



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**KADMİYUM STRESİNE MARUZ BIRAKILAN
BUĞDAY (*Triticum aestivum*) FİDELERİNDE
ANTIÖKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ
ÜZERİNE DIŞARIDAN UYGULANAN
GALLİK ASİTİN ETKİLERİ**

Münevver KABAĞÇI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Temmuz-2018
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ KABUL VE ONAYI

Münevver KABAKÇI tarafından hazırlanan “Kadmium stresine maruz bırakılan buğday (*Triticum aestivum*) fidelerinde antioksidan enzim aktiviteleri üzerine dışarıdan uygulanan gallik asitin etkileri” adlı tez çalışması 27/07/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof. Dr. Gökalp Özmen GÜLER

Danışman

Doç. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI

Üye

Doç. Dr. Evren YILDIZTUGAY

İmza

.....

.....

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. AHMET AVCI
FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Münevver KABAKÇI

27/07/2018

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KADMIYUM STRESİNE MARUZ BIRAKILAN BUĞDAY (*Triticum aestivum*) FİDELERİNDE ANTIOKSİDAN ENZİM AKTİVİTELERİ ÜZERİNE DIŞARIDAN UYGULANAN GALLİK ASİTİN ETKİLERİ

Münevver KABAĞCI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAĞCI

2018, 82 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Gökbalp Özmen GÜLER
Doç. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAĞCI
Doç. Dr. Evren YILDIZTUGAY

Bu çalışmada buğday yapraklarında kadmiyum ile uyarılan oksidatif strese karşı dışarıdan gallik asit (GLA) uygulamasının ağır metalin olumsuz etkilerini iyileştirmede etkili olup olmadığı araştırılmıştır. 100 and 200 µM kadmiyum (Cd) ve 0.25 ve 0.75 mM GLA su kültüründe yetiştirilen buğday fidelerine tek başına ya da kombinasyonlu formda 7 gün süresince uygulanmıştır. Örneklemeye yapılan gruplarda sürgün uzunluk, yaş ağırlık, kuru ağırlık, bağıl su içeriği (RWC), prolin miktarı (Pro), hidrojen peroksit (H₂O₂) birikimi, lipid peroksidasyon düzeyleri ve bazı enzimatik ya da enzimatik olmayan antioksidan aktiviteleri analiz edilmiştir. Cd stresine maruz bırakılan buğday fidelerinde büyüme parametreleri önemli düzeyde etkilenmiştir. Bu parametrelerdeki değişimin yüksek Cd konsantrasyonlarında daha yüksek düzeyde olduğu izlenmiştir. Sürgün uzunluk, yaş ağırlık ve kuru ağırlıkta gözlenen bu sonuca bağlı olarak buğday fidelerinin büyümesi (RGR) ciddi şekilde değişmiştir. Cd uygulanan gruplarda Pro miktarının azalmasının bir sonucu olarak yaprakların su içeriğinde de (RWC) azalma gözlenmiştir. Ağır metal uygulamasıyla birlikte süperoksit dizmutaz (SOD) aktivitesinde artış izlenmiştir. Bu enzimin aktivitesi sonucu oluşan H₂O₂ miktarı artmıştır. Artan bu radikal birikimi askorbat peroksidaz (APX) ile süpürülmüş ancak APX bu süreçte başarılı olamamıştır. Bu durumda stres uygulamasında buğday yapraklarının lipid peroksidasyon düzeyi (TBARS miktarı) artmıştır. Ancak dışarıdan uygulanan GLA uygulamaları, buğday fidelerinin büyüme parametrelerini (uzunluk ve yaş-kuru ağırlıklar), RGR ve yaprak RWC değerlerini iyileştirmiştir. Özellikle stres altında GLA uygulamalarının uyardığı RWC değerlerindeki artış Pro artışıyla da bağlantılıdır. GLA ve stres uygulanan gruplarda SOD artışıyla oluşturulan H₂O₂ antioksidan sistemin aktive edilmesiyle azaltılmıştır. Bu sistemde CAT ve POX enzimlerin aktivitesinde azalma ya da herhangi bir değişim gözlenmemesine rağmen, stres altında düşük GLA konsantrasyonları APX ve GR enzimlerin aktivitelerini uyarılabilmektedir. Böylece, Cd ile uyarılan oksidatif strese karşı korumasında özellikle düşük GLA konsantrasyonunun daha etkili olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Ağır metal, Antioksidan savunma sistemi, Gallik asit, Kadmiyum stresi, Ozmotik düzenlenme, *Triticum aestivum*

ABSTRACT

MS THESIS

THE EFFECTS OF EXOGENOUS GALLIC ACID ON ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITIES IN WHEAT (*Triticum aestivum*) SEEDLINGS EXPOSED TO CADMIUM STRESS

Munevver KABAĞCI

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMEĞİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN MOLECULAR BIOLOGY AND
GENETICS

Assoc. Doc. Dr. Ceyda OZFIDAN-KONAKCI

2018, 82 Pages

Jury

Prof. Dr. Gokalp Ozmen GULER
Doc. Dr. Ceyda OZFIDAN KONAKCI
Doc. Dr. Evren YILDIZTUGAY

In this study, it was investigated whether exogenously application of gallic acid (GLA) against cadmium-induced oxidative stress in wheat leaves is effective in alleviating the adverse effects of heavy metals. 100 and 200 μ M cadmium (Cd) and 0.25 and 0.75 mM GLA were treated alone or the combination form to wheat seedlings grown under hydroponic system for 7 days (d). In the harvesting groups, shoot length, shoot fresh weight, shoot dry weight, relative water content (RWC), proline content (Pro), hydrogen peroxide (H_2O_2) accumulation, lipid peroxidation levels and some enzymatic or non-enzymatic antioxidant activities were analyzed. The growth parameters were significantly affected in wheat seedlings subjected to the Cd stress. The change in these parameters was detected to be higher at higher Cd concentrations. Depending on this result observed in shoot length, fresh weight and dry weight, the growth of wheat seedlings (RGR) were markedly changed. A decrease in the water content of the leaves (RWC) was observed as a result of the reduction of Pro content in the Cd-treated groups. An increase in superoxide dismutase (SOD) activity was detected with heavy metal application. H_2O_2 content resulting from the activity of this enzyme increased. The increased accumulation of this radical was scavenged by ascorbate peroxidase (APX), but APX had not been successful in this process. In this case, the level of lipid peroxidation (TBARS content) of wheat leaves increased during stress application. However, exogenously applied GLA applications improved RGR, leaf RWC levels and the growth parameters (length and fresh-dry weights) of wheat seedlings. The increase in RWC levels induced by GLA treatments under stress was especially linked to the Pro increment. In GLA and stress-treated groups, H_2O_2 content generated with enhancement in SOD was reduced by activating of the antioxidant system. In this system, GLA concentrations under low stress treatment could be induced the activities of APX and GR enzymes, even though the activity of CAT and POX enzymes was not reduced or any change was observed. Therefore, it can be said that the low GLA concentration was particularly more effective in its protection against Cd-induced oxidative stress.

Keywords: Heavy metal, Antioxidant defense system, Gallic acid, Cadmium stress, Osmotic adjustment, *Triticum aestivum*

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında benden yardımlarını ve bilgisini hiç bir zaman esirgemeyen ve büyük özveri ve iyi niyetiyle çalışmamın tamamlanmasında büyük emeği olan sayın hocam Doç. Dr. Ceyda ÖZFİDAN KONAKÇI'ya teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez çalışmamın laboratuvar çalışmaları, yürütülmesinde ve sonuçların yorumlanması aşamasında büyük emekleri olan sayın hocamlarım Prof. Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK ve Doç. Dr. Evren YILDIZTUGAY'ya teşekkürlerimi bir borç bilirim. Laboratuvar çalışmalarımın yürütülmesi ve sonuçlarının alınmasında bana büyük yardımları olan sevgili arkadaşlarım Esmâ AÇIKEL, Işıl Ceyhan BAYCAN ve Hüseyin KARAHAN'a teşekkür ederim.

Eğitim ve öğretim hayatım boyunca beni hep destekleyen, benim başarımla mutlu olan ve bu konuda yardımlarını esirgemeyen, aile olmanın değerini ve önemini her fırsatta hatırlatan öncelikle sevgili babam, İsmail SAN'a, annem, Seniye SAN'a ve kardeşlerim, Merve DOĞANAY'ya, Beytullah SAN'a ve Tuğba SAN'a teşekkür ederim. Ayrıca tezimin yazım aşamasında manevi desteğini hep üzerimde hissettiğim ve beni her konuda tamamlayan sevgili eşim Samet KABAKÇI'ya teşekkür ederim.

Münevver KABAKÇI
KONYA-2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	6
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	32
3.1. Bitki Materyallerinin Temini ve Saklanması.....	32
3.2. Deneme Serilerinin Hazırlanması	32
3.2.1. Fidelere uygun gallik asit ve kadmiyum konsantrasyonunun belirlenmesi ..	32
3.2.2. Denemenin kurulması	33
3.3. Analiz Yöntemleri.....	34
3.4. Büyüme Parametrelerinin Belirlenmesi	34
3.4.1. Sürgünlerin yaş ağırlığı, kuru ağırlığı ve uzunluklarının belirlenmesi	34
3.4.2. Nisbi büyüme oranının belirlenmesi	34
3.5. Yaprak Bağıl Su İçeriğinin Belirlenmesi	35
3.6. Prolin Miktarının Belirlenmesi	35
3.7. ROS Miktarının Belirlenmesi	35
3.7.1. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarının belirlenmesi.....	35
3.8. Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi	36
3.9. Total Protein Miktarının Belirlenmesi	36
3.10. Antioksidan Enzim/İzozim Aktivitelerinin Belirlenmesi	36
3.10.1. Enzim ekstraktlarının hazırlanması	36
3.10.2. Antioksidan enzim/izozim aktivite analizleri	37
3.10.2.1. Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) enzim/izozim aktivitesinin belirlenmesi.....	37
3.10.2.2. Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) enzim aktivitesinin belirlenmesi	38
3.10.2.3. Peroksidaz (POX, EC 1.11.1.7) enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	38
3.10.2.4. Askorbat peroksidaz (APX, EC 1.11.1.11) enzim aktivitesinin belirlenmesi	38
3.10.2.5. Glutasyon redüktaz (GR, EC 1.6.4.2) enzim aktivitesinin belirlenmesi	39
3.11. İstatistiksel Analizler	39
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	40
4.1. Büyüme Parametreleri	40

4.1.1. Buğday fidelerinin yaş ağırlıkları	40
4.1.2. Buğday fidelerinin kuru ağırlıkları	41
4.1.3. Buğday fidelerinin uzunlukları	42
4.1.4. Buğday fidelerinin bağıl büyüme oranı	43
4.2. Buğday Yapraklarının Bağıl Su İçeriği	44
4.3. Buğday Yapraklarının Prolin Miktarı	45
4.4. Buğday Yapraklarının ROS Miktarı	46
4.4.1. Buğday yapraklarının H ₂ O ₂ miktarı.....	46
4.5. Buğday Yapraklarının Lipid Peroksidasyon Düzeyleri	47
4.6. Buğday Yapraklarının Antioksidan Enzim/İzozim Aktiviteleri	49
4.6.1. Buğday yapraklarının süperoksit dismutaz enzim/izozim aktivitesi	49
4.6.2. Buğday yapraklarının katalaz enzim aktivitesi	51
4.6.3. Buğday yapraklarının peroksidaz enzim aktivitesi	52
4.6.4. Buğday yapraklarının askorbat proksidaz enzim aktivitesi	53
4.6.5. Buğday yapraklarının glutatyon edüktaz enzim aktivitesi.....	54
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	55
5.1. Sonuçlar	55
5.2. Öneriler	56
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	69

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Ağır metaller tarafından reaktif oksijen türlerinin oluşumu.....	3
Şekil 1.2. Gallik asitin şikimik asit metabolik yolu ile üretilmesi.....	4
Şekil 2.1. Çevresel stres faktörleri ve bunların birbirleriyle olan ilişkisi.....	11
Şekil 2.2. Enerji transferi aracılığıyla ROS'ların üretimi.....	15
Şekil 2.3. Lipid peroksidasyonu mekanizmaları.....	19
Şekil 2.4. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemi.....	20
Şekil 2.5. Su-Su döngüsü ve Askorbat-Glutatyon döngüsü.....	22
Şekil 2.6. ROS'ların farklı doku ve organlarda sebep olduğu hasarlar.....	24
Şekil 2.7. Prolin biyosentez yolu. P5CS: $\Delta 1$ -prolin-5-karboksilat sentetaz, P5CR: $\Delta 1$ -prolin-5 karboksilat redüktaz.....	25
Şekil 2.8. Fenolik asitlerin genel kimyasal yapısı.....	26
Şekil 2.9. Gallik asitin kimyasal yapısı.....	27
Şekil 2.10. Gallik asitin sentez mekanizması.....	28
Şekil 2.11. Bitki materyalinin başak ve tanelerinin görüntüsü.....	31
Şekil 3.1. Denememizdeki 7 günlük buğday fidelerinin genel görünümü.....	33
Şekil 4.1. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 μ M) maruz bırakılan buğday (<i>Triticum aestivum</i>) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) sürgün yaş ağırlığı (YA, g) üzerine etkileri.....	40

Şekil 4.2. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 µM) maruz bırakılan buğday (<i>Triticum aestivum</i>) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) sürgün kuru ağırlığı (KA, mg) üzerine etkileri.....	41
Şekil 4.3. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 µM) maruz bırakılan buğday (<i>Triticum aestivum</i>) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) sürgün uzunluğu (cm) üzerine etkileri.....	42
Şekil 4.4. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 µM) maruz bırakılan buğday (<i>Triticum aestivum</i>) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) sürgün bağıl büyüme oranları (RGR, mg g ⁻¹ gün ⁻¹) üzerine etkileri.....	43
Şekil 4.5. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 µM) maruz bırakılan buğday (<i>Triticum aestivum</i>) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) yaprak su içeriği (RWC, %) üzerine etkileri.....	44
Şekil 4.6. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 µM) maruz bırakılan buğday (<i>Triticum aestivum</i>) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) yaprak prolin miktarı (Pro, µmol g ⁻¹ YA) üzerine etkileri.....	45
Şekil 4.7. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 µM) maruz bırakılan buğday (<i>Triticum aestivum</i>) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) hidrojen peroksit miktarı (H ₂ O ₂ , µmol g ⁻¹ YA) üzerine etkileri.....	46
Şekil 4.8. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 µM) maruz bırakılan buğday (<i>Triticum aestivum</i>) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) lipid peroksidasyonu (TBARS, nmol g ⁻¹ YA) üzerine etkileri.....	47
Şekil 4.9. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 µM) maruz bırakılan buğday (<i>Triticum aestivum</i>) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) SOD izozim ve total SOD aktivitesi (Unit mg ⁻¹ protein) üzerine etkileri.....	49

Şekil 4.10. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 µM) maruz bırakılan buğday (*Triticum aestivum*) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) total katalaz aktivitesi (CAT, Unit mg⁻¹ protein) üzerine etkileri.....51

Şekil 4.11. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 µM) maruz bırakılan buğday (*Triticum aestivum*) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) total peroksidaz aktivitesi (POX, Unit mg⁻¹ protein) üzerine etkileri.....52

Şekil 4.12. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 µM) maruz bırakılan buğday (*Triticum aestivum*) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) total askorbat peroksidaz aktivitesi (APX, Unit mg⁻¹ protein) üzerine etkileri.....53

Şekil 4.13. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 µM) maruz bırakılan buğday (*Triticum aestivum*) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) total glutatyon redüktaz aktivitesi (GR, Unit mg⁻¹ protein) üzerine etkileri.....54

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2.1. Oksidatif strese sebep olan reaktif türleri.....14

Çizelge 2.2. Bitkilerde ROS'ların üretim, süpürme ve kaçınma mekanizmaları.....16



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%: Yüzde
·OH: Hidroksil radikali
H₂O₂: Hidrojen peroksit
O₂[·]: Süperoksit radikali

Kısaltmalar

L: Litre
m: Metre
mM: mili molar
μM: mikro molar
AsA: Askorbik asit
APX: Askorbat peroksidaz
CAT: Katalaz
DHAR: Dehidroaskorbat redüktaz
GLA: Gallik asit
GOPX: Guaikol peroksidaz
GPX: Glutasyon peroksidaz
GR: Glutasyon redüktaz
GSH: Glutasyon
GSSG: Okside glutasyon
GST: Glutasyon-S-Transferaz
KA: Kuru ağırlık
KA: Kuru Ağırlık
MDA: Malondialdehit
MDHAR: Monodehidroaskorbat redüktaz
POX: Peroksidaz
PSII: Fotosistem II
ROS: Reaktif oksijen türleri
RuBPCase: Ribuloz bifosfat karboksilaz
SOD: Süperoksit dismutaz
YA: Yaş ağırlık

1. GİRİŞ

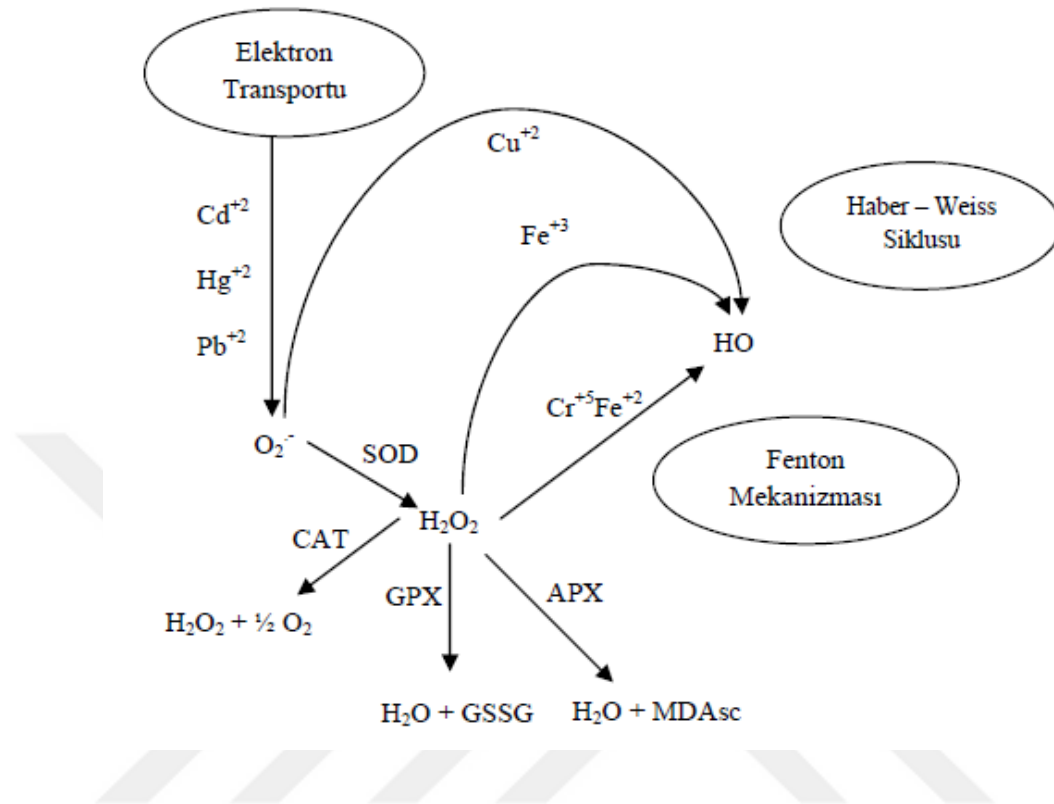
Toprakta ağır metal kirlenmesi önemli bir küresel problemdir. Kentleşme, sanayileşme ve pestisit kullanımını içeren antropojenik faaliyetler dünyadaki ekili alanlarda istenmeyen ağır metallerin birikmesine yol açar. Ağır metal kirliliği endüstriyel ve tarımsal faaliyetler sonucunda son yıllarda başlıca çevre sorunlarından biri haline gelmiştir. Aşırı pestisit ve gübre kullanımları, madencilik, enerji ve yakıt üretimleri ve endüstriyel aktiviteler sonucunda ortaya çıkan ağır metaller çevreye yayılmaktadır. Toprakta ağır metallerin aşırı birikimi tarımsal üretim için hem beslenme bozukluğu hem de oksidatif stres nedeniyle bir problem olmaya başlamıştır. Biriken ağır metaller büyük ölçüde bitki büyüme ve gelişimini olumsuz etkiler ve sonrasında besin zincirleri yoluyla, organizmalarda birikimi nedeniyle özellikle hayvan ve insan sağlığına risklidir. Pinto ve ark.' ları tarafından 2004 yılında kadmiyum (Cd), kurşun (Pb), bakır (Cu) ve civa (Hg) gibi ağır metallerin sebep olduğu zararların önemli boyutlara ulaşmış olduğu bildirilmiştir. Bu ağır metallerden özellikle Cd, son zamanlarda yapılan çalışmaların ilgi odağı haline gelmiştir. Kadmiyum (Cd) düşük konsantrasyonlarda da canlı hücrelere yüksek oranda toksik olan, canlı için temel ihtiyaç olmayan bir ağır metaldir. Cd sadece fotosentez ya da solunum gibi bitkilerdeki metabolik süreçlerle ilişkili değildir, aynı zamanda reaktif oksijen türlerinin oluşumunu uyararak oksidatif strese neden olur. Membran bütünlüğünün bozulması, beslenme dengesizliği ve büyüme düzenleyicilerinin değişen miktarı bu stresin diğer sonuçlarındandır. Cd stresi altında azalan bitki biyo-kütlesi ve klorofil flüoresansı, bitkilerde Cd toksitesini değerlendirmek için etkili bir parametredir. Önemli ölçüde topraklarda Cd birikimine yol açan sebeplerin başında Cd içeren fosforlu gübrelerin kullanılması gelmektedir.

Kadmiyumun topraklardaki yüksek konsantrasyonlara ulaşması bitkilerdeki Cd birikimini de arttırmaktadır. Topraklardaki ağır metal konsantrasyonu tipik olarak 1 ile 100.000 mg kg⁻¹ arasında değişim göstermektedir. Ağır metal birikiminin yüksek seviyelere çıkması toprak kalitesinin bozulmasına, alınan ürün verimi ve kalitesindeki azalmalara sebep olur (Long ve ark., 2002) ve dolayısıyla insan ve diğer canlılar için önemli ölçüde tehlike oluşturmaktadır (Blaylock ve Huang, 2000). Toprakta birikmiş olan ağır metaller bitki ve diğer organizmalara besin zinciri yolu ile taşınarak geçer ve böylece insan sağlığını da önemli ölçüde tehdit eder. Bitki kökleriyle kolaylıkla alınan ve toksitesi yüksek bir ağır metal olan Cd bitkinin gövde, dal ve yapraklarına kolaylıkla

taşınabilir (Sanita-di Toppi ve Gabbrielli, 1999). Cd birikimi bitkilerde fizyolojik ve biyokimyasal reaksiyonlarda sorunlara yol açmaktadır. Bunun sonucunda bitki büyümesi ve morfolojisi olumsuz yönde etkilenir (Sgherri ve ark., 2002). Araştırmalar kadmiyumun, tohum çimlenmesini (Thamayanthi ve ark., 2011) ve bitki büyümesini ve gelişimini engellediğini (Oztürk ve ark., 2003) ortaya çıkarmaktadır. Bitkilerde kadmiyum birikimine bağlı olarak, fotosentezde (Chen ve ark., 2011), besin dağılımında (Abu-Muriefah, 2008) ve bitki-su ilişkilerinde problemlerin ortaya çıktığı ve bu durumun gözle görülebilir zararlarının; sararma, büyümede gerileme, kök uçlarında kahverengileşme ve ölümlere sebep olduğu saptanmıştır (Hsu ve Kao, 2007). Bitkilerde kadmiyumun toksik etkileri özellikle Calvin döngüsü ve klorofil biyosentezine katılan fotosentetik enzimlerin aktivitesini engelleyip fotosentetik süreçlerin olumsuz şekilde etkilendiği ortaya konulmuştur.

