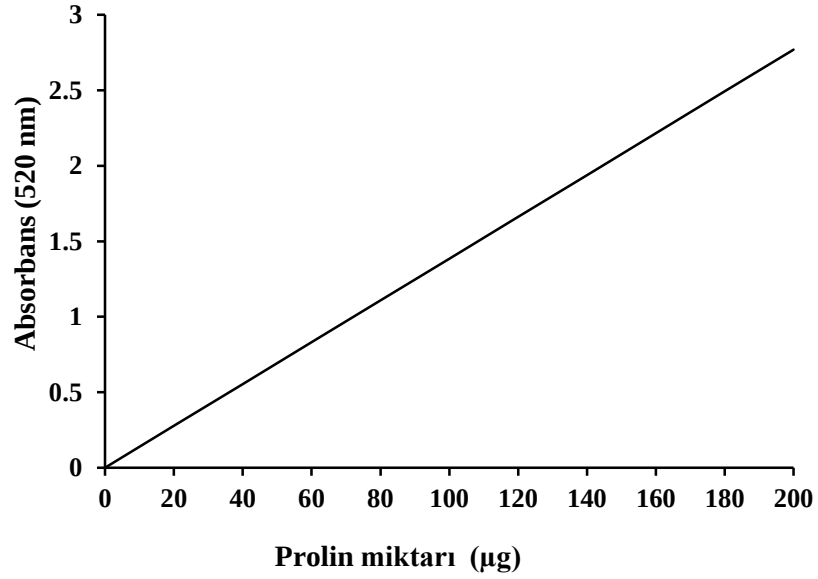
Protein miktarının belirlenmesi Bradford (1976) yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Renk reaksiyonu için Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 ile hazırlanan boya reaktif çözeltisi kullanılır. Tayin işleminde 5 ml boya reaktifi (CBB) ile 0.1 ml supernatant karıştırılır. Blank (kör) için ise 5 ml boya reaktifi ve 0.1 ml saf su kullanılır. Hazırlanan örnekler karanlıkta 10 dakika bekletildikten sonra 595 nm spektrofotometrik ölçümleri yapılır. Protein miktarlarının belirlenmesinde kullanılan standart grafik, bovin serum albuminin (BSA) farklı konsantrasyonları aynı işlemde geçirildikten sonra 595 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerleri ölçülerek hazırlanır. Total çözülebilir protein miktarları μg protein/gr dokucinsinden sunulur.



Şekil 3.8. Protein tayini için kullanılan standart grafik

3.3.6. Prolin miktarının belirlenmesi

Bitki dokularında prolin amino asiti miktarının belirlenmesi Bates vd. (1973)'a göre yapılır. Prolin analizleri için 0.5 gr bitki materyali üzerine 10 ml %3'lük sülfosalisilik asit ilave edilerek iyice homojenize edilir. Homojenat mavi bant filtre kağıdıyla (391,80 g.m⁻²) filtre edilir. Elde edilen süzüntüden 2 ml filtrat alınır, üzerine 2 ml asit ninhidrin ve 2 ml glasiyal asetik asit ilave edilerek 100°C'de 1 saat inkübe edilir. Daha sonra, tüpler, buz banyosunda soğuyuncaya kadar tutulur. Bunu takiben reaksiyon karışımı üzerine 4 ml tolüenle ilave edilir ve tüpler iyice karıştırılır. Sulu fazdan ayrılan tolüen fazı aspire edilmiş ve absorbans değerleri bir UV spektrofotometrede 520 nm dalga boyunda köre karşı okunmuştur. Köre olarak tolüen kullanılmıştır. Aynı işlemlerle saf prolinden hazırlanan standart grafik kullanılarak örneklerdeki prolin miktarları hesaplanır.



Şekil 3.9. Prolin içeriğini belirlemede kullanılan standart grafik

3.3.7. Klorofil miktarı tayini

Bitki yaprakları (0.1 g) sıvı azotta iyice homojenize edildikten sonra homojenat üzerine 10 ml soğuk aseton (%80 v/v) ilave edilir. Örnekler daha sonra 12000xg'de 15 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrası örneklerin aseton seviyesindeki eksilmeler tamamlanarak son hacim 10 ml'ye tamamlanır. Elde edilen pigment ekstraktlarının 645 ve 663 nm'lerdeki absorbans değerleri spektrofotometrede köre karşı okunur. Köre olarak aseton kullanılmıştır. Belirlenen absorbans değerleri aşağıdaki formüllerde yerine konarak klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil değerleri belirlenir (Lichtenthaller, 1987). Bütün işlemler loş ışık altında gerçekleştirilir.

$$\text{mg/klorofil a/g doku} = ((12,7 * (D663) - 2,69 * (D645)) * (V/1000 * W))$$

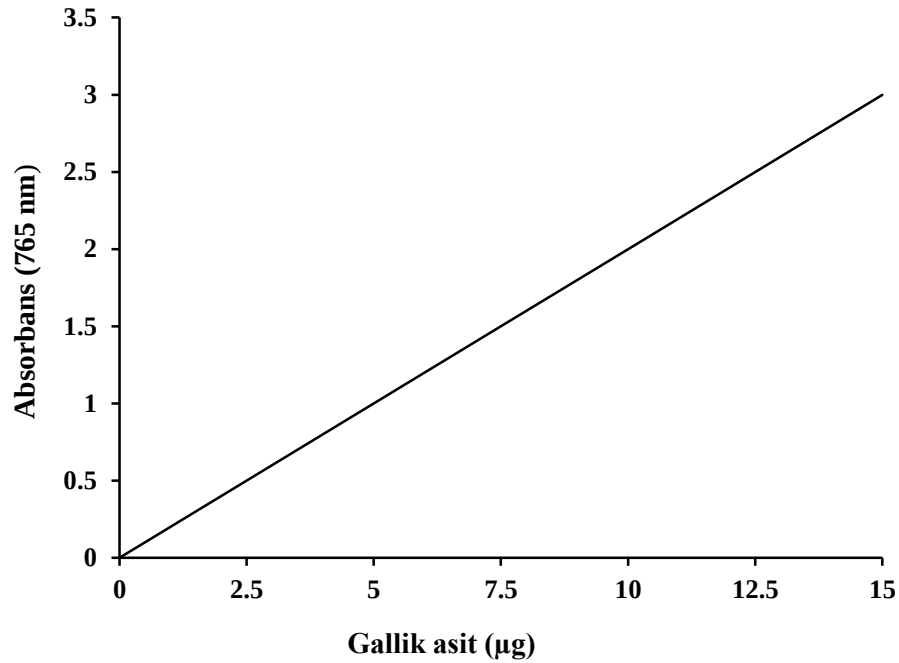
$$\text{mg klorofil b/g doku} = ((22,9 * (D645) - 4,68 * (D663)) * (V/1000 * W))$$

$$\text{mg toplam klorofil/g doku} = ((20,2 * (D645) + 8,02 * (D663)) * (V/1000 * W))$$

$$\text{mg toplam karotenoid / g doku} = (4,07 * D450) - (0,0435 * \text{kl a miktarı} + 0,367 * \text{kl b miktarı})$$

3.3.8. Fenolik madde içeriğinin belirlenmesi

Fenolik madde içeriğinin belirlenmesi için Dewanto vd. (2002) tarafından önerilen prosedür kullanılmıştır. Bu yöntemde bitki yapraklarından alınan 0.5 gr örnek 5 ml 0.1 M'lık fosfat tamponunda homojenize edilir. Homojenatlar 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilir. Daha sonra süpernatant 25 µl alınarak üzerine 125 µl Folin-Coicalteu Reaktifi ilave edildi. Son olarak üzerine 250 µl %20'lik Na_2CO_3 ilave edilerek vortekslenir. Karışımlar 25°C'de 30 dk inkübe edildikten sonra absorbansları 765 nm'de köre karşı belirlenmiştir. Kör olarak 25 µl saf su kullanılarak aynı işlemlerin yapıldığı örnek kullanılmıştır. Fenolik madde içeriği gallik asitin farklı konsantrasyonlarının kullanıldığı standart grafikten yararlanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.10. Fenolik madde içeriğinin belirlenmesinde kullanılan standart grafik

3.3.9. SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE)

Western blot analizi için proteinler %4–10 kesikli sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) Laemmli (1970) yöntemi ile yürütüldü. Bunun için

elektroforez plakaları önce su, sonra alkol ile iyice yıkandı. Daha sonra, iki cam plaka birbirini üstüne konuldu ve kışkaçlarla tutturularak jel hazırlama cihazına konuldu. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektörle aktarıldı. Bu işlemler yapılırken jelde hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için izopropil alkol ile ince bir tabaka oluşturuldu. Jel polimerleşinceye kadar yaklaşık yarım saat beklendi. Polimerizasyon bittikten sonra üzerindeki izopropil alkol döküldü. Daha sonra yığılma jeli üst yüzeye kadar ilave edildi. Yaklaşık 45 dakika sonra tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Oluşan boşluklar işaretlenerek jelin üstü önce saf su, sonra da yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroforez tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu. Numuneler her birinde 20 µg protein olacak şekilde hazırlandı. Numune üzerine toplam hacim 100 µl olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu ilave edildi. Örnekler, 5 dk kaynar su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutulularak, jel kuyularına bir enjektör yardımıyla yüklendi. Yürütme işlemi önce 80 voltluk akımda daha sonra 120 voltta 2-4 saat +4°C’de gerçekleştirildi.

Yığılma jeli, 1 M’lık Tris-HCl (pH: 6,8)’den 380 µl, %30’luk akrilamid-%0,8’lik bisakrilamid’den 400 µl, %10’luk SDS’den 30 µl, %5’lik TEMED’den 3 µl, ve saf sudan 2,2 ml karıştırılarak hazırlandı. Son olarak yine taze hazırlanmış %10’luk amonyum persülfat (NH₄)₂S₂O₈ (PER)’den 30 µl ilave edildi.

Ayırma jeli, 2,03 ml 1M Tris-HCl (pH: 8,8), 2,67 ml %30’luk akrilamid, %0,8’lik bisakrilamid, 80 µl %10 SDS, 3,2 µl %5’lik TEMED (N,N,N’,N’-tetrametil etilen diamin) ve 3,15 ml su karıştırılarak hazırlandı. Bu karışımın üzerine en son olarak 80 µl %10’luk PER ilave edildi. Burada kullanılan PER kullanılmadan hemen önce taze olarak hazırlandı.

3.3.10. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile izoenzimlerin belirlenmesi

Poliakrilamid jeller (PAGE jelleri) aynı şekilde fakat SDS’siz olarak hazırlandı. İzoenzimler belirlenirken antioksidan enzim aktiviteleri için kullanılan enzim ekstraktlarına %20 gliserol eklendi ve içerisinde 50-300 µg protein olacak şekilde

hazırlanıp kuyucuklara yüklendi. Çalışmalarda %4 yığma jeli kullanılırken, çalışılan enzime göre %8, 10 ve 11'lik ayırma jeli kullanıldı. Yürütme tamponu (18,76 gr glisin ve 3,02 gr Tris, pH: 8,3) kullanılarak +4°C'de, 80-120 Voltta 3-4 saat yürütüldü. Yürütme tamponuna askorbat peroksidaz için 2 mM askorbik asit ilave edildi.

3.3.11. Antioksidan Enzimlerin İzoenzim Profillerinin Belirlenmesi

Bitkinin kök ve yapraklarından elde edilen taze örnekler (0.5 gr) önce sıvı azotta ve sonra +4°C'de 9 mM Tris HCl (pH 6.8) tamponunda homejenize edildikten sonra üzerine %13.6 gliserol ilave edilir. Homojenat 15 dakika 15 000 rpm'de santrifül edilir. Elde edilecek süpernatant kısımdan protein miktarı belirlenir (Bradford 1976). Eşit miktarda protein (40 µg) içeren örnekler doğal poliakrilamid jel elektroforezi (Native-PAGE) kullanarak hazırlanan jeller üzerindeki kuyucuklara yüklenir. Elektroforetik SOD ayırımını yapmak için +4°C'de 120 mA şartlarında %4 yığma ve %12 ayırma jeli kullanıldı. SOD izoenzimleri NBT ve riboflavin ile boyanarak fotokimyasal olarak belirlenir. POX izoenzimlerini belirlemek için 10%'luk jelde doğal PAGE'de 40 µg protein içeren örnekler yürütülür. Bant yoğunluklarını görüntülemek için yürütme işlemi biten jeller 1.3 mM benzidin ve %3 H₂O₂ içeren 200 mM Na-acetat tamponunda (pH 5.0) 30 dakika boyunca 30°C karanlık ortamda bekletilir. APX izoenzim ayırımını yapmak için Mittler and Zilinskas (1993) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Buna göre +4°C'de 120 mA şartlarında 10%'luk jelde 40 µg protein içeren örnekler yürütülür. Yürütme işlemi bittikten sonra jel 30 dakika boyunca 2 mM askorbat içeren 50 mM Na-fosfat tamponunda (pH 7.0) inkübe edilir. Daha sonra aynı jel 20 dakika boyunca 4 mM askorbat ve 2 mM H₂O₂ içeren 50 mM Na-acetat tamponunda (pH 7.0) inkübe edilir. İnkübasyon sonrası Jel 1 dakika aynı tamponda yıkandıktan sonra 28 mM N,N,N,N-tetramethyl ethylenediamine (TEMED) ve 2.45 mM NBT içeren 50 mM Na-fosfat tamponuna (pH 7.8) alınır ve 10-20 dakika boyunca ışıklı ortamda hafif çalkalanır. CAT izoenzimlerinin ayırımını yapmak için %0.5 çözünür nişasta içeren 7.5'lik jelde 40 µg protein içeren örnekler yürütülür. Yürütme işlemi bittikten hemen sonra, jel oda sıcaklığında 30 dakika boyunca 18 mM sodyum tiosülfat ve 679 mM H₂O₂ içeren çözeltide inkübe edilir. İnkübasyon sonrası jel saf su ile yıkandıktan sonra 90 mM

potasyum iyod çözeltisine daldırılır ve %0.5 glasiyal asetik asit ile asitleştirilme yapılır. CAT enziminin negatif bantları jelin mavi zemininde görüntülenir (Laemmli 1970; Towbin *et al.* 1979).

3.3.12. Moleküler biyolojik testler

3.3.12.a. RNA izolasyonu

RNA İzolasyonu için Qiagen (Hilden) RNeasy Plant Mini kitleri kullanılmıştır.

Uygulama aşağıdaki gibi yapıldı:

- 1) 100 mg doku havanda iyice homojenize edildi. Homojenat üzerine 350 µl RTL tampon eklenerek 2 ml'lik ependorf tüpe alınıp 56°C'de 1 saat thermal ısıtıcı blokta parçalandı.
- 2) Son hacim 600 µl olacak şekilde %70'lik etanol eklendi ve pipetaj yapıldı.
- 3) Bundan 700 µl'lik hacim alınıp RNeasy plant mini kit lila spin kolonlarına yüklendi ve kapaklar kapatıldı (2ml'lik toplama tüpleri kolon altına geçirilir). 15 saniye 8000xg (10.000 rpm)'de santrifüj yapıldı.
- 4) Altta oluşan süzüntüden kullanılmak üzere 700 µl'lik hacim alınıp RNeasy plant mini kit pembe spin kolonlarına yüklendi ve kapaklar kapatıldı (2ml'lik toplama tüpleri kolon altına geçirilir). 15 saniye 8000xg (10.000 rpm)'de santrifüj yapıldı. Altta oluşan süzüntü atıldı.
- 5) Dha sonra 700 µl tampon RW1 pembe spin kolonun üzerine eklendi. 15 saniye 8000xg(10.000 rpm)'de santrifüj yapıldı. Altta oluşan süzüntü atıldı.
- 6) 500 µl Buffer RPE pembe spin kolonun üzerine eklendi. 15 saniye 8000xg (10.000 rpm)'de santrifüj yapıldı. Altta oluşan süzüntü atıldı.
- 7) 500 µl Buffer RPE pembe spin kolonlarına yüklendi. 2 dakika 8000xg (10.000 rpm)'de santrifüj yapıldı. Toplama tüpleri atıldı.
- 8) Opsiyonel olarak RPE tamponun iyice uzaklaştırılması için toplama tüpleri değiştirilip 1 dakika son hızda santrifuj yapıldı. Toplama tüpleri atıldı.

9) 1,5 ml’lik tüpler içine kolonlar yerleştirildi. Üzerine 30 µl RNase Free Water eklendi. 1 dakika 8000xg’de santrüfuj yapılarak RNA elüsyonları elde edildi.

İzole edilen RNA örneklerinden miktar tayini ve saflık derecesinin belirlenmesi amacıyla spektrofotometre kullanıldı ve 260 nm ve 280 nm’de ölçüm gerçekleştirildi. Ölçüm sonrasında her bir örnekteki toplam RNA miktarı ve Absorbans (260/280) oranından yararlanarak RNA saflık derecesi belirlendi.

3.3.12.b. cDNA eldesi

cDNA eldesi aşamasının tamamı buz üzerinde yapılmış olup Qiagen (Hilden) RT2 First Strand cDNA sentez kiti kullanıldı.

Uygulama aşağıdaki gibi yapıldı :

- a. 1µl RNA’da 100 nanogram konsantrasyon olacak şekilde ayarlama yapıldı. Toplam hacim 10µl’ye tamamlandı.
- b. 2 µl Buffer GE eklendi. Böylece toplam hacim 12µl oldu.
- c. 42°C’de 5 dakika ısısal döngü cihazında inkübe edildi.

- Sürenin bitiminde çıkarılan tüpler üzerine: 5X Reaction tampondan 4 µl, Primer 1 µ, Reverse Transcriptase Mix 2 µ eklenip, toplam hacim 20 µlye tamamlandı.
- 15 dakika 42°C’de, ardından 5 dakika 95°C’de reverse transkriptazı inaktive etmek için Thermal Cycler cihazında inkübasyon yapıldı.

3.3.12.c. Gerçek zamanlı PCR analizi (Real-Time PCR)

Çalışmamız Tagman problemlerine dayalı bir çalışma olup, Qiagen (Hilden) RT2 SyberGreen Master Mix kullanılmıştır. Toplam 5 hedef gen (FSD1, SOD4, CAT-1, SOD9, APX) 1(ACTB) referans gen olmak üzere 6 gen üzerinden gerçekleştirildi ve Qiagen (Hilden) Rotorgene Q cihazı ile uygulama yapıldı.

Mix Protokolü:

- 12.5 µL SyberGreen Master Mix
- 1 µL Forward ve Reverse Primer
- 6.5 µL H₂O eklenip toplam hacim 20 µL'ye ayarlandı.
- Son olarak 5 µL cDNA eklendi. Böylece reaksiyon hacmi 25 µL olmuş oldu.

Uygulama:

- 10 dakika 95°C'de Hold
- 15 saniye 94°C
- 30 saniye 60°C'de Annealing, 40 tekrar.

Real-Time PCR sonrasında elde edilen Ct değerleri (threshold cycle) için Excel tablosu yapıldı. Bu Excel tablosun yüklendiği Qiagen (Hilden) GeneGlobe Veri Analizi Merkezinde, kontrol ve kat değişim ölçütü olarak ACTB(Beta Aktin) referans geni kullanıldı ve ham veri normalizasyonu ile $\Delta\Delta CT$ yöntemine dayalı gerçek zamanlı PCR verileri analiz edildi.

3.4. İstatistiksel Analiz

Çalışma içerisinde sunulan veriler, her bir uygulamadan üç bağımsız örnek (3 paralel) ve her bir örnekten 3 tekrür yapıldıktan sonra elde edilen 9 değerın ortalamasıdır.

Sonuçların karşılaştırılmasında, SPSS 17.0 paket programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. İstatistik anlamlar, 0.05 hata seviyesinde ($P<0.05$) Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi kullanılarak belirlenmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Çalışılan Civa ($HgCl_2$) ve Nitrik oksit (NO) Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Çalışmanın bu aşamasındaki amacımız, çimlenme, büyüme ve gelişmesi aşamalarında test edilecek uygun civa konsantrasyonunu belirlemektir. Petri kaplarına ekimi yapılan tohumların çimlenmeleri günlük olarak takip edilmiş ve 5. günün sonunda toplam çimlenme yüzdeleri, kök ve gövde uzunlukları hesaplanmıştır. Tüm bu işlemler sonucunda Çizelge 4.1 ve 4.2'deki sonuçlara bakıldığında civanın tüm konsantrasyonları kontrole göre hem çimlenme hem de kök-gövde uzunluklarında inhibisyonlara neden olduğu anlaşılmaktadır. Hem çimlenme hem de fide büyüme çalışmasından elde edilen sonuçlara göre, çalışılan mısır bitkisi (*Zea mays* cv. Arifiye-2) çimlenme ve fide büyümesi aşamasında 500 μM civa seviyesine kadar toksisiteyi kısmen de olsa tolere edebilmektedir. Ancak bu konsantrasyonun üzerindeki civa derişimlerini hiçbir şekilde tolere edememekte ve çimlenme tamamıyla inhibe olmaktadır. Tez içeriğinde çok sayıda parametrenin değerlendirileceğinden dolayı, çalışmaların bir civa konsantrasyonu üzerinden devam etmesinin daha uygun olacağı kararlaştırılmıştır. Bu nedenle, çimlenme ve fide büyümesi ön denemelerine göre, civanın 100 μM konsantrasyonu tercih edilmiş ve bundan sonraki tüm çalışmalar bu konsantrasyon üzerinden yürütülmüştür (Çizelge 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5.)

4.1.1. İçsel civa miktarı

İçsel civa miktarı uygulama gruplarına göre farklılık göstermiştir. Kök kısmında tek başına civa uygulaması çok önemli oranlarda artmış içsel civa oranı 100 μM $HgCl_2$ uygulaması ile kökler de 7997,17 ppb gibi çok yüksek bir orana çıkmıştır (Çizelge 1). Tek başına civa uygulamasına göre civa + SNP uygulaması köklerde civa miktarını %14 artırarak 9124,67 ppb seviyesine çıkarmıştır (Çizelge 1). Yapraklarda içsel civa miktarı çok önemli oranlarda düşmüştür (Çizelge 1). Yapraklarda tek başına civa

uygulamasına göre SNP+civa uygulamasında %33 „lük oranda daha fazla civa belirlenmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 4.1. Civa toksisitesi altındaki mısır bitkisi köklerinde içsel civa miktarı üzerine nitrik oksit’in etkisi (ppb)

Gruplar	Kök	Yaprak
Kontrol	0,0c	0,0c
SNP	0,0c	0,0c
Civa	7997,17± 156,3 b	34,65 ± 6,3 b
SNP+Civa	9125,67 ± 120,3 a	46,3532,3 ± 5,3 a

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır

4.1.2. Mısır bitkisine ait kök, gövde, yaş ağırlık ve nispi su içeriği verileri

Çizelge 4.2. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarında yaş-kuru ağırlık, bitki uzunluğu ve bağıl su içeriğine ait bulgular

Gruplar	Yaş ağırlık (gr)	Kuru Ağırlık (gr)	Uzunluk (cm)	Bağıl Su içeriği (%)
Kontrol	0,84 ± 0,37b	0,04 ± 0,002b	27,94 ± 0,6a	94,4 ± 0,001b
SNP	1,02 ± 0,046a	0,05 ± 0,001a	27,19± 0,81a	95,23 ± 0,003a
Civa	0,67 ± 0,036c	0,02 ± 0,007d	23,07 ± 0,15c	94,8 ± 0,005b
SNP+Civa	0,45 ± 0,049d	0,03 ± 0,004c	24,41 ± 0,33b	94,67 ± 0,006b

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.