Cd stresi lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim inaktivasyonuna neden olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna ve oksidatif strese yol açar. Cd stresinin etkilerini organel düzeyinde incelemek, bitki hücrelerinde strese karşı koruyucu mekanizmaların anlaşılmasında önemlidir. Kloroplastlar, fotosistem I (PSI) ve fotosistem II'nin (PSII) lokalize olduğu ve fotosentezin gerçekleştiği yerlerdir. Bitkinin temel ihtiyacı olan oksijen; moleküler yapıdaki oksijenin (O_2) suya (H_2O) indirgenmesiyle bitkilerin metabolizmasında kullanılmaktadır. Stres koşullarına bağlı olarak moleküler oksijenin indirgenme sürecinde bazı sorunlar oluşabilmektedir. Bununla birlikte hücrelerin organik molekülleri üzerinde olumsuz etkiler oluşturan reaktif oksijen türleri (ROS) oluşabilmektedir (Seckin ve ark., 2009). ROS molekülleri içerisinde tek değerlikli oksijen (1O_2) türleri, süperoksit anyon radikalleri ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri ($\cdot OH$) sayılabilmektedir. Bu radikaller bitkilerin kloroplast, mitokondri ve peroksizom gibi hücresel bölmelerinde oluşmaktadır. Zararlı bir yapıda olan moleküler oksijen (O_2), yaşamsal reaksiyonlar sonucunda ya da stres sonucunda oluşabilir. Oluşan bu reaktif oksijen türleri, koruyucu olan mekanizmaların da çalışmadığı durumlarda, bir tek bitkide değil diğer organizmalarında hücre yapısı ve işlevlerini bozar (Demiral ve Türkan, 2004). Stresiz koşullarda, bitkilerin antioksidan savunma sistemleri, reaktif oksijen türlerine karşı gerekli korunmayı sağlamaktadırlar (Cakmak ve ark., 1993). Ancak stres faktörleri ortaya çıktığında meydana gelen stresin; bitki dokularına zarar veren oksijen türlerinin ROS' ların üretimini arttırma potansiyeline sahip oldukları bildirilmiştir (Sairam ve

Srivastava, 2002). Ağır metaller tarafından reaktif oksijen türlerinin oluşumu (Sekil 1.1) de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Ağır metaller tarafından reaktif oksijen türlerinin oluşumu (Benavides ve ark., 2005)

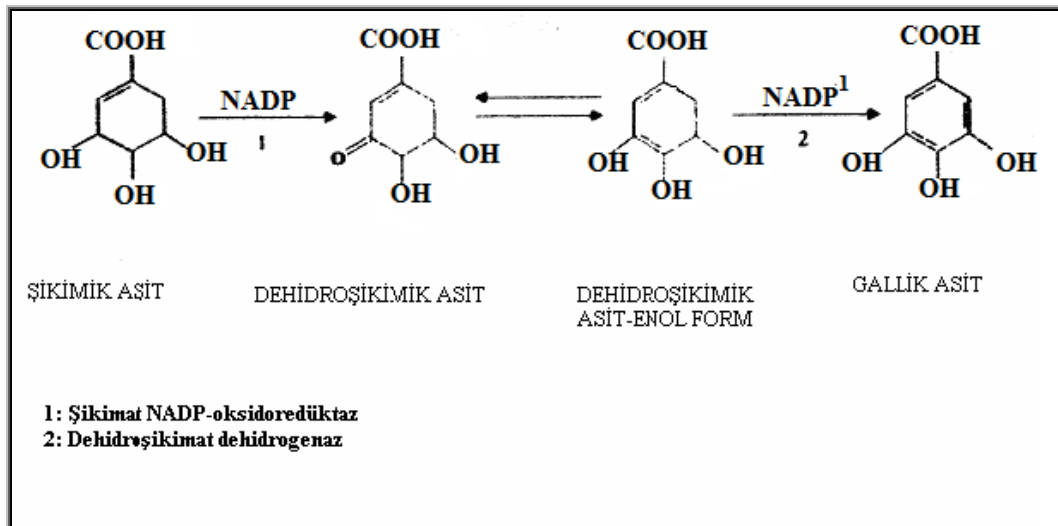
ROS'lar fotosentetik aygıtlarda geri dönüşümsüz hasara neden olan pigment bozulmalarına neden olur. Elektron taşıma zincirinden sızan elektronlar, özellikle bitkiler biyotik ya da abiyotik streslere maruz kaldığında ROS'ları oluşturmak için oksijen ile reaksiyona girer. Böylece kloroplastlar oksidantlarca kolaylıkla hasara uğratılabilir. Fotosentez süresince kloroplastlarda ROS'ların birikimi, Cd stresi gibi abiyotik stresler altında PSII'ye daha fazla oksidatif hasara neden olur (Gechev ve ark., 2006).

Bitkiler, Cd gibi ağır metal stresleri ile uyarılan oksidatif stres sonucunda ROS birikimi artmakta ve bu toksik düzeyde biriken ROS molekülleri enzimatik ya da enzimatik olmayan savunma sistemleri tarafından süpürülmektedir. Bu sistem içinde enzimatik savunma sistemi olarak süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POX), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), askorbat peroksidaz (APX), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), glutatyon peroksidaz (GPX), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), glutatyon-S-transferaz (GST) ve guaikol peroksidaz

(GOPX) enzimleri ve enzimatik olmayan sistem içinde ise askorbik asit (AsA), glutatyon (GSH), fenolik bileşikler, alkoloidler, aminoasitler ve α -tokoferoller sayılabilmektedir (Asada ve Takahashi, 1987).

Bu antioksidanların yanı sıra bitkilerde bazı fenolik asitlerin de kimyasal yapısı gereği antioksidan özelliği taşıdığı rapor edilmiştir. Bu fenolik asitlerden birisi de gallik asittir (GLA). Gallik asit (3, 4, 5- trihidroksibenzoik asit) bitkiler tarafından doğal olarak üretilebilen bir fenolik asittir (Stanely ve ark., 2009). İnsanda ve diğer canlılarda besin yolu ile alınan fenolik maddesi, hastalıkların risklerinin azalttığı yönde olduğu rapor edilmiştir (Hsu ve Yen, 2007). Gallik asitin en önemli kaynağı çaydır (Gupta ve ark., 2007) ve ayrıca meşe ağaçları, kestane ve üzümde de elde edilebilir (Gupta ve ark., 2007). Yurdumuzun hemen hemen her yerinde yetişen meşe ağaçları ve ürünleri (palamut ve mazı) pirogallik tanen bakımından zengindir ve bunların hidrolizleri sonucunda gallik asit elde edilir (Üstün ve Aydın, 2007). Gallik asit, kuvvetli ve doğal bir antioksidandır. Yapılan çalışmalar gallik asitin serbest radikalleri etkisiz hale getirdiğini göstermektedir.

Organik bir asit olan gallik asit, bitkide şikimik asit metabolik yolu üretilen bir bileşiktir (Şekil 1.2). Biyolojik olarak aktif bir maddedir. Etken bir antioksidan olan gallik asit, metabolizmanın yan ürünü olarak oluşturulan serbest radikalleri etkisiz hale getirir ve beyin fosfolipidlerinde peroksidasyonu önlediği bildirilmiştir (Polewski ve ark., 2002) .



Şekil 1.2. Gallik asitin şikimik asit metabolik yolu ile üretilmesi

Reaktif oksijen türlerinin bitkide ve diğer organizmalarda aşırı miktarda üretilmesi sonucunda, canlılarda doğal antioksidan savunma sistemleri devreye girer ve antioksidan bileşikler üretilerek canlı organizma bu durumdan kurtarılmaya çalışılır. Bu bileşikler sekonder metabolit olarak adlandırılır ve fenolik bileşikler sınıfının içinde yer alır. Bu bileşikler bitkiler tarafında bolca üretilmektedir ve antioksidan aktiviteler beslenme yolu ile insan ve diğer canlıların metabolizmasına aktarılmaktadır. Bu sebeplerden dolayı son zamanlarda doğal antioksidanların beslenme ile alınması yapılan çalışmaların önemini arttırmıştır.

Bu literatür bilgileri ışığında çalışmamızda, en önemli tarım bitkilerinden olan buğdayın (*Triticum aestivum*) bir ağır metal olan kadmiyum stresi altında uygulanan gallik asittin iyileştirici etkilerinin olup olmadığını belirlemek, antioksidan sistemlerin aydınlatılması için SOD, CAT, POX, APX ve GR aktiviteleri ile oksidatif zarar belirleyicisi olan lipid peroksidasyonu araştırılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Ağır Metaller

Ağır metaller doğada yok edilemeyen ve bozulmayan kimyasal bileşiklerdir. Ağır metallerin bitkide aşırı birikmesi enzim aktivitesi, protein sentezi, fotosentez, çimlenme, stoma hareketleri, su alımı gibi birçok fizyolojik ve biyokimyasal olayların bozulmasına neden olmaktadır. Bir organizmadan diğerine aktarılarak besin zinciri yoluyla canlı sistemlerinde yüksek konsantrasyonlara ulaşabilmektedir. Canlı sistemlerde metabolizmaya dahil olurlar ve metabolizmadan atılmaları çok yavaş olduğu için eser miktarda birikmesi bile canlılarda hasarlara yol açar (Pohl ve ark., 2011).

Ağır metaller, proteinlerin fonksiyonel gruplarına bağlanarak biyokimyasal reaksiyonları etkileyebilirler. Çinko, nikel, bakır, mangan gibi ağır metaller bitki gelişimi için gerekli iken, kadmiyum, cıva, kurşun, arsenik gibi ağır metaller bitkide toksik etkiye sebep olur (Pohl ve ark., 2011).

Toksisite metalden metale değişebildiği gibi, canlı organizmalara olan zararları bir canlıdan diğerine değişiklik göstermektedir. Toksik etki, olumlu ya da olumsuz olabilir ve yalnızca metalin tipi ve konsantrasyonuna bağlı değildir. Farklı canlı türlerinin genetik esaslı fizyolojik davranışlarıyla da ilgilidir (Haktanır ve Arcaç, 1998).

Türkiye'de başlıca ekonomik gelir kaynaklarından birisi olan tarımın bilinçsiz yapılması toprak kirlenmesine sebep olur. Tarımsal kirlenme zirai mücadelede kullanılan ilaçlar, kimyasal ve hayvansal gübrelere kaynaklanmaktadır. Tarım ilaçlarının kimyasal yapısı dayanıklı olduğundan dolayı uzun yıllar toprak da bozulmadan kalabilir. Bundan dolayı doğrudan toprak kirliliklerine ve dolaylı yollardan su kirliliklerine sebep olurlar (Tiryaki ve ark., 2010).

Bitkiler ağır metal kirliliği altında gelişebilmek ve büyümek için bazı stratejiler geliştirmiştir (Baker ve Walker, 1990):

1. Metal dışlayıcılar: Topraktaki metal konsantrasyonu üzerindeki konsantrasyonların hava yolu ile engelleyen ve köklerinde metallerin geniş oranını kontrol altında tutan bitkiler.
2. Metal indikatörler: Kendi dokuları içerisinde metalleri biriktiren ve topraktaki metal seviyeleri genellikle dokularındaki metal seviyelerini gösteren bitkiler.

3. Toplayıcılar: Topraktaki hazır halde bulunan metalleri kendi dokularında yoğun şekilde bulunduran bitkiler.

Bir geçiş elementi olan kadmiyumun atom numarası 48, yoğunluğu 8.65 g cm^{-3} ve atom ağırlığı $112.411 \text{ g mol}^{-1}$ 'dir. Sembolü "Cd" olan kadmiyum, 2B grubu elementi olan civa ve çinko ile benzer özellikler gösterir. Doğada çinko cevheri ile birlikte bulunan kadmiyum, aynı zamanda çinko metalürjisinin bir yan ürünüdür. Yer kabuğunun yaklaşık %0.01'den de azından oluşan kadmiyum, mineral olarak kadmiyumlu çinko cevherinin indirgenmesi ile elde edilir (Cherif ve ark., 2011).

Kadmiyum insan, hayvan ve bitkiler için toksisitesi oldukça yüksek olan bir metaldir. Bitkide azot ve karbonhidrat metabolizmalarını değiştirir ve daha birçok fizyolojik değişikliklere sebep olur. Proteinlerin -SH gruplarındaki enzimleri inaktive ederek, protoklorofil redüktaz ile aminolevulinik asit sentezinin bozulması sonucu fotosentez mekanizmasının bozulması ve stomaların kapanması, transpirasyon ile su kaybının azalması gibi birçok olaya sebep olur (Sheoran ve ark., 1990; Zengin ve Munzuroğlu, 2005). Fotosentez üzerine olan olumsuz etkisi CO_2 asimilasyonunun azaltılmasıyla olmaktadır. Diğer yandan ağır metallerin serbest radikal oluşumunu teşvik ettiği ve bu yolla tillakoyid membran lipidlerinin oksidatif yıkımlara sebep olduğu, bunun sonucunda ise klorofil yıkımının arttığı ve sentezinin engellendiği ortaya konmuştur (Zengin ve Munzuroğlu, 2005).

Kadmiyum diğer ağır metallere göre nadir bulunan ve tek başına bulunmayan bir metaldir. Düşük dozlarda bile toksisitesinin yüksek olması ve yarı ömrünün uzun olması kadmiyumu önemli bir kirletici haline getirir (Goyer, 1991; Lyons-Alcantara ve ark., 1996). Kadmiyum bitkiler için toksik etkileri ile bilinen bir metaldir (Jiang ve Li, 1989; Çatak ve ark., 2000). Kadmiyum, çinko ile birlikte üretilen bir metaldir. Kadmiyum çinko üretimi ile yiyeceklere, suya ve havaya karışmıştır. Onun öncesinde önemli bir ölçüde etkisi yoktur. Fakat günümüzde ağır metal kirliliğinin sebep olduğu metaller arasında yerini alır. Ancak kadmiyum endüstriyel kirleticilerden olup nikel/kadmiyum pillerin yapımında, dayanımı nedeni ile gemi sanayinde, paslanmaz çelik yapımında, boya sanayisinde, PVC yapımı ve elektronik eşyaların yapımında kullanılır. Ayrıca fosfatlı gübre, deterjan ve petrol sanayinde yaygın olarak kullanılır ve ürünlerin yaygın olarak kullanılması önemli ölçüde kadmiyum kirlenmesine yol açar. Bitki gelişimi ve verimi için toprağa atılan gübreler, sulama kanalları, fabrika bacalarından çıkan gazlar ve evlerde kömür yakılması bitkiyi önemli ölçüde etkileyen kadmiyum kaynaklarıdır (Kahvecioğlu ve ark., 2007).

Ağır metal iyonları solunum ve fotosentezin elektron taşınım reaksiyonlarında devreye girerek olumsuz etkiler yapar. Kadmiyum çoğu bitkide klorofil ve karotenoidlerin sentezini de olumsuz yönde etkilemektedir. 1–20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ konsantrasyonlarındaki kadmiyumun yonca bitkisinde fotosentezi önemli ölçüde yavaşlattığı bildirilmiştir. Yine artan kadmiyum konsantrasyonunun buğdayda klorofil a/klorofil b oranını azalttığı rapor edilmiştir (Kaçar ve ark., 2006).

2.2. Ağır Metallerin Bitkiler Tarafından Alınması

Ağır metaller derişimlerine bağlı olarak bitkiler tarafından, atmosferden, gübrelere, kullanılan pestisitlerden artık su ve çamurlardan alınarak biriktirilir. Ağır metallerin topraktaki tolere edilir miktarlarının saptanması gerekir. Bitkiler, özellikle kadmiyum gibi bazı ağır metalleri çok geniş sınırlar içinde tolere edebilirler. Bu sebeple tarım ürünleri insan ve hayvan beslenmesi üzerinde olumsuzluk oluşturacak düzeyde metal birikimi söz konusudur (Vural, 1993).

2.3. Köklerle Alınması

Topraktaki metallerin bir kısmı toprakta kalırken bir kısmı da bitkiler tarafından alınır. Metalleri depolayan bitkiler öncelikle metalleri toprakta harekete geçirmelidir. Öncelikle toprağa bağlı olan metalleri topraktan çözmek için metal şelatlandırıcı moleküller (fitosideroforez) rizosfere salınır. Örneğin mugineik asit ve avenik asit Graminae familyasının fitosideroforezi olarak görev yapar (Kinnerseley, 1993). Bu fitosideroforezler demir ve çinko eksikliği ile serbest kalırlar ve bakır, çinko ve manganın toprakta harekete geçer (Romheld, 1991). Diğer yandan bitki kök hücrelerinde bulunan membrana bağlı metal redüktazlar metalik iyonları ile bağlantı kurup onların kök hücreleri tarafından alınımını azaltabilir. Son olarak bitki kökleri proton salgılar ve toprak ortamı asitleşir ve ağır metaller çözülerek düşük pH oluşumu sağlanarak toprağın içindeki bağlı ağır metaller iyonlarına ayrılarak serbest kalırlar (Clarkson ve Luttge, 1989). Bitki kökleri, hücre içi ya da hücre dışı yollarla metal iyonlarını alır ve özel ya da genel iyon taşıyıcıları veya kanal yolu ile bitki hücrelerine iletir (Clarkson ve Luttge, 1989; Liu ve ark., 2007). Bitki gelişimi için gerek olmayan ağır metaller de bu membran taşıyıcılarını kullanırlar ve bu yüzden rekabet olur (Salt ve ark., 1995).

2.4. Yapraklarla Alınması

Yapraklarda temel ve temel olmayan metallerin alınımında görev alırlar. Metallerin bir kısmı gaz formunda (örneğin civa) olduklarında stomalardan alınır. Ancak farklı metaller değişik seviyelerde absorbe edilirler. Örneğin, çinko, kadmiyum ve kurşuna göre daha fazla yaprağa nüfuz eder (Wang ve ark., 2003). Ayrıca farklı türler farklı epikutikular ve intrakutikular yapılarda kutikulaya sahip oldukları için metal alımı bitkinin türüne göre değişkenlik gösterirken, çevresel stres de yaprakların metal alımını etkiler (Prasad, 2004).

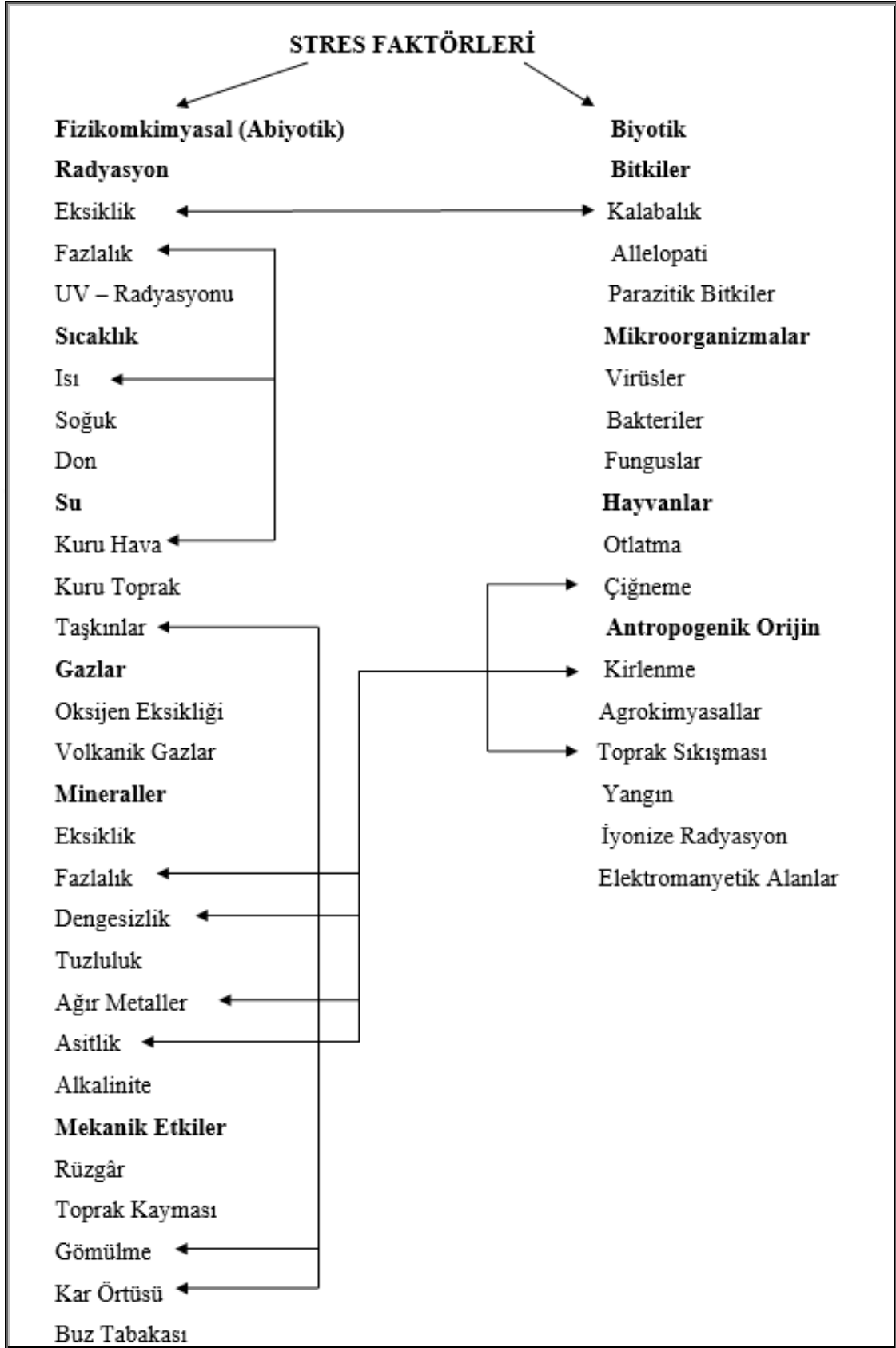
2.5. Bitki Gelişimini Etkileyen Stres Koşulları

Bitkiler her zaman uygun çevre şartları altında bulunmazlar. Yeryüzünde kurak alanlar, tuzlu topraklara sahip bölgeler, kutup bölgeleri ile yüksek dağlar gibi alanlar bulunmaktadır. Bu alanlardaki ekolojik koşullar bitkilerin yaşamlarını olumsuz yönde etkilemektedir. Ayrıca son yıllarda hava, toprak ve su kirleticileri de bitkilerin yaşamını olumsuz yönde etkileyen faktörler arasına girmiştir (Kılınç ve Kutbay, 2004). Olumsuz çevre şartları bitkilerde stres yaratır. Bitkinin üzerinde içsel ya da dışsal faktörlere bağlı olarak büyüme ve gelişme üzerinde etkin olan olumsuz etkiler stres olarak tanımlanır (Madlung ve Comai, 2004). Bir ortamda arada sırada veya devamlı olarak meydana gelen birçok sayıdaki olumsuz ama öldürücü olmayan çevre etkiler stres olarak bilinir. Bir diğer ifadeyle bitkilerin metabolizmasını, büyüme ve gelişmesini etkileyen veya engelleyen durumlar ya da maddeler stres olarak tanımlanmıştır (Lichtenhaler, 1998). Bir diğer yandan Levitt (1980) ise stresi şöyle tanımlar; canlılar için uygun olmayan çevre koşulları (Gaspar ve ark., 2002).

Bitkiler ekosistem içinde sıklıkla pek çok stres olayları ve stres faktörleriyle karşılaşır. Stres faktörleri orijinlerine göre değişik şekillerde sınıflandırılır. Levitt (1980)'e göre stres faktörleri biyotik ve fizikokimyasal faktörler olmak ikiye ayrılır (Şekil 2.1). Biyotik faktörler mantarın, bakterin ve virüs gibi enfeksiyon oluşturan mikroorganizmaların, böcekler ve nematodlar gibi zararlı hayvanların ve diğer organizmaların rekabeti içerir. Fizikokimyasal faktörler ise sıcaklık, su, radyasyon, kimyasal maddeler, manyetik ve elektriksel alanlar gibi çevre faktörleridir. Bir diğer araştırmacı da stres faktörlerini doğal ve antropogenik olarak ikiye ayırmıştır. Doğal stres faktörlerini yüksek sıcaklık, ışık, donma, su eksikliği ve fazlalığı, mineral

maddelerin yetersizliği, böcekler ve patojenler oluşturur. Antropogenik stres faktörlerini ise herbisitler, pestisitler, fungusitler, havayı kirletici maddeler, ozon, foto-oksidadntlar, asit yağmurları, yüksek azot konsantrasyonu, ağır metaller, UV radyasyonu ve karbondioksit düzeyi gibi faktörleri içerir (Kılınç ve Kutbay, 2004).

Stres organizmalar üzerinde güçlü bir baskı oluşturur. Bu sebeple canlı organizmalar hayatta kalabilmek için direnme, kaçınma ve tolerans mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bitkiler, aktif olarak hareket eden canlılardan farklı olarak stres altında daha karmaşık metabolik yollar ile cevap verirler. Bu metabolik yollar, bitkilerin zarar görmeden canlılıklarının devam etmelerini sağlar (Madlung ve Comai, 2004). Kaçınma mekanizması daha çok stresin etkisini azaltmaya yöneliktir. Bitki bunu dış ortam ne olursa olsun iç ortamının strese sokmayarak sağlar. Bitkilerde sakınma mekanizmaları; stomaların büyüklüğü ve yapraklardaki konumu, yaprak kalınlıkları ve yüzeyi, kök ve boylarında meydana gelen değişimlerdir. Örneğin, kurak bölgelerde bitkiler buharlaşmayı azaltabilmek için yapraklardaki kutikula tabaklarını kalınlaştırır veya su depolayabilen etli yapraklar oluşturarak stres koşullarından kaçınmaya çalışır. Diğer bir yandan bitki neslini devam ettirebilmek için kısa süreliğine tohum oluşturmaktadır. Bitki stresin sebep olduğu etkilerin onarılması ve ortadan kaldırılması için oluşturduğu mekanizmalar direnç gösterme durumlarıdır (Kılınç ve Kutbay, 2004). Stres süresi, şiddeti ya da strese maruz kalmış doku ya da organın çeşidine göre ortaya çıkan etkiler bitki ve organizmalarda farklılık gösterir.



Şekil 2.1. Çevresel stres faktörleri ve bunların birbirleriyle olan ilişkisi (Kılınç ve Kutbay, 2004).

Bitkiler stresli koşullarda stresle baş etmek ve hayatta kalmak için hareketli organizmalara nazaran daha karmaşık metabolik cevaplar geliştirmişlerdir. Tolerans mekanizması organizmanın stres faktöründen zarar görmeden canlılığını sürdürmesine olanak verir. Kaçınma mekanizmasında strese maruz kalma önlenirken, direnç mekanizmasında daha etkin önlemler söz konusudur (Madlung ve Comai, 2004). Tolerans bitkinin aşırı dış stres koşullarında olduğu kadar içsel stres altında da bir dereceye kadar fonksiyonlarını ya da canlılığını devam ettirme, yani strese dayanma kapasitesidir. Örneğin bakteriler diğer organizmalar için öldürücü olan düşük ya da yüksek sıcaklıklarda canlılıklarını devam ettirebilirler. Yani tolerans, dayanıklı olmayan türler ya da bireyler için ölümcül ya da inhibitör olan koşullar altında organizmaların canlı kalması için özel biyolojik mekanizmaların gelişmesini ifade eder (Kadıoğlu, 2007). Kaçınmanın mekanizması daha çok stresin etkisini azaltma yönündedir (Kılınç ve Kutbay, 2004). Bunu dış ortamda stres oluşturabilecek koşullar olmasına rağmen bitki, hücrelerini stres altına sokmayan bir iç ortamı meydana getirmekle sağlar. Bitki yaprak laminasının yüzeyi ve kalınlığında, stomaların büyüklüğü ve yerinde, kök ve gövdenin boyutlarında meydana gelen değişimler sakınma mekanizmasına örnek teşkil eder. Örneğin bazı bitkiler su eksikliğinde buharlaşmayı azaltmak için kutikula tabakasını kalınlaştırabildiği gibi su depolayan etli yapraklar oluşturarak da stres koşullarından kaçınmaya çalışır ya da neslini garanti altına almak için kısa sürede tohum veya yumru oluşturur. Direnç gösterme durumunda ise bitkide stresin yarattığı etkilerin onarılması veya ortadan kaldırılması söz konusudur. Bitkilerin olumsuz çevre koşullarına çeşitli mekanizmalarla direnç ya da dayanıklılık gösterdiğinden bahsedilmiştir. Bir bitkinin strese karşı göstereceği direnci birçok faktör belirler (Hale ve Orcutt, 1987). Bu faktörler şöyle sıralanabilir; stresin şiddeti, süresi, strese maruz kalan doku ya da organ tipi ile bitkinin stres koşulları altında iken bulunduğu gelişim evresi ve aynı türe ait farklı çeşit veya genotipler bu faktörler arasındadır (Bray ve ark., 2000). Ayrıca stres faktörleri ile bunların kombinasyonu da direnç mekanizmasını etkileyen faktörlerdendir. Bitki bu durumda adaptasyon veya uyum mekanizmalarını devreye sokar. Bu iki kavram her ne kadar aynıymış gibi algılansa da aralarında önemli farklar vardır. Huner ve ark. (1998)'na göre adaptasyon uzun süren çevresel değişiklikler sonucu meydana gelen genotipik farklılıklar olarak tanımlanır. Adaptasyon sonucunda genomda meydana gelen değişiklikler kararlılığı ifade ederken bu değişiklikler popülasyonda birçok jenerasyon boyunca korunur. Gaspar ve ark. (2002)'na göre ise strese maruz bırakılan bir aynı tür canlı grubunda, strese karşı

toleranza görev alan genler baskın olarak bulunur. Uyum ise ortam koşullarının değişmesi ile oluşan ve genetik yapıda herhangi bir değişiklik olmaksızın ortaya çıkan sadece fenotipik bir durumu ifade eder (Huner ve ark., 1998). Ayrıca bitkilerde stres koşullarında miktarı değişen fenolik bileşiklerde savunma sisteminde rolleri vardır. Önemli sekonder metabolitlerden olan fenolik bileşiklerin yapısı, aromatik halkasında işlevsel hidroksil grubu içeren fenol grubundan oluşur (Kadıoğlu, 2011; Taiz ve Zeiger, 2008). Bu sayede reaktif oksijen türlerini yok etme yeteneğine sahiptir. Ayrıca bu bileşikler hidroksil grubundaki hidrojen atomlarını reaktif oksijen türlerine vermek suretiyle kararlı fenoksil radikallerini oluştururlar ve böylece savunma sistemini devreye sokmuş olurlar.

2.6. Serbest Radikal ve Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu

Bitkilerde fotosentezin yan ürünü olarak ortaya çıkan serbest radikaller orbitallerinin dış yörüngesinde eşleşmemiş elektron taşıyan yüksek enerjili kararsız atom ya da moleküllerdir. Bitkilerdeki ağır metal stresi serbest radikal oluşumunu teşvik eder. Serbest radikallerin oksijen kaynaklı olanlarına Reaktif Oksijen Türleri (ROS) denir. Aerobik canlılar için en önemli element oksijendir. Oksijen anaerobik canlılar içinde bir dizi reaksiyon sonucunda toksik etki gösterir. Oksijenden oluşan radikaller ekosistemlerde oluşan radikal türlerin en önemli sınıfıdır ve ROS olarak adlandırılırlar. Süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil (OH^{\bullet}) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) yapısındaki ROS' lar normal metabolik reaksiyonlar veya dış faktörler ve ajanlar ile oluşturulmaktadır (Ferk ve ark., 2011).

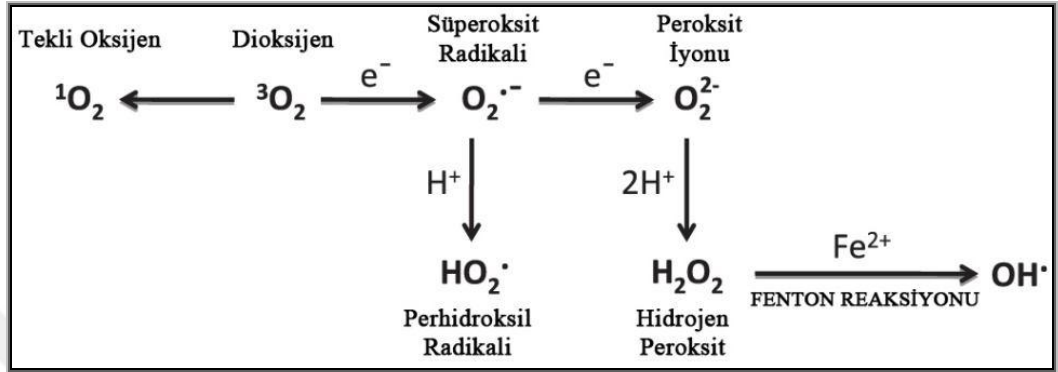
Serbest radikaller oldukça küçük moleküler yapıda bileşiklerdir ve düşük aktivasyon enerjilidirler bu sebeple ömürleri de kısadır. Küçük yapıda olmaları hücre membranlarını kolaylıkla geçmelerini sağlamaktadır (Jensen, 2003). ROS' lar ve diğer serbest radikaller ile antioksidanlar arasında meydana gelen dengesizlikler oksidatif strese sebep olur. Bu dengesizlikler hücrelerin önemli kısımlarında geri dönüşümsüz olarak hasarlara sebep olmaktadır. Oksidatif strese sebep olduğu bilinen radikal ve radikal olmayan reaktif türleri (Çizelde 2.1)' de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Oksidatif strese sebep olan reaktif türleri (Halliwell, 2001)

Radikaller	Radikal olmayanlar
<i>Reaktif oksijen türleri (ROS)</i>	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Süperoksit ($O_2^{\bullet-}$)	Hipobromöz asit (HOBr)
Hidroksil (OH^{\bullet})	Ozon (O_3)
Hidroperoksil (HO_2^{\bullet})	Singlet oksijen (O_2^1)
Lipid peroksil (LO_2^{\bullet})	Lipid peroksitler (LOOH)
Lipid alkoksil (LO^{\bullet})	Maillard reaksiyonu ürünleri
<i>Reaktif klorür türleri (RCS)</i>	Hipokloröz asit (HOCl)
Atomik klor (Cl^{\bullet})	Nitril klorür (NO_2Cl)
	Kloraminler
<i>Reaktif azot türleri (RNS)</i>	Nitröz asit (HNO_2)
Nitrik oksit (NO^{\bullet})	Nitrozil kasyonu (NO^+)
Azot dioksit (NO_2^{\bullet})	Nitroksil anyonu (NO^-)
	Diazot tetraoksit (N_2O_4)
	Diazot trioksit (N_2O_3)

Bitkilerde ağır metal stresi sonucu ROS' lar oluşur. Biyotik ve abiyotik stres sonucunda oluşan ROS' lar, hücrelere zarar veren etmenlerin başında gelir. Abiyotik stres faktörlerinin ilk işaretleri, spesifik membran hasarlarıdır. Stresin etkilerinden dolayı bozulmuş olan hücresel bölmelerden olan kloroplast ve mitokondri membranların elektron taşıma sistemlerinden sızmış elektronların oksijeni indirgemesi sonucunda reaktif oksijen türleri (ROS; süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), nitrik oksit radikali (NO^{\bullet}) ve hidroksil radikali (OH^{\bullet}) oluşur (Şekil 2.2). ROS' lar protein, DNA, lipid ve diğer önemli makromoleküller üzerinde sitotoksik etkilere sahiptir. Bu radikallerin ortamdaki uzaklaştırılması için bitkiler, enzimatik [süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POX), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR) ve askorbat peroksidaz (APX)] ve enzimatik olmayan antioksidan (glutatyon ve askorbat) savunma sistemini geliştirmişlerdir. SOD ile $O_2^{\bullet-}$ hızlıca bozularak H_2O_2 ve O_2 'ye dönüştürülmektedir. CAT ile çeşitli peroksidazlar, H_2O_2 'in parçalanmasını katalizlemektedir. Ayrıca askorbat-glutatyon (Asada-Halliwell yolu) döngüsünün ilk basamağında askorbat peroksidaz (APX) enzimi, elektron vericisi olarak askorbatı kullanarak H_2O_2 detoksifikasyonunda rol oynamaktadır. Bitki dokularında kuraklık stresinde, (i) ROS'ların üretimini artırması ve hedef moleküllerin okside olması, (ii) antioksidan fonksiyon için genlerin ifadesinin artırılması, (iii) antioksidanlar ve antioksidatif sistemlerin düzeyinin artırılması, (iv) ROS'ların süpürücü kapasitesinin artırılması ile strese karşı

tolerans oluşturulur. Strese karşı tolerans, bitkide dayanıklılığın göstergesidir ve bitki türüne, yaşadığı ortam ve çevre şartlarına bağlı olarak farklılıklar gösterir. Strese tolerans gösteren bitkiler, yüksek sitoplazmik viskozitesine ve artan hidrofilik sitoplazmik proteinlerin veya bazı makromoleküllerin düzeyine sahiptir. Bitkilerde ROS' ların üretim, süpürme ve kaçınma mekanizmaları (Çizelge 2.2)'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Enerji transferi aracılığıyla ROS'ların üretimi (Gill ve Tuteja, 2010)

Çizelge 2.2. Bitkilerde ROS'ların üretim, süpürme ve kaçınma mekanizmaları (Mittler, 2002)

Mekanizma	Üretim Yeri	ROS'lar
Üretim		
Fotosentetik PSI veya PSII	Kloroplast	$O_2^{\bullet-}$
Solunumda ETS	Mitokondri	$O_2^{\bullet-}$
Glikolat oksidaz	Peroksizom	H_2O_2
Uyarılmış klorofil	Kloroplast	1O_2
NADPH oksidaz	Plazma membranı	$O_2^{\bullet-}$
Yağ asidi β -oksidasyonu	Peroksizom	H_2O_2
Okzalal oksidaz	Apoplast	H_2O_2
Ksantin oksidaz	Peroksizom	$O_2^{\bullet-}$
Proksidazlar, Mn^{+2} , ve NADH	Hücre duvarı	$H_2O_2, O_2^{\bullet-}$
Amin oksidaz	Apoplast	H_2O_2
Süpürme		
Süperoksit dismutaz	Kloroplast, Sitosol, Mitokondri, Peroksizom, Apoplast	$O_2^{\bullet-}$
Askorbat peroksidaz	Kloroplast, Sitosol, Mitokondri, Peroksizom, Apoplast	H_2O_2
Katalaz	Peroksizom	H_2O_2
Glutatyon peroksidaz	Sitosol	$H_2O_2, ROOH$
Peroksidazlar	Hücre duvarı, Sitosol, Vakuol	H_2O_2
Tioredoksin peroksidaz	Kloroplast, Sitosol, Mitokondri	H_2O_2
Askorbik asit	Kloroplast, Sitosol, Mitokondri, Peroksizom, Apoplast	$H_2O_2, O_2^{\bullet-}$
Glutatyon	Kloroplast, Sitosol, Mitokondri, Peroksizom, Apoplast	H_2O_2
α -Tokoferol	Membranlar	$ROOH, ^1O_2$
Karotenoidler	Kloroplast	1O_2
Kaçınma		
Anatomik adaptasyonlar	Yaprak yüzeyi, epiderma	$O_2^{\bullet-}, H_2O_2, ^1O_2$
C_4 veya CAM metabolizması	Kloroplast, Sitosol, Vakuol	$O_2^{\bullet-}, H_2O_2$
Kloroplast hareketi	Sitosol	$O_2^{\bullet-}, H_2O_2, ^1O_2$
Fotosentezin baskılanması	Kloroplast	$O_2^{\bullet-}, H_2O_2$
Fotosistem	Kloroplast	$O_2^{\bullet-}, ^1O_2$
Alternatif oksidazlar	Kloroplast, Mitokondri	$O_2^{\bullet-}$

2.6.1. Süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) radikali

Oksijenli solunum yapan tüm bitkisel hücrelerde moleküler oksijenin elektron alması sonucunda $O_2^{\bullet-}$ radikali oluşur. $O_2^{\bullet-}$ radikali, doğrudan canlılara zarar vermez. $O_2^{\bullet-}$ radikalının asıl önemi, H_2O_2 kaynağı ile geçiş metallerinin indirgeyicisi olmasıdır. Süper oksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) ile perhidroksil radikali (HO_2^{\bullet}) birlikte reaksiyona girdiklerinde biri okside olur ve diğeri indirgenir. Bu ters değişim (dismutasyon) reaksiyonu sonucunda O_2 ile H_2O_2 oluşur (Parvaiz ve ark., 2010). Süperoksit radikali, mitokondrinin elektron transferinden oksijen sızarken ve oksijen bir elektron aldığı zamanda oluşturulur. Ortamda redoks döngüsü bileşiklerinin oluşması ile süperoksit radikalının oluşumu hızlanır. Negatif yüklü bir molekül olması sebebi ile biyolojik membranlardan geçemez ve bu sebeple süperoksit radikalının bulunduğu yerde giderilmesi önemlidir.

2.6.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

H_2O_2 , süperoksit radikalının ($O_2^{\bullet-}$) son orbitinden bir elektron alarak ya da moleküler oksijenin (O_2) son orbitinden iki elektron almasıyla oluşan peroksit iyonunun (O_2^{2-}) iki proton (H^+) ile birleşmesiyle oluşmaktadır. Canlı organizmalarda H_2O_2 'in asıl üretimi, $O_2^{\bullet-}$ ters değişimi ile oluşur (Parvaiz ve ark., 2010).

Hidrojen peroksit (H_2O_2) reaktif oksijen türü olup hücreler tarafından yağ asitlerinin peroksizomlarda β -oksidasyonu, fotorespirasyon ve pürin katabolizması gibi aerobik reaksiyonlar sonucunda oluşturulur. H_2O_2 , farklı konsantrasyon seviyelerinde mitojenik büyüme ve apoptosise kadar birçok hücrel cevap mekanizmasında etki gösterir. H_2O_2 'in hücrelerden uzaklaştırılması ile reaktif olan hidroksil radikallerinin de oluşumu engellemiş olur ve ayrıca canlının aerobik ortamda yaşaması kolaylaştırılmış olur (Mittler, 2017).

2.6.3. Hidroksil (OH^{\bullet}) radikali

Hidroksil radikali, hücredeki bilinen en reaktif radikaldır. OH^{\bullet} radikali hücrelerde kolayca tüm biyolojik moleküller ile reaksiyona girebilir. Bu sebepten dolayı OH^{\bullet} radikalının fazla miktarda üretilmesi hücrelerde kalıcı hasarlara ve ölümlere sebep olur. OH^{\bullet} radikali, nispeten kendisinden daha az zararlı olan hidrojen peroksit (H_2O_2)

ve O_2^- anyonunun metal iyonları varlığında Haber-Weiss (Cu^+ , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Fe^{+3}) ya da fenton (Fe^{+2} ve geçiş metalleri) reaksiyonlarının sonunda oluşturulur (Haber ve Weiss, 1934). OH^\bullet radikalinin oluşum reaksiyonları şöyledir;

- Haber- Weiss : $O_2^- + H_2O_2 \rightarrow O_2 (^1\Delta g) + OH + OH^\bullet$
- Elektron Transferi : $OH^\bullet + O_2^{-1} \rightarrow O_2 (^1\Delta g) + OH + OH^\bullet$
- Dismutasyon : $2H^+ + 2O_2^{-1} \rightarrow O_2^- (^1\Delta g) + H_2O_2$
- Fenton : $Fe^{+3} + O_2^- \rightarrow Fe^{+2} + O_2$
 $Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + O_2 + OH + OH^\bullet$
- Net Reaksiyon : $O_2^- + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH + OH^\bullet$

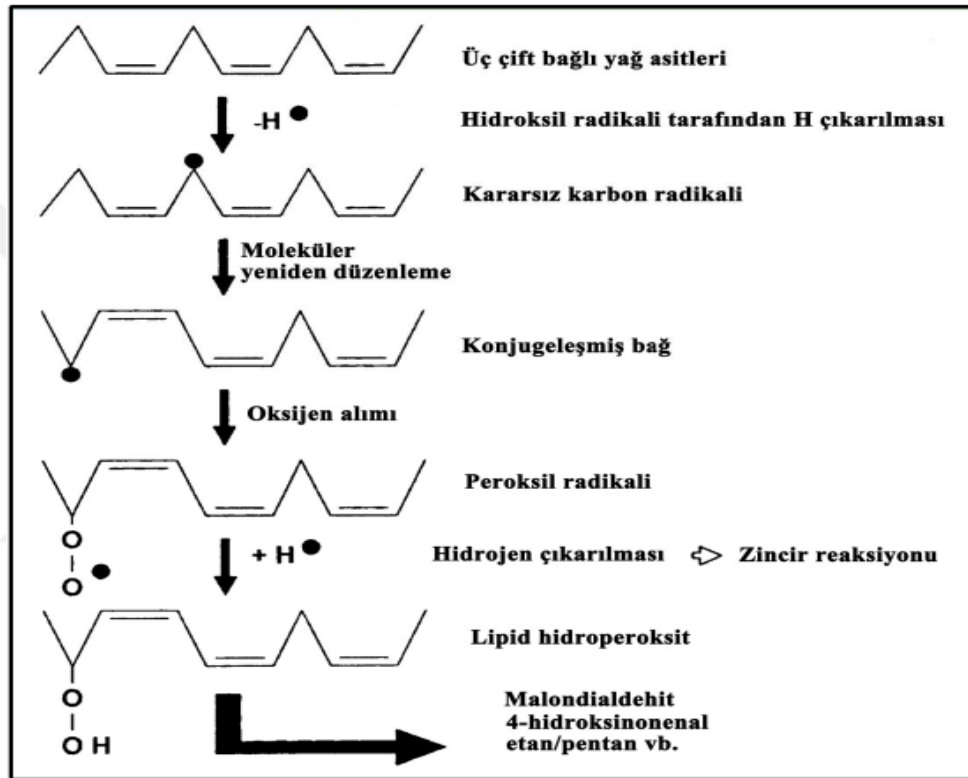
2.6.4. Singlet oksijen (1O_2)

O_2 mokolü fazladan enerji aldığı anda elektron taşıma sistemindeki elektronların dönüş yönlerinin tersi yönünde yer değiştirmesiyle oluşabilir. Farklı olarak 1O_2 radikalinin nitrik oksit (NO) ile reaksiyonu veya hidrojen peroksidin (H_2O_2) hipoklorit (ClO^-) ile reaksiyonu sonucunda oluşabilmektedir. 1O_2 radikali birçok molekülün ve atomun yapısına benzediği için kolaylıkla reaksiyona girebilir. Karbonlar (C) arası çiftli bağlar 1O_2 radikalinin tepkimeye girdiği bağlardır. Sistein, metionin, triptofan, tirozin ve histidinin yapılarında bulunan çiftli bağlar yüksek elektron yoğunluğuna sahiptir ve kükürt kısımlarından 1O_2 radikaliyle oksidasyona uğrarlar (Stadman ve Barlett, 1997).