Kontrole göre tek başına civa uygulaması bitki yapraklarında yaş ağırlık, kuru ağırlık ve boyca uzama oranlarında sırasıyla %36, %20 ve %18.8 gibi önemli oranlarda ($P < 0.05$) azalmaya neden olmuştur (Çizelge 4.1). Civa uygulamasına göre civa + SNP uygulamasında ise yaş ağırlık, kuru ağırlık ve boyca uzama oranlarında %24, %20, %6 ve önemli artışlara neden olmuştur (Çizelge 4.1). Yaprakta bağıl su içeriğinde herhangi bir farklılık oluşmamıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.3. Farklı civa konsantrasyonlarının mısır tohumlarının çimlenme oranları üzerine etkileri

Gruplar	Çimlenme oranları(%)
0 (Kontrol)	78,4 ± 1,3a*
1 µM HgCl ₂	64,5 ± 1,6d
5 µM HgCl ₂	72,5 ± 1,1b
10 µM HgCl ₂	62,5 ± 2,1d
20 µM HgCl ₂	62,5 ± 1,9d
40 µM HgCl ₂	70,3 ± 2,3c
50 µM HgCl ₂	69,4 ± 2,3c
100 µM HgCl ₂	64,1 ± 1,3d
200 µM HgCl ₂	61,3 ± 1,4d
500 µM HgCl ₂	27,5 ± 1,2e
1000 µM HgCl ₂	0,0 ± 0,0f

Çizelge 4.4. Farklı civa konsantrasyonlarının mısır tohumlarının kök-gövde uzunlukları (cm) üzerine etkileri

Uygulamalar	Kök	Gövde
0 (Kontrol)	14,74 ±1,0a	6,88 ±0,1a
1 µM HgCl ₂	12,01 ±1,3b	6,47 ±0,2a
5 µM HgCl ₂	12,7 ±1,2b	6,34 ±0,2a
10 µM HgCl ₂	12,06 ±1,1b	5,23 ±0,4b
20 µM HgCl ₂	12,06 ±1,1b	5,45 ±0,3b
40 µM HgCl ₂	12,56 ±1,2b	5,77 ±0,1b
50 µM HgCl ₂	11,74 ±1,3b	5,33 ±0,2b
100 µM HgCl ₂	10,52 ±0,5c	4,51 ±0,1c
200 µM HgCl ₂	8,89 ±0,2d	4,59 ±0,3c
500 µM HgCl ₂	2,67 ±1,1e	2,71 ±0,1d
1000 µM HgCl ₂	0 ±0,0f	0 ±0,0e

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır

4.1.3. Mısır bitkisine ait element içeriği bulguları

Hidroponik ortamda yetiştirilen bitkilerde civa ve nitrik oksitin mineral alınımları ve taşınımı üzerine etkisini incelemek için dokuz tane esas element içeriği incelenmiştir. Mısır bitkisinin köklerinde kontrolle kıyaslandığında tek başına civa uygulaması Mn, Ni, Zn, Na, K, Mg ve Ca içeriklerini sırasıyla %72, %20, %40, %29, %67, %58.7 ve %53.3 gibi önemli oranlarda azaltmış, Cu miktarını etkilememiş, ancak Fe oranını %297 gibi çok önemli ($P < 0.05$) bir oranda artırmıştır (Çizelge 4.16). Tek başına civa uygulamasına göre civa + SNP uygulaması da Cu, Mn, Ni, Zn, K, Mg ve Ca oranlarını %40.7, %55.2, %64, %6, %33, %39, ve %38.6 oranlarında azaltırken, Na oranını ise %10 oranında ise artırmıştır (Çizelge 4.16). Kontrole göre tek başına SNP ise Cu, Mn, K ve Ca oranı artırmış, Ni, Zn, Na, ve Fe oranlarını azaltmış ve Mg oranını ise etkilememiştir (Çizelge 4.4 ve 4.5).

Çizelge 4.5. Mısır bitkisinin köklerinde esas elementlerin içeriğine ait bulgular

	Ppb					ppm			
	Cu	Mn	Ni	Zn	Na	K	Mg	Ca	Fe
K	11247,2 ±32,1 b	33400 ±53,4 b	16468,2± 49,2 a	9457 ±52,1 a	29680,5± 63,8 a	22330,4± 96,6 b	961,8 ±2,1 a	849,8 ±2,9 b	70,7 ±1,1 c
SNP	14205,6 ±43,4 a	43474,7± 62,1 a	11283,6± 37,1 c	8711,3±3 2,5 b	27231,6± 78,1 b	24630,1± 88,9 a	936,5 ±6,1 a	934,4 ±3,3 a	43,8 ±0,9 d
C	11201,1 ±26,4 b	9220,9 ±81,2 c	13053 ±62,6 b	5668,8±4 8,7 c	21049,1± 44,5 d	7229,3 ±75,1 c	414,2 ±2,4 b	396,7 ±4,1 c	288,7 ±9,7 a
SNP	6633,2 ±12,1 c	4123,2±2 2,6 d	4703,6±3 5,4 d	5342,2±2 6,4 d	23109,6± 32,8 c	4842,7 ±65,9 d	252,1 ±3,8 c	243,2 ±5,8 d	58,8 ±7,5 b

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.

Mısır bitkisinin yapraklarında kontrol grubu ile kıyaslandığında tek başına civa uygulaması Cu, Ni, Zn, Na, Mg ve Fe içeriklerini sırasıyla %6, %100, %11.3, %29, %18.3 ve %60 gibi önemli oranlarda arttırmış, K miktarını etkilememiş ancak Mn ve Ca oranlarını ise sırasıyla %39.4 ve %13.3'lük ($P < 0.05$) oranlarda azaltmıştır (Çizelge 4.5). Tek başına civa uygulamasına göre SNP+Civa uygulaması da Cu, Mn ve K oranlarını %12, %7.3, ve %8.7 oranlarında artırırken, Ni, Zn, Na, Mg ve Fe oranlarını sırasıyla %34.6, %22.3, %26, %19 ve %70 oranlarında ise azaltmış ve Ca oranını ise etkilemiştir (Çizelge 4.5). Kontrole göre tek başına SNP ise Cu, Mn, Zn, Na, K ve Ca oranı artırmış, Mg değişmemiş ve Ni ve Fe oranlarını azaltmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.6. Mısır bitkisinin yapraklarında esas elementlerin içeriğine ait bulgular

	Ppb					ppm			
	Cu	Mn	Ni	Zn	Na	K	Mg	Ca	Fe
K	4185,97±4 8,1 c	24356,46±9 9,4 b	4354,6 ±56,1 c	10839,04±3 89,1 c	519,66±6 3,1 c	33351,53±6 32,1 c	653,1 ±6,3 c	872,85 ±2,9 b	58,1 ±3 b
SNP	4544,43±6 3,2 b	26044,8 ±72,6 a	3910,54±4 63,2 d	14671,16±4 74,3 a	4710,18±3 2,1 a	38361,38±4 42,4 a	743,91±4 1 b	1026,3±4 3 a	36,32±2 c
C	4443,23±7 2,1 b	14755,76±4 6,6 d	8694,24±5 85,1 a	12066,92±4 61,1 b	4543,29±2 9,6 b	33222 ±29,3 c	773,27±3 3 a	756,23 ±5,1 c	93,14±1 a
SNP	4977,48±3 2,3 a	15839,03±7 1,1 c	5679,44±9 41,3 b	9365,23 ±52,9 d	3364,25±3 6,2 d	36127 ±51,3 b	625,93±2 1 c	751,21 ±6,4 c	28,05±4 c

4.1.4. Lipid peroksidasyon seviyesi (MDA olarak) ve elektrolit geçirgenliği bulguları

Tek başına civa uygulaması kontrollerine göre mısır bitkisinin kök ve yapraklarının MDA seviyesinde önemli artışlara neden olmuştur (Çizelge 4.6). Kontrol bitkilerinin kök ve yapraklarında MDA miktarları sırasıyla 0.38 ve 1.13 nmol.g⁻¹ olarak ölçülürken, bu değerler tek başına civa uygulamalarıyla sırasıyla 0,58 ve 1.67 nmol.gr⁻¹'ye ulaşmıştır (Çizelge 4.6). Hücre zarından elektolit sızıntısı da kontrole göre tek başına civa uygulaması ile önemli oranda artmıştır (Çizelge 4.6). Civa toksisitesine karşı uygulanan SNP kök ve yapraklarda hem MDA hemde EL seviyelerini önemli (p<0.05) oranlarda düşürerek toksisiteye karşı bitkinin tolerans artışına yardımcı olmuştur.

Çizelge 4.7. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarında MDA ve EL bulguları

Uygulamalar	MDA (nmol.gr ⁻¹)		EL (%)	
	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak
Kontrol	0,38 ± 0,13c	1,13 ± 0,10c	15,5 ± 0,13c	14,3 ± 0,27c*
SNP	0,41 ± 0,17bc	1,15 ± 0,07c	17,3 ± 0,25c	16,5 ± 0,31c
Civa	0,58 ± 0,26a	1,67 ± 0,09a	80,6 ± 0,21a	72,6 ± 0,46a
SNP + Civa	0,47 ± 0,19b	1,41 ± 0,01b	50,2 ± 0,11b	45,3 ± 0,19b

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar P < 0.05 önem seviyesine göre anlamsızdır

4.1.5. Total protein ve prolin miktarı

Tüm gruplara ait uygulamalarda çözünebilir protein ve prolin içerikleri önemli oranlarda etkilenmiştir (Çizelge 4.7). Mısır bitkisinin köklerinde kontrole göre, civa uygulamasında hem total protein hem de prolin miktarlarında sırasıyla %59 ve %68 gibi yüksek oranlarda azalmalar meydana gelmiştir (Çizelge 4.7). Tek başına civa uygulamasına göre, SNP+civa grubunun köklerinde ise total protein ve prolin içeriklerinde sırasıyla %18 ve %50 oranlarında artışlar meydana gelmiştir (Çizelge 4.7). Yapraklarda ise kontrole göre tek başına civa uygulamasında total protein ve prolin içeriklerinde %19.5 ve %68.6 oranlarda önemli artışlar sağlamıştır (Çizelge 4.7). SNP+civa grubunda ise tek başına civa grubuna göre total protein ve prolin içeriklerinde %11.3 ve %26.4 oranlarında önemli artışlar sağlamıştır (Çizelge 4.7). Görüldüğü gibi civa stresi mısır kök ve yapraklarında protein ve prolin içerikleri üzerinde farklı tepkilere neden olmuştur. Benzer şekilde SNP her iki dokuda civa stresini tolere etmede farklı davranmıştır. Özetle civa köklerde protein ve prolin içeriğini düşürürken, yapraklarda artırmıştır. SNP ise buna cevap olarak köklerde düşen iki parametreyi artırırken, yapraklarda artışını sürdürmüştür. Bu farklı cevap civanın iki organda farklı seviyede birikimi ve iki organın farklılığının bir sonucu olabilir.

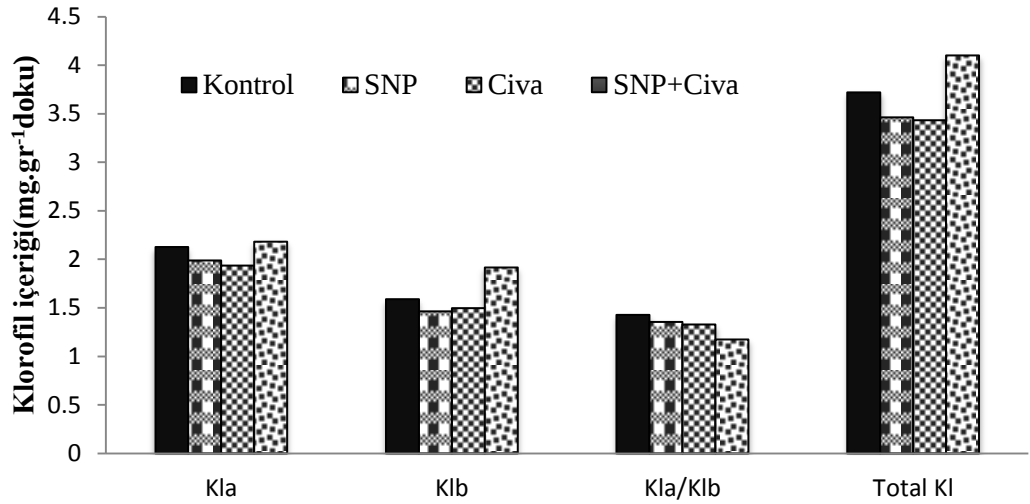
Çizelge 4.8. Protein ve prolin içeriği

Gruplar	Protein (mg.g ⁻¹ doku)		Prolin (µg.g ⁻¹ doku)	
	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak
Kontrol	7,05 ± 0,23b	16,18 ± 0,17c	0,542 ± 0,05a	0,3196±0,02c
SNP	8,75 ± 0,56a	16,52 ± 0,28c	0,4406 ± 0,06b	0,338 ± 0,03c
Civa	2,89 ± 0,41c	19,34 ± 0,11b	0,171 ± 0,01d	0,419 ± 0,01b
SNP + Civa	3,41 ± 0,18d	21,54 ± 0,13a	0,2566 ± 0,03b	0,530 ± 0,02a

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar P<0.05 önem seviyesine göre anlamsızdır.

4.1.6. Fotosentetik pigment içeriğine ait bulgular

Çalışmamızda kullanılan civanın toksik konsantrasyonu mısır bitkisinin fotosentetik pigmentlerin miktarını önemli oranlarda düşürmüştür (Çizelge 4.8). Civa toksisitesine maruz bırakılmadan önce uygulanan SNP ise civa stresi etkisi ile pigmentlerdeki azalmayı önemli derecede iyileştirmiştir (Çizelge 4.8). Kontrole göre tek başına civa uygulaması kla ve klb içeriklerinde sırasıyla %9 ve %6'lık azalmalara neden olmuştur. Civa toksisitesi altındaki bitkilere SNP uygulaması yapıldığında ise tek başına civa uygulamasına göre kla ve klb içeriğinde sırasıyla %12 ve %28'lik gibi önemli (p<0.05) artışlara neden olmuştur (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Mısır bitkisinin yapraklarında klorofil içerikleri

Çizelge 4.9. Mısır bitkisinin yapraklarında klorofil miktarlarına ait bulgular

Gruplar	Kla	Klb	Kla/Klb	Total Klorofil
Kontrol	2,126 ± 0,03a	1,59 ± 0,01ab	1,428 ± 0,08a	3,722 ± 0,01b
SNP	1,99 ± 0,01b	1,464 ± 0,02b	1,356 ± 0,05b	3,462 ± 0,01c
Civa	1,936 ± 0,04b	1,498 ± 0,05b	1,33 ± 0,02b	3,434 ± 0,01c
SNP+Civa	2,182 ± 0,06a	1,916 ± 0,09a	1,174 ± 0,01c	4,102 ± 0,01a

4.1.7. Fenolik madde içeriği bulguları

Civa toksisitesi altındaki mısır bitkisinin kök ve yapraklarında fenolik madde içeriği önemli oranlarda değişiklik göstermiştir. Mısır bitkisi köklerinde kontrole göre tek başına civa uygulaması fenolik madde içeriğini %100'den daha fazla oranda azaltarak 81.2 $\mu\text{g.gr}^{-1}$ olarak ölçülmüştür. Tek başına SNP uygulaması fenolik madde içeriğini kontrole göre değiştirmemiştir. Civa öncesi uygulanan SNP, mısır bitkisi köklerinde fenolik madde içeriğini %34.25 oranında artırarak 89.53 $4 \mu\text{g g}^{-1}$ seviyesine çıkarmıştır. Mısır bitkisinin köklerinde fenolik madde içeriği kontrol, SNP, civa ve Civa+SNP gruplarında sırasıyla 241.8, 245.03, 81.2 ve 89.53 $\mu\text{g g}^{-1}$ olarak ölçülmüştür.

Mısır bitkisinin yapraklarındaki fenolik madde içeriği civa toksisitesi ve toksisite öncesi uygulanan SNP (SNP+civa) ile artış göstermiştir (Çizelge 4.10). Kontrol bitkisinde fenolik madde içeriği $475.86 \mu\text{g.gr}^{-1}$ olarak ölçülmüşken, tek başına civa uygulanan bitkilerin yapraklarında %10,84 oranında bir artışla $527,46 \mu\text{g.gr}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Tek başına civa uygulaması ile karşılaştırıldığında; SNP+civa grubunda istatistiksel olarak önemli bir artış belirlenmemiştir. Mısır bitkisinin yapraklarında fenolik madde içeriği kontrol, SNP, civa ve Civa+SNP gruplarında sırasıyla 475.86, 471.03, 527.46 ve 505.96 $\mu\text{g.gr}^{-1}$ olarak ölçülmüştür.

Çizelge 4.10. Civa toksisitesi altındaki mısır bitkisinde fenolik madde içeriği üzerine nitrik oksit'in etkisi ($\mu\text{g g}^{-1}$)

Gruplar	Kök	Yaprak
Kontrol	$241,8 \pm 0,5a$	$475,86 \pm 0,3b$
SNP	$245,03 \pm 0,41a$	$471,03 \pm 0,4b$
Civa	$81,2 \pm 0,4b$	$527,46 \pm 0,3a$
SNP +Civa	$89,53 \pm 0,9c$	$505,96 \pm 0,5a$

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.

4.2. Reaktif Oksijen Türleri seviyelerine ait bulgular

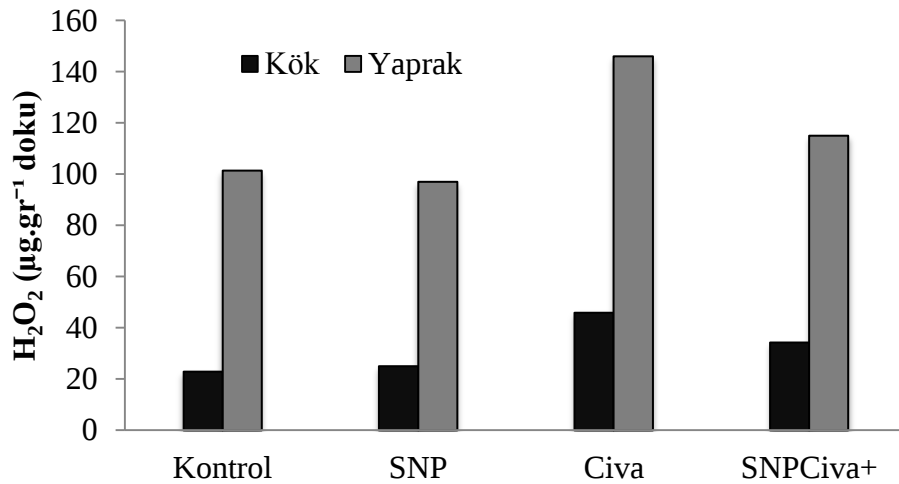
Tek başına civa uygulaması, kontrole göre mısır yapraklarının H_2O_2 seviyesinde önemli ($p < 0.05$) artışlara neden olmuştur (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.2). Kontrol bitkilerinde H_2O_2 miktarı 22.96 ng.gr^{-1} olarak ölçülürken, bu değer $100 \mu\text{M HgCl}_2$ uygulamasıyla 45.88 ng.gr^{-1} 'a kadar arttığı görülmektedir (Çizelge 4.10). Diğer taraftan, SNP uygulanmış fidelerin hem kök hem de yapraklarında H_2O_2 seviyesi, tek başına civa uygulamasıyla karşılaştırıldığında, önemli ($p < 0.05$) oranda düşmüştür (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.2). Düşüşler kökte ve yapraklarda sırasıyla %25 ve %21 oranında olmuştur.

Bu verilere göre civanın mısır fidelerinin kök ve gövdesinde H_2O_2 içeriğini artırmakla birlikte, artışın köklerde daha yüksek olduğu ifade edilebilir. Ancak civa stresinden

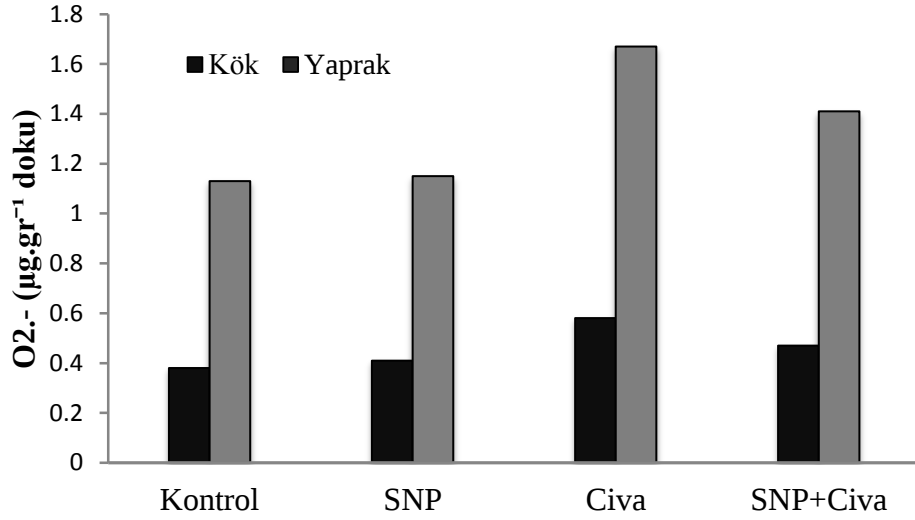
önce uygulanan SNP, her iki organda civa uygulamasıyla artan H_2O_2 seviyesini önemli düzeyde düşürebilmiştir.

Önemli bir reaktif oksijen türü olan süperoksit anyonun (O_2^-) miktarındaki değişimler Çizelge 4.10. verilmiş ve daha açık değerlendirebilmek için Şekil 4.3’de sunulmuştur. Bulgularımıza göre hem kök hem de yapraklarda tek başına civa uygulaması O_2^- miktarını kontrol grubuna göre önemli oranda artırmıştır. Bu artışlar, köklerde %22, yapraklarda ise yaklaşık %10 olarak belirlenmiştir. SNP+civa uygulamasında özellikle köklerde çok önemli iyileştirmelerin olduğu tespit edilmiştir. Köklerde SNP+civa, tek başına civa uygulamasına göre, O_2^- miktarında %22’lik bir azalmaya, yapraklarda ise %10’luk bir azalmaya neden olmuştur.

Bu verilere göre civanın mısır fidelerinin kök ve gövdesinde O_2^- içeriğini artırmıştır. Ancak civa stresinden önce uygulanan SNP, her iki organda civa uygulamasıyla artan O_2^- seviyesini önemli düzeyde düşürebilmiştir.



Şekil 4.2. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarında H_2O_2 içerikleri



Şekil 4.3. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarında O₂⁻ içerikleri

Çizelge 4.11. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarında H₂O₂ (µg.gr⁻¹) ve O₂⁻ (µg.gr⁻¹) içerikleri

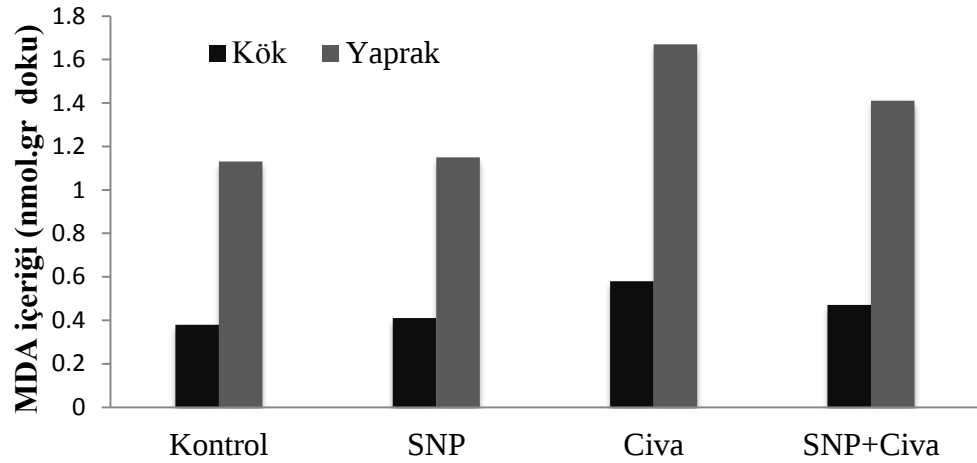
Uygulamalar	H ₂ O ₂		O ₂ ⁻	
	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak
Kontrol	22,96 ± 0,39d	101,4 ± 0,43c	0,98 ± 0,27b	3,62 ± 0,15c
SNP	24,99 ± 0,21c	97 ± 0,18c	1,44 ± 0,11a	4,25 ± 0,27a
Civa	45,88 ± 0,33a	146,03 ± 0,52a	1,2 ± 0,18ab	3,91 ± 0,16b
SNP+Civa	34,25 ± 0,45b	115,07 ± 0,51b	0,97 ± 0,37b	3,48 ± 0,08c

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar P < 0.05 önem seviyesine göre anlamsızdır.

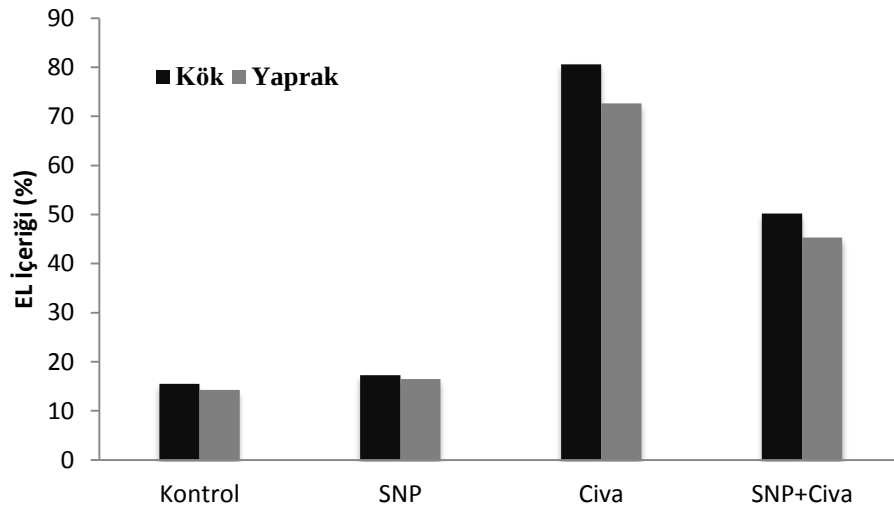
4.3. Lipid Peroksidasyon Seviyesi (MDA olarak) ve Elektrolit Geçirgenliği Bulguları

Tek başına civa uygulaması kontrollerine göre mısır bitkisinin kök ve yapraklarının MDA seviyesinde önemli artışlara neden olmuştur (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.4). Kontrol bitkilerinin kök ve yapraklarında MDA miktarları sırasıyla 0.38 ve 1.13 nmol.gr⁻¹ olarak ölçülürken, bu değerler tek başına civa uygulamalarıyla sırasıyla 0.58 ve 1.67 nmol.gr⁻¹'ye ulaşmıştır (Çizelge 4.11). Hücre zarından elektrolit sızıntısı da kontrole göre tek

başına civa uygulaması ile nemli oranda artmıştır (Çizelge 4.11). Civa toksisitesine karşı uygulanan SNP kök ve yapraklarda hem MDA hem de EL seviyelerini önemli ($p<0.05$) oranlarda düşürerek toksisiteye karşı bitkinin tolerans geliştirmesine yardımcı olmuştur (Şekil 4.4 ve 4.5).



Şekil 4.4. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarına ait MDA bulguları



Şekil 4.5. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarına ait EL bulguları

Çizelge 4.12. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarında MDA ve EL bulguları

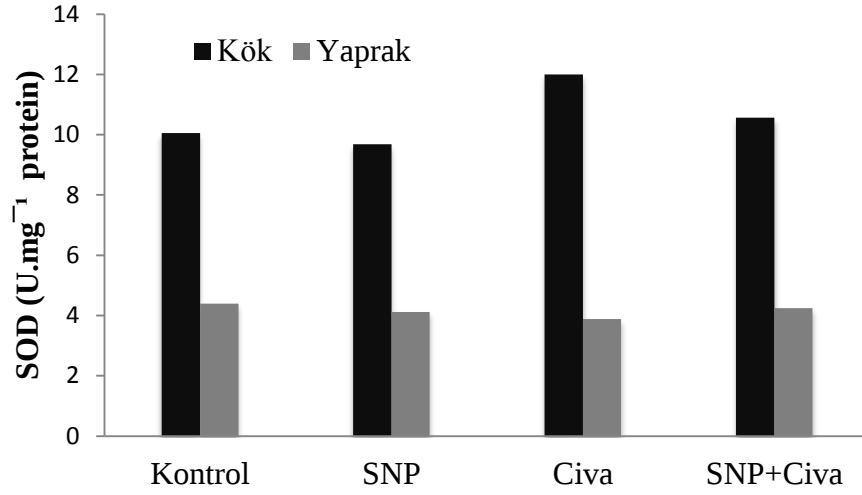
Uygulamalar	MDA(nmol.grdoku)		EL(%)	
	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak
Kontrol	0,38 ± 0,13c	1,13 ± 0,10c	15,5 ± 0,13c	14,3 ± 0,27c
SNP	0,41 ± 0,17bc	1,15 ± 0,07c	17,3 ± 0,25c	16,5 ± 0,31c
Civa	0,58 ± 0,26a	1,67 ± 0,09a	80,6 ± 0,21a	72,6 ± 0,46a
SNP+Civa	0,47 ± 0,19b	1,41 ± 0,01b	50,2 ± 0,11b	45,3 ± 0,19b

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.

4.4. Antioksidan Enzimlerin Aktivitelerine Ait Bulgular

4.4.1. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ve izoenzim profili

SOD enziminin aktivite düzeylerinin civa ve SNP uygulamalarında farklılık gösterdiği görülmüştür (Çizelge 4.9). Kontrole göre tek başına civa uygulaması bitkilerin köklerinde SOD aktivitesinde %20'lik önemli bir artışa ($P < 0.05$) neden olurken, yapraklarda ise istatistik anlamda önemli bir farklılığa neden olmamıştır (Çizelge 4.12). Tek başına civa uygulamasına göre, civa+SNP uygulanmış bitkilerde ise SOD aktivitesi kökte %20 düşerken, yapraklarda ise %10 artmıştır ($P < 0.05$). Bu bulgular, enzimin izoenzim profillerinden elde edilen verilerle desteklenmiştir. Örneğin, Şekil 4.6'ya dikkat edilirse, köklerde 4 izoenzim belirlenmiştir. Bu bantların tümünün yoğunlukları artmakla birlikte, özellikle SOD1 ve SOD4 civa uygulamasıyla önemli seviyede artmıştır. SNP+civa uygulamalarında ise bantların yoğunluğunda belirgin düşüşler görülmektedir. Yapraklarda ise 5 izoenzim belirlenmiştir (Şekil 4.7). Yapraklara ait izoenzim bulguları ile aktiviteye ait bulgular birbirini desteklemektedir (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.6). Bu verilere göre civa uygulamasının özellikle köklerdeki SOD aktivitesini artırdığı ve bu artışın civa stresinden önce uygulanan SNP ile yatıştırılabildiği görülmektedir.

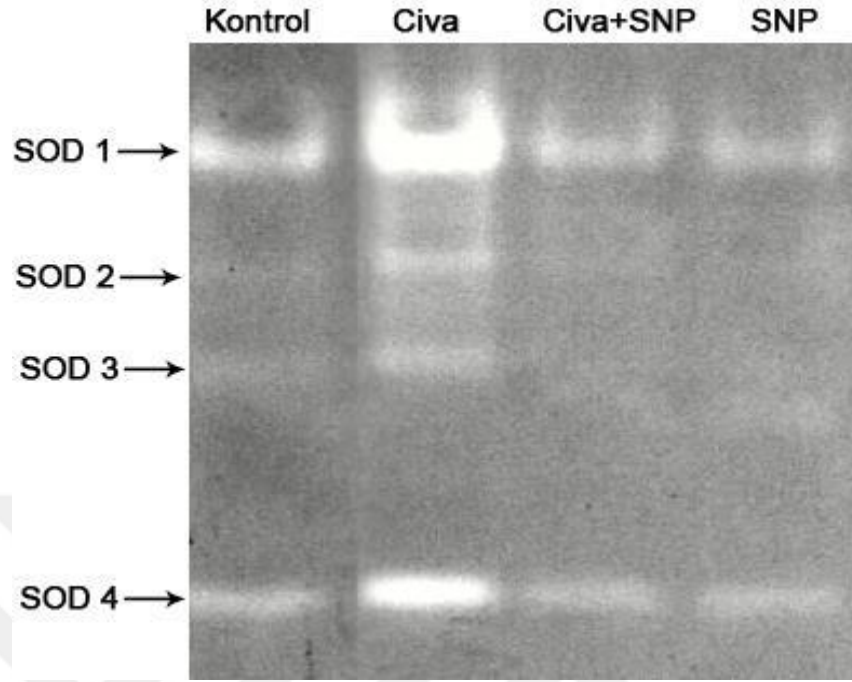


Şekil 4.6. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarına ait SOD aktivitesi (U.mg⁻¹ protein)

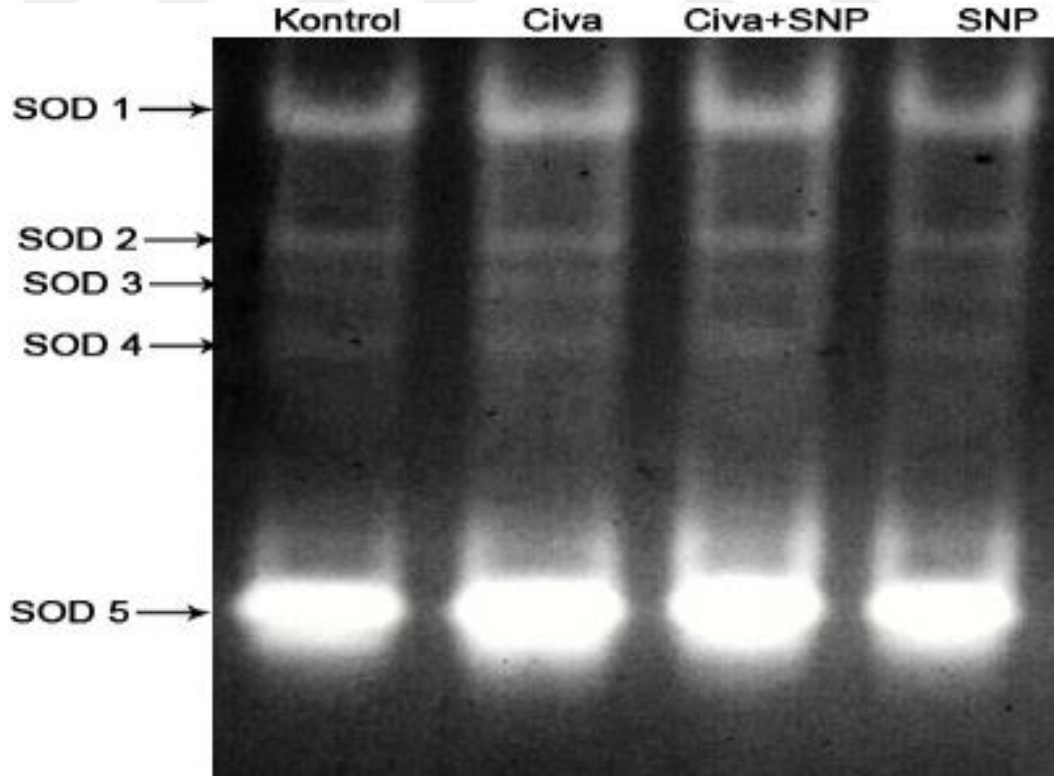
Çizelge 4.13. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarında SOD aktivitesi (U.mg⁻¹ protein)

Uygulamalar	Kök	Yaprak
Kontrol	10,05 ± 0,32b	4,39 ± 0,27b
SNP	9,68 ± 0,19c	4,12 ± 0,41a
Civa	12,00 ± 0,23a	3,88 ± 0,11b
SNP+ Civa	10,56 ± 0,33b	4,25 ± 0,16b

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.7. Mısır bitkisi köklerinde SOD izoenzim profili



Şekil 4.8. Mısır bitkisi yapraklarında SOD izoenzim profili

4.4.2. CAT enzim aktivitesi ve izoenzim profili

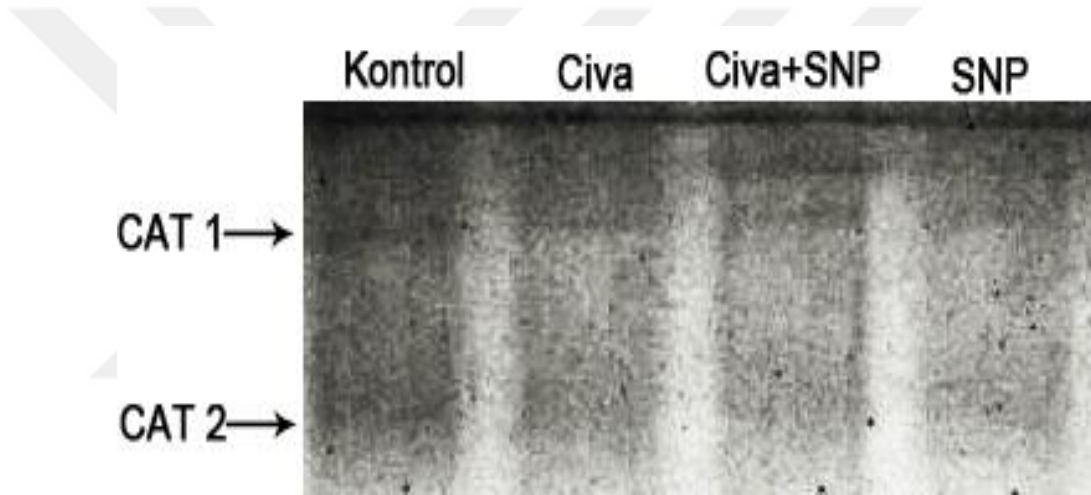
CAT aktivitesi mısır bitkisi kök ve yapraklarında hem civa hem de SNP+civa uygulamalarından önemli ($P<0.05$) derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.13). Bitki köklerinde tek başına civa uygulaması, kontrole göre CAT aktivitesinde çok önemli bir düşüşe neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki hücrel CAT aktivitesi 0.30 U.mg^{-1} protein iken, $100 \text{ } \mu\text{M}$ HgCl_2 uygulamasıyla aktivite %93'lük bir azalışla 0.02 U.mg^{-1} protein olarak belirlenmiştir. Ancak $0.1 \text{ } \mu\text{M}$ SNP uygulamaları civa ile azalan hücrel CAT aktivitesini önemli bir oranda arttırdığı belirlenmiştir. Tek başına civa uygulamasına göre SNP+civa uygulaması aktivitede %100'den daha fazla bir artışa ($P<0.05$) neden olmuştur (Çizelge 4.13). Yapraklarda da tek başına civa uygulaması CAT aktivitesinde bir düşüşe neden olmuştur. Kontrol bitkisinin yapraklarındaki hücrel CAT aktivitesi 0.96 U.mg^{-1} protein iken, $100 \text{ } \mu\text{M}$ HgCl_2 uygulamasıyla bu değer %9'lük bir azalışla 0.87 U.mg^{-1} protein olarak belirlenmiştir. SNP+civa uygulamaları tek başına civa ile azalan hücrel CAT aktivitesini %20.6'lık bir oranda arttırdığı belirlenmiştir (Çizelge 4.13).

Bu çarpıcı sonuç, CAT enzimin izoenzim profillerinden elde edilen verilerle desteklenmiştir. Mısır yapraklarından elde edilen enzim ekstraktları ile poliakrilamid jel üzerinde toplamda 2 farklı (CAT 1 ve 2) CAT izoenzim bandı belirlenmiştir (Şekil 4.9). Kontrol bitkisine göre tek başına civa uygulamasında bantlarının yoğunluğunun çok fazla azaldığı görülmektedir. Ancak SNP uygulaması bu durumu tersine çevirebilmiştir. Bu verilere göre civa uygulamasının özellikle köklerdeki CAT aktivitesini inhibe ettiği ve bu olumsuzluğun civa stresinden önce uygulanan SNP ile iyileştirilebildiği görülmektedir.

Çizelge 4.14. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarında CAT aktivitesi (U.mg^{-1} protein)

Gruplar	Kök	Yaprak
Kontrol	$0,30 \pm 0,11b$	$0,96 \pm 0,03b$
SNP	$0,40 \pm 0,21a$	$0,99 \pm 0,04a$
Civa	$0,02 \pm 0,04c$	$0,87 \pm 0,03b$
SNP+Civa	$0,28 \pm 0,09c$	$1,05 \pm 0,05a$

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.

**Şekil 4.9.** Mısır bitkisi yapraklarında CAT izoenzim profili

4.4.3. POD enzim aktivitesi ve izoenzim profili bulguları

Mısır bitki köklerinde tek başına civa uygulaması, kontrole göre POD aktivitesinde önemli ($p < 0.05$) artışa neden olmuştur (Çizelge 4.14). Örneğin, kontrol bitkisinin köklerindeki POD aktivitesi 2141 U.mg^{-1} protein iken, tek başına civa uygulamasıyla bu değer %100'den daha fazla bir artışla 4752 U.mg^{-1} protein olarak belirlenmiştir. SNP+civa uygulaması, tek başına civa uygulamasına göre, POD aktivitesini daha da artırdığı belirlenmiştir. Örneğin, tek başına civa uygulamasına göre SNP+civa uygulaması POD aktivitesinde %10'lık ($P < 0.05$) bir artış sağlamıştır (Çizelge 4.14). Mısır bitkisinin yapraklarında da POD aktivitesi hem civa hem de SNP uygulamalarında göre önemli değişimler meydana gelmiştir (Çizelge 4.14). Kontrol bitkisinin

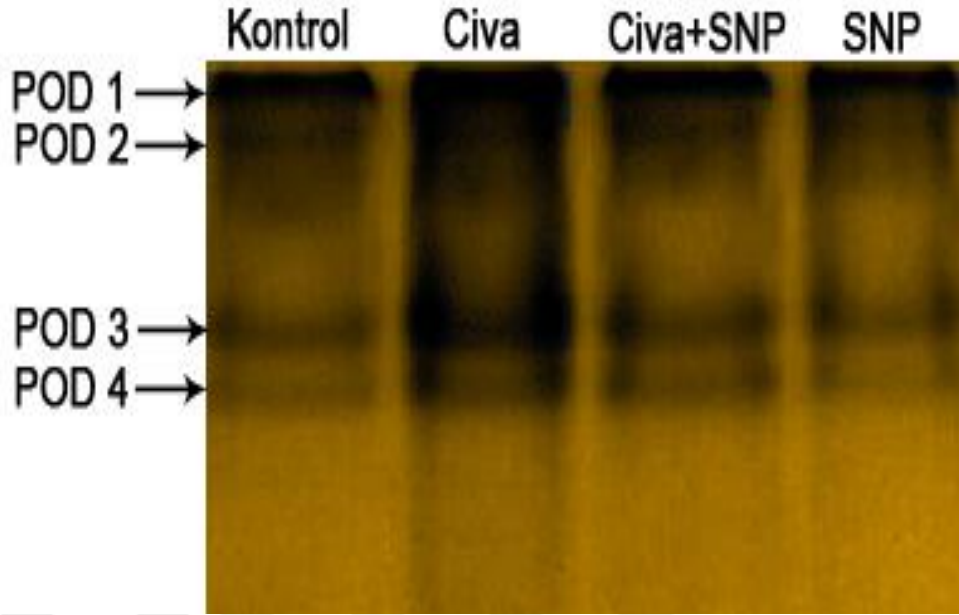
yapraklarında POD aktivitesi 108 U.mg^{-1} protein iken, tek başına civa uygulamasıyla bu değer %13'lük bir azalışla 94 U.mg^{-1} protein olarak belirlenmiştir. SNP+civa uygulaması ise tek başına civa uygulamasına göre POD aktivitesini önemli bir oranda ($P<0.05$) artırdığı belirlenmiştir. Tek başına civa uygulamasına göre SNP+civa uygulaması POD aktivitesinde %31'lik ($P<0.05$) bir artış sağlamıştır.

Mısır yapraklarından elde edilen enzim ekstraktları ile poliakrilamid jel üzerinde toplamda 4 farklı (POD 1-4) POD izoenzim bandı belirlenmiştir (Şekil 4.9). Kontrol bitkisine göre tek başına civa uygulamasında bantlarının yoğunluğu arttığı görülmektedir. Civa toksisitesi öncesi uygulanan SNP (SNP+civa uygulaması), tek başına civa toksisitesindeki gibi 4 farklı izoenzim bandı belirlenmiş ve bantların yoğunluğunun da arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.10).

Çizelge 4.15. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarında POD aktivitesi (U.mg^{-1} protein)

Gruplar	Kök	Yaprak
Kontrol	$2141 \pm 5,16c$	$108 \pm 1,17b$
SNP	$1413 \pm 8,91d$	$115 \pm 2,23ba$
Civa	$4752 \pm 6,47b$	$94 \pm 1,10c$
SNP+ Civa	$4952 \pm 9,12a$	$124 \pm 2,35a$

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır.



Şekil 4.10. Mısır bitkisi yapraklarında POD izoenzim profili

4.4.4. GR enzim aktivitesi ve izoenzim profili

Mısır bitki köklerinde tek başına civa kontrole göre GR aktivitesinde artışa neden olmuştur. Kontrol bitkisinin köklerindeki GR aktivitesi $6,48 \text{ U.mg}^{-1}$ protein iken, tek başına civa uygulamasıyla bu değer %100'den daha fazla bir artışla $15,02 \text{ U.mg}^{-1}$ protein olarak belirlenmiştir. SNP+civa uygulaması tek başına civa uygulamasına göre GR aktivitesini azalttığı belirlenmiştir. Tek başına civa uygulamasına göre SNP+civa uygulamasında GR aktivitesinde %17.7'lik ($P<0.05$) bir azalış meydana gelmiştir (Çizelge 4.15). Mısır bitkisinin yapraklarında ise GR aktivitesi hem civa hem de SNP+civa uygulamalarında önemli değişimler meydana gelmiştir (Çizelge 4.15). Kontrol bitkisinin yapraklarında GR aktivitesi $4,72 \text{ U.mg}^{-1}$ protein iken, tek başına civa uygulamasıyla bu değer %19.4'lük bir azalışla $3,8 \text{ U.mg}^{-1}$ protein olarak belirlenmiştir. SNP+civa uygulaması ise tek başına civa uygulamasına göre GR aktivitesinin de bir artışa neden olduğu belirlenmiştir. Tek başına civa uygulamasına göre SNP+civa uygulaması GR aktivitesinde %15'lik ($P<0.05$) bir artış sağlamıştır (Çizelge 4.15).

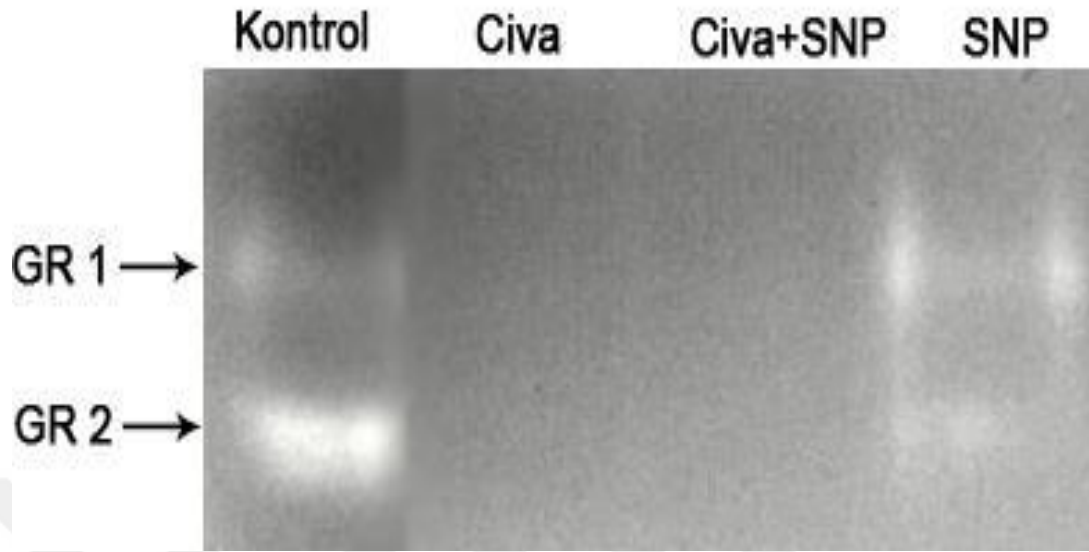
Çizelge 4.16. Mısır bitkisinin kök ve yapraklarında GR aktivitesi (U.mg⁻¹ protein)

Gruplar	Kök	Yaprak
Kontrol	6,48 ±0,153c	4,72 ±0,164a
SNP	5,52 ±0,254d	4,54 ±0,248a
Civa	15,02 ±0,445a	3,8 ±0,112b
SNP+ Civa	12,32±0,334b	4,38 ±0,196a

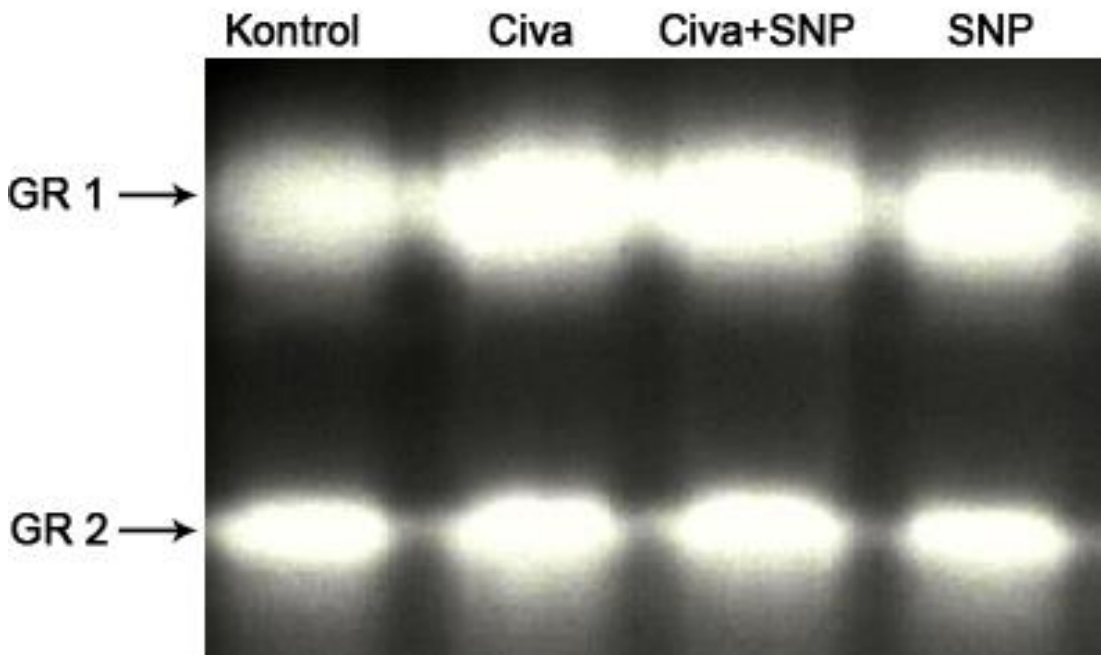
Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar P<0.05 önem seviyesine göre anlamsızdır

Mısır köklerinde elde edilen enzim ekstraktları ile poliakrilamid jel üzerinde toplamda 2 farklı (GR 1-GR2) GR izoenzim bandı belirlenmiştir (Şekil 4.11). Kontrol bitkisine göre tek başına civa uygulamasında herhangi bir bant belirlenememiştir. Civa toksisitesi öncesi uygulanan SNP (SNP+civa), tek başına civa toksisitesine göre herhangi bir bant belirlenememişken tek başına SNP uygulamasında ise 2 izoenzim tespit edilmiştir. Mısır yapraklarında elde edilen enzim ekstraktları ile poliakrilamid jel üzerinde toplamda 2 farklı (GR 1-2) GR izoenzim bandı belirlenmiştir (Şekil 4.11). Kontrol bitkisine göre tek başına civa uygulamasında özellikle GR 1 bandının yoğunluğu artmıştır. Civa toksisitesi öncesi uygulanan SNP (SNP+civa), tek başına civa toksisitesine gibi bantların yoğunluğu artmış ancak tek başına SNP uygulamasında ise GR 2 izoenziminin bant yoğunluğu azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.11).