2.7. Reaktif Oksijen Türlerinin Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkisi

Serbest radikallerin, zararlarından bir diğeri de organizmaların membran lipid ve proteinlerinin geri dönüşümsüz olarak hasarlara sebep olmasıdır. ROS' lar kolaylıkla membran lipidlerini doğrudan etkiler ve doymamış aldehit oluşumuna sebep olurlar. Stres altında oluşan serbest radikallerin en önemli hasarlarından bir tanesi de hücre zarındaki lipidleri peroksidasyona uğratmasıdır. Çoklu doymamış yağ asitleri ile oksidantların reaksiyona girmesiyle hücre zarındaki lipidlerin peroksidasyonu başlar. Lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak malondialdehit (MDA) oluşturulur. MDA membranlardan iyon alışverişini etkileyerek bileşiklerin çapraz bağlanmalarına neden olur. Hücre membranlarında iyonların geçirgenliği ve enzim aktiviteleri değişir ve olumsuz sonuçlar oluşur (Niki, 1987).

Lipid peroksidasyonu, hücrelerin mebran bütünlüğüne zarar vermekte ve elektrolit geçirgenliğinin artmasına neden olmaktadır. Hücre içerisine kalsiyum ve sodyum iyonlarının girmesi, organizmaların ATP tüketimini artırarak enerji oluşturan mekanizmalarını etkiler. Kalsiyum iyonlarının hücre içerisindeki aşırı artışı protein ve lipidlerde daha fazla hasara sebep olur. Ayrıca DNA'nın yapısını bozarak enzim inaktivasyonlarına ve hatta hücre ölümüne sebep olur (Cummins ve ark., 1994). Lipid peroksidasyonu mekanizmaları (Şekil 2.3)'de gösterilmiştir.

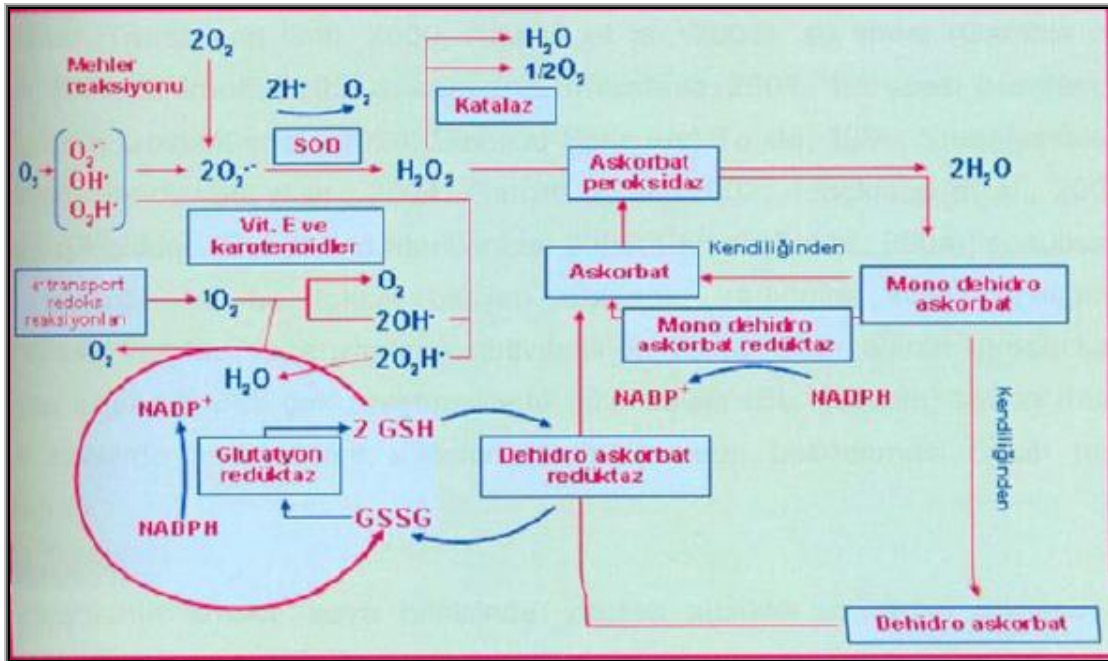


Şekil 2.3. Lipid peroksidasyonu mekanizmaları (Young ve McEneny, 2001)

2.8. Bitkilerde Reaktif Oksijen Türlerine Karşı Oluşturulan Savunma Mekanizmaları

Hücrelerde biriken ROS'lar proteinlerin, klorofillerin, lipidlerin, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi maddelerin oksidasyonuna sebep olur. Stres tarafında toksik düzeyde oluşturulan ROS' lar antioksidan savunma sistemlerince ortadan kaldırılır. Bu sistemdeki bazı enzimler: Katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon peroksidaz (GPX), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), guaikol peroksidaz

(GOPX) ve glutatyon-S-transferaz (GST) enzimleridir. Bunun yanı sıra bu enzimlerin dışında enzim özelliği taşımayan moleküllerde vardır: Askorbik asit (AsA), indirgenmiş ve yükseltgenmiş glutatyon (GSH ve GSSG), alkaloidler, fenolik bileşikler ve α -tokoferol (Parvaiz ve ark., 2010).



Şekil 2.4. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemi (Bray ve ark., 2000).

2.8.1. Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD), oksijenli solunum yapan bütün canlılarda ROS aracılığıyla oksidatif strese karşı savunmada görevli olan en etkili antioksidan enzimdir ve aynı zamanda metaloenzim olarak görev yapmaktadır (Gill ve Tuteja, 2010). Çevresel streslere maruz kalan bitkiler tarafından ROS'lar oluşturulur. Bu ROS'ların toksik etkilerini temizlemek için SOD tarafından karşı savunmanın ilk hattı oluşturulur (Gill ve Tuteja, 2010). SOD enzimi süperoksit anyon radikalini H_2O_2 'e ve oksijene dönüştürür. SOD tarafından $O_2^{\bullet-}$ radikaline parçalanması sonucunda oluşan H_2O_2 'in hücrelere zarar vermesini önlemek için hemen ortadan uzaklaştırılması gerekir. Çünkü bu radikal, $Cu^{+2/+3}$ ve $Fe^{+2/+3}$ gibi bazı metal iyonları ve metal şelatların bulunması halinde son derece reaktif olan OH^{\bullet} radikallerinin oluşumunu hızlandırır (Imlay ve Linn, 1988). Glioksizom ve peroksizomlarda gerçekleşen β -oksidasyon oluşturulan H_2O_2 kalataz tarafından suya dönüştürülür. Kloroplastlarda oluşturulan

H₂O₂ elektron vericisi olarak AsA kullanan APX enzimiyle toksik olmayan moleküllere dönüştürülür (Shigeoka ve ark., 2002).

Kloroplastlarda yer alan fotosentetik elektron taşınım zinciri bileşenleri, kendi kendine okside olma özelliğindedir ve NADP miktarının düşük olduğu koşullar altında süperoksit anyon radikalleri oluşabilir (Foyer ve Noctor, 2000). Kloroplastlarda en temel ROS kaynağı “Mehler Reaksiyonu”dur ve O₂’nin ışıkta indirgenme miktarı çevresel koşullara bağlı olarak değişir. Mitokondride üretilen H₂O₂ miktarı, kloroplast ve peroksizomlarda ışığa maruz kalmanın sonucu üretilen H₂O₂ miktarından daha azdır (Foyer ve Noctor, 2003). Stresle oluşan bu radikallerin neden olduğu oksidatif stresle başa çıkabilmek için bitkiler, katalaz (CAT; EC 1.11.1.6), süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1), peroksidaz (POX; EC 1.11.1.7), glutatyon redüktaz (GR; EC 1.6.4.2) ve askorbat peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini artırır. Bu savunmada SOD enzimi merkezi bir role sahiptir.

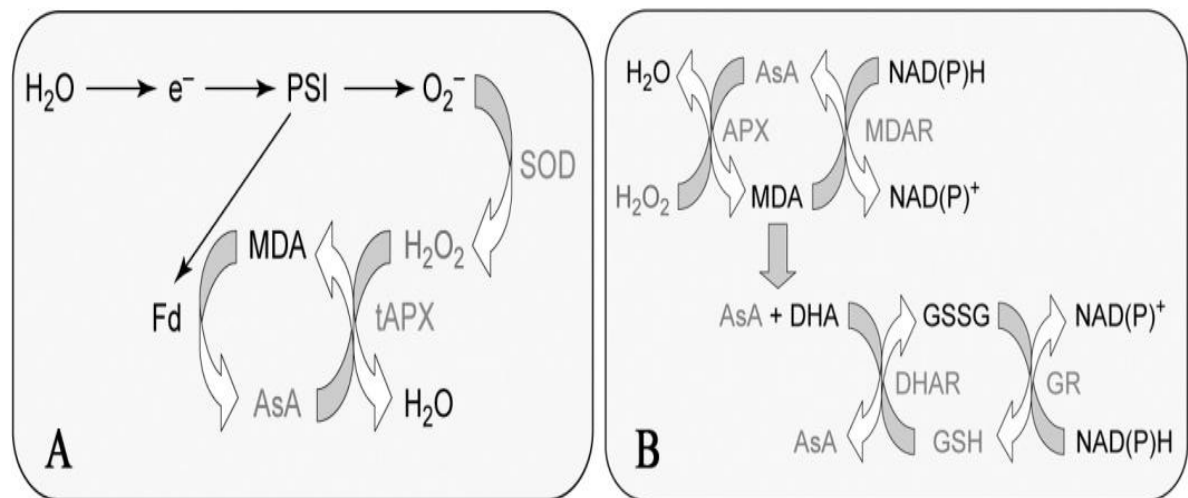


Süperoksit radikalleri sitoplazma, mitokondri ve kloroplastlara yerleşmiş olan farklı SOD tiplerinin aktivitesi ile H₂O₂’ye dönüştürülür. SOD aktivitesinin bu toksik ürünü APX ve GR tarafından ortadan kaldırılır. CAT enzimi de oluşan H₂O₂’i suya ve moleküler oksijene dönüştürür. Bu reaktiflerin zararsızlaştırılmasında enzimatik olmayan antioksidanlar da rol oynar. Bunlardan askorbik asit hidrofilik antioksidan, karoten pigmentler lipofilik antioksidandır ve bunlar fotosentetik sistemlerin temel bileşenleridir.

2.8.2. Askorbat peroksidaz (APX)

Bitkiler, algler, öglena ve diğer canlı organizmalarda ROS'ların süpürülmesi ve hücrelerin korunmasında en önemli rolü oynayan enzimlerden bir diğeri de askorbat peroksidaz (APX) enzimidir (Gill ve Tuteja, 2010). APX, H₂O₂’in süpürülmesi su-su döngüsü ve askorbat-glutatyon döngüsünde görev almaktadır (Şekil 2.4). APX elektron vericisi olarak askorbik asidi kullanır (Şekil 2.5). Beş farklı APX izoformu tanımlanmıştır ve bu formlar; kloroplast stromasındaki çözünebilir form (sAPX), tilakoide bağlı form (tAPX), sitoplazmik form (cAPX), glioksizom membran form (gmAPX) ve mitokondride bulunan mitAPX’dur (Noctor ve Foyer, 1998). Sitoplazmik

formunu monodehidroaskorbat radikali (MDA) oluşturmaktadır. APX, H_2O_2 'e karşı katalaz ile peroksidazdan çok yüksek bir ilgiye sahiptir. CAT ve POX, mM seviyesinde H_2O_2 'e duyarlılık gösteriyorken, APX enzimi μM seviyesindeki H_2O_2 'e ilgi gösterir. Bu özelliğinden dolayı APX stres şartlarında oluşturulmuş olan ROS' ların yıkımında en önemli enzim olarak görev yapar (Gill ve Tuteja, 2010).



Şekil 2.5. Su-Su döngüsü (A) ve Askorbat-Glutatyon döngüsü (B) (Mittler, 2002)

CAT ve APX her ikisi de H_2O_2 'i süpürmesine rağmen aralarında bazı farklılıklar bulunmaktadır: (i) APX indirgeyici olarak askorbatı kullanır ancak CAT bu reaksiyon için indirgeyici ajana ihtiyaç duymaz (ii) CAT yüksek bir reaksiyon oranına sahiptir, fakat APX'a göre H_2O_2 'e karşı ilgisi azdır (Willekens ve ark., 1997). Bu nedenle peroksizomlarda bulunan CAT, sadece yüksek miktardaki H_2O_2 'i süpürürken, APX daha özel bölmelerde bulunan çok küçük miktarlardaki H_2O_2 'leri bile ortadan kaldırabilir (Sekmen, 2009).

2.8.3. Peroksidaz (POX)

Peroksidazlar, SOD' ların süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) radikallerini süpürürken ortaya çıkan hidrojen peroksidin (H_2O_2) hücrelerden süpürülmesinde önemli olan enzimlerden bir tanesidir (Asada ve Takahashi, 1887). Aynı zamanda patojen yaralanmalarda, oksin metabolizmasında, lignin ve etilen biyosentezinde ve farklı streslere karşı oluşturulan glikoproteindir (Radic ve ark., 2006; Kim ve ark., 1999).

2.8.4. Katalaz (CAT)

Katalaz, çevresel streslere karşı geliştirilen cevap mekanizmalarından olup ve ayrıca patojenlerin öldürülmesinde organizmaların savunma sistemleri tarafından üretilmektedir. Yüksek konsantrasyonlar H_2O_2 canlıların hücrelerine zarar verir. Hücrelerde biriktirilmesi protein, lipid ve DNA gibi hücrel yapıların oksidasyonuna sebep olur (Mittler, 2017). Bu görevde katalaz tarafından yürütülmektedir.

Katalazlar, stres altında ROS'ların deoksifikasyonu için mutlaka gerekli olan ve yapısında tetramerik demir bulunan enzimlerdir (Garg ve Manchanda, 2009). Katalaz hidrojen peroksidin (H_2O_2), moleküler oksijen (O_2) ve suya (H_2O) dönüşmesini sağlar ve yoğun olarak peroksizomlarda bulunurlar (Srivalli ve ark., 2003). Katalazlar, ROS'ların yıkımını diğer antioksidanlardan daha yoğun olarak gerçekleştirirler. Dakikada 6 milyon O_2 ve H_2O 'in dönüşümünü gerçekleştirirler. Bütün aerobik ökaryotlarda CAT bulunur (Gill ve Tuteja, 2010). CAT diğer bir yandan toksik kimyasallar olan peroksitatif reaksiyon ile fenol, formik asit, alkol ve formaldehit gibi maddeleri de etkileyerek canlılarda oluşabilecek zararlı etkilere karşı organizmaları da korurlar (Venkat ve ark., 2006). Katalaz aktivitesi canlılarda daha çok eritrosit, böbrek hücreleri ve karaciğer hücrelerinde gözlenmektedir (Memişoğulları, 2005).

2.8.5. Glutatyon redüktaz (GR)

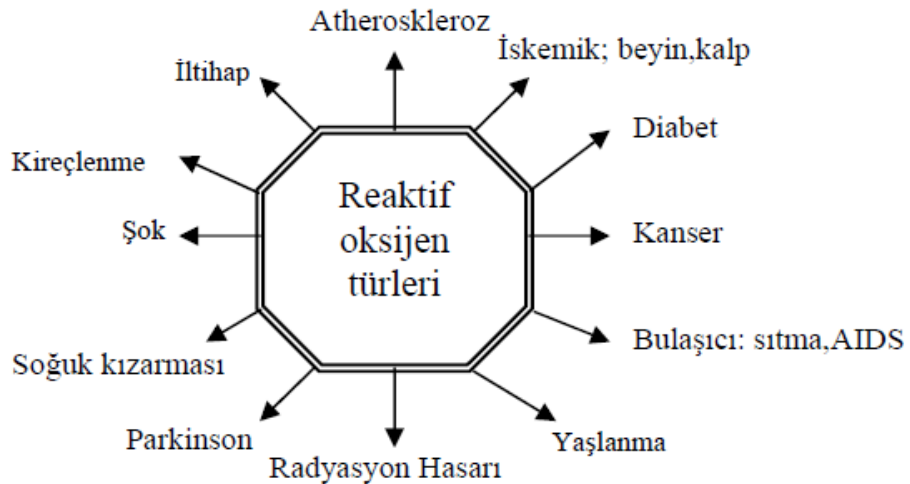
Glutatyon redüktaz enzimi, okside glutatyonun (GSSG), glutatyon (GSH) indirgenmesiyle oluşur. Glutatyon redüktaz redoks döngüsü reaksiyonlarında önemli bir enzimdir. Hücrel GSH' ın hücrelerde yeteri seviyelerde kalmasında rol oynar. GSH serbest radikaller ve organik peroksitler ile reaksiyona girer ve ayrıca antioksidan olarak görev yapar.

2.8.5. Antioksidanlar

Huang ve ark. (2005) antioksidanları yükseltgenme reaksiyonlarını kayda değer şekilde geciktiren ya da engelleyen moleküller olarak tanımlamaktadır. Fenolik asitler, karotenoidler ve vitaminler (C ve E) antioksidatif etkileri ile öne çıkan başlıca bileşiklerdir (Kalt, 2005; Dimitrios, 2006). β -karoten, provitamin A, C ve E vitaminleri antioksidan vitaminler olarak bilinir ve antioksidan savunma mekanizmasında ROS

formlarını yok etmede aktif rol oynarlar. Diğer yandan zincir kırıcı antioksidan olarak da etki gösterirler. Antioksidanlar hem tek başına hem de sinerjist olarak görev yaparak ROS'ları geciktirirler ya da engellerler (Elliot, 1999). Fenolik bileşikler serbest radikalleri bağlayarak, metallerle şelat oluşturarak ve lipoksigenaz enzimini inaktive ederek antioksidatif özellik gösterirler (Frankel, 1999; Cemeroğlu, 2007).

Antioksidanlar, hücrelere zarar veren reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerin toksik etkilerini indirgeyerek önemli derecede azaltırlar. Bu tehlikeli maddelerin oluşmasının engellenmesi veya süpürülmesi insan ve diğer canlı organizmaların sağlığı açısından antioksidan bileşiklerin ve enzimlerin önemini artırır. (Şekil 2.6)'da reaktif oksijen türlerinin farklı doku ve organlarda sebep olduğu hastalıklar ve hasarlar gösterilmiştir.



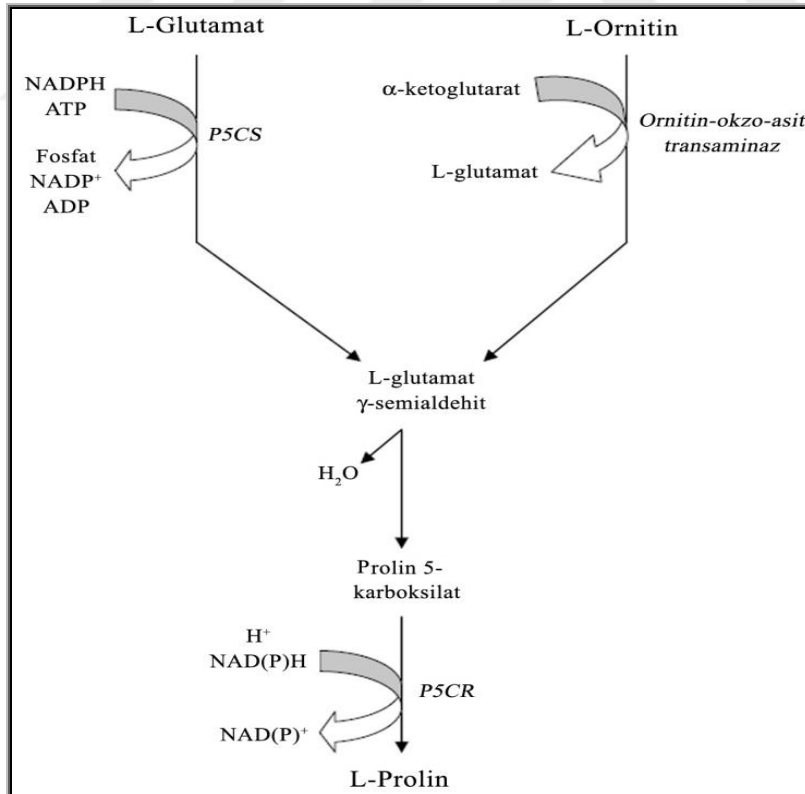
Şekil 2.6. ROS'ların farklı doku ve organlarda sebep olduğu hasarlar.

2.8.5.1. Aminoasitler ve amidler

Prolin stres altındaki bitkilerde en yaygın olarak biriktirilen ozmolitlerden ve aynı zamanda bitki stres altındayken en fazla üretilen aminoasitlerden biridir. Prolin, glutamat ya da ornitinden sentezlenir, fakat baskın olarak glutamattan sentezlenmektedir. (Yıldız ve ark., 2010). Prolin, azot fazlalığında ornitinden sentezlenir (Delauney ve ark., 1993). Bitkilerde prolin birikimi, tuzluluk, kuraklık, yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık, ağır metal, patojen enfeksiyonu, besin kıtlığı, atmosferik kirlenme ve UV gibi stres durumlarında arttığı rapor edilmiştir

(Siripornadulsil ve ark., 2002). Bitkide prolin biriktirilmesi türden türe değişebilir ve bu biriktirilen miktar kontrol bitkisine göre 100 kat daha fazla olabilir. Prolin bitkilerde yaygın olarak bulunabilir ve diğer aminoasitlere oranla daha fazla biriktirilebilir. Bu sebeple biriktirilen prolin, kullanılan azot birikiminin düzenlenmesinde etkilidir. (Abraham ve ark., 2003). Prolin bitkilerdeki NADP^+ gereksinimlerini iyileştirerek stres altındaki hücrelerde oluşan redoks potansiyeli değişimlerini iyileştirici etki yaptığı düşünülmektedir (Hare ve ark., 1998).

Bütün bitkiler stres altında prolin biriktirebilirler. Prolin sentezi için Δ^1 -prolin-5-karboksilat sentetaz (P5CS) geninin ekspresyonu tüm dokularda süratle teşvik edilir. Prolin sentezinde üç enzimatik aktivite rol oynar: (i) L-glutamat üzerinden P5CS' nin Δ^1 - γ -glutamil kinaz aktivitesi, (ii) L-ornitin üzerinden P5CS'nin glutamik- γ -semialdehit dehidrogenaz aktivitesi ve (iii) glutamatın Δ^1 -prolin-5-karboksilat redüktaz (P5CR) tarafından proline dönüştürülmesi (Atienza ve ark., 2004; Yıldız ve ark., 2010) (Şekil 2.7). Bitkiler için stresten sonraki iyileşme döneminde prolinin parçalanmasıyla karbon, azot ve enerji kaynağı sağlanır.

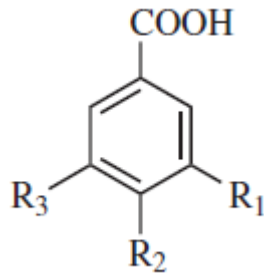


Şekil 2.7. Prolin biyosentez yolu. P5CS: Δ^1 -prolin-5-karboksilat sentetaz, P5CR: Δ^1 -prolin-5 karboksilat redüktaz (Delauney ve ark., 1993)

2.8.5.2. Fenolik asitler

Fenolik asitler doğal antioksidanların en önemli gruplarındandır ve bitkilerin tüm kısımlarında görülen polifenolik bileşenlerdir. Fenolik asitler, flavonoidler, sinamik asit türevleri, kumarinler ve tokoferoller en yaygın olarak bulunan fenolik antioksidanlardır. Fenolik asitler, besinlerde bulunuyor olması ve kolaylıkla oksitlenebilen maddelerdir ve oksidasyondan korudukları bilinmektedir (Tunalı ve ark. 2002). Fenolik bileşikler bir ya da daha çok fenolik grubun aromatik halkaya direkt bağlanmasıyla oluşur.