GR enzim aktiviteleri ve izoenzim profilleri birlikte değerlendirildiğinde, civa stresine mısır kök ve gövde GR'leri farklı cevap vermişlerdir. Kökte civa stresi ile artan GR aktivitesi, SNP+civa uygulaması ile aktivite düşürülmüştür. Yapraklarda ise kökteki davranışın tersi bir durum gözlenmiştir. Bu durum GR'nin kökte ve yapraktaki birikimlerle ilgili olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.11. Mısır bitkisinde kökte GR izoenzim profili



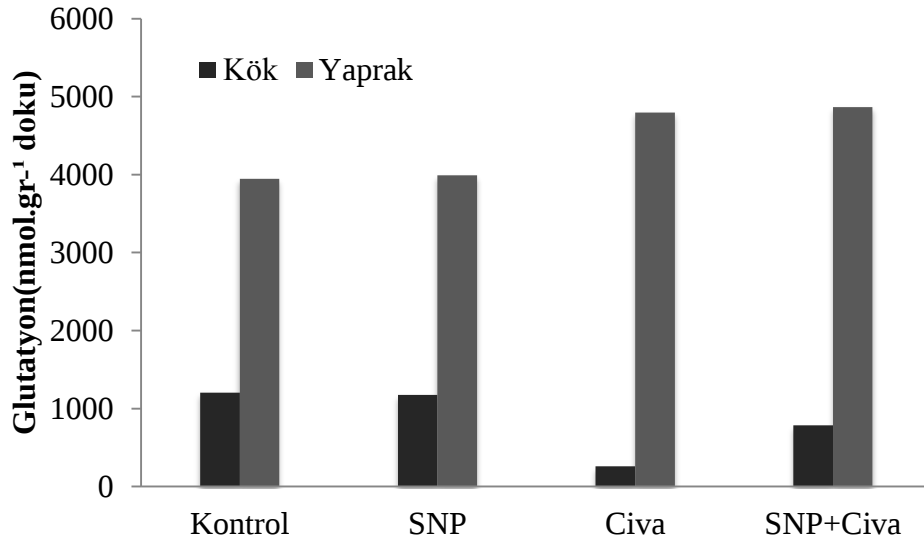
Şekil 4.12. Mısır bitkisi yapraklarında GR izoenzim profili

4.4.5. Glutasyon ve askorbat içeriği bulguları

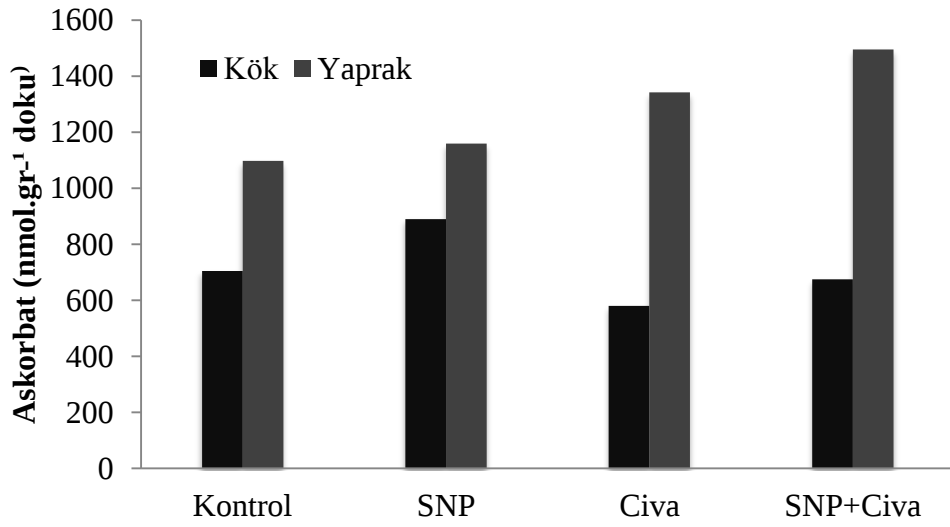
Mısır köklerinde glutasyon (GSH) içeriğinde tek başına civa uygulaması ve diğer uygulamalar önemli ($p<0.05$) azalmalara neden olmuşlardır. Tek başına civa uygulaması yapılan gruba göre, SNP+civa uygulaması %100'den daha fazla bir artışa neden olmuştur ($P<0.05$). SNP+civa uygulaması ile tek başına civa uygulamasında $257,5 \text{ nmol.g}^{-1}$ doku olarak ölçülen glutasyon içeriğinin 785 nmol.g^{-1} doku değeri ne yükselmesine neden olmuştur (Çizelge 4.16). Mısır yapraklarında ise kontrole göre GSH değeri civa uygulaması ile %21'lik önemli oranda artmıştır. SNP+civa uygulaması ise tek başına civa uygulamasına göre yapraklarda GSH oranını biraz artırmış ancak bu artış istatistiksel olarak önemsiz olmuştur ($P<0,05$).

Tek başına civa uygulaması mısır bitkisi köklerinde kontrol grubuna göre indirgen askorbat (ASA) içeriğini önemli derecede azaltmıştır. Kontrol grubunda $705,6 \text{ nmol.gr}^{-1}$ doku değeri nde ölçülen ASA miktarını tek başına civa uygulaması %17.4 düşürerek $580,8 \text{ nmol.gr}^{-1}$ doku değeri ne kadar azaltmıştır ($P<0.05$). Köklerde tek başına civa uygulamasına göre SNP+civa uygulaması ASA içeriğini %16'lık bir artış sağlamıştır (Çizelge 4.16). Yapraklarda ise kontrole göre tüm gruplarda ASA miktarı önemli derece artmıştır. Kontrol grubu yapraklarında $1098,1 \text{ nmol.gr}^{-1}$ doku değeri nde ölçülen ASA miktarı tek başına civa uygulaması ile %22.2 artırarak $1342,5 \text{ nmol.gr}^{-1}$ doku değeri ne kadar yükseltmiştir ($P<0.05$). Tek başına civa uygulamasına göre SNP+civa uygulaması ASA içeriğini %11.4 oranında artırarak $1495,6 \text{ nmol.gr}^{-1}$ doku değeri ne kadar yükseltmiştir ($P<0.05$) (Çizelge 4.16).

Görüldüğü gibi civa stresi altında kökler ve yapraklar GSH ve ASA miktarları üzerinden farklı cevap vermişlerdir. Köklerde genelde civa stresi ile hem GSH hem de ASA düşerken yapraklarda artmıştır. Bu civanın kök ve yapraklardaki birikim miktarlarıyla ilişkili olabilir. Civa stresi öncesinde uygulanan SNP ise köklerde civa uygulamasıyla artan GSH ve ASA'yı artırırken, yapraklarda ise düşürmüştür. Bu durum civa stresi esnasında SNP'nin GSH ve ASA seviyelerini düzenlediğini gösterebilir (Şekil 4.12 ve 4.13).



Şekil 4.13. Civa toksisitesi altındaki mısır bitkisinde GSH içeriği



Şekil 4.14. Civa toksisitesi altındaki mısır bitkisinde askorbat içeriği

Çizelge 4.17. Civa toksisitesi altındaki mısır bitkisinde glutatyon (nmol.gr^{-1}) ve askorbat (nmol.gr^{-1}) içeriği

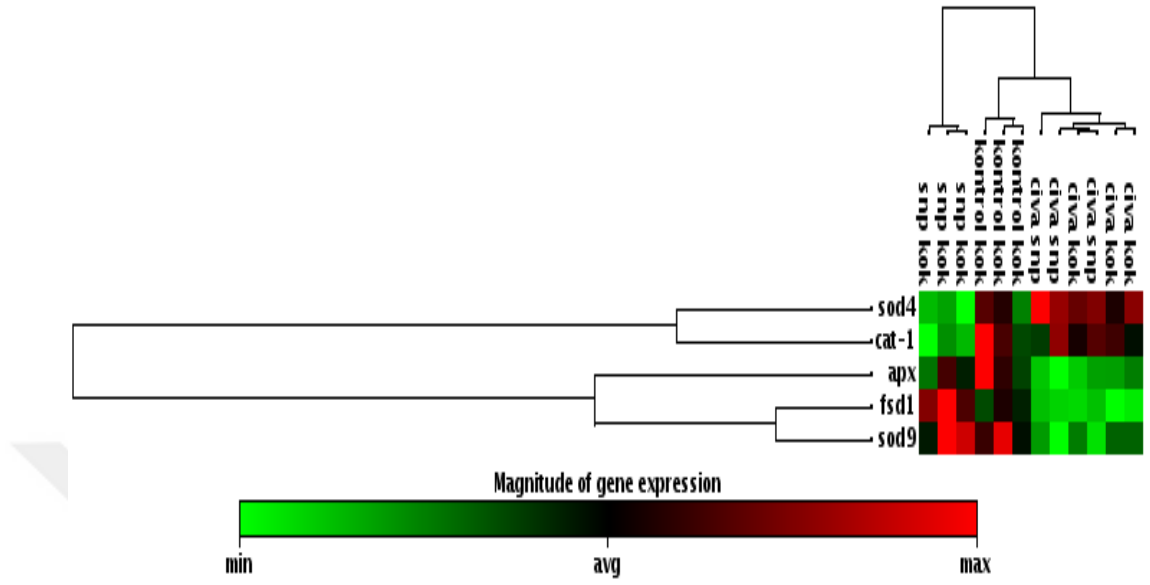
Uygulamalar	GSH		ASA	
	Kök	Yaprak	Kök	Yaprak
Kontrol	1205 $\pm$ 6,92a	3947,5 $\pm$ 9,86b	705,6 $\pm$ 6,41b	1098,1 $\pm$ 5,78c
SNP	1175 $\pm$ 9,83a	3990 $\pm$ 8,92b	890,6 $\pm$ 4,14a	1160,5 $\pm$ 6,11c
Civa	257,5 $\pm$ 3,12c	4796 $\pm$ 7,128a	580,8 $\pm$ 3,25c	1342,5 $\pm$ 4,56b
SNP+Civa	785,0 $\pm$ 4,62b	4865 $\pm$ 5,82a	675,2 $\pm$ 5,16b	1495,6 $\pm$ 8,46a

Bir sütun içinde aynı harflerin bulunduğu gruplar arasındaki farklılıklar $P < 0.05$ önem seviyesine göre anlamsızdır

4.5. Antioksidan Genlerin Ekspresyonu

Çalışmamızda istediğimiz genlerin ifade oranlarındaki değişimini belirlemek için RNA izolasyonu, cDNA eldesi ve gerçek zamanlı PCR analizi yapılmıştır. Çalışmamız Syber Green tabanlı bir çalışma olup, Qiagen (Hilden) RT2 SyberGreen Master Mix kullanılmıştır. Toplam 5 hedef gen (FSD1, SOD4, CAT-1, SOD9, APX) 1(ACTB) referans gen olmak üzere 6 gen üzerinden gerçekleştirildi ve Qiagen (Hilden) Rotorgene Q cihazı ile uygulama yapıldı.

Kontrol grubuna göre tüm gruplardaki beş genin ifadesinin değişim diyagramı sunulmuştur. Kontrol grubuna göre bitki köklerinde yapılan değerlendirmede çalışılan beş genin birbirlerinden farklı şekilde ifade oldukları belirlenmiştir. Kök kısmında kontrol grubuna göre tek başına civa toksisitesi ile SOD4 ve CAT-1 genlerinin ifadeleri artmıştır. Ancak FSD1, SOD 9 ve APX genlerinin ifade oranları civa toksisitesi altındaki bitkilerde azalmıştır (Şekil 4.14). Kökte tek başına civa ile SNP+civa grubu karşılaştırıldığında toksisite altındaki bitki köklerinde SNP uygulamasıyla FSD1, SOD4, CAT-1 ve APX genlerinin up-regule olduğu, ancak SOD9 geninin ise down-regule olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.14.).

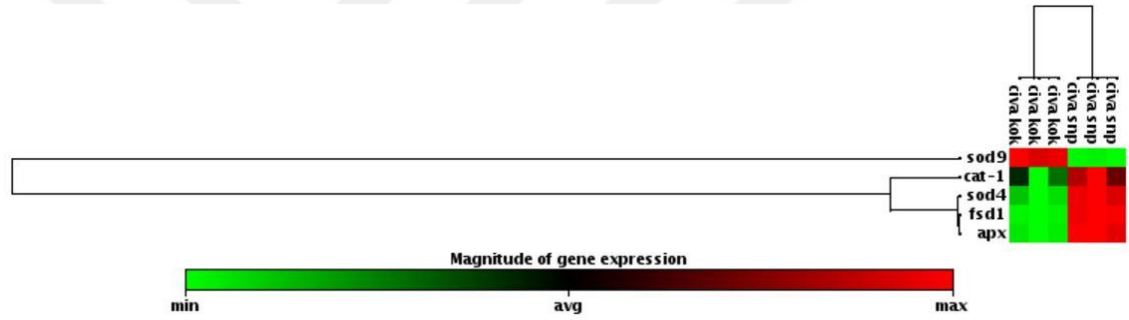


Şekil 4.15. Mısır köklerinde kontrole göre diğer tüm gruplarda antioksidan genlerin gerçek zamanlı ifade oranlarının değişimi

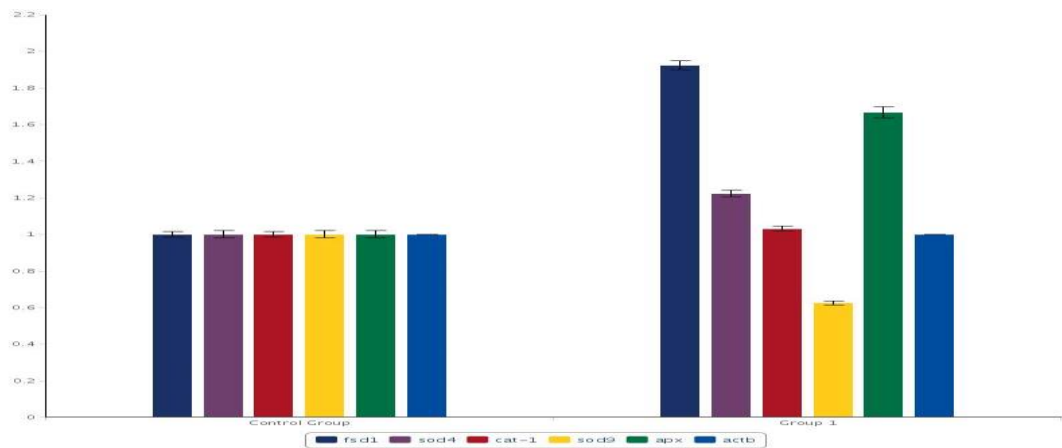
A

Position	Gene Symbol	p-value	Fold Up- or Down-Regulation
		P Value	Civa + SNP / Civa
1	fsd1	0.000000	1.92
2	sod4	0.000019	1.22
3	cat-1	0.014413	1.03
4	sod9	0.000001	-1.60
5	apx	0.000001	1.67
6	actb	0.000000	1.00

B

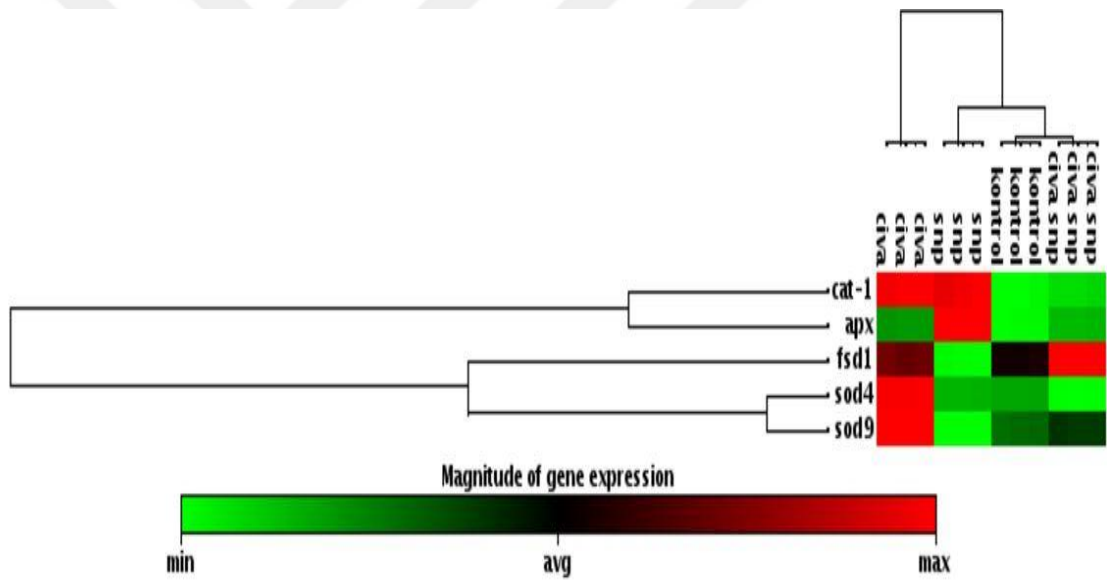


C



Şekil 4.16. Mısır köklerinde kontrole göre diğer tüm gruplarda antioksidan genlerin gerçek zamanlı ifade oranlarının değişimi
a) ifade oranları, b) değişim diyagramı c) ifade grafiği

Mısır yapraklarında kontrol grubuna göre tüm gruplardaki beş genin ifadesinin değişim diyagramı belirtilmiştir(Şekil 4.15). Kontrol gruba göre bitki yapraklarında yapılan değerlendirmede çalışılan beş genin birbirlerinden farklı şekilde ifade oldukları belirlenmiştir. Yaprak kısmında kontrol grubuna göre tek başına civa toksisitesi ile CAT-1, SOD4, FSD1 ve SOD 9 genlerinin ifade oranlarının arttığı belirlenirken, APX geni ise normal kontrole göre down-regule olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.15.). Yaprakta tek başına civa ile SNP+civa grubunun birbirleriyle karşılaştırıldığında toksisite altındaki bitki köklerinde SNP etkisiyle FSD1 geninin önemli oranda ifadesinin arttığı, diğer genlerin ise ifade oranlarının down-regule oldukları tespit edilmiştir(Şekil 4.15).

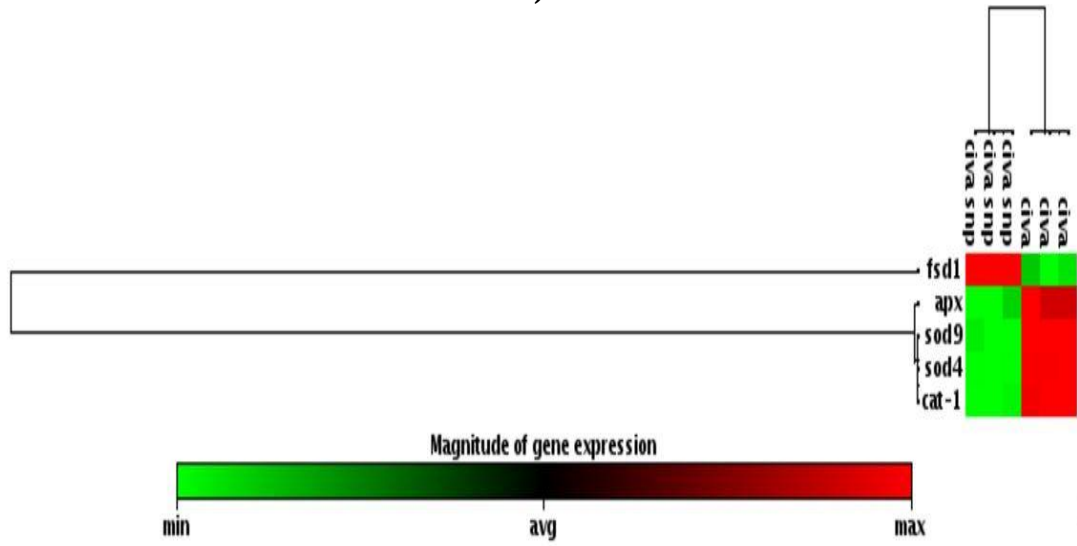


Şekil 4.17. Mısır yapraklarında kontrole göre diğer tüm gruplarda antioksidan genlerin gerçek zamanlı ifade oranlarının değişim diyagramı.

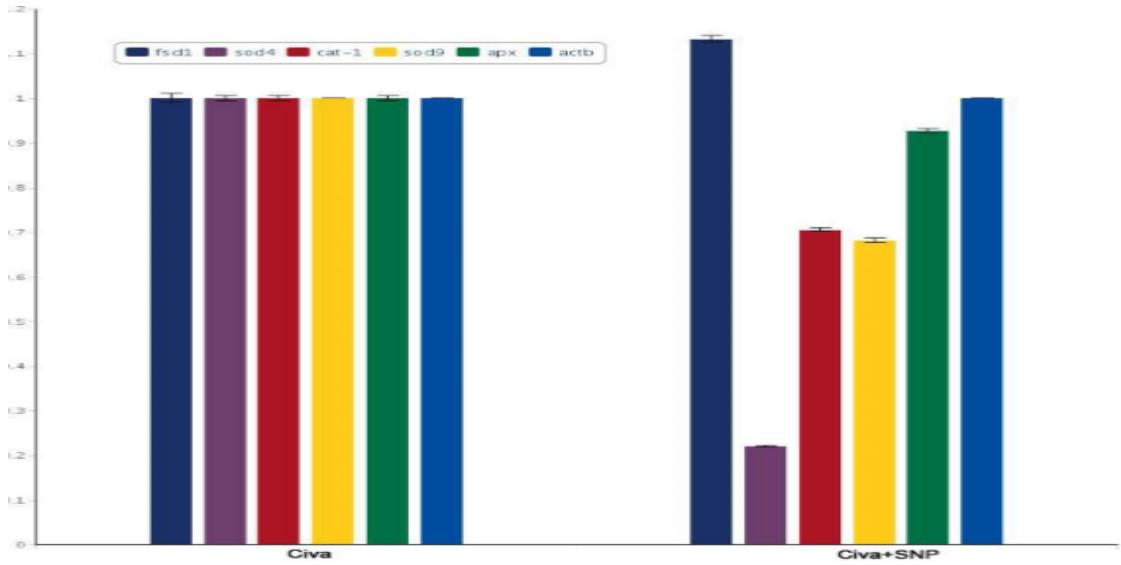
A

Position	Gene Symbol	Fold Up- or Down-Regulation	
		Civa + SNP / Civa	
1	fsd1	1.13	
2	sod4	-4.51	
3	cat-1	-1.42	
4	sod9	-1.47	
5	apx	-1.08	
6	actb	1.00	

B)



C)



Şekil 4.18. Mısır yapraklarında kontrole göre diğer tüm gruplarda antioksidan genlerin gerçek zamanlı ifade oranlarının değişimi
a) ifade oranları, b) değişim diyagramı c) ifade grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. Tartışma

Çalışmamızda insanoğlunun kültüre aldığı en eski tarla bitkilerinden biri olan mısır (*Zea mays* L.) kullanılmıştır. Dünyada tahıl bitkileri içerisinde buğday ve arpadan sonra en geniş ekim alanı ve üretime sahip olan mısır, 585 bin hektar ekim alanı, 2.5 milyon ton üretim ve 425 kg/da tane verimi ile ülkemizde özellikle Marmara ve Karadeniz Bölgeleri'nde yaygın olarak yetiştirilmekle birlikte bölgemizde de (Doğu Anadolu) tarımı yapılabilen bir tahıl bitkisidir (Süzer 2004). Günümüzde zengin besin maddesi içeriği nedeniyle hem insan, hem de hayvan beslenmesi gibi çok sayıda kullanım alanı olan ve önemi giderek artan mısır, yüksek verim alınabilen bir tarla bitkisi olarak diğerlerinden farklılık göstermektedir (Eryılmaz 2007).

Ağır metaller, bitki verimini kısıtlayan ve insan sağlığını olumsuz etkileyen önemli abiyotik stres faktörlerinden birisidir. Endüstriyel etkinlikler, motorlu taşıtların egzoz gazları, maden yatakları ve işletmeleri, volkanik faaliyetler, tarımda gübreleme ve ilaçlama gibi pek çok etken ağır metal kirliliğinin nedenleri arasında yer almaktadır. Bütün canlılar için toksik bir ağır metal olan civa (Hg), bitkilerin büyüme ve gelişmesi üzerinde de çok fazla olumsuzluklara sebep olduğu ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Patra and Sharma 2000; Esteban *et al.* 2008; Sierra *et al.* 2009). Bitki dokularında Hg birikimi, çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik süreçleri bozar ve özellikle oksidatif stresi teşvik ederek büyümenin engellenmesine neden olur ve daha ileri toksik seviyelerde ise hücre ve dokuların ölümüne yol açar (Wang and Greger 2004). Ağır metal stresini de içine alan çevresel streslere maruz kalan bitkilerde, metabolizmada ortaya çıkan bozulmaların bir sonucu olarak hücrelerde yüksek düzeyde oksidatif özellikleri olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) hızlı bir artışı meydana gelir. Bitki böyle bir durumla karşılaştığında, ROS bileşiklerinin zararsız hale getirilmesi için antioksidan sistemini harekete geçirir ve bu sistemin önemli bir parçası olan katalaz (CAT), peroksidaz (POX), süperoksit dismutaz (SOD) gibi enzimlerin aktivitelerinin düzenlenmesini sağlar.

Son yıllarda, stresli çevrelere bitki toleransının artırılması için bitkide antioksidan savunma sisteminin düzenlenmesini sağlayan doğal sinyal moleküller üzerinde yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bir sinyal bileşik, bitkide stres bilgisinin alınmasını, bu bilginin gerekli yerlere iletilmesini ve bitkide bu strese karşı bir cevap oluşturulmasını tetikleyen bir ajan olarak değerlendirilebilir. Bu sinyal moleküllerden bir tanesi de bitkilerde sentezlenen ve günümüzde birçok bitki stresinde önemli düzenleyici rolleri olduğu kabul edilen nitrik oksittir (NO) (Beligni and Lamattina 2001; Neill *et al.* 2002a,b). NO; bitkilerde çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik olaylarda ikincil haberci olarak rol oynamaktadır (Neill *et al.* 2003; Crawford and Guo 2005). NO'nun eksojen uygulamalarının bitkilerde büyüme, gelişme, çimlenme, de-etiyolasyon, klorosis, senesens gibi fizyolojik olayların yanında bazı stres koşullarında oluşturulan savunma mekanizmalarında da yer aldığı birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur (Neil *et al.* 2003; Crawford and Guo 2005).

Çalışmamızda, bitkiye stres öncesi uygulanan NO'nun (SNP olarak), bitki Hg stresi ile karşılaştığında, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler mekanizmalar üzerindeki etkileri ve stres cevabını iyileştirilebilme potansiyeli araştırılmıştır. Bu nedenle araştırmamızda monokotil bir bitki olan mısır (*Zea mays* cv. Arifiye-2) bitkisine, NO gaz formunda olan bir bileşik olduğu için, suda çözünebilen ve bitki tarafından alındığında parçalanarak NO üreten bir bileşik olan sodyum nitroprussid (SNP) uygulanmıştır. Daha sonra bitkiler Hg stresine maruz bırakılmışlardır. Çalışmamızda, çimlenme aşamasındaki ön denemeler ile SNP uygulamaları için 0.1 μ M; Hg uygulamaları için ise 100 μ M konsantrasyonları kullanılmıştır. NO'nun mısır fidelerini Hg toksisitesinden koruyabilme potansiyelini araştırırken, koruma derecesi ve kriterinin göstergesi olarak literatürde en çok kullanılan parametreler seçilmiştir. Bunlar, kök ve yapraklardaki elektrolit sızıntısı, yaş-kuru ağırlık, boy uzunluğu, lipid peroksidasyon (MDA miktarı) seviyesi ve reaktif oksijen türlerinin (hidrojen peroksit ve süperoksit anyonu) miktarlarının ölçülmesi deneyleridir. Ayrıca hücrelerdeki enzimatik antioksidan kapasitedeki değişimi takip etmek için antioksidan enzimlerin (SOD, POD, GR ve CAT) aktiviteleri ve bunların izoenzim profilleri, enzimatik olmayan antioksidan bileşiklerin (GSH ve ASA) içsel seviyeleri, total protein, prolin, element içeriği, içsel

civa miktarları gibi biyokimyasal parametreler de değerlendirilmiştir. Ayrıca antioksidan enzimlerden sorumlu genlerin ifade oranlarındaki değişimler RT-PCR ile belirlenmiştir. Yapılan bu fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler deneylerin tümünün sonuçlarının yorumlanması ve diğer araştırmacıların sonuçları ile karşılaştırılmalı değerlendirmeleri aşağıda sunulmuştur.

Canlılarda gerek büyüme ve gelişme, gerekse değişen çevre koşullarına uyumda metabolizma ile inorganik element içerikleri arasında yakın bir ilişki vardır. Elementler metabolizmada yapısal, elektrokimyasal ve katalitik olarak çok önemli fonksiyonlara sahiptirler. Onlar organik maddelerin yapısına katılabilir (yapısal fonksiyon), iyon dengesinin ayarlanmasında önemli roller oynayabilir (elektrokimyasal fonksiyon), ya da enzimlerin yapısında ko-faktörler olarak görev alabilirler (katalitik fonksiyon) (Kocaçalışkan 2004). Bitkide büyüme hızlandığı zaman, bitkinin protein, nükleik asit ve şeker gibi maddelere olan ihtiyacı da artacağından, bu ihtiyacı karşılamak için bitkide meydana gelen sentez reaksiyonlarının (örn. protein sentezi, nükleik asit sentezi ve fotosentez) hızı da artacaktır. Örneğin potasyum (K) enzim aktivasyonu, fotosentez, nişasta sentezi, şeker, su ve besin taşınımında önemli düzenleyici roller oynar. Benzer şekilde, magnezyum (Mg) de en başta klorofil oluşumu için gereklidir. Fe, bitkilerin protein içeriğini, tahıl ve yumrularda nişasta içeriğini ve meyvelerde C vitamini içeriğini artırır. Çinko (Zn) ise enzimlerdeki fonksiyonunun yanı sıra, nükleik asit ve protein sentez metabolizmasına katılır. Canlılarda inorganik element içeriği ile enzim aktiviteleri arasında yakın ilişki vardır.. Örneğin magnezyum (Mg) ko-faktör olarak birçok metabolik süreçte rol oynar. Bakır (Cu) ise redoks reaksiyonlarına katılan enzimlerle ilgilidir. Öte yandan, Na^+ , K^+ ve Cl^- gibi tek değerlikli iyonlar, bitkide belirli bir seviyenin üzerine çıktığında toksik etki yapmaktadır.

Mısır bitkisinin köklerinde kontrolle kıyaslandığında tek başına civa uygulaması Mn, Ni, Zn, Na, K, Mg ve Ca içeriklerini önemli oranlarda azaltmış, Cu miktarını etkilememiş, ancak Fe'yi %297 gibi önemli bir oranda artırmıştır (Çizelge 4.5). Tek başına civa uygulamasına göre SNP+civa uygulaması da Cu, Mn, Ni, Zn, K, Mg ve Ca oranlarını azaltırken, Na oranı ise artırmıştır. Yapraklarda, kontrol grubu ile

kıyaslandığında tek başına civa uygulaması Cu, Ni, Zn, Na, Mg ve Fe içeriklerini arttırmış, K miktarını etkilememiş ancak Mn ve Ca içeriklerini ise azaltmıştır (Çizelge 4.6). Tek başına civa uygulamasına göre SNP+civa uygulaması da Cu, Mn ve K oranlarını artırırken, Ni, Zn, Na, Mg, Fe oranlarını azaltmış ve Ca oranını ise etkilemiştir. Tüm bu bilgiler ışığında, SNP uygulamaları, normal şartlarda bitkiye köklerden sağlanan inorganik madde alınımini hızlandırmış, ancak stres şartlarında ise azaltmıştır. SNP uygulanan bitkilerin yapraklarında Mg, Cu, Ca, K ve Mn içeriklerindeki artışlar, bitkide artan büyüme ile ilgili metabolik olaylarda gerekli olan enzimlerin, gerek sentezi ve gerekse aktif hale getirilmeleri için bitkiye köklerden sağlanmakta olan element taşınım oranının arttığı ve SNP'nin tüm bu olayları direkt veya indirekt yollarla regüle edebildiği anlamına gelmektedir. Normal şartlarda SNP uygulamaları nedeniyle, bitkide artan büyüme hızına paralel olarak, Mg, Cu, Ca, K ve Mn gibi elementlerin alınımini artarken, Na⁺ element içeriğinde düşüşün meydana gelmesi, SNP'nin kök emici tüy hücre zarlarının fonksiyonlarını, muhtemelen iyon antagonizması prensibini daha etkin hale getirmek suretiyle, bitkinin toksik etkiye maruz kalmasını önleyecek şekilde zarlarda regülasyon sağladığı anlaşılmaktadır. Toksik Hg altındaki köklerde SNP'nin köklerde iyon miktarını düşürmesinin muhtemel nedeni SNP'nin toksik civanın alınımini engellemek için iyon kanallarının kapatmasından kaynaklanabilir. Sonuç olarak; SNP bitkilerin inorganik element içeriklerinde önemli değişimlere neden olmuştur.

Bitkiler kontrollü hidroponik ortamda yetiştirildiklerinde kontrol ve tek başına SNP uygulanmış gruplarda içsel civa belirlenememiştir. Hg uygulanan grupta ise içsel Hg miktarının yüksek seviyelere çıktığı tespit edilmiştir. İçsel Hg birikimi yapraklardan ziyade köklerde biriktiği görülmektedir. Yapraklarda içsel civa miktarı 34 ppb olarak belirlenirken köklerde 7997 ppb olarak belirlenmiştir. SNP+civa grubunda ise tek başına civa uygulamasına göre civa birikimi daha fazla olmuştur. Bu durum muhtemelen SNP ile alınımini artan Na iyon alınımini ile olmuş olabilir. SNP köklerde miktarı artan Hg'yi yapraklara taşınımını baskılamaya çalıştığı görülmektedir. Muhtemelen Hg'nin köklerde depolanması hedeflenmektedir. Bu nedenle hem tek başına civa hem de SNP+civa gruplarında köklerde birikimi artan civa yapraklara

taşınımı oldukça baskılanmıştır. Bazı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da içsel Hg miktarının yapraklardan ziyade köklerde daha fazla olduğu belirlenmiştir (Sinha *et al.* 1996; Wang and Greger 2004; Israr *et al.* 2006). Bu durumun temel sebebi civanın taşınımının sınırlı olmasından kaynaklanmaktadır.

Bitkilerde çözünebilir protein içeriğinin ölçülmesi, ağır metal toksisitesi gibi çeşitli stres koşullarında hücrelerin fizyolojik durumlarının belirlenmesi için önemli bir belirteç olarak kabul edilmektedir (Cuypers *et al.* 2005). Çözünebilir protein içeriği, bitki metabolizmasındaki dönüşümlü ve dönüşümsüz değişikliklerin belirlenmesinde çok önemli göstergelerden birisidir. Bitkilerdeki morfolojik değişim, genelde dokulardaki protein değişimleriyle yorumlanır. Bu yüzden protein içeriği, bitki büyüme ve gelişmesinin belirteçleri olarak görülmektedir (Cuypers *et al.* 2005; Eryılmaz 2007). Mevcut çalışmada tek başına civa uygulaması, köklerde protein içeriğini azaltırken, yapraklarda ise artırmıştır. SNP+civa uygulaması ise hem kök hem de yapraklarda protein içeriğini önemli oranlarda artırmıştır (Çizelge 4.8.). Bu bulgu klorofil içeriği bulgularıyla orantılı olmuştur. Çünkü NO civa ile düşen klorofil içeriğini artırmıştır. Artan klorofil ise fotosentezin artmasının ve sonuçta daha fazla protein sentezinin bir göstergesi olabilir (Eryılmaz 2007). Stres şartlarında prolin birikimi bitkilerde stres tolerans mekanizması olarak görev yapmaktadır (Alia and Saradhi 1991; Ali *et al.* 1998; Eryılmaz 2007). Prolin hücrelerdeki osmotik değerlerin değişimine neden olan durumlarda miktarı önemli oranda artar ve hücre savunma sistemini harekete geçirerek stres şartlarında dayanıklılığı artırır (Alia and Saradhi 1991; Ali *et al.* 1998; Eryılmaz 2007). Çalışmamızda tek başına civa uygulamasında kontrole göre köklerde prolin miktarı azalmış, ancak yapraklarda artmıştır (Çizelge 4.8). Tek başına civa uygulamasına göre SNP+civa grubu bitkilerinin hem kök hem yapraklarında prolin miktarının arttığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). Bu bulgu, protein içeriği bulgusuyla örtüşmektedir (Çizelge 4.8). Köklerde protein ve prolin içeriğinin düşmesi, yapraklarda ise artması, iki dokudaki Hg birikim farklılığının bir sebebi olabilir. Çünkü bulgularımıza göre, civa uygulaması ile köklerin yapraklara oranla 228 kat daha fazla civa biriktirdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Yoncada yapılan bir çalışmada toksik civaya maruz bırakılan fidelerde protein ve prolin miktarının arttığı rapor edilmiştir

(Zhou *et al.* 2009). Bazı ağır metal (kurşun, demir, kobalt, civa) stresleri ile yapılan çalışmalarda NO hem protein hem de prolin miktarını artırdığı belirtilmiştir (Uchida *et al.* 2002; Koypra and Gwozdzy 2003; Yu *et al.* 2005). Lipid peroksidasyonu (LPO) doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımıdır (Posmyk *et al.* 2005). Hücre zarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyon vererek peroksidasyon ürünlerinin oluşmasına neden olmakta ve bunun sonucunda zar geçirgenliği ve özellikleri bozulmaktadır. LPO seviyesinin artması, zar geçirgenliğini de etkileyeceğinden zarlarda elektrolit sızıntısı (EL) oranında da büyük değişimler meydana gelmektedir. LPO ve EL düzeyleri, hücresel düzeyde stresin sebep olduğu hasarın hem derecesi hem de yansıması olduğu bilinmektedir (Neto *et al.* 2006). Bitkiler strese maruz kaldıklarında, doymamış yağ asitlerinin bozulmasıyla son ürün olarak oluşan malondialdehit (MDA) miktarındaki artış, hücresel zarların yapısal bütünlüğünün bozulduğunu ve LPO seviyesini gösteren iyi bir indikatördür (Posmyk *et al.* 2005). LPO kendi kendini devam ettiren bir zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Bundan dolayı LPO ile oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Akkuş 1995). Mevcut çalışmamızda kontrol grupları ile karşılaştırıldığında tek başına Hg uygulaması hem yaprak hem de köklerde MDA ve EL seviyelerini arttırmıştır (Çizelge 4.12). Bu sonuç civanın membranlardaki LPO'yu tetikleyerek membran yapısını bozduğunu ve bunun sonucu olarak EL seviyesini artırdığını gösterir. Çalışmamızda Hg stresi öncesi uygulanan SNP ise hem kök hem de yapraklarda MDA ve EL seviyelerini önemli oranda azaltmıştır (Çizelge 4.12). Bu sonuç SNP'nin mebranlardaki LPO oluşumunu baskıladığını gösterir. Bizim bulgularımıza benzer olarak, Hg toksisitesine maruz bırakılan domates, medikago, çeltik, bakla ve salatalık bitkilerinde MDA ve EL seviyelerinin arttığı rapor edilmiştir (Cargnelutti *et al.* 2006; Zhou *et al.* 2007, 2008; Chen *et al.* 2012; Myrene and Devaraj 2013). Diğer taraftan, stresli şartlarda artan MDA ve EL seviyelerinin uygulanan NO ile azaldığına dair literatürde bazı çalışmalar mevcuttur. Örenğin, soğuk stresi (Liu *et al.* 2010), tuz stresi (Shi *et al.* 2007; Li *et al.* 2008), su stresi (Zhao *et al.* 2008; Arasimowicz-Jelonek *et al.* 2009), nikel (Kazemi *et al.* 2010), Cd (Singh *et al.* 2008) ve arsenik toksisitesi (Singh *et al.* 2009) ve yüksek sıcaklık stresi (Song *et al.* 2006) gibi streslerde artan MDA miktarının, dışsal uygulanan NO tarafından azaltıldığı belirtilmiştir. MDA seviyesinin düşmesinin bir nedeni, uygulanan NO ile artan SOD aktivitesinin (Çizelge 4.13) etkisiyle özellikle O_2^-

radikalinin dismutasyona uğraması olabilir. Ayrıca SNP uygulaması diğer antioksidanları uyarak da membranlarda MDA oluşumunu baskılamış olabilir. MDA seviyesinin NO uygulamalarıyla düşmesinin diğer bir nedeni de NO molekülünün O_2^- radikali ile birleşerek daha az zararlı olan peroksinitriti oluşturması ve bu şekilde membranın yapısındaki lipidlerin daha az etkilenmesi olabilir. Çalışmamızda, uygulanan NO'nun hücrelerde oluşan oksidatif hasarların önemli bir göstergesi olan MDA seviyesini düşürmesi, bitki canlılığı için son derece önemlidir. Hücrenin temel elemanlarından olan membranın korunması, hücre bütünlüğünün korunması anlamına gelir. Yani hücrelerinin bütünlüğü sağlanmış olan bir bitki, stres şartlarına adapte olmak için avantaj sağlamış olur.

Biyotik veya abiyotik stres faktörlerinin bitkiler üzerindeki etkilerini anlamak için sıkça başvurulan yöntemlerden biri de klorofil içeriğinin belirlenmesidir (Kupper *et al.* 1996; Bogoeva 1998; Eryılmaz 2007). Ağır metaller gibi çeşitli çevresel kirleticilerin bitkiler üzerindeki etkileri; klorofil yıkımı ve membran yapısının bozulması gibi toksik özellikleri dikkate alınarak incelenmiştir (Frankart *et al.* 2002). Bazı araştırmacılar metal kirliliğine bağlı olarak değişik bitki türlerinde klorofil miktarının azaldığını rapor etmiştir (Mocquot *et al.* 1996; Kırbag-Zengin and Munzuroglu, 2005). Ağır metallerin topraktan özellikle Fe^{+2} ve Mg^{+2} alımını indirgeyerek klorofil sentezini engelledikleri tespit edilmiştir (Guo *et al.* 2007). Örneğin, bitkilerdeki aşırı Cu^{+2} iyonlarının, anten kompleksleri ve reaksiyon merkezlerindeki klorofil moleküllerinin yapısındaki Mg^{+2} iyonunun yerini aldığı ve böylece klorofilin yapı ve işlevlerine zarar verdiği saptanmıştır (Kupper *et al.* 1996). Çalışmamızda toksik civaya (100 μM) maruz kalan mısır (*Zea mays* L., cv. Arifiye-2) fidelerinde meydana gelen toplam klorofil azalışı yukarıda ifade edilen çalışmaları desteklemektedir. Yine bulgularımızı destekleyecek bir çalışmada, domateste farklı konsantrasyonlardaki cıvanın klorofil içeriğini azalttığı rapor edilmiştir (Chao and Park 2000). Diğer taraftan çalışmamızda Hg stresi öncesinde mısır fidelerine uygulanan SNP (0.1 μM) fidelerde klorofil içeriğinin önemli seviyede artırmıştır (Çizelge 4.9 Şekil 4.1.). Aftab *et al.* (2012), bor (B) ve alüminyum (Al) toksitesine maruz kalan pelin otu (*Artemisia annua*) bitkisinde klorofil içeriği azalmasının bir sonucu olarak fotosentezin olumsuz yönde etkilendiğini ve bitkinin

büyüme ve veriminde öneli kayıplar olduğunu belirtmiştir. Ancak aynı stresler altındaki bitkiye SNP uygulaması sonucu artan klorofil içeriği, bitkilerin büyüme ve gelişimini olumlu yönde etkileyerek, stresin olumsuz etkilerini azalttığı belirlenmiştir. Mevcut çalışmamızda yapraklarda NO, fotosentetik pigmentlerin oranını artırarak bitkinin toksik cıvaya karşı dayanıklılığını artırmaya yardımcı olmuştur. Bizim çalışmamızda ise NO (SNP olarak), benzer etkiyi cıva stresine maruz kalan mısır fidelerinde yapmıştır. Bulgularımız literatürle uyumlu olmakla birlikte, NO'nun klorofil ve fotosentez üzerindeki iyileştirici etkisinin ağır metaller arasında ayırım yapmadan gerçekleştirebildiğini ortaya koyması bakımından önemlidir.

Ağır metal stresini de içine alan çevresel streslere maruz kalan bitkilerde, metabolizmada ortaya çıkan bozulmaların bir sonucu olarak, hücrelerde yüksek düzeyde oksidatif özellikleri olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) hızlı bir artışı meydana gelir. Bitki böyle bir durumla karşılaştığında, ROS bileşiklerinin zararsız hale getirilmesi için antioksidan sistemini harekete geçirir. Stres zararının yatıştırılması için bu sistemin önemli bir parçası olan katalaz (CAT), peroksidaz (POX), süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan enzimlerin aktiviteleri ve Asa ve GSH gibi enzimatik olmayan antioksidanların seviyelerinin düzenlenmesi sağlanmalıdır (Ahmad *et al.* 2008). Bu regülasyonun sağlanmasında sinyal bileşikler önemli rol oynarlar. Bir sinyal bileşik, bitkide stres bilgisinin alınmasını, bu bilginin gerekli yerlere iletilmesini ve bitkide bu strese karşı bir cevap oluşturulmasını sağlar.

Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), stres şartlarında içsel seviyesi artan ve hücrelerde önemli hasarlara neden olan bir radikaldir. Bu radikalin lipid peroksidasyonu, membran hasarı, hücresel toksisite ve DNA'daki tek zincir kırılmalarına sebep olduğu belirtilmiştir (Fridovich 1995; Desikan *et al.* 2005; Asada 2006). Mevcut çalışmamızda tek başına cıva, kontrole göre, kök ve yapraklarda içsel $O_2^{\cdot-}$ miktarını artırmıştır (Çizelge 4.11). Bu durum, cıva stresi esnasında metabolizmada oksijenin kullanıldığı yerlerde büyük bir dengesizlik olduğuna ve oksidatif stresi tetikleyen $O_2^{\cdot-}$ anyonu üretiminde çok hızlı bir artışa işaret eder. Daha önce yapılan çalışmalarda da; domates, medikago, çeltik, bakla ve salatalık bitkilerinin cıva toksisitesine maruz kaldıklarında $O_2^{\cdot-}$ miktarının arttığı

rapor edilmiştir (Cargnelutti *et al.* 2006; Zhou *et al.* 2007,2008; Chen *et al.* 2012; Myrene and Devaraj 2013). Diğer taraftan, civa stresinden önce 0.1 μ M SNP uygulaması tek başına civa uygulamasına göre $O_2^{\cdot-}$ miktarını hem kök hem de yapraklarda önemli oranda düşürmüştür (Çizelge 4.11). Bu sonuç, civa stresi öncesinde uygulanan SNP'nin bitkiyi oksidatif hasara karşı hazırladığına ve bitki civa stresine karşılaştığında ROS'lerden kaynaklanan oksidatif hasarı yatıştırdığına işaret eder. Civa toksisitesine karşı uygulanan NO'nun $O_2^{\cdot-}$ miktarı üzerindeki etkisi ile ilgili literatürde herhangi bir bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak diğer bazı ağır metal stresi (çinko, demir, nikel, civa, kobalt, kadmiyum) altında NO'nun $O_2^{\cdot-}$ miktarını düşürdüğüne dair çalışmalar bulunmaktadır (Uchida *et al.* 2002; Koypra and Gwozdzy 2003; Yu *et al.* 2005; Wang *et al.* 2010). Stres şartlarında artan $O_2^{\cdot-}$ miktarı özellikle membran hasarlarına neden olmaktadır. Uygulanan NO ile azaltılmış $O_2^{\cdot-}$ miktarı ya daha az zararlı olan peroksinitrite dönüştürülmüş ya da aktivitesi artan SOD enzimi ile dismutasyona uğramış olabilir. Azalmış olan $O_2^{\cdot-}$ miktarı membran yapısına zarar veremeyeceğinden hücre bütünlüğü korunmuş olur. Bunun sonucunda hücre canlılığını koruyabilir ve bitki bir bütün olarak strese karşı tolerans gösterebilir. Çalışmamızın sonuçları NO'nun civa toksisitesi altındaki mısır bitkisinin özellikle yapraklarında $O_2^{\cdot-}$ miktarını azaltarak oksidatif stres zararından korunmaya önemli bir katkı yaptığını göstermektedir.

Hidrojen peroksit (H_2O_2); bitkilerde özellikle peroksizom, mitokondri ve kloroplastlardaki metabolik etkinlikler sonucunda oluşan bir oksidan üründür. H_2O_2 , bitkilerin abiyotik ve biyotik stres etmenleri ile hormon ve yerçekimi gibi uyarıcılara karşı yanıt olarak sentezlenen bir sinyal molekülü olarak da bilinmektedir (Dat *et al.* 1998; Apel and Hirt 2004; Gechev *et al.* 2006; Mittler 2006). Normal konsantrasyonlarda toksisitesi diğer oksijen bileşiklerine göre daha az olan H_2O_2 , ortamda Fe ve Cu gibi geçiş metallerinin varlığında süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) ile tepkimeye girerek biyolojik sistemlerdeki en tehlikeli serbest radikal olan hidroksilin ($\cdot OH$) oluşumuna neden olmaktadır (Liochev and Fridovich 2007). Bu bileşiklerin hücrelerdeki birikimi, membran lipidlerinin peroksidasyonu ve enzim aktivitelerinin inaktivasyonu gibi pek çok yapısal ve fizyolojik hasara yol açtığı bilinmektedir.