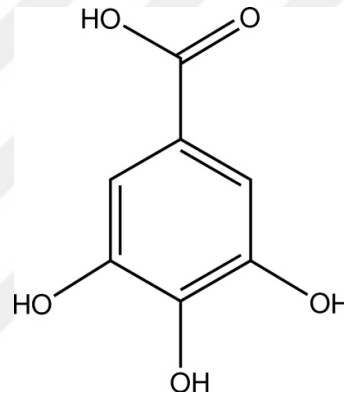
Bitkide çok miktarda bulunan fenolik asitler, hidroksi sinamik asit ve hidroksi benzoik asit olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır. Fenolik asitlerin çoğunu da hidroksi sinamik asitlerden oluşur (Cadenas ve Parker, 2002). Bu asitler, L-fenil alanin veya L-tirosinden p-kumarik, ferulik, kaffeik, sinapik ve klorojenik asitten meydana gelir. Sinamik asitlerin yapısındaki $CH=CH-COOH$ gruplarının var olması, hidrojen verebilme yeteneklerini artırır ve benzoik asitlere göre radikalleri daha kararlı hale getirirler. Benzoatlardan daha fazla etki gösterirler. Hidroksibenzoik asitler, yapısındaki hidroksi ve metoksi gruplarının yer değişmesi ile çeşitlilik gösterirler ve bu asitler gallik asit, vanilik asit, şiringik asit, resorsilik ve protokateşuik asitler gibi asitlerdir. Monohidroksibenzoatlar etkili hidroksil radikal süpürücüleridir. Bu sebeple hidroksillenmeye ve hidroksil radikallere yüksek reaktivite göstermeye eğilimlidirler. Fenil asetik asitler, fenolik halka ile karboksilat grubu arasında metilen grubunun girmesiyle oluşur ve onun orto ve meta hidroksi türevleri antioksidan aktivite (1 mM) gösterir. Hidroksil gruplarının varlığına bağlı olarak dihidroksi benzoik asit türevleri antioksidan aktivite gösterir, o-p pozisyonlarına sahip moleküllerde aktivite yüksek iken, m-p pozisyonlarında ise aktivite düşüktür (Rice- Evans ve ark., 1996).



R ₁	R ₂	R ₃	
H	H	H	Benzoik asit
H	OH	H	p-Hidroksibenzoik asit
OH	OH	OH	Gallik asit
OCH ₃	OH	OCH ₃	Siringik asit
OCH ₃	OH	H	Vanilik asit

Şekil 2.8. Fenolik asitlerin genel kimyasal yapısı

2.9. Gallik Asit ve Genel Özellikleri



Şekil 2.9. Gallik asitin kimyasal yapısı (Zhao ve ark., 2011)

Gallik asitin (3,4,5-trihidroksibenzoik asit; C₇H₆O₅) genel kimyasal ve fiziksel özellikleri;

Formül C₆H₂(OH)₃COOH

Molekül ağırlığı 170.12

Toksosite Oral rat LD50: 5000 mg kg⁻¹

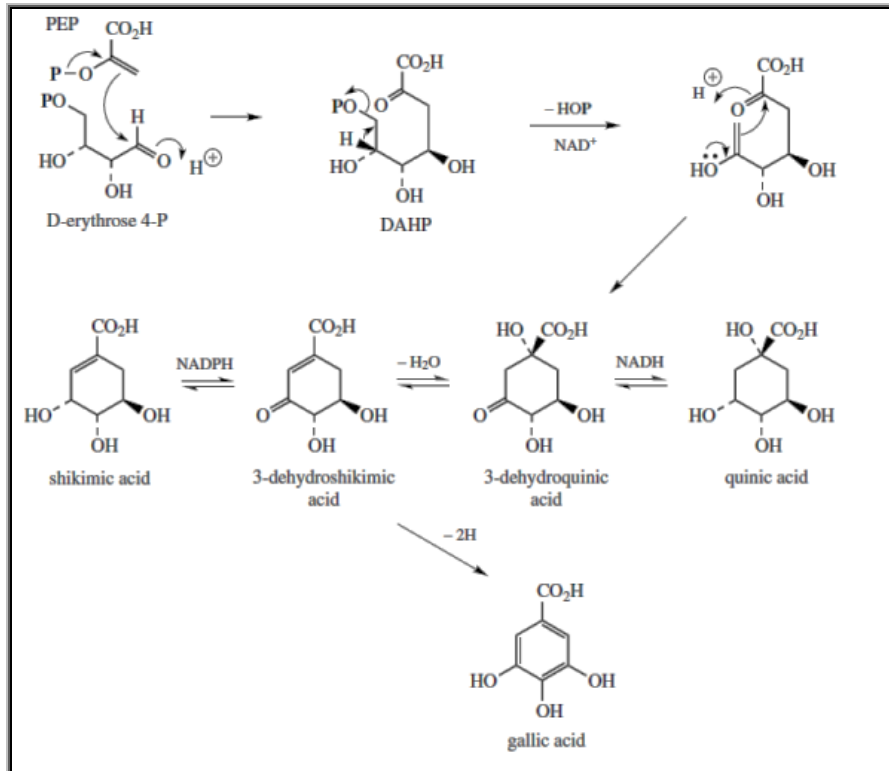
Sinonim 3,4,5-Trihidroksibenzoik asit

Fiziksel hali Beyaz kristal toz

Kaynama sıcaklığı 251°C

Antioksidanlar, metabolizma sonucu oluşan hücreye zararlı serbest radikalleri zararsız hale getirmektedirler. Ayrıca, sekonder metabolitlerin stres altında bitkileri koruyucu rolleri vardır. Stres altında oluşan tekli oksijen, serbest radikaller ve hidroksil

radikallerini süpürme kabiliyetinden dolayı fenolik bileşikler hem antioksidan hem de pro-oksidan özelliklerine sahiptir. Gallik asit (GLA; 3,4,5-trihidroksibenzoik asit, $C_6H_2(OH)_3COOH$) fenolik bir asittir ve hemen hemen tüm bitkilerde bulunan tanenlerin hidroliziyle oluşan doğal bir üründür. GLA, antioksidan rolünden dolayı stres altında oksidatif hasara karşı hücrelerin koruyucudur. Fenolik bileşikler düşük konsantrasyonlarında bitki büyümesine yararlı olabilir, ancak daha yüksek miktarlarda fitotoksitete ve büyüme üzerine zararlı etkilere sahiptir. Ayrıca fitotoksitenin derecesi bitki türüne, kültüvare ve uygulama süresine bağlıdır. GLA'nın uygun düzeydeki miktarı koruyuculuk rolüne sahip olduğu kadar, toksik miktarı hücrelerde apoptosis gibi olumsuz etkilere sahip olabilir (You ve Park, 2009; Hsu ve Yen, 2007). GLA ile uyarılan apoptosis, ROS türevli oksidatif stres, mitokondriyal bozukluk ve artan intrasellüler Ca^{+2} düzeyleri ile ilişkilidir (Chen ve ark., 2009). GLA, antiallerjik, antimutajenik, antikarsinojenik ve antiviral etkilere sahip güçlü bir antioksidandır. Hatta GLA antioksidan olarak glutatyondan yaklaşık 16 kat daha fazla etkilidir (Cortina-Puig ve ark., 2010). Ayrıca insanlarda GLA, C ve E vitaminlerinden 50 kat daha fazla koruyuculuk özelliği vardır (Ferk ve ark., 2007). GLA'nın hem pro-oksidan hem de antioksidan özellikleri ortamdaki demir ya da H_2O_2 'e bağlıdır (You ve Park, 2010).



Şekil 2.10. Gallik asitin sentez mekanizması (Dewick, 2002)

Bitkilerde fenolik asitlerin görev aldığı süreçler geniş dağılım göstermektedir: besin alınımı, protein sentezi, enzim aktivitesi, fotosentez, yapısal bileşiklerde, allelopati (Wu ve ark., 1999). Fenolik asitlerin aktive gösterdiği başlıca bölge kök membranlarıdır. Membran ve fenolik asitlerin etkileşimi, depolarizasyona ve iyon çıkışına neden olurken, hidrolik iletkenlik ve besin alınımında azalmaya neden olur (Lehman ve Blum, 1999). GLA, biyosentez yolu mikrobiyal aktivitelerle olabildiği gibi tannik asitin sülfürik asit ile hidrolizi sonucu da olabilir. Fenolik bileşikler, şikimik asit yoluyla sentezlenen ve monomerlere hidrolize olan ikincil bitki metabolitleridir (Muzzalupo ve ark., 2011). Bitki, bakteri ve mantarlarda GLA'nın birikimi ve sentez yolu tanımlanmış olmasına rağmen, biyosentez yolu tam olarak bilinmemektedir (Muir ve ark., 2011). Bitkilerde GLA sentez mekanizması halen araştırma konusudur, ancak 3 alternatif biyosentez yolu önerilmektedir: (a) 3,4,5-trihidroksisinnamik asitin α -oksidasyonu yoluyla (b) 3-dehidroşikimatın 3,4-dihidroksisinnamik asite (protocatechuic acid, PCA) dehidrasyonu (c) 3-dehidroşikimik asitin (şikimat yolunun aracılı bileşiği) doğrudan oksidasyonu (Kambourakis ve ark., 2000). Ancak bazı bitkilerde (*Betula pubescens* ssp. *czerepanovii* gibi), 4,5-trihidroksisinnamik ve 3,4-dihidroksisinnamik asitin öncülleri olmadığından (a) ve (b) yolları aktif değildir (Werner ve ark., 1999). Bu nedenle (c) yolu, bitkilerde en muhtemel GLA biyosentez yoludur. GLA, NADP'a bağlı dehidroşikimat dehidrogenazın (DSDG) katalizlemesiyle 3-dehidroşikimik asitten oluşmaktadır (Ossipov ve ark., 2003). Aromatik aminoasit sentezinde temel olan şikimat yolundaki şikimat dehidrogenaz (SDH) enzimi GLA üretimi için gereklidir (Muir ve ark., 2011). Şikimat yolu fosfoenolpiruvat (PEP, glikolisiz sonucu oluşur) ve D-eritroz 4-fosfat (E4P, pentoz fosfat döngüsü sonucu oluşur) reaksiyonu ile başlar ve 7 C'lu 3-deoksi-D-arabino-heptulosonik 7-fosfatı (DAHP) oluşturulur (Şekil 2.10'da gösterilmiştir).

2.10. Bitki Materyali Buğday

Alem	: Plantae
Şube	: Magnoliophyta
Sınıf	: Liliopsida
Takım	: Poales
Familiya	: Poaceae
Cins	: Triticum
Tür	: <i>Triticum aestivum</i>

Buğday kapalı tohumluların (Angiospermae) bir çenekli (Monocotyledonae) buğdaygiller (Poaceae, Gramineae) familyasından otsu yapılı bir yıllık bitkidir. Buğday çiçekleri küçük başakçıklardan meydana gelir. Başak içerisindeki taneler, nişasta deposu birer çiçektir (Şekil 2.11'de gösterilmiştir). Her çiçekli bitki gibi buğdayda kök, gövde ve yaprak olmak üzere üç kısımdan meydana gelir. Buğday kökleri saçak köktür ve ancak toprağın yüzey kısımlarındaki besinleri alabilir. Buğday ılıman bölgelerin başlıca tarım ürünüdür. Bitkinin tarımının ve adaptasyonunun kolay olması, kutuplar hariç her yerde tarımının yapılabilirliği buğdayı stratejik bir bitki yapar.

Buğday, yüzyıllar boyunca ve günümüzde insan besininde kullanılan en önemli tahıllardan birisi olmuştur (FAO, 2010). Buğday karasal iklimde üretilir ve üretim sırası olarak mısır ve çeltik bitkilerinden sonra 3. sırada yer alır. Kabuğu ile ya da kabuğu ayrılarak da öğütülebilir. Buğday un, irmik, nişasta ve yem sanayisinde kullanılan önemli bir temel besin kaynağıdır. Buğdayın hasattından sonra artık ürün olarak hayvan besini için kullanılan saman ortaya çıkar.

Buğday, Türkiye'de olduğu gibi dünyada da stratejik bir bitkidir. İnsanla ve diğer canlılar için temel enerji ve protein kaynağıdır. Türkiye'de besin ihtiyacının %40'ı buğday ürünlerinden karşılanmaktadır. Ülkemizde tarımı yapılan bitkilerin %50'sini tahıllar oluşturur ve tahılların da yaklaşık %70'ini buğdaylar oluşturmaktadır (Güleç ve ark., 2010). Ülkemizde buğday ekim alanları çok fazla olup son sınırlarına ulaşmıştır ve buğday ekmeye elverişli olmayan alanlarda bile buğday tarımı yapılmaktadır. Bu sebep ile buğday verimini arttırmak için tarım yapılan alanları değil buğday veriminin artırılması yoluna gidilmelidir. Bunun için, yüksek verimli buğday türleri ve stres şartlarına dayanabilecek buğday türleri seçilip ekilmelidir.

Kaliteli buğday için tek bir kriter belirlemek mümkün değildir. Buğday da kalite ilgili tüketim alanlarına göre değişim göstermektedir. Çiftçi için buğdayın verimi önemli iken, değirmenci için un randımanı önem kazanırken, fırıncı için ekmeğin kabarması önemlidir (Yürür, 1998). Buğday üretimi ve verimi toplum ihtiyaçlarına ve tüketimlerine göre yapılmaktadır. Bu sebeple buğday ıslah çalışmaları genellikle ekmek ve makarna yapımında kullanılan buğday üzerine olmuştur.

Buğday üretiminin kolay olması, besleyiciliğinin yüksek olması, depolanması ve taşınmasının kolay olması, işlenebilirliğinin kolay olması gibi nedenlerden dolayı dünyada nüfusunun yaklaşık %35'inin temel besin kaynağıdır. Bir buğday tanesi yaklaşık olarak %65-75 nişasta, %8-15 protein, %1-5 yağ, %1.5-3 şeker, %1-2 kül, %11-13 de sudan oluşmaktadır. Bu sebeplerden dolayı buğday, önemli karbonhidrat, yağ ve protein kaynağı haline gelmektedir (Kün, 1998)

Tahıllar içerisinde bulundurdukları fenolik asitler, ferulikler ve vanilikler gibi antioksidan madde bulundurmaları tahılları önemli bir polifenol kaynağı yapar. Bu sebeple tahıllar meyve ve sebzelerden daha önemli bir antioksidan kaynağıdır. Yapılan çalışmalar sonucunda tam buğday içerikli gıdalar (kabuğu ayrılmamış) ile beslenen canlıların, kalp damar hastalıkları ve kanser riskinin azaltılmasında etkili olduğu saptanmıştır.



Şekil 2.11. Bitki materyalinin başak ve tanelerinin görüntüsü (Toprak Mahsulleri Ofisi'nden alıntı, <http://www.tmo.gov.tr/Main.aspx?ID=1>, Ziyaret Tarihi: 08.05.2018)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitki Materyallerinin Temini ve Saklanması

Tez çalışmasında kullandığımız buğday (*Triticum aestivum* L. cv. *Karahan99*) tohumları Konya Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Laboratuvara getirilen tohumlar denemenin kurulması aşamasına kadar +4°C'de saklanmıştır.

3.2. Deneme Serilerinin Hazırlanması

Buğday fideleri kontrollü koşullara sahip iklim odasında su kültürü ortamında yetiştirilmiştir. Gerekli ısı, ışık, nem ve ayrıca sterilizasyon kontrolleri yapılmıştır. Buğday tohumlarının çimlendirilmesi ve çimlenme sonrası fidelerin uygulama boyutuna getirilmesi %70 nem, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık fotoperiyotta, 24±1°C sıcaklık ile 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğu olacak şekilde iklim kabini içerisinde sağlanmıştır.

3.2.1. Fidelere uygun gallik asit ve kadmiyum konsantrasyonunun belirlenmesi

Fidelere uygun konsantrasyonda gallik asit (GLA) ve kadmiyum (Cd) dozlarını belirlemek için ön deneme kurulmuştur. Dolgun görünüşlü sağlam ve birbirine benzer büyüklükte olan buğday tohumları seçilerek kullanılmadan önce yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Sterilizasyon için tohumlar %5'lik sodyum hipoklorid içerisinde 15 dakika tutulduktan sonra steril deiyonize su ile yıkanmıştır. Tohumlar 15'er adet gruplandırılarak içerisinde deiyonize su bulunan petri kutularında kurutma kâğıdı üzerinde 24±1°C'de, karanlık ortamda iklim odasında çimlenmeye bırakılmıştır. Çimlendirilen tohumlar, su kültürü ortamına aktarılmıştır. Fideler 21 gün süresince su kültürü ortamında kontrollü şartlar altında (12 saat ışık/12 saat karanlık, 24°C±1 sıcaklık, %70 nem, 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğu) büyütülmüş GLA ve Cd uygulamasına geçilmeden önce fideler gruplandırılmıştır. Gruplandırılan fidelere 0.25, 0.75 ve 1 mM GLA dozları ile 50, 100, 200 ve 400 μM konsantrasyonlarda Cd uygulanmıştır ve uygulama süresinin 1 hafta olmasına karar verilmiştir. Süre sonunda fideler hasat edilerek malondialdehit (TBARS) içerikleri belirlenmiştir. Fidelerin lipid

peroksidasyon seviyelerinin belirlenmesi ile en uygun GLA (0.25 ve 0.75 mM GLA) ve Cd (100 ve 200 μM Cd) dozları tespit edilmiştir.

3.2.2. Denemenin kurulması

Buğday tohumlarına 140 dakika süresince %5 sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) ile yüzey sterilizasyonu uygulanmış ve sonrasında beş kere distile su ile yıkanmıştır. Sterilize edilen tohumlar distile su ile ıslatılmış çift tabakalı kurutma kağıdına yerleştirilmiş ve çimlenmeye bırakılmıştır. Çimlenen buğday fideleri yarı ölçekli Hoagland solüsyonu içeren su kültürüne aktarılmıştır. Fideler kontrollü koşullar altında (24°C , 12/12 saat ışık/karanlık periyodunda %70 kısmi nem ve $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotosentetik foton akış yoğunluğunda) büyüme odasında üç hafta süresince bırakılmıştır. Bu süre sonunda tek başına ya da kombinasyonlu şekilde gallik asit uygulamaları (0.25 ve 0.75 mM GLA) ve kadmiyum uygulamaları (100 ve 200 μM Cd) yapılmıştır. Uygulamanın 7. gününde fideler hasat (örnekleme) edilmiş ve fizyolojik analizleri hasat esnasında tamamlanmıştır. Diğer yandan, yaprak örnekleri biyokimyasal ve elektroforetik analizlerinde kullanılmak üzere -86°C 'de derin dondurucuda saklanmıştır.



Şekil 3.1. Denememizdeki 7 günlük buğday fidelerinin genel görünümü

3.3. Analiz Yöntemleri

Örnekleme yapılan buğday yapraklarından aşağıda belirtilen fizyolojik ve biyokimyasal parametreler ölçülmüştür:

- Fidelerin büyüme parametreleri (Sürgün yaş ağırlıkları, kuru ağırlıkları, uzunlukları)
- Bağıl büyüme oranı (RGR)
- Yaprak bağıl su içeriği (RWC)
- Prolin analizi
- ROS miktarı -Hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarı
- Lipid peroksidasyonu (TBARS miktarı)
- Protein miktarı
- Antioksidan enzim/izozim aktiviteleri -Süperoksit dismutaz (SOD; Mn-SOD, Cu/Zn-SOD ve Fe-SOD), Katalaz (CAT), Peroksidaz (POX), Askorbat peroksidaz (APX) ve Glutatyon redüktaz (GR)

3.4. Büyüme Parametrelerinin Belirlenmesi

3.4.1. Sürgünlerin yaş ağırlığı, kuru ağırlığı ve uzunluklarının belirlenmesi

21 günlük buğday fideleri, Cd ve/veya GLA uygulamasının 0. ve 7. gününde hasat edilmiştir. Her bir gruptan rastgele 5'er bitki alınarak gövde ve kökler birbirinden ayrılmıştır. Buğday sürgünleri tartılarak yaş ağırlıkları (YA, g) ve uzunlukları (cm) belirlenmiştir. Örnekler 70 °C'de 72 saat bekletildikten sonra kuru ağırlıkları (KA, g) ölçülmüştür.

3.4.2. Nisbi büyüme oranının belirlenmesi

Uygulamaları takiben her bir gruptan rastgele alınan bitki fidelerinin uzunlukları ölçülmüştür. Bu örneklerin ayrıca yaş ağırlıkları da (YA) belirlenmiştir. Örnekler 70°C'de 72 saat etüvde bekletildikten sonra kuru ağırlıkları (KA) kaydedilmiştir. Yaprak kısmi büyüme oranı (RGR) değerleri, Hunt ve ark. (2002) tarafından verilen formüle göre hesaplanmıştır:

$$RGR = [\ln (KA_2) - \ln (KA_1)] / (t_2 - t_1),$$

KA_1 = kuru ağırlık (g), t_1 zamanında; KA_2 = kuru ağırlık (g), t_2 zamanında, t_1 ; başlangıç hasat (0. gün hasadı) t_2 ; son hasat (7. gün hasadı).

3.5. Yaprak Bağlı Su İçeriğinin Belirlenmesi

Stres uygulamasının 7. gününde her bir gruptaki fidelerden yaklaşık olarak eş boyutlarda yaprak örnekleri alınarak yaş ağırlıkları (YA) ölçülmüştür. Yapraklar 6 saat süresince 50 ml deiyonize su içeren petrilere bekletilerek ve turgorlu hale geçmeleri sağlanmıştır. Bu süre sonunda turgorlu yapraklar kurutularak tartılmış ve turgorlu ağırlıkları (TA) belirlenmiştir. Tartılan yaprak örnekleri 48 saat süreyle 65-70°C'de etüvde kurutulmuş ve kuru ağırlıkları (KA) rapor edilmiştir. Her bir gruba ait yaprak örneklerinin bağlı su içeriği Smart ve Bingham (1974) tarafından rapor edilen formüle göre % olarak hesaplanmıştır:

$$RWC (\%) = [(YA - KA) / (TA - KA)] \times 100$$

3.6. Prolin Miktarının Belirlenmesi

Serbest prolin miktarının belirlenmesi, Bates ve ark. (1973) 'na göre yapılmıştır. Her bir gruptan 0.5 g yaprak örnekleri alınmış ve %3 (w/v) sülfosalisilik asit (SSA) ile homojenize edilmiş ve homojenat filtre kağıdından süzdürülmüştür. Asit ninhidrin ve glasiyal asetik asit eklendikten sonra oluşan karışım 100°C'de 1 saat su banyosunda bekletilmiştir. Daha sonra reaksiyon, buz banyosu kullanılarak durdurulmuştur. Bu karışıma toluen ilave edilerek, sıvı fazdan aspire edilen toluen fraksiyonunun 520 nm'deki absorbansı spektrofotometre ile okunmuştur. Prolin konsantrasyonu, kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmış ve $\mu\text{mol g}^{-1}$ taze ağırlık olarak ifade edilmiştir.

3.7. ROS Miktarının Belirlenmesi

3.7.1. Hidrojen peroksit (H_2O_2) miktarının belirlenmesi

H_2O_2 miktar tayini Liu ve ark. (2010) tarafından rapor edilen prosedüre göre yapılmıştır. Örnekleme sonrasında 0.5 g yaprak örnekleri sıvı azotta ezildikten sonra -

20°C’de buzdolabında bekletilen asetonun 3 ml’si homojenize edilmiş ve 3.000 g’de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatanta 0.1 ml titanyum karışımı (%20 (v/v) titanyum tetraklorid içeren ve hidroklorik asit ile hazırlanan) ilave edilmiştir. Daha sonra karışım, amonyum hidroksit titanyum-peroksit kombinasyonu ile karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı 16.000 g’de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Pellet kısmı -20°C’de soğutulmuş aseton ile yıkanmıştır. Sonrasında pellet 1 M H₂SO₄ ile çözdürülmüştür. Solüsyonun absorbanı 410 nm’de okunmuştur. Örneklerdeki H₂O₂ miktarları, bilinen H₂O₂ konsantrasyonlarına göre hazırlanan standart eğim grafiğine göre hesaplanmıştır.

3.8. Lipid Peroksidasyonunun Belirlenmesi

Lipid peroksidasyonu düzeyini gösteren TBARS miktarı, Madhava ve Sresty (2000)’ nin tanımladığı metoda göre yapılmıştır. 0.5 g yaprak örnekleri TCA (tiokloroasetik asit) ile homojenize edilmiş ve 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden elde edilen süpernatanta TBA (2-tiobarbitürik asit) ve TCA (Triokloroasetik asit) karışımını içeren reaksiyon karışımı eklenmiş ve karışım 95°C ’de 30 dakika süresince tutulmuştur. Karışım 10.000 g’de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Aktivite için 532-600 nm aralığında absorban değişimleri izlenmiştir.

3.9. Total Protein Miktarının Belirlenmesi

Bradford (1976) tarafından tanımlanan prosedüre göre total protein miktarı belirlenmiştir. 50 µl örnek ve 0.95 ml Bradford boyası içeren karışım polistren küvetlere ilave edilmiş ve protein miktarı spektrofotometrede 595 nm’de ölçülmüştür. Kör için ise 50 µl seyreltme tamponu ve 0.95 ml Bradford boyası kullanılmıştır. Çözünebilen total protein miktarı mg yaş ağırlık olarak belirlenmiştir.

3.10. Antioksidan Enzim/İzozim Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.10.1. Enzim ekstraktlarının hazırlanması

Antioksidan enzimlerin ekstraksiyonu için derin dondurucuda bekletilmiş olan yaprak örnekleri sıvı azotta öğütüldükten sonra homojenizasyon tamponu ile

homojenize edilmiştir. Homojenizasyon tamponu 50 mM Tris-HCl, 0.1 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA), %0.2 (w/v) Triton X-100, 1 mM fenilmetilsülfonil florid (PMSF) ve 2 mM ditiotreitol (DTT) içermektedir. APX aktivitesinin belirlenmesinde homojenizasyon tamponuna DTT yerine %2 (w/v) PVPP konulmuş ve 5 mM askorbat eklenmiştir. Homojenatlar 14.000 g'de 30 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant kısmı protein ve enzim aktivitelerinde kullanılmıştır.

3.10.2. Antioksidan enzim/izozim aktivite analizleri

3.10.2.1. Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) enzim/izozim aktivitesinin belirlenmesi

Eşit miktarda protein içeren (40 µg) yaprak örnekleri Laemmli (1970) tarafından belirlenen yöntemle göre native page ile ayrılmıştır. Örneklerdeki protein miktarı, Bradford (1976)'a göre belirlenmiş ve belirli konsantrasyonlardaki standartlar bovin serum albumin (BSA) kullanılarak hazırlanmıştır. Örnekleri jelle yüklemeye önce taze yaprak örnekleri 9 mM Tris HCl ve %13.6 (v/v) gliserol içeren tampon karışımıyla homojenize edilmiştir. Karışım 14.000 g'de 5 dakika süresince santrifüj edilmiş ve elde edilen karışımın süpernatant kısmı enzim aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Ekstraktlar 120 mA sabit akımla %12 separating jel ve %5 stacking jel ile 2D-Hoeffer elektroforezinde ayrılmıştır. SOD aktivitesi, Beauchamp ve Fridovich (1971)'e göre riboflavin ve nitrobluetetrazolium (NBT) boyası ile belirlenmiştir. Elektroforezden sonra farklı SOD izozimleri, boya çözeltisine inhibitörler eklenerek belirlenmiştir. Potasyum siyanür (KCN), Cu/Zn-SOD inhibisyonu için, H₂O₂ ise Fe-SOD ve Cu/Zn-SOD inhibisyonu için boya çözeltisine eklenmiştir. Mn-SOD aktivitesi ise her iki inhibitöre de direnç göstermiştir. Jeller 30 dakika kadar boya solüsyonunda bekletildikten sonra, SOD izozim bantları jel görüntüleme cihazında görüntülenmiş ve densiyometrik analizi Bio-1D yazılım programıyla tayin edilmiştir. Total SOD aktivitesi 560 nm'de nitroblue tetrazolium (NBT) 'un fotokimyasal indirgenmesinin %50 inhibisyonu neden olan protein miktarı olarak ölçülmüştür. Aktivite tayini için reaksiyon karışımı 50 mM Na-fosfat tamponunda 0.033 mM NBT, 10 mM L-metiyonin, 0.66 mM EDTA.Na₂ ve 0.0033 mM riboflavin içermektedir. Riboflavin karışıma en son ilave edilmiş ve karışımı içeren test tüpleri 300 µmol m⁻² s⁻¹ ışık yoğunluğunda 10 dakika süresince bekletilmiştir. Enzim içermeyen test tüpleri yüksek NBT indirgenmesi

nedeniyle maksimum oranda renk yoğunluğuna sahiptir ve renk oluşturmayan tüpler kontrol grubu olarak belirlenmiştir.

3.10.2.2. Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Bergmeyer (1970) tarafından tanımlanan metoda göre, total katalaz (CAT) enzim aktivitesi tayini yapılmıştır. 0.1 mM EDTA, 50 mM Na-fosfat tamponu (pH 7.0), deiyonize su, %0.3 H₂O₂ ve enzim ekstraktından oluşan reaksiyon karışımı kuvarz küvetlere eklenmiştir. Aktivite UV ışığı bölgesinde köre karşı 240 nm'de H₂O₂'in azalma oranına bağlı olarak 3 dakika süresince belirlenmiştir. CAT aktivitesi dakikada harcanan $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ olarak ifade edilmiştir.

3.10.2.3. Peroksidaz (POX, EC 1.11.1.7) enzim aktivitesinin belirlenmesi

Total POX enzim aktivitesi, Herzog ve Fahimi (1973) tarafından raporlanan yöntemeye göre tamamlanmıştır. 465 nm'de DAB (3'-3'-diaminobenzidin tetrahidroklorit) H₂O₂ varlığında okside olmaktadır ve absorbanstaki değişim oksidasyon miktarına bağlı olarak 3 dakika süresince izlenmiştir. Reaksiyon karışımı, DAB solüsyonu, %0.6'lık H₂O₂, deiyonize su ve enzim ekstraktından oluşmaktadır. Reaksiyon karışımına H₂O₂ en son eklenmiştir ve absorban artışı takip edilmiştir. Spesifik enzim aktivitesi dakikada tüketilen $\mu\text{mol/ml H}_2\text{O}_2$ olarak ifade edilmiştir.

3.10.2.4. Askorbat peroksidaz (APX, EC 1.11.1.11) enzim aktivitesinin belirlenmesi

APX enzim tayini Nakano ve Asada (1981) tarafından belirlenen metoda göre yapılmıştır. 290 nm'deki absorbansta oluşan azalma miktarı askorbat miktarındaki yükseltgenmeyi göstermektedir ve hesaplamalar askorbatın ekstinksiyon katsayısı kullanılarak yapılmıştır. 50 mM sodyum fosfat tamponu, 0.5 mM askorbat, 0.1 mM EDTA-Na₂ ve 1.2 mM H₂O₂ reaksiyon karışımını oluşurmaktadır. Askorbatın yükseltgenmesi, enzim ekstraktının katılmasıyla başlatılmış ve absorbanstaki azalma 3 dakika süresince takip edilmiştir. Bir birim APX aktivitesi dakikada okside olan 1 mmol ml⁻¹ askorbat olarak ifade edilmiştir.

3.10.2.5. Glutasyon redüktaz (GR, EC 1.6.4.2) enzim aktivitesinin belirlenmesi

GR enzim aktivitesi, 340 nm'deki absorbans azalmasına bağı olarak ölçülmüştür (Foyer ve Halliwell, 1976). 0.2 M Na₂HPO₄ ve 0.2 M NaH₂PO₄ içeren Na-fosfat tamponu, 0.005 M okside glutasyon (GSSG), 5 ml tampon ile tamamlanacak olan 0.0012 M NADP.Na₄ reaksiyon karışımını oluşturmaktadır. Kör örnek içermeyecek ve sadece reaksiyon karışımı olacaktır. NADPH varlığında, yükseltgenmiş glutasyon miktarındaki azalma, köre karşı üç dakika süresince izlenmiştir. Hesaplamalarda GR enziminin ekstinksiyon katsayısı kullanılmıştır. Spesifik enzim aktivitesi, dakikada indirgenen 1 mmol ml⁻¹ GSSG miktarı olarak ifade edilmiştir.

3.11. İstatistiksel Analizler

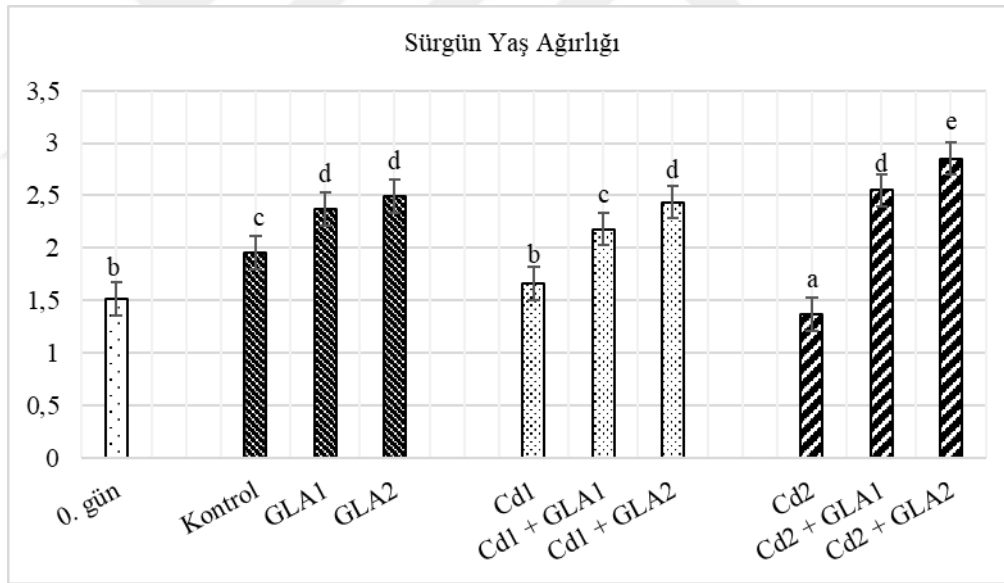
Tez projesini oluşturan gruplarda örnekler üç kez tekrar edilmiştir ve her bir sonuç, büyüme parametreleri dışında üç tekrardan oluşmaktadır. Elde edilen sonuçlar tek yönlü varyans ile (One-way ANOVA) ile analiz edilmiş ve ortalamalar arasındaki farklılıklar Lowest Standard Deviations (LSD) testi ile kıyaslanmıştır. P <0.05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı (önemli) kabul edilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS programı (standart versiyon 20.0) ile yapılmıştır. Bütün grafiklerdeki sütunların üzerindeki hata çubukları standart hatayı ifade etmektedir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Büyüme Parametreleri

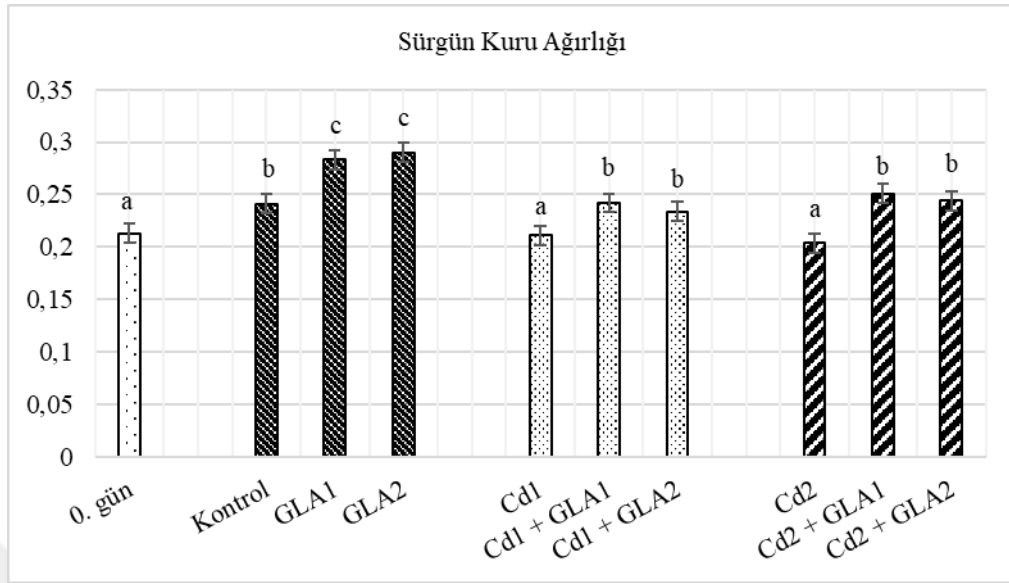
4.1.1. Buğday fidelerinin yaş ağırlıkları

0. gün örneklemesinde 1.516 g yaş ağırlığı belirlenirken, 7. gün örneklemesinde yaş ağırlıkta bir artış (1.957 g) kaydedilmiştir (Şekil 4.1). Ancak stres uygulaması sürgün yaş ağırlıklarında konsantrasyona bağlı kademeli olarak azalma göstermiştir. Bu durum, dışarıdan GLA uygulaması ile önlenebilmiştir. Aynı şekilde kontrol koşulları altında uygulanan GLA, sürgün yaş ağırlıklarında artışa neden olmuştur. Çalışmamızdaki sonucumuza paralel olarak Bhardwaj ve ark. (2017) kuraklık stresine maruz bıraktıkları buğday sürgün yaş ağırlıklarında bir azalma izlerken, dışarıdan fenolik asit uygulaması sonrasında yaş ağırlıklarında bir iyileşme saptamışlardır.



Şekil 4.1. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 μ M) maruz bırakılan buğday (*Triticum aestivum*) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) sürgün yaş ağırlığı (YA, g) üzerine etkileri. Sütunlar üzerindeki aynı harfler, istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir ($P < 0.05$)

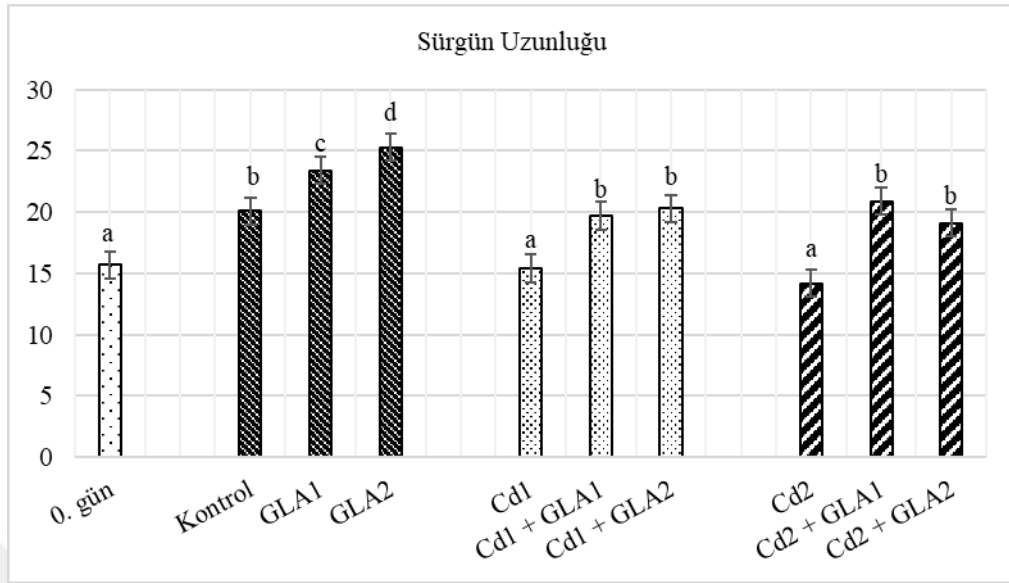
4.1.2. Buğday fidelerinin kuru ağırlıkları



Şekil 4.2. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 μ M) maruz bırakılan buğday (*Triticum aestivum*) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) sürgün kuru ağırlığı (KA, mg) üzerine etkileri. Sütunlar üzerindeki aynı harfler, istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir ($P > 0.05$)

Stres ve GLA uygulamasına bağlı olarak sürgün kuru ağırlıklarında izlenen değişimler Şekil 4.2'de verilmiştir. Stres altında sürgün kuru ağırlığında oluşan değişimler stresin önemli bir belirleyicisidir. Stresle birlikte buğday sürgün kuru ağırlıkları azalırken, stres ve GLA birlikte uygulanan gruplarda bu parametre istatistiksel olarak artış göstermiştir. Bu sonuca benzer olarak tek başına uygulanan GLA kontrol grubuna göre sürgün kuru ağırlıklarında azalmaya neden olmuştur. Bu konuda yapılan bir çalışmada buğday fideleri kuraklık stresine maruz bırakıldıktan sonra kuru ağırlıklarında azalma gözlenmiştir. Ancak bu sonuç dışarıdan salisilik asit uygulamasıyla iyileştirilmiştir (Kang ve ark., 2013).

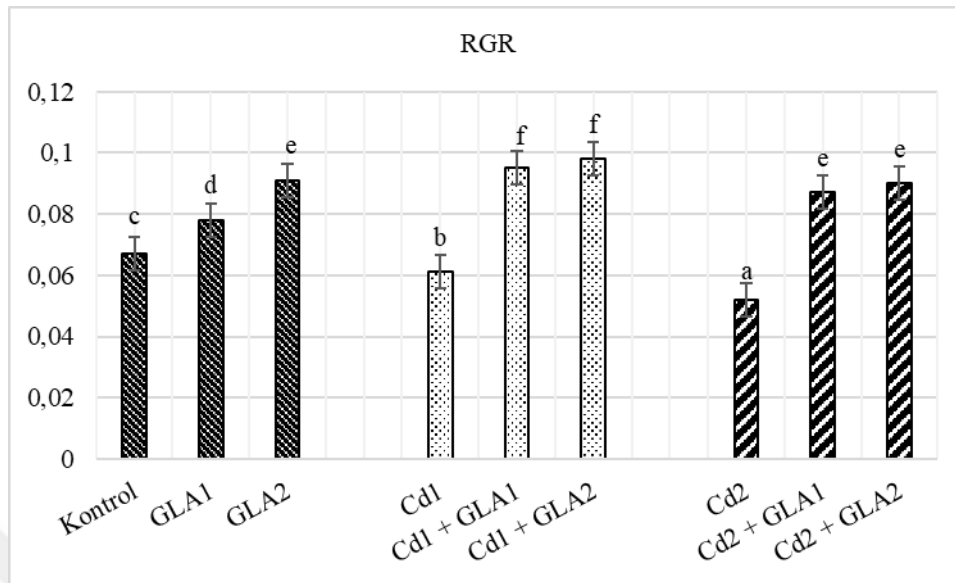
4.1.3. Buğday fidelerinin uzunlukları



Şekil 4.3. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 μ M) maruz bırakılan buğday (*Triticum aestivum*) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) sürgün uzunluğu (cm) üzerine etkileri. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir ($P < 0.05$)

Kadmiyumun bitkiler üzerindeki olumsuz etkilerin biriside bitki gelişiminin azalmasıdır (Dalcorsio ve ark., 2010). Şekil 4.3'te verildiği gibi, 0. gün ve 7. gün örneklemede buğday fidelerinin sürgün uzunluklarında büyüme gözlenmiştir. Cd stresine maruz kalan buğday fidelerinin sürgün uzunlukları kayda değer şekilde azalmıştır ve bu azalma yüksek Cd konsantrasyonunda daha belirgin şekildedir. Wan ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada dehidrasyon stresine maruz kalan salatalık bitkilerinde sürgün uzunluklarında olumsuz yönde etkilenme rapor etmişlerdir. Diğer yandan hem tek başına uygulanan GLA hem de stres altında uygulanan GLA ile sürgün uzunluklarında artış izlenmiştir. Öte yandan, Singh ve ark. (2017) dışarıdan uygulanan gallik asitin çeltik gövde uzunluğunda 1.3 kat artış oluşturduğunu bildirmişlerdir.

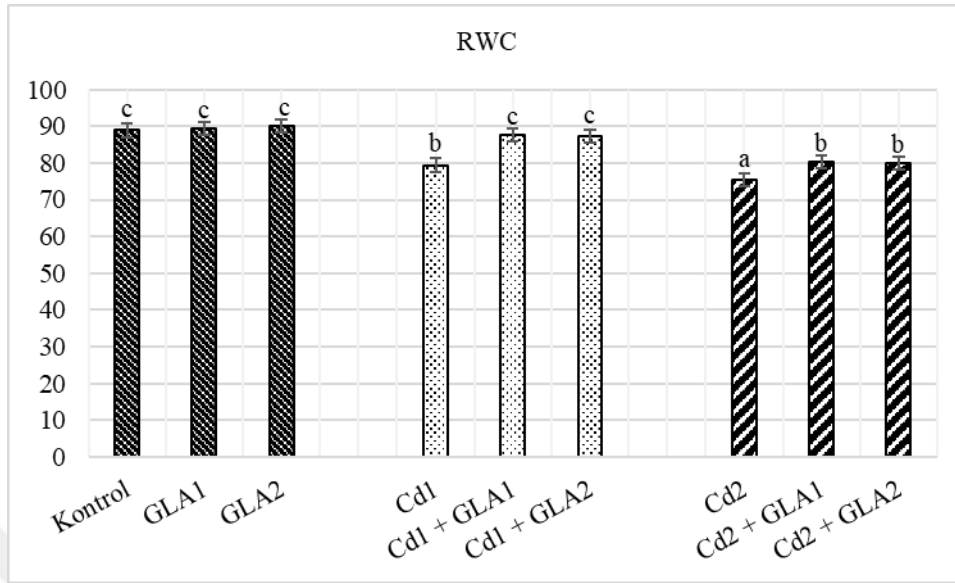
4.1.4. Buğday fidelerinin bağıl büyüme oranı



Şekil 4.4. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 μM) maruz bırakılan buğday (*Triticum aestivum*) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) sürgün bağıl büyüme oranları (RGR, $\text{mg g}^{-1} \text{gün}^{-1}$) üzerine etkileri. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir ($P < 0.05$)

Buğday fidelerinin Cd ve/veya GLA uygulamalarına bağlı olarak bağıl büyüme oranı (RGR) Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Tek başına uygulanan Cd stresi RGR düzeylerini önemli düzeyde azaltmıştır. Bu azalmanın oranı 200 μM Cd stresi altında (%22.3) daha fazladır. Aynı şekilde, Cd uygulanan *Lepidium sativum* bitkilerinin büyümesinde önemli düzeyde azalma saptanmıştır (Gill ve ark., 2012). Ancak bu durum dışarıdan GLA uygulaması ile iyileştirilebilmiştir. Diğer bir deyişle, Cd ve GLA kombinasyonu, tek başına stres uygulamalarına göre RGR değerlerini artırmıştır. Benzer olarak, sinamik asit mısırda fotosentetik pigmentleri tuz stresinin zararından korumakta ve böylece artan fotosentetik oran büyümeyi tetiklemektedir (Singh ve Chaturvedi, 2014). Bu çalışmada da strese maruz kalan buğday fidelerine uygulanan gallik asit fotosentetik parametrelerde (F_v/F_m) iyileştirme sağlamış (yayınlanmamış data) ve RGR'de gözlenen artış fotosentez verimliliğindeki artışla bağlantılı olduğu izlenmiştir. Bunun yanı sıra tek başına uygulanan GLA konsantrasyonları RGR değerlerini uyarabilmiştir. Benzer sonuç, gallik asit uygulanan çeltik bitkisinde büyümenin arttığı Singh ve ark. (2017) tarafından rapor edilmiştir.