(Gutteridge 1995; Halliwell and Gutteridge 1999; Eryılmaz 2007). Bitki stres derecesinin belirlenmesinde biyolojik bir sinyal olarak kullanılan H_2O_2 'nin düşük seviyeleri, bitki savunma sisteminin uyarılmasını, yüksek miktarlarda bulunduğu zaman ise dokularda oksidatif hasarlara, yani strese neden olmaktadır (Liu *et al.* 2010). Mevcut çalışmada, mısır bitkilerine tek başına civa uygulaması, kontrol grubuna göre H_2O_2 miktarını artırmıştır (Çizelge 4.11). Bu durum önceki çalışmamalarla iyi bir uyum göstermektedir. Örneğin, domates ve yabani yonca (alfafa) gibi bitkiler ile yapılan çalışmalarda Hg toksisitesine bağlı olarak H_2O_2 miktarında önemli derecede bir artış görülmüştür (Cho and Park 2000; Zhou *et al.* 2007). Bakla bitkisi ile yapılan başka bir çalışmada da Hg etkisiyle H_2O_2 içeriğinin arttığı rapor edilmiştir (Myrene and Devaraj 2013). Görüldüğü gibi bizim çalışmamıza paralel olarak birçok çalışmada civa toksisitesi bitkide içsel H_2O_2 seviyesini artırdığı belirlenmiştir. Bu artış bitkide birçok fizyolojik ve metabolik işlevlerin bozulmasına yol açan ve dolayısıyla civa toksisitesi esnasında bitkiye zarar veren mekanizmalardan birisidir. Çalışmamızda civa toksisitesi öncesi uygulanan SNP uygulaması, tek başına civa uygulaması ile karşılaştırıldığında, hem kök hem de yapraklarda H_2O_2 miktarında önemli derecede azalmalar sağlamıştır (Çizelge 4.11). SNP aynı zamanda özellikle yapraklarda H_2O_2 'yi süpüren antioksidan enzim aktivitelerini de artırmıştır. İncelemelerimize göre, literatürde civa toksisitesine maruz bırakılan bitkilerde NO'nun H_2O_2 içsel seviyesi üzerine etkisiyle ilgili herhangi bir çalışma belirlenememiştir. Ancak, tuzluluk (Huaifu *et al.* 2007; Li *et al.* 2008) ve diğer ağır metal (demir, kadmiyum, kurşun, bakır) (Hsu and Kao 2004; Cui *et al.* 2010) gibi abiyotik streslerde artan H_2O_2 miktarının, uygulanan NO tarafından azaltıldığını belirtilen çalışmalar mevcuttur. Çalışmamızın sonuçları literatürdeki bu çalışmalarla iyi bir uyum göstermektedir. Bizim bulgularımıza göre, mısır bitkisinde civa toksisitesi ile artan H_2O_2 miktarının, civa stresi öncesi uygulanacak NO ile önemli derecede azaltılabileceği ve bu yolla oksidatif strese karşı bitki toleransının artırılmasına önemli katkı sağlanabileceği ileri sürülebilir.

Antioksidan enzimler olumsuz çevresel faktörler nedeniyle reaktif oksijen türlerinin (ROS) bitki hücrelerinde ortaya çıkışındaki artışa bağlı olarak aktive olabilmekte ve bu durum bitkinin değişen çevre şartlarına uyum sağlamasına yardımcı olmaktadır (Mittler

2002; Halliwell 2006; Eryılmaz 2007). Bundan dolayı Hg toksisitesine karşı mısırın antioksidan enzim aktivitelerini düzenlemesi toksisiteye karşı tolerans sağlamada önemli bir gösterge olabilir. ROS, normal metabolizma sonucunda hücrelerde meydana gelmekle birlikte, bitki strese maruz kalınca üretimi ve birikimi artmaktadır. Gerek normal şartlarda gerekse stres şartları altında ROS miktarını kontrol etmek ve hücreleri ROS'un olumsuz etkilerinden korumak için bitkiler hem enzimatik hem de enzimatik olmayan bileşenlerden oluşan antioksidan savunma sistemine sahiptirler (Makale verelim). Başlıca antioksidan enzimlerden olan SOD, CAT, POD ve GR aktivitelerinin birbirlerine göre dengede bulunması; hücrelerde aşırı üretilen O_2^- ve H_2O_2 'yi süpürerek zararlı etkilerinin önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır (Mittler 2002; Halliwell 2006; Eryılmaz 2007). Bu nedenle NO'nun antioksidan enzimlerin aktivitelerini düzenleyici etkisi, bitkinin stres koşullarına karşı direncinin artmasına ve adaptasyonunun kolaylaşmasına yardımcı olması muhtemeldir. Çalışmamızda tek başına civa uygulaması, kontrole göre, kökte SOD aktivitesini artırmıştır. Bu bulgu SOD izoenzimlerinin görüntülediği şekilde de açıkça görülebilmektedir (Şekil 4.7). Ancak Hg uygulaması yapraklarda aktivite üzerinde anlamlı seviyede etkili olmamıştır (Çizelge 4.13). Bu sonuca göre Hg stresi esnasında SOD aktivitesini artırmaktadır. Bunun sebebi köklerin yapraklara göre daha fazla Hg biriktirmesiyle ilgili olabilir. Çünkü yaptığımız çalışmaya göre kökler Hg'yi yapraklara göre çok daha fazla (228 kat) biriktirmekte ve bitkinin üst bölümlerine taşınmasını engellemeye çalışmaktadırlar (Çizelge 4.1). Literatürde civa toksisitesinin SOD aktivitesi üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Çeltikte (Chen *et al.* 2012), buğdayda (Li *et al.* 2013), yoncada (Zhou *et al.* 2007, 2008), domateste (Cho and Park 2000), *Kandelia candel* ve *Bruguiera gymnorhiza* bitkilerinde (Zhang *et al.* 2007), *Sesbania drummondii* (Israr and Sahi 2006) ve beyaz acı baklada (Esteban *et al.* 2008) civa toksisitesi etkisiyle SOD enziminin aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Ancak bizim çalışmamız Hg'nin köklerde daha fazla bir biriktiğini göstermesi ve bunun sonucu olarak da SOD enziminin köklerde anlamlı seviyede arttığını göstermesi bakımından literatüre önemli bir katkı yapmıştır. SOD, bitkilerdeki antioksidan sistemin önemli bir enzimatik bileşenidir ve O_2^- radikalini H_2O_2 ya parçalayan reaksiyonu katalizler (Raychaudhuri and Deng 2000). SOD aktivitesinin artması, hücrede O_2^- radikalinin oluşumunun arttığının bir göstergesi olmakla birlikte, bir başka oksidant bileşik olan H_2O_2 miktarının da arttığının bir kanıtı

olarak kabul edilmektedir (Liochev and Fridovich 2007). Bu durum SOD enziminin aşırı miktardaki $O_2^{\cdot -}$ radikalini uzaklaştırarak Hg toksisitesi altındaki bitkinin direncini artırmaya çalıştığını göstermektedir. Diğer taraftan, çalışmamızda Hg stresinden önce uygulanan 0.1 μM SNP köklerde SOD aktivitesini tek başına civa uygulamasına göre azaltırken, yapraklarda ise aktiviteyi hafif derecede artırmıştır ($P>0.05$). Ancak, yapraklardaki artışlar izoenzim bantları incelendiğinde daha belirgindir (Çizelge 4.13). Literatürde eksojen uygulamalarla NO'nun SOD aktivitesi üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Tuzluluk ile ısı stresi altındaki çeltikte (Uchida *et al.* 2002) ve tuzluluk stresin altındaki salatalıkta (Shi *et al.* 2007) NO'nun özellikle yapraklarda SOD aktivitesini artırdığı belirtilmiştir. Bu durum SOD enziminin aşırı miktardaki $O_2^{\cdot -}$ radikalini uzaklaştırarak stres altındaki bitkinin direncini artırmaya yönelik bir rol oynadığını göstermektedir. Çalışmamızda, aktivitesi araştırılan diğer bir antioksidan enzim de katalaz (CAT)'dır. CAT'ın bitki dokularında H_2O_2 'in zararsız hale dönüştürülmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Ogawa *et al.* 1997). Bu enzim, oldukça yüksek katalitik özelliğe sahip olup, substratına afinitesi zayıftır. Bitkilerde CAT enziminin, H_2O_2 'in yıkımının yanı sıra, stres esnasına savunma sisteminin önemli bir bileşeni olduğu belirtilmiştir (Willekens *et al.* 1997). Ayrıca CAT özellikle mitokondriyal bileşenleri, oksidatif zararlardan korurken, hücrenin diğer kısımlarındaki H_2O_2 'in yıkımında yetersiz kaldığı belirtilmiştir (Scandalios 1994). Çalışmamızda kontrole kıyasla tek başına Hg uygulaması köklerde ve yapraklarda CAT aktivitesini düşürmüştür (Çizelge 4.14). Ancak yapraklardaki düşüş istatistik olarak anlamlı olmamıştır. Mısır bitkisinde CAT aktivitesi çok düşük olduğundan köklere ait izoenzim çalışmasından sonuç alınamamıştır, ancak yapraklardan elde edilen CAT izoenzim jel fotoğrafında Hg ile CAT izoenzimlerinin bant yoğunluğunun düştüğü görülmektedir (Şekil 4.9). Jelde özellikle CAT-2 izoenziminin Hg uygulamasıyla daha fazla olumsuz etkilendiği açıkça görülmektedir. Bu bulgulara göre mısırdaki Hg stresi, CAT enzimini hem kökte hem de yapraklarda olumsuz etkilediği söylenebilir. (Chen *et al.* 2012) tarafından çeltik bitkisinde yapılan çalışmada civa toksisitesinin CAT aktivitesini azalttığı sonucuna varmışlardır. Bu sonuç mevcut çalışmada elde ettiğimiz sonuçlarla iyi bir uyum göstermektedir. Çalışmamızda Hg stresi öncesi uygulanan NO, tek başına civa grubuna göre hem kök hem de yapraklarda CAT aktivitesini artırmıştır (Çizelge 4.14). Bu bulgu NO'nun, bitkide Hg ile düşürülen CAT aktivitesini artırdığını

ve bu yolla CAT'ın substratı olan H_2O_2 'nin azaltılmasını sağlayarak oksidatif hasarın yatıştırılmasına önemli bir katkı yaptığını gösterir. Çünkü çalışmamızda Hg'nin CAT substratı olan H_2O_2 'yi kök ve yapraklarda artırdığı ve bu artışın NO uygulamasıyla düşürüldüğü belirlenmiştir (Çizelge 4.11). Görüldüğü gibi hem CAT aktivitesi bulguları hem de H_2O_2 miktarına ait bulgular birbirini desteklemektedir. NO'nun, tuzluluk (Shi *et al.* 2007; Li *et al.* 2008), ağır metal (Uchida *et al.* 2002; Koypra and Gwozdzy 2003; Yu *et al.* 2005; Wang *et al.* 2010) ve kuraklık (Zhao *et al.* 2008) streslerine maruz bırakılmış bitkilerde CAT aktivitesini artırdığı belirlenmiştir. POD enzimi antioksidan savunma sisteminin diğer önemli ayaklarından birisidir. Çalışmamızda, kontrole göre tek başına Hg uygulaması, POD) aktivitesini ve izoenzimlerin bant yoğunluğunu köklerde artırırken, yapraklarda (Çizelge 4.15) ise azaltmıştır ($P<0.05$). Civa toksisitesi altında POD aktivitesinin değişimi ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Cho and Park 2000; Zhou *et al.* 2008; 2009). Civa toksisitesi altındaki mısır köklerinde POD aktivitesinin artması literatür ile uyumludur. Ancak yapraklarda ise, civa toksisitesi POD aktivitesini önemli derecede azaltmıştır, bu durum tek başına civa uygulaması köklerde aşırı biriktiğinden dolayı bitki POX aktivitesini köklerde yoğunlaştırdığını göstermektedir. Civa toksisitesine maruz kalmadan önce NO uygulanmış ve daha sonra toksisiteye maruz kalmış bitkilerden elde edilen POD aktivitesi sonuçları, tek başına civaya maruz kalan grup ile kıyaslanırsa, NO uygulaması hem kök hem de yapraklarda aktiviteyi artırmıştır (Çizelge 4.15). POD aktivitesi üzerine civa toksisitesi ve NO'nun birlikte etkisi ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla beraber NO'nun tuzlulukta (Shi *et al.* 2007), ağır metal ve yüksek sıcaklık stresinde (Uchida *et al.* 2002; Koypra and Gwozdzy 2003; Yu *et al.* 2005; Wang *et al.* 2010), ve UV-B (Zhang *et al.* 2009) streslerine maruz bırakılmış bitkilerde POD aktivitesini artırdığı belirlenmiştir. Çeşitli çevresel stres koşullarında aktivitesi artan ve bitki hücrelerinde etkili bir savunma sistemi şeklinde görev yapan POD, genellikle stres enzimi olarak da kabul edilmektedir (Fang and Kao 2000). Bitki hücrelerinin farklı kısımlarında bulunan POD enzimi H_2O_2 'in süpürülmesinde iş gören en önemli enzimlerden biridir (Bakardjieva and Christov 1996). Civa toksisite altındaki bitkilerde NO'nun POD aktivitesini artırması ve H_2O_2 miktarını azaltması strese NO'nun rolünün önemini göstermektedir.

Glutasyonun (GSH) metabolik düzenleyici ve antioksidan olarak oynadığı birçok rol, onun glutasyon disülfite (GSSG) okside olmasıyla açıklanmaktadır (Noctor and Foyer, 1998). Okside olmuş glutasyonun (GSSG), GSH'a indirgenmesi önemli bir antioksidan enzim olan GR tarafından NADPH'a bağımlı olarak gerçekleşmektedir. Bu reaksiyon sonucunda ortamda hidroksil radikalının varlığı azalır ya da oluşumu engellenir (Madhava Rao and Sresty 2000). Mevcut çalışmada tek başına Hg uygulaması kontrole göre köklerde GR aktivitesini azalmıştır, yapraklarda ise artmıştır (Çizelge 4.17). Tek başına civa uygulamasına göre SNP+civa uygulamasıyla aktivitede köklerde düşüş, yapraklarda ise artış sağlanmıştır (Çizelge 4.17). Yoncada yapılan çalışmada civa toksisitesinin GR aktivitesini artırdığı rapor edilmiştir (Zahou *et al.* 2008). Diğer bir çalışmada ise bakır uygulanan fidelerin kök, gövde ve yapraklarındaki GR aktivitesinin belirgin bir şekilde arttığını bildirmektedir (Peng *et al.* 2006; Tanyolaç *et al.* 2007). Bu çalışmalara göre, artan GR aktivitesi hücre içi H₂O₂'nin kontrolünde önemli rol oynamaktadır ve bitkinin antioksidan etkinliğinin bir göstergesidir. Gallego vd. (1996) ise kadmiyuma maruz bırakılmış ayçiçeği fidelerinde GSH içeriğinin ve GR aktivitesinin düşüş gösterdiğini tespit etmiştir. Bu bulgular, Hg toksisitesi altındaki mısır bitkisi ile yapılan mevcut çalışmada elde ettiğimiz verileri desteklemektedir. Diğer taraftan, çalışmamızda NO uygulamasının yapraklarda GR aktivitesini artırması (Çizelge 4.16) önemli bir bulgudur. Çalışmamızda Hg stresi altında NO etkisiyle GR aktivitesinin artışı (Çizelge 4.17) ile aynı koşullarda içsel GSH'ın artması (Çizelge 4.16), elde edilen bulguların güvenilirliğini de desteklemektedir. Çünkü hücrelerde GR aktivitesinin artışı, GSH fazlalığına neden olacaktır. Bu da sonuçlarımızda görülebilmektedir. Bu olay, glutasyon redüktaz, glutasyon peroksidaz gibi diğer antioksidan enzimlerin aktiviteleri için gerekli GSH'ı üretmesi bakımından önemli olup bitkinin antioksidan kapasitesinin artırılmasında en büyük katkı yapacaktır (Alvarez *et al.* 2005).

Çevresel stresler sonrası oluşan ROS'ların temizlenmesinde görev alan SOD, POD, CAT ve GR enzimlerinin aktive olması, bitkinin strese karşı tolerans sağlamasında büyük bir öneme sahiptir. Bu antioksidan enzimlerin tek başına aktive olması, her zaman yeterli olmayabilir. Tolerans sağlanması için hem antioksidan enzimlerin aktive

olması, hem de ROS'ların miktarı ve MDA seviyesinin düşmesi beklenir. Civa toksisitesi, mısır bitkisinin antioksidan enzimlerini her ne kadar aktive etmişse de, bu yeterli olmamıştır. Çünkü toksik civa aynı zamanda hem ROS miktarı hem de MDA seviyesini de artırmıştır. Çalışmamızda kullandığımız NO'nun 0.1 μ M konsantrasyonu özellikle yapraklarda antioksidan enzimlerin aktivitelerini ve izoenzim profillerini artırırken, aynı zamanda ROS'ların miktarını ve MDA seviyesini ise düşürmüştür. Sonuçlara bakarak, NO'nun toksik civaya karşı bitki enzimatik antioksidan mekanizmasını harekete geçirdiği söylenebilir. Canlı hücrelerinde hem normal hem de stres şartları altında ROS oluşumu ve süpürülmesi arasındaki denge enzimatik antioksidan ve enzimatik olmayan antioksidan mekanizma ile birlikte sağlanır (Noctor and Foyer 1998).

Enzimatik olmayan antioksidan mekanizma askorbat (ASA) ve glutatyon (GSH) gibi redoks düzenleyici metabolitleri ile sağlanır. GSH, canlı hücrelerin plazmatik bölmelerinde düşük konsantrasyonlarda (μ M) bulunan düşük molekül ağırlıklı önemli bir tioldür (Foyer and Noctor, 2005). Merkezinde yer alan sistein grubundan dolayı glutatyon, okside ya da redükte hale dönüştürülebilir. Bu nedenle glutatyon hücrede, ya indirgenmiş glutatyon (GSH) ya da okside olmuş glutatyon disülfid (GSSG) olarak bulunmaktadır. Hücredeki okside ve indirgenmiş glutatyonların dengesinin sağlanması canlı hücrelerinde sinyal iletim yolunun devamlılığı için son derece önemlidir. Literatürdeki pek çok çalışmaya göre hücredeki GSH seviyesinin artışı, biyotik veya abiyotik streslere toleransı arttırdığı bulunmuştur. Örneğin, kuraklık stresine maruz bırakılan ayçiçeği fidelerinde GSH seviyesinin ve ASA-GSH döngüsü enzimlerinin aktivitelerinin artmasıyla hücrelerdeki oksidatif hasarın engellendiği ileri sürülmüştür (Sgherri and Navari-Izzo, 1995). Yabani tipin %5i kadar glutatyon sentezleyen ve daha düşük miktarlarda ASA içeren *Arabidopsis* mutantlarında gözlenen stres teşvikli oksidatif hasarın yabani tiptekilerden daha yüksek olduğu bulunmuştur (Xiang *et al.* 2001). Civa toksisitesinin GSH miktarını artırdığı ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır (Cho and Park 2000; Zhang *et al.* 2007; Zhou *et al.* 2007, 2008). Mevcut araştırmamızda özellikle yapraklarda tek başına civa uygulamasına göre NO'nun GSH oranını artırması mısır bitkisinin toksik civaya karşı toleransta etkili olabileceği

düşünülmektedir.(Şekil 4.13) Bunlara ek olarak; GSH₂’ın şelatlama özelliğinden dolayı da ağır metal atresi altındaki bitkilerde miktarının artması bitkilerin dayanıklılığını artırmasına yardımcı olabilir. Askorbik asit (ASA), GSH gibi ROS’ların aşırı birikimi sonucu hücrelerde meydana gelen hasarı engelleyen güçlü ve suda çözünebilir bir antioksidandır (Zhou *et al.* 2008). Bütün bitkisel dokularda oluşmasına rağmen genellikle fotosentetik ve meristematik hücrelerde daha yüksektir. ASA, normal koşullar altındaki bitkilerin yaprak ve kloroplastlarında çoğunlukla indirgenmiş formda bulunur. Total ASA’nın %30-%40’ı kloroplastta ve stromada bulunur (Smirnoff, 2000). ASA, enzimatik ve enzimatik olmayan birçok reaksiyonda elektron vericisi olarak görev yaptığından güçlü bir ROS süpürücüsü olarak kabul edilmektedir. Askorbat, süperoksit ve hidroksil radikallerinin süpürülmesi ve tokofroksil radikalinden alfa-tokoferol un yeniden oluşumunda rol oynamasından dolayı hücre membranlarının korunmasını sağlayabilir. ASA’nın ASA-GSH döngüsündeki görevine ek olarak prostetik geçiş metal iyonlarını içeren enzimlerin aktivitelerinin korunmasında da önemli rol oynarlar (Noctor and Foyer 1998). Yang vd (2005) yüksek ışık ve kuraklık koşullarında *Cassia tora* fidelerinde ASA miktarının arttığını rapor etmişlerdir. Benzer olarak Agarwal (2007)’da UV-B stresine bağlı olarak *Cassia angustifolia* fidelerinde ASA’nın arttığını rapor etmiştir. Bu çalışmalarda bitkilerdeki ASA artışı, strese toleranstaki artışla ilişkilendirilmiştir. Mevcut çalışmamızda da ASA miktarı tek başına civa uygulamasında kontrole göre köklerde azalmış, ancak yapraklarda artmıştır. SNP+civa grubunda ise tek başına civa uygulamasına göre hem kök hem de yapraklarda önemli oranda artmıştır (Çizelge 4.17). Yapılan bazı çalışmalarda arsenik, kadmiyum gibi ağır metallerin toksisitesine karşı NO’nun bitkilerde ASA ve GSH miktarlarını artırdığı rapor edilmiştir (Hsu and Kao 2004; Laspina *et al.* 2005). Bu bulgulara göre, mısır bitkisine Hg stresi önceisinde uygulanan NO, enzimatik olmayan sistem parametrelerinden hem GSH hem de ASA seviyelerini artırarak, enzimatik antioksidan sisteme destek olarak, bitkinin antioksidatif kapasitesini artırabilmektedir.

SOD, CAT, APX ve GR gibi çeşitli antioksidan enzimler bitkilerde hücresel homeostazinin devamını ve ROS süpürülmesi görevlerini koordineli bir şekilde yaparlar (Gill and Tuteja 2010). Bu enzimler genellikle birbirlerine göre uyumlu bir şekilde

düzenlenebilirler. Çevresel stresler hücre ve dokularda ROS birikimini artırır ve bu durum antioksidan enzimleri kodlayan genlerin ifade oranlarında değişim sağlayabilir (Michiels *et al.* 1994). Yaygın olarak CAT, SOD ve POX genlerinin tuzluluk, kuraklık ve aşırı sulama gibi streslerde nasıl değişime uğradığı araştırılmıştır (Ma *et al.* 2003; Park *et al.* 2003; Tsai *et al.* 2005; Lin *et al.* 2007; Xing *et al.* 2007). Mevcut çalışmamızda da; SOD4, CAT-1, FSD1, SOD 9 ve APX genleri kök ve yapraklarda farklı şekillerde ifade olmuştur. Kök kısmında kontrol grubuna göre tek başına civa toksisitesi ile SOD4 ve CAT-1 genlerinin ifadeleri artmıştır (up-regulasyon) (Şekil). FSD1, SOD 9 ve APX genlerinin ifade oranları civa toksisitesi altındaki bitkilerde azalmıştır (down regulasyon) (Şekil). Bununla birlikte köklerde SNP etkisiyle FSD1, SOD4, CAT-1 ve APX genlerinin up regule olduğu ancak SOD9 geninin ise down-regule olduğu belirlenmiştir (Şekil). Yaprak kısmında kontrol grubuna göre tek başına civa toksisitesi ile CAT-1, SOD4, FSD1 ve SOD 9 genlerinin ifade oranlarının arttığı belirlenirken, APX geni ise normal kontrole göre down-regule olduğu belirlenmiştir (Şekil). SNP etkisiyle FSD1 geninin önemli oranda ifadesinin arttığı, diğer genlerin ise ifade oranlarının down-regule oldukları tespit edilmiştir (Şekil). Köklerde ve yapraklarda SNP uygulanan bitkilerde civa toksisitesinin neden olduğu H₂O₂ seviyesi önemli oranda düşürülmesinin nedeni aktive olmuş CAT ve APX enzimleri olabilir. Bununla birlikte CAT-1 ve APX genlerinin ifadeleri de özellikle köklerde artmıştır. Küçük bir protein ailesini farklı şekilde kodlayan katalaz genlerinin ifade olmaları *Arabidopsis*, çeltik, marul ve biber bitkilerinde gelişme ve stresle ilişkili olarak düzenlendiği belirtilmiştir (Lee and An 2005; Kwon *et al.* 2007; Du *et al.* 2008; Joo *et al.* 2014). Çalışmamızda CAT-1 ve APX genlerinin ifadelerinin özellikle SNP uygulamaları ile artması daha önceki çalışmalarla uyum göstermiştir.

Fe-SOD fotosentetik aktivite ve oksidatif zarardan PSII'yi etkili bir şekilde koruduğu belirlenmiştir (Ribera-Fonseca *et al.* 2013; Huan *et al.* 2016). Bu çalışmada özellikle yapraklarda SNP etkisiyle civa toksisitesi altındaki bitkilerde FSD1 geninin ifade oranının arttığı belirlenmiştir. FSD1 geninin yapraklarda ifadesinin artması oksidatif zarardan kloroplastında ayrıca korunduğu sonucuna varılabilir. SNP uygulaması ile yapraklarda belirlenen SOD enziminin yüksek aktivitesi ve süperoksit anyonunun

miktarının düşmesi FSD1 geninin transkripsiyonal düzenlenmesinden kaynaklanabilir. Civa toksisitesi altında SNP uygulaması ile FSD1, CAT-1 ve APX genlerinin ifade oranlarının artması reaktif oksijen

türlerinin süpürülmesinde rol olan antioksidan enzimlerinde aktivitelerini artırmış ve bu durum H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ oranlarında azalmaya neden olmuştur.