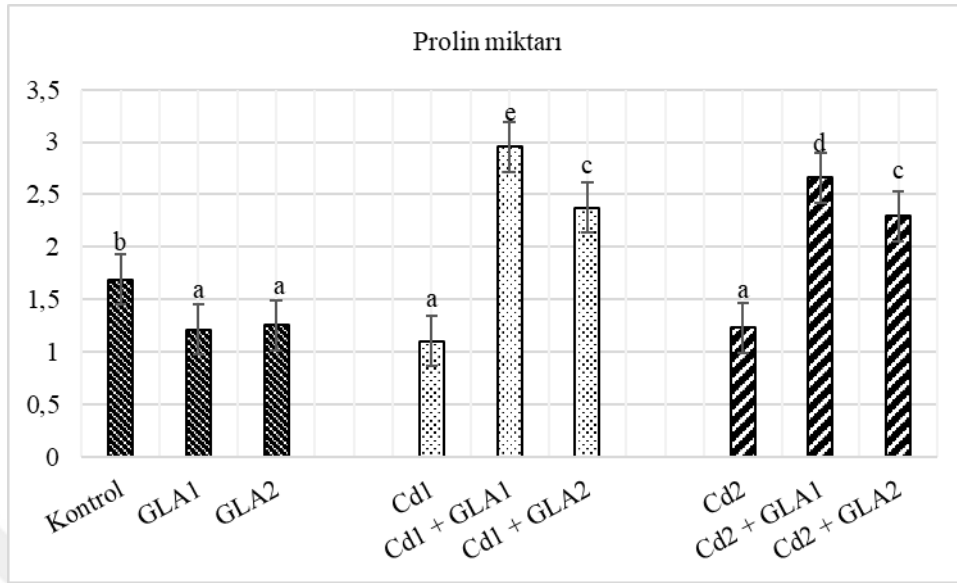
4.2. Buğday Yapraklarının Bağlı Su İçeriği



Şekil 4.5. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 μ M) maruz bırakılan buğday (*Triticum aestivum*) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) yaprak su içeriği (RWC, %) üzerine etkileri. Sütunlar üzerindeki aynı harfler, istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir ($P > 0.05$)

Cd stresi buğday fidelerinin yaprak RWC miktarında önemli azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.5). 100 μ M Cd stresine maruz bırakılan *Dorycnium pentaphyllum* yapraklarında RWC’de azalma saptanmıştır (Lefevre ve ark., 2009). Sandalio ve ark. (2001) tarafından bildirildiği gibi, çalışmamızda stresle uyarılan RWC’deki azalma Cd alınımının artışına bağlı olarak gerçekleşen su alınımı ve taşınımındaki bozulmayla bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada, RWC’nin azalması strese bağlı membran geçirgenliğindeki bozulma ve bunu takiben su kaybının tetiklenmesiyle bağlantılı olabilir. Diğer yandan her iki GLA konsantrasyonu da stresin azalttığı RWC değerlerini uyarabilmiştir. RWC’de gözlenen bu değişim artan Pro miktarıyla da bağlantılıdır. Benzer sonuç Yıldıztuğay ve Ozfidan-Konakci (2014) tarafından rutin ve Cd uygulanan bitkilerde gösterilmiştir. Tek başına uygulanan GLA, kontrol grubu ile kıyaslandığında yaprak su içeriğinde herhangi bir etkiye neden olmamıştır.

4.3. Buğday Yapraklarının Prolin Miktarı

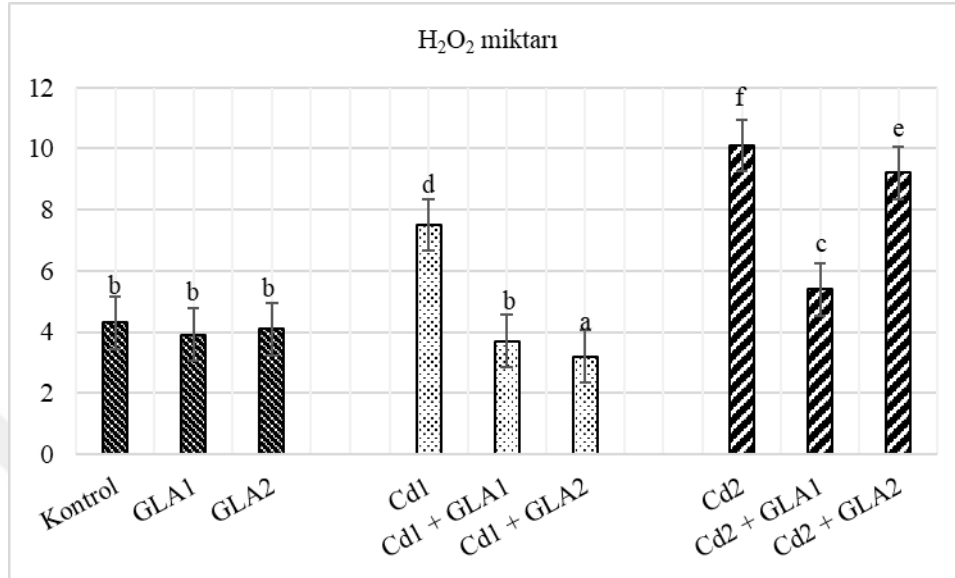


Şekil 4.6. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 µM) maruz bırakılan buğday (*Triticum aestivum*) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) yaprak prolin miktarı (Pro, µmol g⁻¹ YA) üzerine etkileri. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir (P < 0.05)

Şekil 4.6'da verildiği gibi, 100 ve 200 µM Cd uygulamasının 7. gününde Pro miktarı sırasıyla %34.8 ve %26.9 azalış göstermiştir. Buna zıt olarak, Cd stresine maruz bırakılan patatesten Pro birikimi artmıştır (Fidalgo ve ark., 2011). Pro miktarındaki bu azalış, dışarıdan uygulanan GLA ile önlenmiştir. GLA1+Cd gruplarında gözlenen Pro miktarındaki artış daha kayda değerdir. Diğer bir çalışmada nohut stresin azalttığı Pro miktarının GLA uygulamasıyla artışı, bitkilerdeki Pro miktarının olumlu rollerini ön plana çıkarmaktadır. Pro birikimi bitkilerde proteinlerin çevresindeki hidrojene bağlı suyun oluşumunda ve serbest radikallerin süpürülmesinde, membranların yapısının korunmasında ve stres altında hücre içi redoks potansiyelinin dengelenmesinde rol aldığı bilinmektedir (Sharma ve Dietz, 2006). Bu nedenle çalışmamızda Cd+GLA gruplarında TBARS ve Pro miktarı sonuçları arasında zıt bir ilişki bulunmaktadır. Ayrıca GLA'nın ozmotik düzenlemede rolü olduğunu düşünebiliriz. Cd stresi uygulanan gruplara benzer olarak tek başına uygulanan GLA konsantrasyonları Pro miktarına azalmaya neden olmuştur.

4.4. Buğday Yapraklarının ROS Miktarı

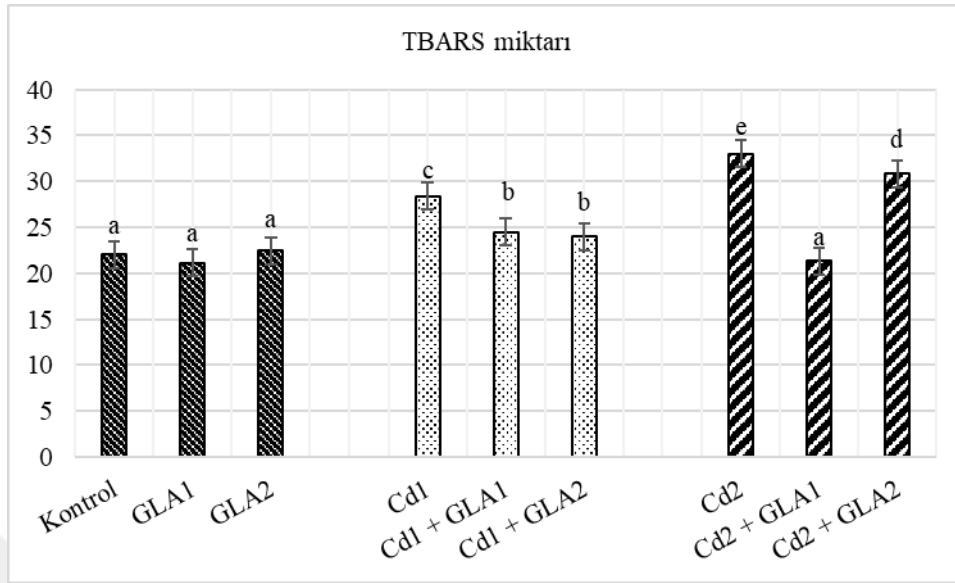
4.4.1. Buğday yapraklarının H₂O₂ miktarı



Şekil 4.7. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 µM) maruz bırakılan buğday (*Triticum aestivum*) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) hidrojen peroksit miktarı (H₂O₂, µmol g⁻¹ YA) üzerine etkileri. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir (P < 0.05)

Gerek ağır metal stresi gerekse diğer abiyotik stresler (kuraklık, tuzluluk, su veya su taşkını stresleri) bitkilerde ROS düzeylerinin artışına neden olmaktadır (Bhardwaj ve ark., 2017). Cd'un uyardığı oksidatif stres buğday yapraklarında H₂O₂ miktarını artırmıştır (Şekil 4.7). Bu değişimin oranı, 200 µM Cd stres altında 2.3 kat artışla en yüksek düzeydedir. Buna benzer olarak arsenik uygulanan bitkilerde H₂O₂ miktarının arttığı rapor edilmiştir (Chauhan ve ark., 2017). Stres uygulaması ile birlikte GLA, tek başına stres uygulamasına göre H₂O₂ miktarında önemli bir azalmaya neden olmuştur. Tek başına uygulanan GLA ise örnekleminin 7. gününde H₂O₂ miktarında herhangi bir etki oluşturmamıştır. Fenolik asitlerin stres koşulları altında hücrel antioksidanların aktivitelerini artırdığı yönünde çalışmalar mevcuttur (Zhang ve ark., 2012; Bhardwaj ve ark., 2017). Antioksidanların aktivitelerinin fenoliklerle uyarılan bu artışı H₂O₂ miktarının azaltılmasında etkilidir.

4.5. Buğday Yapraklarının Lipid Peroksidasyon Düzeyleri



Şekil 4.8. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 μ M) maruz bırakılan buğday (*Triticum aestivum*) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) lipid peroksidasyonu (TBARS, nmol g⁻¹ YA) üzerine etkileri. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, istatistiksel bakımdan farklı olman değerleri göstermektedir ($P < 0.05$)

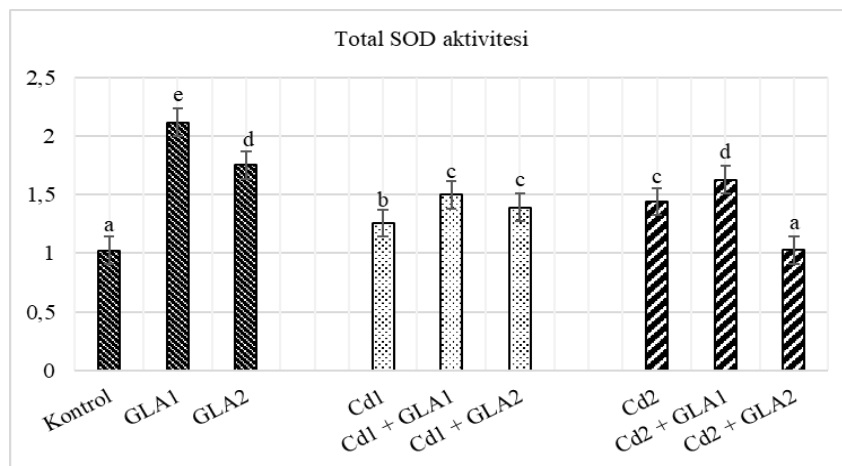
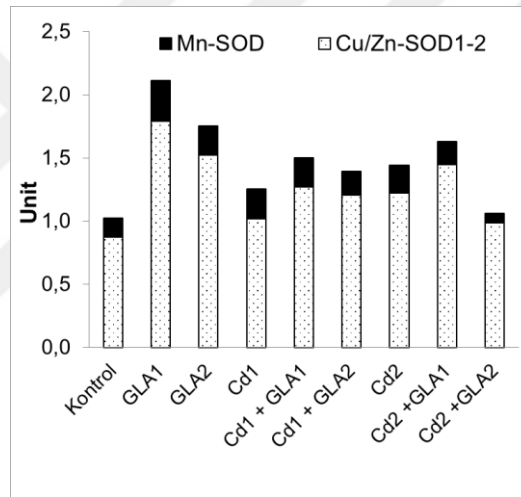
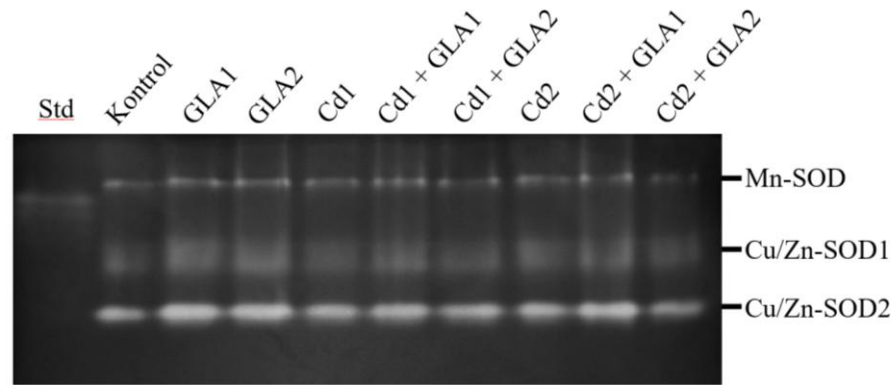
Lipid peroksidasyonu, tek başına olmasa da hücre düzeyinde Cd stresinin neden olduğu hasarın bir göstergesidir (Hernandez ve Almansa, 2002). Tiobarbirütik asit reaktif maddeler (TBARS) miktarının analiz edilmesi ve bu sonucun membran lipidleri üzerine yaptığı etkilerin değerlendirilmesi, ağır metal ile uyarılan stresin bitki üzerinde oluşturduğu hasarın anlaşılmasında rolü bulunmaktadır (Perez-Lopez ve ark., 2009). Buğday fidelerinde Cd ve GLA'nın tek başına ya da kombinasyonlu uygulamasında TBARS düzeylerinde gözlenen değişimler Şekil 4.8' de verilmiştir. Cd stresinin konsantrasyonunun artışına bağlı olarak TBARS düzeyleri indüklenmiştir. Bu uyarılma 200 μ M Cd stres altında daha fazla olup TBARS düzeylerinde 1.5 kat artış izlenmiştir. Stres uygulanan buğday fidelerine GLA uygulaması TBARS düzeylerinde istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmaya neden olmuştur. Bu azalma, Cd2+GLA1 grubunda tek başına stres uygulamasına göre daha belirgin şekilde (%35.3) gözlenmiştir. Li ve ark. (2013) salatalık bitkisine sekonder metabolit olan dışarıdan ferulik asit uygulamışlardır ve uygulamayla birlikte TBARS düzeylerinde bir azalmayı gözlemişlerdir. Caturla ve ark. (2003)'nın gösterdiği gibi, bu azalma muhtemelen artan antioksidan kapasiteyle

pozitif olarak etkileşimdedir. Kontrol koşulları altında uygulanan GLA, TBARS düzeylerinde herhangi bir etki oluşturmamıştır.



4.6. Buğday Yapraklarının Antioksidan Enzim/İzozim Aktiviteleri

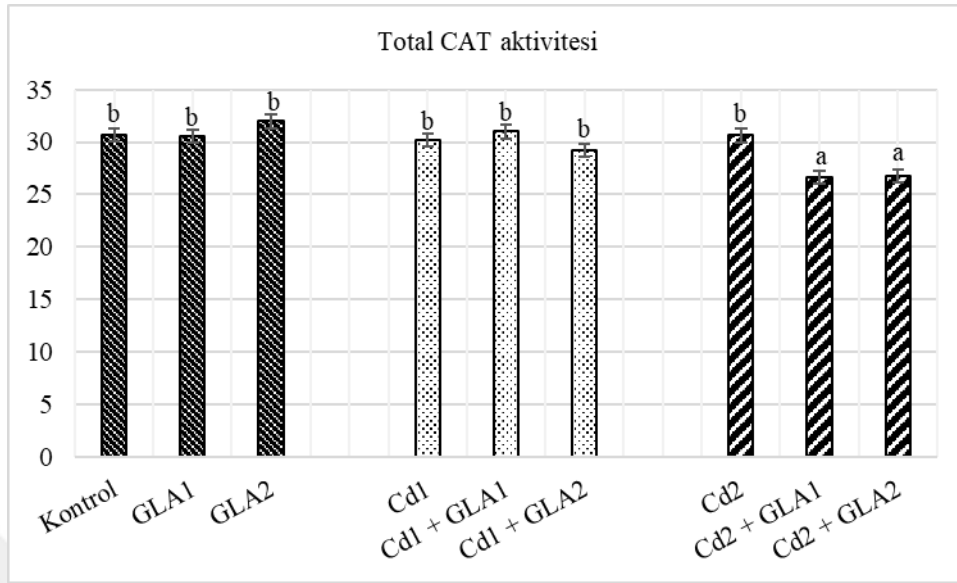
4.6.1. Buğday yapraklarının süperoksit dismutaz enzim/izozim aktivitesi



Şekil 4.9. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 μ M) maruz bırakılan buğday (*Triticum aestivum*) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0,25 ve 0,75 mM) SOD izozim ve total SOD aktivitesi (Unit mg⁻¹ protein) üzerine etkileri. Jele 40 μ g'lık protein içeren örnekler pipetlenmiştir. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir (P < 0,05)

Deneme süresince buğday yapraklarında bir Mn-SOD ve iki Cu/Zn-SOD olmak üzere toplam üç SOD izozimi tanımlanmıştır (Şekil 4.9). Total SOD ve SOD izozim sonuçları birbiriyle uyumludur. Total SOD aktivitesinde Cd stresiyle birlikte artış izlenmiştir. Bu sonuç Mn-SOD ve Cu-Zn-SOD1 yoğunluklarıyla da bağlantılıdır. Bu artışa bağlı olarak buğday yapraklarında SOD enziminin katalizlediği reaksiyonun ürünü olan H₂O₂ miktarı stresle birlikte uyarılmaktadır. Ayrıca, Haghghi ve ark. (2010) marul bitkisine Cd uygulaması sonucunda SOD aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. Diğer yandan, Cd²⁺+GLA2 grubu dışında, stres uygulanan buğday bitkilerine GLA uygulamasıyla SOD aktivitesindeki stresle birlikte gözlenen artış korunmuştur. Bu artış ise Cu-Zn-SOD1-2 bantlarında gözlenen yoğunluk artışıyla paraleldir. Tek başına GLA uygulaması ise SOD aktivitesinde diğer gruplarla benzer olarak artış sağlamıştır. Bu değişim tüm SOD izozimleriyle de uyumludur. Benzer olarak, Ozfidan-Konakci ve ark. (2015) tarafından tuz ve ozmotik stresin kombinasyonlu şekilde çeltik bitkilerine uygulamasından sonra SOD artışı rapor edilmiştir.

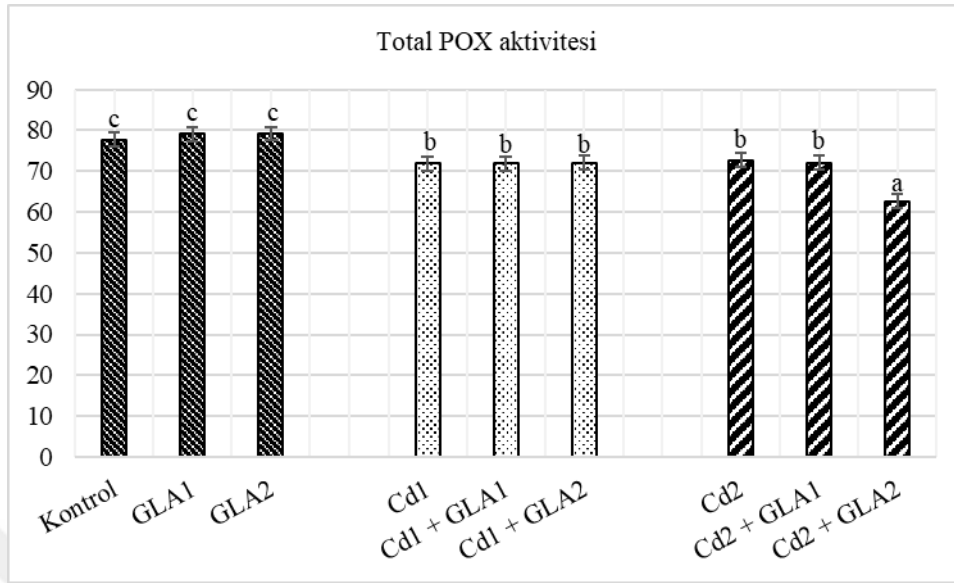
4.6.2. Buğday yapraklarının katalaz enzim aktivitesi



Şekil 4.10. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 μ M) maruz bırakılan buğday (*Triticum aestivum*) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) total katalaz aktivitesi (CAT, Unit mg^{-1} protein) üzerine etkileri. Sütunlar üzerindeki aynı harfler, istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir ($P > 0.05$)

Stresle birlikte hücrede biriken toksik düzeydeki H_2O_2 'nin süpürülmesi CAT, POX, APX ya da GR ile başarılmaktadır (Zhang ve ark., 2009). Total CAT aktivitesinde stres uygulamasında herhangi bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.10). Ancak, total CAT aktivitesinde azalma sadece yüksek Cd konsantrasyonlarında (200 μ M Cd) her iki GLA miktarıyla izlenmiştir. Bu grupta gözlenen değişime paralel olarak, çeltik bitkisine uygulanan Cd stresi CAT aktivitesinde azalmaya neden olmuştur (Rahman ve ark., 2016). Stres uygulamasında olduğu gibi, total CAT aktivitesinde Cd (100 μ M Cd) ve GLA kombinasyonları değişime neden olmamıştır. Benzer olarak, kontrol koşulları altından uygulanan GLA grubundaki CAT aktivitesiyle kontrol grubundaki aktivite benzerdir. Çalışmamızdaki bu sonucumuza zıt olarak kuraklık altında uygulanan salisilik asit ve gallik asit CAT aktivitesinde artışa neden olmuştur (Saruhan ve ark., 2012; Wan ve ark., 2014).