SOD4, CAT-1, FSD1, SOD 9 ve APX gibi antioksidan enzim genleri mısır bitkisinde civa toksisitesi ve NO ile transkripsiyonel olarak farklı şekillerde düzenlenmişlerdir. Ancak bu genlerin post-transkripsiyonel olarak mı yoksa post-translasyonel olarak mı ifade oldukları hala belli değildir. Bununla birlikte; civa toksisitesine tolerans ve bu esnada NO'nun rolü ile ilgili daha ileri çalışmalar yapılarak mısır bitkisinde başka yeni genlerin etkisi de incelenmelidir.

5.2. Sonuç

Araştırmada elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

- 1) Mısır bitkisinde (Zea mays cv. Arifiye-2) büyüme ve gelişim üzerinde %50 inhibisyona neden olan civa ($HgCl_2$) konsantrasyonunun $100 \mu M$ olduğu ve bu konsantrasyonun sebep olduğu toksisitenin yatıştırılmasında en uygun NO (SNP olarak) konsantrasyonunun $0.1 \mu M$ olduğu belirlenmiştir.
- 2) İçsel civa köklerde birikmiş ve yapraklara çok az taşınabilmiştir. Bu durum yüksek civa birikiminden dolayı köklerde hem oksidatif hasar hem de fizyolojik hasarın daha fazla oluşmasına neden olmuştur. Civanın mısır köklerinde aşırı birikmesine rağmen, yapraklara çok fazla taşınamaması, mısırın civa için hiperakümülatör bitki olabilme potansiyelini desteklemiştir.
- 3) Civa stresi, mısır fidelerinde çalışılan ROS seviyelerinin toksik düzeye çıkmasına neden olmuştur, ancak stres öncesi fidelere uygulanan SNP ROS seviyelerini düşürmüştür.
- 4) Lipid peroksidasyonu ve elektrolit geçirgenliği Hg uygulamasıyla artmış, ancak NO uygulaması hem iki parametrenin seviyesini düşürmüştür

- 5) Civa uygulaması bitki yaş-kuru ağırlık, bitki uzunluğu gibi fizyolojik parametreleri düşürmüştür. Hg'nin bu olumsuz etkisi özellikle kuru ağırlık üzerinde SNP uygulamasıyla iyileştirilebilmiştir.
- 6) Hg uygulaması, genelde klorofil, protein ve prolin içeriğini düşürmüştür. Hg'nin bu olumsuz etkisi Hg stresi öncesi uygulanan SNP ile iyileştirilebilmiştir.
- 7) Mısır fidelerine Hg uygulaması köklerde Mn, Ni, Zn, Na, K, Mg ve Ca içeriklerini düşürmüş, ancak Fe içeriğini artırmıştır. SNP+civa uygulaması Cu, Mn, Ni, Zn, K, Mg ve Ca içeriğini düşürmüştür. Yapraklarda ise Hg uygulaması Cu, Ni, Zn, Na, Mg ve Fe içeriklerini artırmış, ancak Mn ve Ca içeriğini azaltmıştır. SNP+civa uygulaması ise Cu, Mn ve K içeriklerin, artırırken; Ni, Zn, Na, Mg ve Fe içeriklerini düşürmüştür.
- 8) Bu uygulamada kök ve gövde SOD izoenzimleri belirlenmiştir. Bunun yanı sıra köklerde yapılan birçok tekrara rağmen CAT ve POD izoenzim bantları gözlenmemiştir.
- 9) Bitki köklerinde yapılan değerlendirmede çalışılan beş genin birbirlerinden farklı şekilde ifade oldukları belirlenmiştir. Kökte civa toksisitesi ile SOD4 ve CAT-1 genlerinin ifadeleri artmıştır (up-regulasyon). FSD1, SOD-9 ve APX genlerinin ifade oranları civa toksisitesi altındaki bitkilerde azalmıştır (down regulasyon). Civa stresi öncesinde uygulanan SNP, bitki köklerinde FSD1, SOD4, CAT-1 ve APX genlerinin upregule ederken, SOD9 geninin ise down-regule olmasına neden olmuştur.
- 10) Yapraklarda ise civa toksisitesi ile CAT-1, SOD4, FSD1 ve SOD 9 genlerinin ifade oranlarının arttığı belirlenirken, APX geninin down-regule olduğu belirlenmiştir. SNP uygulaması ile FSD1 geninin önemli oranda ifadesinin arttığı, diğer genlerin ise ifade oranlarının down-regule oldukları tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, mısır bitkisine civa stresine maruz kalmadan önce uygulanan NO, bir sinyal molekül olarak bitkide çalışılan fizyolojik, biyokimyasal parametreler ile gen seviyesinde cevap mekanizmalarını uyararak bitki toleransının artırılmasına önemli bir katkı yaptığı belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Aftab T, Khan M. M. A, Naeem M, Idrees M, Moinuddin, Teixeira da Silva J. A, Ram M. 2012. Exogenous nitric oxide donor protects *Artemisia annua* from oxidative stress generated by boron and aluminium toxicity. *Ecotox. Environ. Safe* 80, 60–68.
- Agarwal, S., Pandey V. 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*, *Biologia Plantarum*, 48(4), 555-560.
- Ahmad, P ., Sarwat, M., Sharma,S., 2008. Reactive Oxygen Species, Antioxidants and Signaling in Plants *Journal of Plant Biology*, May, 51 (3) ,167-173.
- Ali MB., Vajpayee P., Tripathi RD., Rai UN., Kumar A., Singh N., Behl HM., Singh SP. 2000. Mercury bioaccumulation induces oxidative stress and toxicity to submerged macrophyte *Potamogeton crispus* L., *Bull Environ Contam Toxicol*, 65:573–582.
- Ali, G., Srivastava, P.S. Ve Iqbal, M. 1998. Morphogenic response and proline content in *Bacopa monniera* culture grown under copper stress, *Plant Sci.*, 138, 191-195.
- Alia, P. And Saradhi, P. 1991. Proline accumulation under heavy metal stress, *J. Plant Physiol.*, 138, 554–558.
- Alscher; RG., Hess JL .1993. Antioxidants in higher plants. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Amaya, I., Botella, MA., Calle, M., Medina, M.I., Heredia, A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Quesada, MA., Valpuesta, V., 1999. Improved germination under osmotic stress or tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Lett*, (457), 80- 84
- Ananieva, EA., Alexieva VS., Popova LP. 2002. Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis, *J. Plant Physiol.*, 159, 685-693.
- Anderson, L., and Mansfield, T.A., 1979. The effects of nitric oxide pollution on the growth of tomato. *Environmental pollution*, 20, 113-121
- Angelini, R., and Federico R. 1989. Histochemical evidence of polyamin oxidation and generation of hydrogen peroxide in the cell wall, *J Plant Physiol*, 135, 212-217.
- Apel, K., and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, (55), 373–399.
- Arasimowicz-Jelonek, M., Floryszak-Wieczorek, J., Kubiś, J. 2009. Interaction between polyamine and nitric oxide signaling in adaptive responses to drought in cucumber. *J Plant Growth Regul*, (28),177–18.
- Asada, K. 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* 141:391–396.
- Aytamka, E., 2005. Soya Fasulyesi (*Glycine max* L.) Bitkisinde Tuz Stresi ile Nitrik Oksit Arasındaki İlişki, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı Botanik Programı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Baccouch, S., Chaoui, A. And El Ferjani, E. 1998. Nickel induced oxidative damage and antioxidative responses in *Zea mays* shoots, *Plant Physiol. Biochem.*, 36, 689-694.

- Bakar, C., Baba, A. 2009. Metaller ve İnsan Sağlığı;Yirminci Yüzyıldan Bugüne ve Geleceğe Miras kalançevre Sağlığı Sorunları. 1. Tıbbi Jeoloji Çalıştayı, 30Ekim-1 Kasım. Ürgüp, Nevşehir, 162-185.
- Bakardjieva, N., and Christov K., 1996. Effect of calcium and zinc ions on the sensitivity of peroxidase from moses (*Mnium* sp.) And ferns (*Polydium vulgare*) to hight temperature. *Can. J. Bot.*, 74, 1665-1670.
- Banci, L., 1997. Structural properties of peroxidase. *J. Biotech.*, (53), 253-263.
- Barroso, J.B., Corpas, F.J., Carreras, A., Sandalio, L.M., Valderrama, R., Palma J.M., Lupianez, J.A. ve del RIO, L.A., 1999, Localization of Nitric Oxide Synthase in Plant Peroxisomes, *Journal of Biological Chemistry*, 274, 36729-36733.
- Baş L., Demet Ö. 1992. Çevresel Toksikoloji Yönünden Bazı Ağır Metaller, *Ekoloji Dergisi*, 5: 42-46.
- Bates LS., Waldren RP., and Teare ID. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies, *Plant and Soil*, 39, 205-207. Becher M., Talke IN., Krall L., Kramer U. 2004.Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*, *Plant J*, 37, 251–268.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. ve Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies, *Plant Soil*, 39, 205–207.
- Beligni MV., and Lamattina L. 2000. Nitric oxide stimulates seed germination and deetiolation and inhibits hypocotyl elongation, *Three Light-Inducible Responses in Plants*, *Planta*, 210, 215-221.
- Blokhina O., Virolainen, E., Fagersted, KV. 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany* . 91 (2): 179-194.
- Blum, A. 1986. *Plant Breeding for Stress Environments*, CRC Press, Boca Raton, USA.
- Bogoeva, I. 1998. Pigment content in cereal crops growth on copper polluted soil, *Bulg. J. Agr. Sci.*, 4 (6), 767-772.
- Boveris, A.D., Galatro, A., Puntarulo, S., 2000. Effect of nitric oxide and antioxidants on microsomal content of lipid radicals. *Biol Res*, 33, 159–165.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantition of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding analitic, *Biochemistry*, 72, 248-254,
- Bradl HB., Kim C., Kramar U., Stüben D. 2005. Heavy metals in the environment, *Interactions of Heavy Metals*, 119-124.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stresses, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, W. Gruissem, B. Buchanan, R. Jones (eds), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp. 158-1249.
- Bunkelmann, J.R., ve Trelease, R.N., 1996, Ascorbate peroxidase: a prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes, *Plant Physiol.*, 110, 589–598.
- Büyük, İ., Aydın, S., Aras., 2012. Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 69(2): 97-110.
- Campbell ,K.M.,1999. *Biochemistry* 3 rd Ed. New York: Academic press; 502, 618-638.
- Cargnelutti D., Tabaldi LA., Spanevello RM., Jucoski GO., Battisti V., Redin M., Linares CEB., Dressler VL., Flores MM., Nicoloso FT., Morsch VM., Schetinger MRC. 2006. Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedlings, *Chemosphere*, 65, 999–1006.

- Castro-Gonzalez, MI, Mendez-Armenta M. 2008. Heavy metals: Implications associated to fish consumption, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26, 263-271.
- Chaudiere, J., and Ferrari-Iliou, R., 1999. Intracellular antioxidants from chemical to biochemical mechanism. *Food Chem. Toxicol.*, 37, 949-962.
- Chen F., Wang F., Sun H., Cai Y., Mao W., Zhang G., Vincze E., Wu F. 2010. Genotype-dependent effect of exogenous nitric oxide on Cd-induced changes in antioxidative metabolism, ultrastructure, and photosynthetic performance in barley seedlings (*Hordeum vulgare*), *J. Plant Growth Regul.*, 29, 394–408.
- Chen J., Shiyab S., Han FX., Monts DL., Waggoner CA., Yang Z., Su Y. 2009. Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Pteris vittata* and *Nephrolepis exaltata*, *Ecotoxicology*, 18:110–121.
- Chen J., Yang ZM. 2012. Mercury toxicity, molecular response and tolerance in higher plants, *Biometals*, 25, 847–857.
- Cho UH., Park JO. 2000. Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings, *Plant Sci*, 156:1–9.
- Chopra, RK., Solete, DS. 2007. Acclimation To Drought Stress Generates Oxidative Stress Tolerance In Drought-Resistant Than -Susceptible Wheat Cultivar Under Field Conditions. *Environmental and Experimental Botany* 60 , 276–283.
- Clarke, A., Desikan, R., Hurst, R.D., Hancock, J.T. ve Neill, S.J., 2000, NO Way Back: Nitric Oxide and Programmed Cell Death in *Arabidopsis thaliana* Suspension Cultures, *Plant Journal*, (24), 667-677.
- Cooney, R.V., Harwood, P.J., Custer, L.J. and Franke, A.A., 1994. Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environ Health Perspect.* 102(5):460-2.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Carreras, A., Quiro's, M., Leo'n, A.M., Romero-Puertas, M.C., Esteban, F.J., Valderrama, R., Palma, J.M., Sandalio, L.M., 2004. Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol*, 136, 2722–2733
- Costa S., Crespo D., Henriques B., Pereira E., Duarte A., Pardal M. 2011. Kinetics of mercury accumulation and its effects on *Ulva lactuca* growth rate at two salinities and exposure conditions, *Water Air Soil Pollution*, 217:689–699.
- Cui XM., Zhang YK., Wu XB., Liu CS. 2010. The investigation of the alleviated effect of copper toxicity by exogenous nitric oxide in tomato plants, *Plant Soil Environ.* (56), 274–281.
- Cui, X.M., Zhang, Y.K., Wu, X.B., Liu, C.S. 2010. The investigation of the alleviated effect of copper toxicity by exogenous nitric oxide in tomato plants. *Plant Soil Environ.* (56), 274–281.
- Cuypers, A., Koistinen, K.M., Kokko, H., Kärenlampi, S., Auriola, S. And Vangronsveld, J. 2005. Analysis of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins affected by copper stress, *Journal of Plant Physiology*, 162, 383-392.
- D'Souza Myrene, R., & Devaraj, V. R. 2013. Mercury-induced changes in growth and oxidative metabolism of Field bean (*Dolichos lablab*). *Research Journal of Chemistry and Environment*. Vol.17 (9), 86-93.
- Çevre ve Orman Bakanlığı, Civa Kirliliğinin Çevre ve Sağlık Üzerine Etkileri, <http://www.cevreorman.gov.tr/mozturk> (2006).

- Çulha, Ş., Çakırlar, H. 2011. Effect of Salt Stress Induced by NaCl on Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Cultivars at Early Seedling Stages. *Hacettepe Journal Biology. & Chemistry.*, 2011, 39 (1), 61–64.
- Dat, J.F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C.H., and Scott, I.M. 1998. Parallel changes in H_2O_2 and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol.*, 116, 1351-1357.
- Dean, J.V. and Harper, J.E., 1986. Nitric Oxide and Nitrous Oxide Production by Soybean and Winged Bean During the in vivo Nitrate Reductase Assay, *Plant Physiology*, 82:718-723.
- Dehon, L., Macheix, J.J., ve Durand, M., 2002, Involvement of peroxidases in the formation of the brown coloration of heartwood in *Juglans nigra*, *J. Exp. Bot.*, 53, 303–311.
- Delledonne, M., 2005. NO News is Good News for Plants, *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 1-7.
- Desikan, R., Hancock, J.T., Bright, J., Harrison, J., Weir, I., Hooley, R., Neill, S.J., 2005. A role for ETR1 in hydrogen peroxide signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.*, 137, 831–83.
- Desikan, R., Hancock, J.T., Bright, J., Harrison, J., Weir, I., Hooley, R., Neill, S.J. 2005. A role for ETR1 in hydrogen peroxide signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.*, 137, 831–836.
- Devi, S.R. ve Prasad, M.N.V. 1998. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: Responses of antioxidant enzymes and antioxidants, *Plant Sci.*, 138, 157-165.
- Dhindsa, R., Plumb-Dhindsa, P., ve Thorpe, T., 1981, Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase, *J. Exp. Bot.*, 32, 93–101.
- Ding Y., Chen Z., Zhu C. 2011. Microarray-based analysis of cadmium-responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*), *J Exp Bot*, 62, 3563–3573.
- Du X., Zhu YG., Liu WJ., Zhao XS. 2005. Uptake of mercury (Hg) by seedlings of rice (*Oryza sativa* L.) grown in solution culture and interactions with arsenate uptake, *Environ Exp Bot*, 54:1–7.
- Du Y-Y, Wang P-C, Chen J, Song C-P (2008) Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *J Integr Plant Biol* 50:1318–1326
- Durmuş, N., 2003. Büyümeyi düzenleyici maddelerin oksidatif stres üzerine etkileri. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Durner J. and Klessig DF. 1999. Nitric Oxide as a Signal in Plants, *Current Opinion in Plant Biology*, (2), 369-374.
- Erdei, S., Hegedüs, A., Hauptmann, G., Szalai, J., ve Horvath, G., 2002, Heavy metal induced physiological changes in the antioxidative response system, *Acta Biol Szeged*, 46 3–4, 89–90.
- Ericksen JA., Gustin MS. 2004. Foliar exchange of mercury as function of soil and air mercury concentrations, *Sci Total Environ*, 324, 271–279,
- Eryılmaz, 2007. Bakır (Cu) uygulanmış mısır (*Zea mays*) fidelerindeki antioksidan aktivitelerin fizyolojik ve anatomik yönden incelenmesi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

- Esim N. 2011. Nitrik oksitin mısır da (*Zea mays*) düşük sıcaklık stresine toleransı üzerine etkisi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Esteban E., Moreno E., Penalosa J., Cabrero JI., Millan R., Zornoza P. 2008., Short and long-term uptake of Hg in white lupin plants: kinetics and stress indicators, *Environ Exp Bot*, 62, 316–322.
- Eyidoğan, F.D., Öktem H.A., Yücel, M., 2003. Superoxide dismutase activity in salt stressed wheat seedlings. *Acta Physiologia Plantarum*, 25, 263-269.
- Ezeh, AC., Bongaarts, J., Mberu, B. 2012. Global population trends and policy options. *Lancet* 380: 142–48.
- Fang, W.C. and Kao, C.H. 2000. Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc, *Plant Sci.*, 158, 71-76.
- Foyer C.H., Noctor G. 2005. Redox homeostasis and anti-oxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses., *Plant Cell*, 17, 1866– 1875.
- Foyer, C.H., Halliwell, B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, (133), 21-25.
- Frankart, C., Eullaffroy, P. Ve Vernet, G. 2002. Photosynthetic responses of *Lemna minor* exposed to xenobiotics, copper, and their combinations, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 53, 439–445.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annu. Rev. Biochem.*, 64, 97-112.
- Gallego, S.M., Benavides, M.P. and Tomaro, M.L. 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress *Plant Sci.*, 121 (2), 151-159.
- Gao S., Ou-yang C., Tang L., Zhu JQ., Xu Y., Wang SH., Chen F. 2010. Growth and antioxidant responses in *Jatropha curcas* seedling exposed to mercury toxicity, *J Hazard Mater* 182-(516): 591–597,
- Garcia-Mata C., and Lamattina L. 2001. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress, *Plant Physiology*, 126, 1196–1204,
- Ge, C., Ding Y., Wang Z., Wan D., Wang Y., Shang Q., Luo S. 2009. Responses of wheat seedlings to cadmium, mercury and trichlorobenzene stresses, *J Environ Sci*, 21, 806–813,
- Gechev, T., Gadjev I., Breusegem F. V., Inze D., Dukiandjiev S., Taneve V., Minkov I. 2002. Hydrogen peroxide protect tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *CMLS*, 59, 708-714.
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48:909–930
- Gill SS., Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48, 909–930.
- Gorfer M., Persak H., Berger H., Brynda S., Bandian D., Strauss J. 2009., Identification of heavy metal regulated genes from the root associated ascomycete *Cadophora finlandica* using a genomic microarray, *Mycol Res*, 113, 1377–1388.

- Guo, T.R., Zhang, G.P. Ve Zhang, Y.H. 2007. Physiological changes in barley plants under combined toxicity of aluminum, copper and cadmium, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 57 (2), 182-188.
- Gupta, R.C. 2007. Mercury, *Veterinary Toxicology*, Elsevier Inc., India, 442-448
- Gutteridge, J.M. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage, *Clin. Chem.*, 41, 1819-1828.
- Güler Ç., Çobanoğlu Z. 1997. Kimyasallar ve Çevre, Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi 50, 9-51
- Güven A., Kahvecioğlu Ö., Kartal G., Timur S. 2004. Metallerin Çevresel Etkileri-III, *Metallurji Dergisi*, 138, 64-71.
- Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* (141), 312-322.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. 1999. Free radicals in biology and medicine, Oxford university press, Oxford. Aust, S.D., Morehouse, L.A., and Thomas, C.E. 1985. Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free Radical. Biol. Med.*, (1), 3-25.
- Han FX., Banin A., Su Y., Monts DL., Plodinec MJ., Kingery WL., Triplett GE. 2002. Industrial age anthropogenic inputs of heavy metals into the pedosphere, *Naturwissenschaften*, 89:497-504.
- Han FX., Su Y., Monts DL., Waggoner CA., Plodinec MJ. 2006. Binding, distribution, and plant uptake of mercury in a soil from *Oak ridge*, Tennessee, USA, *Sci Total Environ*, 368:753-768.
- Haynes, D.W., 1986, Stratiform copper deposits hosted by low-energy sediments: II. Nature of source rocks and composition of metal-transporting water: *Economic Geology*, v. 81, 266-286
- Heaton ACP., Rugh CL., Wang NJ., Meagher RB. 2005. Physiological responses of transgenic merA-tobacco (*Nicotiana tabacum*) to foliar and root mercury exposure, *Water Air Soil Pollution*, 161:137-155.
- Heidenreich B., Mayer K., Sandermann JR., Ernst D. 2001. Mercury-induced genes in *Arabidopsis thaliana*: identification of induced genes upon long-term mercuric ion exposure, *Plant, Cell Environ*, 24, 1227-1234.
- Henry, Y.A., Ducastel, B. And Guissani, A., 1997. Basic Chemistry of Nitric Oxide and Related Nitrogen Oxides, *Nitric Oxide Research From Chemistry To Biology*, Landes Co . Biomed. Publ, Austin, USA, 15-46.
- Herbette S., Taconnat L., Hugouvieux V., Piette L., Magniette ML., Cuine S., Auroy P., Richaud P., Forestier C., Bourguignon J., Renou JP., Vavasseur A., Leonhardt N. 2006. Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots. *Biochimie* 88, 1751-1765.
- Horemans, N., Foyers, C.H. and Asard, H., 2000, Transport and action of ascorbate at the plasma membrane, *Trends Plant Sci.*, 5, 263-267
- Houston MC. 2011., Role of mercury toxicity in hypertension, cardiovascular disease, and stroke, *The Journal of Clinical Hypertension*, 13 (8), 621-627.
- Hsieh JL., Chen CY., Chiu MH., Chein MF., Chang JS., Endo G., Huang CC. (2009)., Expressing a bacterial mercuric ion binding protein in plant for phytoremediation of heavy metals, *J Hazard Mater* 161, 920-925.
- Hsu, Y.T., Kao, C.H. 2004. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regul.* 42, 227-238.

- Hu, X., Fang, J., Cai, W., Tang, Z., 2003. NO-mediated hypersensitive responses of rice suspension cultures induced by incompatible elicitor. *Chinese Science Bulletin*, 48, 358–363.
- Huaifu, F., Shirong, G., Yansheng, J., Runhuna, Z. and Juan, L. 2007. Effects of exogenous nitric oxide on growth, active oxygen species metabolism and photosynthetic characteristics in cucumber seedlings under NaCl stres. *Front. Agric. China*, (1), 308-314.
- Huan, C., Jiang, L., An, X., Yu, M., Xu, Y., Ma, R., & Yu, Z. (2016). Potential role of reactive oxygen species and antioxidant genes in the regulation of peach fruit development and ripening. *Plant Physiology and Biochemistry*, 104, 294-303.
- Huang, X., Von Rad, U., Durner, J., 2002. Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta*, 215, 914–923
- Hufton, C.A., Besford, R.T. and Wellburn, A.R., 1996. Effects of NO (+NO₂) Pollution on Growth, Nitrate Reductase Activities and Associated Protein Contents in Glasshouse Lettuce Grown Hydroponically in Winter CO₂ Enrichment, *New Phytologist*, (133), 495-501
- Israr M., Sahi S., Datta R., Sarkar D. 2006. Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*. *Chemosphere* 65, 591–598.
- Jaleel, C.A., Sankar, B., Sridharan, R., Panneerselvam, R., 2008. Soil salinity alters growth, chlorophyll content, and secondary metabolite accumulation in *Catharanthus roseus*. *Turk. J. Biol.*, (32), 79–83.
- Jones, H.G. and Jones, M.B. 1989. Introduction: some terminology and common mechanisms, *Plants Under Stress*, H.G. Jones, T.J. Flowers, M.B. Jones (eds), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-10.
- Jones-Rhoades MW., Bartel DP., Bartel B. 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants, *Ann Rev Plant Biol*, 57, 19–53.
- Joo J, Lee YH, Song SI (2014) Rice CatA, CatB, and CatC are involved in environmental stress response, root growth, and photorespiration, respectively. *J Plant Biol* 57:375–382
- K. Lenti., Fodor, F., B. Böddi. 2002. Mercury Inhibits the Activity of the NADPH:Protochlorophyllide Oxidoreductase (POR). *Photosynthetica* Volume 40, Issue 1, pp 145–151.
- Kaya, Y., 2008. Tohumlu Bitkiler. Erzurum.
- Kazemi, N., Khavari-Nejad A.R., Fahimi, H., Saadatmand, S., Nejad-Sattari, T., 2010. Effects of exogenous salicylic acid and nitric oxide on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in leaves of *Brassica napus* L. under nickel stres. *Scientia Horticultura*, 126, 402–407.
- Kerkütlüoğlu, E., 2005. Mercimek (*Lens culinaris* medık.) Tohumlarının çimlenmesi ve erken fide büyümesi üzerine nitrik oksit (NO) etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.
- Kim, K.Y., Kwon S.Y., Lee H.S., Hur Y., Bang C.W., Choi K.S. and Kwak S.S., 2000. Differential expression of four sweet potato peroxidase genes in response to abscisic acid and ethephon. *Phytochemistry*, 54, 19-22.
- Kirbag-Zeng N, F. ve Munzuroglu, Ö. 2005. Fasulye fidelerinin (*Phaseolus vulgaris* L. Strike) klorofil ve karotinoid miktarı üzerine bazı ağır metallerin (Ni⁺², Co⁺², Cr⁺³, Zn⁺²) etkileri, *F.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17 (1), 164-172.

- Kopyra ,M., Gwóźdz, E.A. 2003. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Physiol Biochem* 41, 1011–1017.
- Kupper, H., Kupper, F. Ve Spiller, M. 1996. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants, *J. Exp. Bot.*, 47, 259-266.
- Kwon SI, Lee H, An SC (2007) Differential expression of three catalase genes in the small radish (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*). *Mol Cells* 24:37–44
- Laloue, H., Weber-Lofti, F., Lucau-Danila, A., ve Guillemat, P., 1997, Identification of ascorbate and guaiacol peroxidase in needle chloroplasts of spruce trees, *Plant Physiol. Biochem.*, 35, 341–346.
- Lamattina C., Garcia-Mata M., Pagnussat G. 2003. Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule, *Annuals Reviews Plant Biology*, (54) 109–136.
- Lamattina, C., Garcia-Mata, M., Graziano & G. Pagnussat. 2003. Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule. *Annuals Reviews Plant Biology* (54) 109–136.
- Lamattina, C., Garcia-Mata, M., Graziano & G. Pagnussat. 2003. Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule. *Annuals Reviews Plant Biology* (54) 109–136.
- Laspina, N.V., Groppa, M.D., Tomaro, M.L. and Benavides, M.P. 2005. Nitric Oxide Protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress, *Plant Science*, 168 (7), 252-260.
- Lea, U.S., Ten Hoopen, F., Provan, F., Kaiser, W.M., Meyer, C. And Lillo, C., 2004. Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in high nitrite excretion and NO emission from leaf and root tissue. *Planta*, 219, 59– 65
- Leshem, Y.Y., and Haramaty, E., 1996. The Characterisation and Contrasting Effects of the Nitric Oxide Free Radical in Vegetative Stress and Senescence of *Pisum sativum* Linn. *Foliage, Journal of Plant Physiology*, (148), 258-263
- Leshem, Y.Y., Haramaty,, E., Iluz, D., Malik, Z., Sofer, Y., and Roitman, L. 1997. Effect of Galactolipid Fluidity and Lipoxygenase Activity, *Plant Physiology and Biochemistry*, (35), 573-579.
- Li, Q.Y., Niu, H.B., Yin, J., Wang, M.B., Shao, H.B., Deng, D.Z., Chen, X.X., Ren, J.P., Li, Y.C. 2008. Protective role of exogenous nitric oxide against oxidative-stress induced by salt stress in barley (*Hordeum vulgare*). *Colloids and Surfaces B; Biointerfaces*, 65, 220-225.
- Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes, *Methods in Enzymology*, 148, 350-382.
- Lin K, Lo H, Lin C, Chan M (2007) Cloning and expression analysis of ascorbate peroxidase gene from eggplant under flooding stress. *Bot Stud* 48:25–34
- Liochev, S.I. and Fridovich, I. 2007. The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ Formation. *Free Radical Biology and Medicine*, 42 (10), 1465-1469.
- Liu Y., Wu R., Wan Q., Xie G., Bi Y. 2007. Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a pivotal role in nitric oxide-involved defense against oxidative stress under salt stress in red kidney bean roots, *Plant Cell Physiol* 48, 511–522.
- Liu,Y., Jiang,H., Zhao,Z., and An,L. 2010. Nitric oxide synthase like activity-dependent nitric oxide production protects against chilling induced oxidative damage in

- Chorispora bungeana* suspension cultured cells. Plant physiology and Biochemistry. 48, 936-944.
- Madhava Rao KV., Sresty,TV.2000. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Sci.* ;157(1):113-128.
- Mahajan, S., Tuteja, Narendra. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview, Archives of Biochemistry and Biophysics, 444, 139-158.
- Marschner ,H., 1995. Mineral nutrition of higher plants, 2nd edn. San Diego: Academic Pres. McClung ,C.R.,1997. Regulation of catalases in Arabidopsis. Free Radicals in Biology and Medicine 23, 489-494.
- Meng DK., Chen J., Yang ZM. 2011. Enhancement of tolerance of Indian mustard (*Brassica juncea*) to mercury by carbonmonoxide. J Hazard Mater, 186:1823–1829.
- Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J (1994) Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. Free Radic Biol Med 17:235–248
- Millhollen AG., Gustin MS., Obrist D. 2006. Foliar mercury accumulation and exchange for three tree species. Environ Sci Technol 40: 6001–6006.
- Minibaeva, F.V. and Gordon L.Kh., 2003a. Superoxide production and the activity of extracellular peroxidase in plant tissues under stress conditions. Russ. J. Of Plant Physiology, 50(3), 411-416.
- Mittler, R., 2006, Abiotic stress, the field environment and stress combination, Trends Plant Sci., 11, 15-19.
- Mocquot, B., Vangrosveld, J., Clijsters, H.M.M. Ve Mench, M. 1996. Copper toxicity in young maize (*Zea mays* L.) plants: Effects on growth, mineral and chlorophyll contents and enzyme activities, Plant Soil, 182, 287-300.
- Navrot, N., Rouhier R., Gelhaye, E., Jacquot, JP.2007. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. Physiologia Plantarum 129: 185–195.
- Neill SJ., Desikan R., and Hancock JT. 2003. Nitric Oxide signalling in plants, New Phytologist, 159, 1469-1481.
- Neill, S.J., Desikan, R. Ve Hancock, J.T., 2003, Nitric Oxide Signalling in Plants, New Phytologist, 159, 1469-1481.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hancock, J.T., 2002b. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signalling in stomatal guard cells. Plant Physiol., 128,13–16.
- Neto, A.D.A., Prisco, J.T., En'eas-Filho, J. 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. Brazilian Journal of Plant Physiology, 56, 87–94.
- Ninneman, H. Ve Maier, J., 1996, Indication for the Occurrence of Nitric Oxide Synthase in Fungi and Plants and the Involvement in Photoconidiation of *Neurospora crassa*, Photochemistry Photobiology,(64), 393-398.
- Niu Z., Zhang X., Wang Z., Ci Z. 2011. Field controlled experiemtns of mercury accumulation in crops from air and soil. Environ Pollut 159, 2684–2689.
- Noctor G., and Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control, Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology, 49, 249-279.

- Oral, B., 2003. Salisilik asit ve düşük sıcaklıkların ıspanak yapraklarında nitrat redüktaz, katalaz ve peroksidaz aktivitesi ve donma hasarı seviyesi üzerine etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum
- Ortega-Villasante C., Hernandez LE., Rellan-Alvarez R., Del Campo FF., Carpena-Ruiz RO. 2007. Rapid alteration of cellular redox homeostasis upon exposure to cadmium and mercury in alfalfa seedlings. *New Phytol* 176, 96–107.
- Park SY, Ryu SH, Kwon SY, Lee HS, Kim JG, Kwak SS (2003) Differential expression of six novel peroxidase cDNAs from cell cultures of sweetpotato in response to stress. *Mol Genet Genom* 269:542–552
- Patra M., Sharma A. 2000. Mercury toxicity in plants. *Bot Rev*, 66, 379–422.
- Pattanayak, D., and Chatterjee, S. R., 1999. Inactivation of Sunflower NADH:Nitrate Reductase by White Light-Activated Rose Bengal. *Molecular Cell Biology Research Communications*.1(3), 41–45.
- Patykowski, J., and Urbanek, H., 2003. Activity of enzymes related to H₂O₂ generation and metabolism in leaf apoplastic fraction of tomato leaves infected with *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology*, (151), 153–161.
- Pedroso, M.C. and Durzan, D.J., 2000. Effect of Different Gravity Environments on DNA Fragmentation and Cell death in *Kalanchoë* Leaves, *Ann. Bot.*, 86:983–994.
- Pedroso, M.C. and Durzan, D.J., 2000. Effect of Different Gravity Environments on DNA Fragmentation and Cell death in *Kalanchoë* Leaves, *Ann. Bot.*, 86:983–994
- Pedroso, M.C., Magalhaes, J.R. ve Durzan, D.J., 2000b. Nitric oxide induces cell death in *Taxus* cells, *Plant Sci.*, (157), 173–180.,
- Peng, H.-Y., Yang, X.-E., Yang, M.-J. ve Tian, S.-K. 2006. Responses of antioxidant enzyme system to copper toxicity and copper detoxification in the leaves of *Elsholtzia splendens*, *J. Plant Nutrition* 29, 1619-1635.
- Perales-Vela, H.V., González-Moreno, S., Montes-Horcasitas, C. ve Cañizares-Villanueva, R.O. 2007. Growth, photosynthetic and respiratory responses to sub-lethal copper concentrations in *Scenedesmus incrassatulus* (*Chlorophyceae*), *Chemosphere*, 67 (11), 2274-2281.
- Phillips JR., Dalmay T., Bartels D. 2007. The role of small RNAs in abiotic stres, *FEBS Lett* , 581, 3592–3597.
- Posmyk, M.M., Bailly C., Szafranska K., Janas K.M., Corbineau F. 2005. Antioxidant enzymes and isoflavonoids in chilled soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seedlings, *J. Plant Physiol.*, (162), 403-412.
- Pryor, W.A. ,and Squadrito, G.L., 1995. The Chemistry of Peroxynitrite: a Product from the Reaction of Nitric Oxide with Superoxide?, *American Journal of Physiology*, 268, 699-700.
- Ribera-Fonseca, A., Inostroza-Blancheteau, C., Cartes, P., Rengel, Z., Mora, M., 2013. Early induction of Fe-SOD gene expression is involved in tolerance to Mn toxicity in perennial ryegrass. *Plant Physiol. Biochem.* 73, 77e82.
- Riberio, E.A., Cunha, F.Q., Tamashiro, W.M.S.C. ve Martins, I.S., 1999, Growth phasedependent Subcellular Localization of Nitric Oxide Synthase in Maize Cells, *FEBS Letters*, (445), 283-286.

- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J. Ve Kaiser, W.M., 2002. Regulation of Nitric Oxide (NO) Production by Plant Nitrate Reductase in vivo and in vitro, *Journal of Experimental Botany*, (53), 103-110.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J. Ve Kaiser, W.M., 2002. Regulation of Nitric Oxide (NO) Production by Plant Nitrate Reductase in vivo and in vitro, *Journal of Experimental Botany*, (53), 103-110.
- Rout JR., Sahoo SL. 2013., Antioxidant enzyme gene expression in response to copper stress in *Withania somnifera* L, *Plant Growth Regul*, 71, 95–99.
- Rugh CL., Senecoff JF., Meagher RB., Merkle SA. 1998. Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation, *Nat Biotechnol* 16, 925–928.
- Ruiz ON., Alvarez D., Torres C., Roman L., Daniell H. 2011. Metallothionein expression in chloroplasts enhances mercury accumulation and phytoremediation capability, *Plant Biotechnol J*, 9, 609–617.
- Sairam, R.K., Deshmukh, P.S., Saxena, D.C. 1998. Role of Antioxidant systems in wheat cultivars tolerance to water stress, *Biologia Plantarum (Biol. Plant.)*, 41, 387-394.
- Sambrook J., Fritsch EF., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Savenstrand H., Strid A. (2004)., Six genes strongly regulated by mercury in *Pisum sativum* roots. *Plant Physiol Biochem* 42:135–142.
- Scandalios , JG., Polidoros, AN., Mylona, PV.2001. Transgenic tobacco plants expressing the maize Cat2 gene have altered catalase levels that affect plant-pathogen interactions and resistance to oxidative stress. *Transgenic Research*. Volume 10, Issue 6, pp 555–569.
- Sen, S., ve Cheema, I.R.,1995, Nitric Oxide Synthase and Calmodulin Immunoreactivity in Plant Embryonic Tissue, *Biochemical Archives*, 11, 221-227.
- Sengar RS., Gautam M., Sengar K., Chaudhary R., Garg S. 2010. Physiological and metabolic effect of mercury accumulation in higher plants system, *Toxicological & Environmental Chemistry*, 92, 1265–1281.
- Sgherri CLM., Loggini B., Puliga S., and Navari-Izzo F. 1994. Antioxidant system in *Sporobolus stapfianus*: changes in response to desiccation and rehydration, *Phytochemistry*, 35(3), 561-565. Sgherri, C. L. M., & Navari-Izzo, F. 1995. Sunflower seedlings subjected to increasing water deficit stress: oxidative stress and defence mechanisms. *Physiologia Plantarum*, 93(1), 25-30.
- Shen Q., Jiang M., Li H., Che LL., Yang ZM. 2011. Expression of a *Brassica napus* heme oxygenase confers plant tolerance to mercury toxicity, *Plant, Cell Environ*, 34, 752–763.
- Shi Q., Ding F., Wang X., Wei M. 2007. Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress, *Plant Physiol Biochem*, 45, 542–550.
- Shiyab S., Chen J., Han FX., Monts DL., Matta FB., Gu M., Su Y., Masad MA. 2009. Mercury-induced oxidative stress in Indian mustard (*Brassica juncea* L.). *Environ Toxicol*, 24, 462–471,
- Siddiqui M.H., Al-Whaibi M.H., Basalah M.O., 2010. Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma*, 248(3):447-55.

- Sierra MJ., Millan R., Esteban E. 2009. Mercury uptake and distribution in *Lavandula stoechas* plants grown in soil from Almadén mining district (Spain). *Food Chemical Toxicol*, 47, 2761–2767.
- Singh B, Saxena AK, Chandan KK, Gupta DK, Bhutani KK, Anand KK (2001) Adaptogenic activity of a novel withanolide-free aqueous fraction from the roots of *Withania somnifera* Dunal. *Phytother Res* 15:311–318
- Lee SH, An SC (2005) Differential expression of three catalase genes in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Mol Cells* 20:247–255
- Singh HP., Batish DR., Kaur G., Arora K., Kohli RK. 2008. Nitric oxide (as sodium sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots, *Environ Exp Bot*, 63: 158-167.
- Singh P.H., Kaur S., Daizy R., Batish Ved P., Sharma N., Ravinder K. 2009. Nitric oxide alleviates arsenic toxicity by reducing oxidative damage in the roots of *Oryza sativa* (rice). *Nitric Oxide*, 20, 289–297.
- Singh, H.P., Batish, D.R., Kaur, G., Arora, K., Kohli, R.K. 2008. Nitric oxide (as sodium sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. *Environ. Exp. Bot.* 63, 158-167.
- Sinha, S., Gupta, M., Chandra, P. 1996. Bioaccumulation and biochemical effects of mercury in the plant *Bacopa monnieri* L. *Environ.*
- Smirnoff N., Conklin P.L., and Loewus F.A. 2001. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52, 437–467.
- Solomonson, L., Barber, M.J., 1990. Assimilatory nitrate reductase: Functional properties and regulation. *Ann. Rew. Plan Phys. And Plant Mol. Biol.*, 41, 225.
- Song L., Ding W., Zhao M., Sun B., Zhang L. 2006. Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed, *Plant Sci*, 171, 449–458.
- Stöhr, C., and Ullrich, W.R., 2002. Generation and Possible Roles of NO in Plant Roots and Their Apoplastic Space, *Journal of Experimental Botany*, 53:2293-2303.
- Streb, P., Shang W. And Feierabend J., 1999. Resistance to cold-hardened winter rye leaves (*Secale cereale* L.) To photo-oxidative stress. *Plant Cell and Environment*, 22, 1211- 1223.
- Suzuki, N., Mittler, R. 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum* Volume 126, Issue 1 Pages 45–51.
- Süzer, S., 2004, *Mısır Tarımı*, Trakya Tarımsal Enstitüsü Yayınları.
- Tanyolaç, D., Ekmekçi, Y. and Ünalın, S. 2007. Changes in photochemical and antioxidant enzyme activities in maize (*Zea mays* L.) leaves exposed to excess copper, *Chemosphere*, 67, 89-98.
- Tewari RK., Hahn EJ., Paek KY. 2008. Modulation of copper toxicity-induced oxidative damage by nitric oxide supply in the adventitious roots of *Panax ginseng*, *Plant Cell Reports* 27, 171–181.
- Tian QY., Sun DH., Zhao MG., Zhang WH. 2007. Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) underlies aluminum-induced inhibition of root elongation in *Hibiscus moscheutos*, *New Phytol*, 174, 322–331.

- Tilman, D., Balzer, C., Hill, J., Beford BL. 2011. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. PNAS | December 13, 2011 | vol. 108 | no. 50, 20261.
- Tsai Y, Hong C, Liu L, Kao CH (2005) Expression of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in roots of rice seedlings in response to NaCl and H₂O₂. J Plant Physiol 162:291–299
- Tsang, EW., Bowler, C., Hérouart, D, Camp W, Villarroel R, Genetello C, Montagu M, Inzé D. 1991. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. The Plant Cell Online Vol. 3, Issue 8.
- Uchida, A., Jagendorf, A.T., Hibino, T., Takabe, T., Takabe, T. 2002. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. Plant Sci 163, 515–523.
- Van de Mortel J., Schat H., Moerland PD., Ver Loren van Themaat E., van Der Ent S., Blankestijn H., Ghandilyan A., Tsiatsiani S. 2008. Expression differences for genes involved in lignin, glutathione and sulphate metabolism in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana* and the related Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerlescens*, Plant Cell Environ, 31:301-324.
- Van der Vliet, A., Eiserich, J.P., Kaur, H., Cross, C.E. and Halliwell, B., 1996. Nitrotyrosine as Biomarker for Reactive Nitrogen Species, In: Packer L, ed. Nitric Oxide, B. Physiological and Pathological Processes, Methods in Enzymology, 269, 175-184
- Vassilev, A. 1997. Analysis of the growth and photosynthetic activity in winter barley (*H. vulgare* L.) in condition of toxicity of Cd, PhD thesis, Inst. of Plant Physiol., Sofia.
- Venkatachalam P., Srivastava AK., Raghothama KG., Sahi SV. 2009. Genes induced in response to mercury-ion-exposure in heavy metal hyperaccumulator *Sesbania drummondii*, Environ Sci Technol, 43, 843–850.
- Vinit-Dunand, F., Epron, D., Alaoui-Sosse, B. Ve Badot, P.M. 2002. Effects of copper on growth and on photosynthesis of mature and expanding leaves in cucumber plants, Plant Sci., 163, 53–58.
- Vranova, E., Inze, D., Van Breusegem, F., 2002. Signal transduction during oxidative stress. J. Exp. Bot. 53, 1227-1236
- Vural N. 2005. Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 504-512, 521-532.
- Wahid A., Gelani S., Ashraf M , Foolad MR .2007. Heat tolerance in plants: An overview. Environmental and Experimental Botany 61 (2007) 199–223.
- Wang FJ., Zeng B., Sun ZX., Zhu C. 2009. Relationship between proline and Hg²⁺-induced oxidative stress in a tolerant rice mutant, Arch Environ Contam Toxicol, 56:723–731.
- Wang YD., Greger M. 2004. Clonal differences in mercury tolerance, accumulation, and distribution in willow, J Environ Qual, 33, 1779–1785.
- Wang YS., Yang ZM. 2005. Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L, Plant Cell Physiol, 46, 1915–1923.
- Wang, H-H., Huang J-J., Bi Rong. 2010. Nitrate reductase-dependent nitric oxide production is involved in aluminum tolerance in red kidney bean roots. Plant Science , 281–288.

- Wei YY., Zheng Q., Liu ZP., Yang ZM. 2011. Regulation of tolerance of *Chlamydomonas reinhardtii* to heavy metal toxicity by heme oxygenase-1 and carbon monoxide, *Plant Cell Physiol*, 52:1665–1675.
- Weitzberg, E., and Lundberg, J.O.N. (1998). Nonenzymatic nitric oxide production in humans. *Nitric Oxide* 2, 1–7.
- Wendehenne, D., A. Pugin, D. F. Klessig & J. Durner. 2001. Nitric oxide: comparative synthesis and signalling in animal and plant cells. *Trends in Plant Sciences*, 6, 177–183.
- WHO (World Health Organization), Elemental mercury and Inorganic mercury compounds: Human Health Aspects, Geneva, <http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad50.pdf> (2003).
- Wildt, J., Kley D, Rockel A, Rockel P, Segschneider HJ. 1997. Emission of NO from several higher plant species. *Journal of Geophysical Research* 102: 5919–5927.
- Willekens, H., Villarroel, R., Montagu, M.V., Inze, D., Camp, W.V., 1997. Molecular identification of catalases from *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *FEBS Letters*, 352, 79-83.
- Wright, A., Bubb, WA., Hawkins, CL., Davies MJ. 2002. Singlet Oxygen-mediated Protein Oxidation: Evidence for the Formation of Reactive Side Chain Peroxides on Tyrosine Residues. *Photochemistry and Photobiology*. Vol. 76, Issue 1, pg(s) 35-46 doi: 10.1562/0031-8655(2002)076<0035:SOMPOE>2.0.CO;2.
- Xing, H., Tan, L.L., An, L.Z., Zhao, Z.G., Wang, S.M., Zhang, C.L., 2004. Evidence for the involvement of nitric oxide and reactive oxygen species in osmotic stress tolerance of wheat seedlings: Inverse correlation between leaf abscisic acid accumulation and leaf water loss. *Plant Growth Regul.*, 42, 61-68.
- Xiong J., An L., Lu H., Zhu C. 2009. Exogenous nitric oxide enhances cadmium tolerance of rice by increasing pectin and hemicelluloses contents in root cell wall, *Planta*, 230: 755-765.
- Yadav, RK., Girke, T., Pasala, S., Xie, M., Reddy, GV. 2009. Gene expression map of the *Arabidopsis* shoot apical meristem stem cell niche. *PNAS*, vol. 106 no. 12 4941–4946.
- Yamaguchi H., Fukuoka H., Arao T., Ohyama A., Nunome T., Miyatake K., Negoro S. 2010. Gene expression analysis in cadmium-stressed roots of a low cadmium-accumulating solanaceous plant, *Solanum torvum*, *J Exp Bot*, 61, 423–437,
- Yamasaki, H., and Sakihama, Y., 2000, Simultaneous Production of Nitric Oxide and Peroxynitrite by Plant Nitrate Reductase: in vitro Evidence for the NR Dependent Formation, *FEBS Letters*, 468, 89-92
- Yu, C.C., Hung, K.T., Kao, C.H. 2005. Nitric oxide reduces Cu toxicity and Cu-induced NH_4^+ accumulation in rice leaves. *J Plant Physiol* (162), 1319–1330.
- Zengin, FK., Munzuroğlu, O. 2002. Toxic effects of cadmium (Cd^{++}) on metabolism of sunflower (*Helianthus annuus* L.) Seedlings. *Journal Acta Agriculturae Scandinavica, Section B Soil & Plant Science* Volume 56, 2006 - Issue 3.
- Zhang H., Li YH., Hu LY., Wang SH., Zhang FQ., Hu KD. 2008. Effects of exogenous nitric oxide donor on antioxidant metabolism in wheat leaves under aluminum stress, *Russian Journal of Plant Physiology*, 55, 469-474.
- Zhang LP., Mehta SK., Liu ZP., Yang, ZM. 2008. Copper-induced proline synthesis is associated with nitric oxide generation in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Cell Physiol*, 49, 411–419.

- Zhao MG., Tian QY., Zhang WH. 2007. Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*, *Plant Physiol*, 144, 206- 217.
- Zhou ZS., Huang SQ., Guo K., Mehta SK., Zhang PC., Yang ZM. 2007. Metabolic adaptations to mercury-induced oxidative stress in roots of *Medicago sativa* L, *J Inorganic Biochem*, 101,1–9.
- Zhou ZS., Wang SJ., Yang ZM. 2008. Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Chemosphere* 70, 1500–1509. · Ma C, Wang PP, Cao ZY, Zhao YX, Zhang H (2003) Cloning and differential gene expression of two catalases in *Suaeda salsa* in response to salt stress. *Acta Bot Sini* 45:93–97
- Zottini, M., Formentin, E., Scattolin, M., Carimi, F., Schiavo, F.L., Terzi, M., 2002. Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo. *FEBS Lett*, 515, 75–78.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Erzurum’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzurum’da tamamladı. 2008 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2012 yılında mezun oldu. 2013 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı ve halen öğrenimine devam etmektedir.