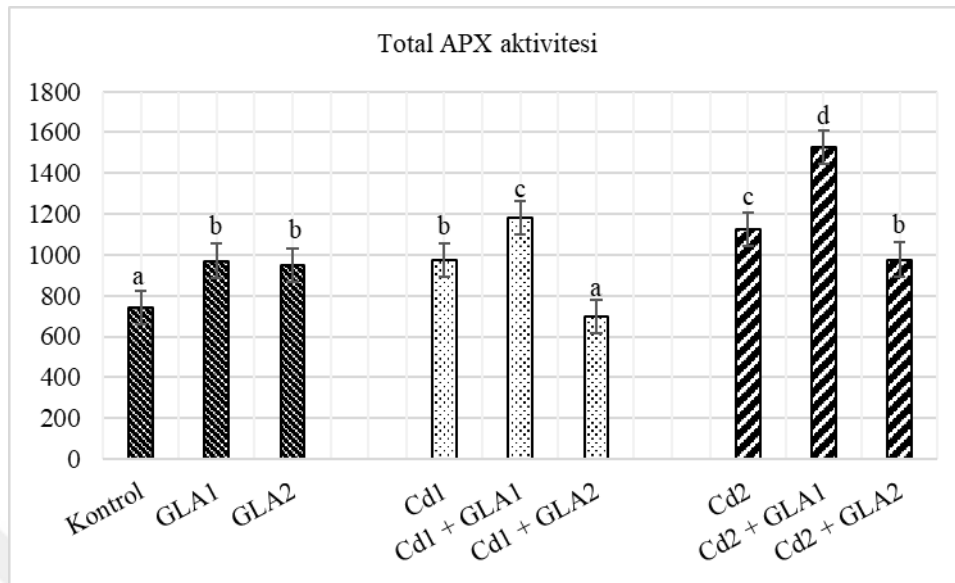
4.6.3. Buğday yapraklarının peroksidaz enzim aktivitesi



Şekil 4.11. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 μ M) maruz bırakılan buğday (*Triticum aestivum*) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) total peroksidaz aktivitesi (POX, Unit mg^{-1} protein) üzerine etkileri. Sütunlar üzerindeki aynı harfler, istatistiksel bakımdan farklı olmayan değerleri göstermektedir ($P > 0.05$)

H_2O_2 ' in toksik düzeylerinin süpürülmesinde görev alan diğer bir enzimde POX'dur (Bhardwaj ve ark., 2017). Şekil 4.11'de görüldüğü gibi, Cd stresi POX aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. Bu azalmanın oranları 100 ve 200 μ M Cd stresinde sırasıyla %7 ve %6'dır. Ancak bu sonucumuza zıt olarak Cd stresi altında yetiştirilen *Kosteletzkya virginica* bitkisinde POX aktivitesinin arttığı izlenmiştir (Han ve ark., 2013). Aynı şekilde tek başına GLA uygulamasında ve düşük Cd konsantrasyonlarında GLA uygulamalarında POX aktivitesinde değişim izlenmemiştir. POX aktivitesinde 200 μ M Cd ve GLA2 birlikte uygulandığında tek başına stres uygulamasıyla kıyaslandığında %14 oranında bir azalma bulunmuştur. Ancak diğer bir çalışmada soğuk stresinde arpada salisilik asit uygulamaları POX aktivitesinin daha da uyarılmasını sağlamaktadır (Mutlu ve ark., 2013).

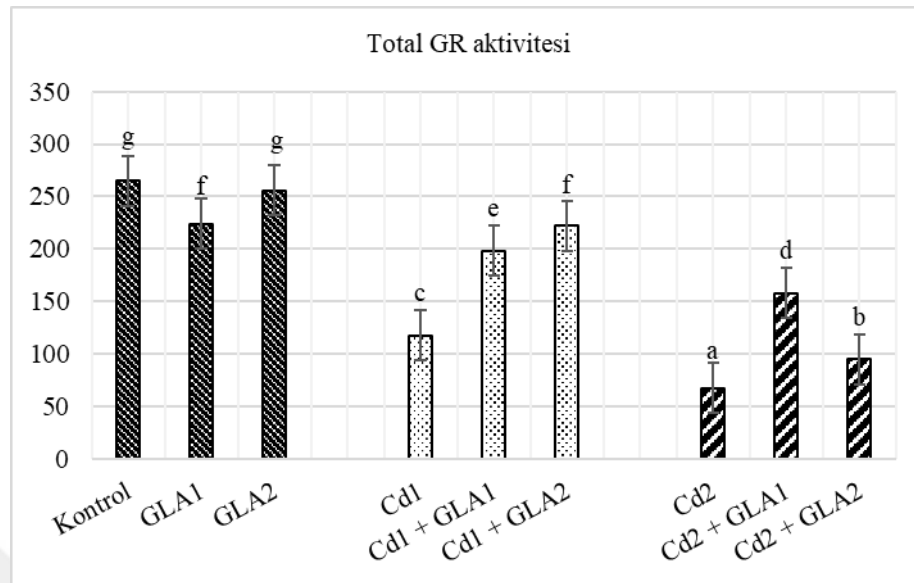
4.6.4. Buğday yapraklarının askorbat proksidaz enzim aktivitesi



Şekil 4.12. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 μM) maruz bırakılan buğday (*Triticum aestivum*) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) total askorbat peroksidaz aktivitesi (APX, Unit mg^{-1} protein) üzerine etkileri. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir ($P < 0.05$)

Stres ve GLA uygulamaları altında buğday fidelerinin APX aktivitesinde izlenen değişimler Şekil 4.12' de verilmiştir. Her iki Cd konsantrasyonlarıyla (100 ve 200 μM Cd) APX aktivitesindeki artış oranı sırasıyla 1.3 ve 1.5 kattır. Aynı şekilde Bhardwaj ve ark. (2017) kuraklık stresinin APX aktivitesini artırdığını göstermişlerdir. Bu çalışmada APX aktivitesindeki bu artış sadece Cd stresi altında GLA1 ile korunmuştur. Diğer yandan, Cd stresi uygulanan buğday fidelerine dışarıdan GLA2 uygulaması APX aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. Stres uygulamasına benzer olarak, kontrol grubu ile kıyaslandığında tek başına GLA uygulaması APX aktivitesinde artış sağlamıştır. Bir fenolik asit örneği olan kafeik asit kuraklık stresine maruz kalan salatalık bitkisinde de APX aktivitesini artırmıştır (Wan ve ark., 2014).

4.6.5. Buğday yapraklarının glutatyon edüktaz enzim aktivitesi



Şekil 4.13. 7 gün süreyle kadmiyum stresine (Cd, 100 ve 200 μ M) maruz bırakılan buğday (*Triticum aestivum*) yapraklarında dışarıdan uygulanan gallik asitin (GLA, 0.25 ve 0.75 mM) total glutatyon redüktaz aktivitesi (GR, Unit mg^{-1} protein) üzerine etkileri. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, istatistiksel bakımdan farklı olan değerleri göstermektedir ($P < 0.05$)

APX stres süresince uyarılan H_2O_2 'nin süpürülmesinde temel enzimlerden birisi iken, GR stres altında glutatyon havuzunun korunmasında rol almaktadır (Contour-Ansel ve ark., 2006). 7 gün süresince uygulanan ağır metal stresi total GR aktivitesinde azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.13). Diğer bir çalışmada, ayçiçeğine uygulanan Cd stresi GR aktivitesinde azalmaya neden olmuştur (Saidi ve ark., 2014). GR aktivitesindeki bu azalma dışarıdan GLA uygulamaları ile önlenmiştir. Cd1+GLA2 grubunda GR aktivitesindeki artış maksimum oranda olup bu artış oranı tek başına stres uygulamasıyla kıyaslandığında 1.9 kattır. Aynı şekilde GR aktivitesi, *Brassica juncea*'da PEG ile uyarılan kuraklık stresi dışarıdan uygulanan salisilik asit ile iyileştirilmiştir (Alam ve ark., 2013).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu tez çalışması buğday yapraklarında kadmiyum ile uyarılan oksidatif strese karşı dışarıdan gallik asit (GLA) uygulamasının ağır metalin olumsuz etkilerini iyileştirici yönde etkili olup olmadığını belirlemek için yapılmıştır. Su kültüründe yetiştirilen buğday fidelerine 100 ve 200 μM kadmiyum miktarları tek başına 0.25 ve 0.75 mM GLA kombinasyonlarıyla birlikte 7 gün süresince uygulanmıştır. Örneklemeye yapılan gruplarda sürgün uzunluk, yaş ağırlık, kuru ağırlık, bağıl su içeriği (RWC), prolin miktarı (Pro), hidrojen peroksit (H_2O_2) birikimi, lipid peroksidasyon düzeyleri ve bazı enzimatik ya da enzimatik olmayan antioksidan aktiviteleri analiz edilmiştir. Cd stresine maruz bırakılan buğday fidelerinde kayda değer şekilde büyüme parametrelerinde etkilenme söz konusudur. Bu değişim yüksek Cd konsantrasyonlarında daha yüksek düzeyde olduğu izlenmiştir. Sürgün uzunluk, yaş ve kuru ağırlıkta gözlenen bu sonuca bağlı olarak buğday fidelerinin büyümesinde (RGR) ciddi şekilde değişim görülmüştür. Cd uygulanan gruplarda prolin (Pro) miktarının azalmasının bir sonucu olarak yaprakların su içeriğinde de (RWC) azalma gözlenmiştir. Ağır metal uygulamasıyla birlikte süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinde artış izlenmiştir. Bu enzimin aktivitesi sonucu oluşan H_2O_2 miktarı artmıştır. Artan bu radikal birikimi askorbat peroksidaz (APX) ile süpürülmeye çalışılmış ancak APX bu süreçte başarılı olamamıştır. Stres uygulamasında tek başına APX aktivitesi yeterli olmadığından buğday yapraklarının lipid peroksidasyon düzeyi (TBARS miktarı) artma göstermiştir. Ancak dışarıdan uygulanan GLA uygulamaları buğday fidelerinin büyüme parametrelerinde (uzunluk ve yaş-kuru ağırlıklar), RGR, yaprak RWC değerlerinde iyileşme sağlayabilmiştir. Özellikle stres altında GLA uygulamasının uyardığı RWC değerlerindeki artış Pro artışıyla da bağlantılıdır. GLA ve stres uygulanan gruplarda SOD artışıyla oluşturulan H_2O_2 antioksidan sistemin aktive edilmesiyle azaltılmıştır. Bu sistemde CAT ve POX enzimlerin aktivitesinde azalma ya da herhangi bir değişim gözlenmemesine rağmen, stres altında düşük GLA konsantrasyonlarıyla birlikte APX ve GR enzimlerin aktivite artışa uyarılabilmiştir. Bu durumda strese karşı GLA korumasında özellikle düşük GLA konsantrasyonlarının daha etkili olduğu söylenebilir. Bu sonuçlar askorbat-glutasyon döngüsü içinde yer alan diğer enzim ve enzim olmayan moleküllerin analiziyle de daha da iyi yorumlanabilir.

5.2. Öneriler

Gerek ülkemiz gerekse dünya topraklarında kadmiyum konsantrasyonlarının birikimi bitkiler üzerinde ciddi etkiler oluşturmaktadır. Ağır metal ile uyarılan hasarlar; bitki verimliliği ve ürün kalitesi üzerine önemli sonuçlar doğurmaktadır. Artan endüstrileşme ve insan faaliyetleri sonucu topraklarda ve havada ağır metal birikimi artış göstermektedir. Bu anlamda insan ve bitkiler üzerine etkilerini düşünecek olursak bu olumsuz etkilerle başa çıkma önem kazanmaktadır.

Buğdayın yeryüzündeki geniş yetiştirme alanını düşünecek olursak çalışma bitki materyalimizi oluşturan buğday bitkilerini kadmiyum gibi ağır metallerin etkilerinden korumak için bitkilerin geliştirdikleri savunma mekanizmalarını anlamak ve yorumlamak önemlidir.

Son yıllarda streslere karşı sekonder metabolitlerin koruyuculuk rolleri yeni bir çalışma konusudur. Bu metabolitlerden birisi de gallik asittir. GLA'nın kadmiyum dışındaki stres koşullarına verdiği cevaplar dikkat çekicidir. GLA'nın kadmiyum ile etkileşim yollarının açıklanması sadece moleküler biyolojiye değil aynı zamanda biyoteknolojik çalışmalara da ışık tutacaktır. Bitki içindeki GLA'nın sentez yollarında yer alan enzimler ve bu enzimlerin sentezinden sorumlu genlerin ifadelerinin artırılması ya da bu genlerin aktarılmasıyla transgenik bitkilerin oluşturulması bitki devamlılığı açısından değerlidir. Bu konuda oluşturulacak yeni bilimsel veriler ve yayınlar diğer araştırmacılara yardımcı olacaktır. Buğday dışındaki ekonomik değere sahip diğer bitkilere de GLA uygulanması başta ziraat konusunda çalışan araştırmacılar olmak üzere tüm araştırmacılara yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abraham, E., Rigo, G., Szekely, G., Nagy, R., Koncz, C., Szabados, L., 2003, Light – dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*, *Plant Molecular Biology*, 51, 363–372.
- Abu-Muriefah, S.S., 2008, Growth parameters and elemental status of cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings in response to cadmium accumulation, *International Journal of Agriculture and Biology*, 10, 261-266.
- Alam, M.M., Hasanuzzaman, M., Nahar K., Fujita, M., 2013, Exogenous salicylic acid ameliorates short-term drought stress in mustard (*Brassica juncea* L.) seedlings by up-regulating the antioxidant defense and glyoxalase system, *Australian Journal of Crop Science*, 7, 1053–1063.
- Atienza, S.G., Faccioli, P., Perrotta, G., Dalfino, G., Zschiesche, W., Humbeck, K., Stanca, A., Cattivelli, L., 2004, Large scale analysis of transcripts abundance in barley subjected to several single and combined abiotic stress conditions, *Plant Science*, 167, 1359-1365.
- Asada, K., Takahashi, M., 1987, Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis, In: Kyle, D.J. (Ed.), *Photoinhibition*, Elsevier, Amsterdam/North, Holland, 227-287.
- Baker, A.J.M., Walker P.L., 1990, Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants, heavy metal tolerance in plants, In: Shaw A.J. *Evolutionary Aspects*. CRC Pres, Boca Raton, 155-177.
- Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D., 1973, Rapid determination of free proline for water stress studies, *Plant and Soil*, 39, 205–207.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971, Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Analytical Biochemistry*, 44, 276-287.
- Benavides, M.P., Gallego, S.M., Tomaro, M.L., 2005, Cadmium toxicity in plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17 (1), 21-34.
- Bergmeyer, N., 1970, Methoden der enzymatischen Analyse, Vol.1 Akademie Verlag, Berlin, 636-647.
- Bhardwaj, A., Srivastava, S. K., Khan, M. A., Prajapati, V. K., Singh S., Carter, J. E. Singh, A. P., 2017, Racial disparities in prostate cancer: a molecular perspective, Landmark (Ed), *Frontiers Bioscience* 22, 772-782.
- Blaylock, M.J., Huang, J.W., 2000, Phytoextraction of metals: using plants to clean up the environment, In: Raskin, I., Ensley, B.D., (Eds), *John Wiley & Sons*, New York, 53-70.

- Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Bray, E. A., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E., 2000, Responses to abiotic stress, In *Biochemistry, Molecular Biology Of Plants*, Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (Eds.), *American Society Of Plant Physiologists*, 1158-1202.
- Cadenas, E., Packer, L., 2002, Handbook of antioxidants, Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5.
- Cakmak, I., Strbac, D., Marschner, H., 1993, Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds, *Journal of Experimental Botany*, 44, 127-132.
- Caturla, N., Vera-Samper, E., Villalain, J., Reyes-Mateo, C., Micol V., 2003, The relationship between the antioxidant and antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes, *Free Radical Biology and Medicine*, 34, 648-662.
- Chen, D., Wang, Q., Huang, H., Xia, L., Jiang, X., Kan, L., Sun, Q., Chen, D., 2009, Effete-mediated degradation of Cyclin A is essential for the maintenance of germline stem cells in *Drosophila*, *Development*, 136 (24), 4133-4142.
- Chen, Y.W., Li, C.H., Zhang, A.Q., Yang, S.Z., Zang, W.Z., Dong, J.H., 2011, Preserving hepatic artery flow during portal triad blood inflow occlusion reduces liver ischemia-reperfusion injury in rats, *Journal of Surgical (RESEARCH)*, 1-7.
- Cemeroğlu, B., 2007, Gıda analizleri, *Gıda Teknolojisi Yayınları* No: 34, Ankara, 34, 535.
- Chauhan, R., Awasthi S., Tripathi, P., Mishra, S., Dwivedi, S., Niranjana, A., Mallick, S., Tripathi, P., Pande, V., Tripathi R.D., 2017, Selenite modulates the level of phenolics and nutrient element to alleviate the toxicity of arsenite in rice (*Oryza sativa* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 138, 47-55.
- Cherif, J., Mediouni, C., Ammar, W.B., Jemal F., 2011, Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (*Solanum lycopersicum*), *Journal of Environmental Sciences*, 23, 5, 837-844.
- Clarkson, D.T., Luttge, U., 1989, Mineral nutrition: divalent cations, transport and compartmentalization, *Prog Botany*, 51, 93-112.
- Contour-Ansel, D., Torres-Franklin, M.L., Cruz, H., de Carvalho, M., D'arcyLameta, A., Zuily-Fodil, Y., 2006, Glutathione reductase in leaves of cowpea: cloning of two cDNAs, expression and enzymatic activity under progressive drought stress, desiccation and abscisic acid treatment, *Annals of Botany*, 98, 1279-1287.

- Cortina-Puig, M., Muñoz-Berbel, X., Cales-Blanchard, C., Marty, J-L., 2010, Diazonium-Functionalized tyrosinase-based biosensor for the detection of tea polyphenols, *Microchimica Acta*, 171 (1-2), 187-193.
- Cummins, J.M, Jequier, A.M, Kan, R., 1994, Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics, oxidative stress?, *Molecular Reproduction and Development*, 37, 345-362.
- Çatak, E., Güler Ç., Süleyman, T., Orhan, B., 2000, Bazı domates ve tütün genotiplerinde kadmiyum etkilerini inceleyen istatistiksel bir çalışma, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2 (1), 13-41.
- Dalcorso, G., Farinati, S., Furini, A., 2010, Regulatory networks of cadmium stress in plants, *Plant Signaling & Behavior*, 5, 663–667.
- Delauney, A.J., Hu, C.A., Kishor, P.B., Verma, D.P., 1993, Cloning of ornithine delta-aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans- complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis, *Journal of Biological Chemistry*, 268, 18673–18678.
- Demiral, T., Türkan, I., 2004, Does exogenous glycinebetaine affect antioxidative system of rice seedlings under NaCl treatment?, *Journal of Plant Physiology*, 161, (10), 1089–1100.
- Dewick, P.M., 2002, Medicinal natural products: A biosynthetic approach, England, 22.
- Dimitrios, B., 2006, Sources of natural phenolic antioxidants, *Trends Food Science and Technology*, 17, 505-512.
- Elliot, J.G., 1999, Application of antioxidant vitamins in foods and beverages, *Food Technology*, 53, 46-48.
- FAO., 2010, FAO Land and Plant Nutrition Management Service, <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/>. [Ziyaret Tarihi: 14 Haziran 2018].
- Ferk, F., Mišik, M., Hoelzl, C., Uhl M., Fuerhacker, M., Grillitsch, B., Parzefall, W., Nersesyan, A. Mičieta, K., Grummt, T., Ehrlich, V., Knasmüller, S., 2007, Benzalkonium chloride (BAC) and dimethyldioctadecyl-ammonium bromide (DDAB), two common quaternary ammonium compounds, cause genotoxic effects in mammalian and plant cells at environmentally relevant concentrations, *Mutagenesis*, 22 (6), 363-370.
- Ferk, F., Chakraborty, A., Jäger, W., Kundi, M., Bichler, J., Mišik, M., Wagner, KH., Grasl-Kraupp, B., Sagmeister, S., Haidinger, G., Hoelzl, C., Nersesyan, A., Dušinská, M., Simić, T., Knasmüller, S., 2011, Potent protection of gallic acid against DNA oxidation: Results of human and animal experiments, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 715 (1-2), 61-71.

- Fidalgo, M., Shekar, P.C., Ang, Y.S., Fujiwara, Y., Orkin, S.H., Wang, J., 2011, Zfp281 functions as a transcriptional repressor for pluripotency of mouse embryonic stem cells, *Stem Cells*, 29, 1705-1716.
- 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.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2000, Oxygen processing in photosynthesis, regulation and signalling, *New Phytologist*, 146, 359–388.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2003, Redox sensing signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria, *Physiologia Plantarum*, 199, 335-364.
- Frankel, E.N., 1999, Food antioxidants and phytochemicals: present and future perspe, *Fett/Lipid*, 101, 450-455.
- Garg, N., Manchanda, G., 2009, ROS generation in plants: boon or bane?, *Plant Biosystems*, 143 (1), 81-96.
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Joune, L., Hausman, J. F., Dommes, J., 2002, Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures, *Plant Growth Regulation*, 37, 263-285.
- Gechev, T.S., Breusegem, F.V., Stone, J.M., Denev, I., Laloi C., 2006, Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death, *BioEssays*, Germany, 28 (11), 1091-1101.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010, Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.
- Gill, S.S., Khan, N.A., Tuteja, N., 2012, Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L.), *Plant Science*, 182, 112–120.
- Goyer, R. A., 1991. Toxic effects of metals. In: Caserett and Doull's toxicology, The Basic Science of Poisons, Amdur, M.O., Doull, J., Klaassen, C.D., (Eds), *Pergamon Press*, New York, 1032.
- Gupta, N., Gupta, S., Mahmood, A., 2007, Gallic acid inhibits brush border disaccharidases in mammalian intestine, *Nutrition Research*, 27, 230-235.
- Güleç, T.E., Sönmezoglu, Ö.A., Yıldırım, A., 2010, Makarnalık buğdaylarda kalite ve kaliteyi etkileyen faktörler, *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 27 (1), 113-120.

- Haber, F., Weiss, J., 1934, The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts, *Proceedings of The Royal Society A*, London, 147 (861), 332-351.
- Haghighi, K.S., Soltani, M., Nikbakhat, B.G., Ghasemi, M., Skall, H.F., 2010, Molecular epidemiology of zoonotic streptococcosis/lactococcosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) aquaculture in Iran, *Iranian Journal of Microbiology*, 2 (4), 198-209.
- Haktanır, K., Arcaç, S., 1998, Çevre Kirliliği, *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü*, Ankara, 457, 1503.
- Hale, M.G., Orcutt, D.M., 1987, The physiology of plants under stress, *John Willey-Sons Inc*, New York, 1-4.
- Halliwell, B., 2001. Food-derived antioxidants: How to evaluate their importance in food and in vivo, *Handbook of Antioxidants*, New York, 1-45.
- Han, R-M., Lefèvre, I., Albacete, A., Pérez-Alfocea, F., Barba-Espín, G., Diaz-Vivancos, P., Quinet, M., Ruan, C-J., Hernández, J.A., Cantero-Navarro, E., Lutts, S., 2013, Antioxidant enzyme activities and hormonal status in response to Cd stress in the wetland halophyte *Kosteletzkya virginica* under saline conditions, *Physiologia Plantarum*, 147, 352–368.
- Hare, P.D., Cress, W.A., Van Staden, J., 1998, Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress, *Plant, Cell and Environment*, 21, 535-553.
- Hernandez, J.A., Alamansa, M.S., 2002, Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf relations of pea leaves, *Physiologia Plantarum*, 115, 251-257.
- Herzog, V., Fahimi H., 1973, Determination of the activity of peroxidase, *Analytical Biochemistry*, 55, 557-562.
- Hsu, Y.T., Kao, C.H., 2007, Heat shock-mediated H₂O₂ accumulation and protection against Cd toxicity in rice seedlings, *Plant and Soil*, 300, (1-2), 137–147.
- Hsu, C.L., Yen, G.C., 2007, Effects of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats, *British Journal of Nutrition*, 98, 727-735.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005, The chemistry behind antioxidant capacity assays, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Huner, N.P.A., Oquist, G., Sarhan, F., 1998, Energy balance and acclimation to light and cold, *Trends in Plant Science*, 3 (6), 224-230.
- Imlay, J.A., Linn, S., 1988, DNA damage and oxygen radical toxicity, *Science*, 240, 1302-1309.

- Jensen, S.J.K., 2003, Oxidative stress and free radicals. *Journal of Molecular Structure: (THEOCHEM)*, 666–667, 387–392.
- Jiang, W.Z., Li J.L., 1989, Effects of Cadmium on Photosynthetic Characteristics of Tobacco, *Plant Physiology Communications*, 6, 27-31.
- Kaçar, B., Katkat, A.V., Öztürk Ş., 2006, Bitki Fizyolojisi, *Nobel*, Ankara 493-544.
- Kadıoğlu, A., 2007, Bitki Fizyolojisi, *Esen Ofset Matbaacılık*, Trabzon, 406-426.
- Kadıoğlu, A., 2011, Bitki Fizyolojisi, *Gündüz Ofset Matbaacılık*, Trabzon, 104-188.
- Kahvecioğlu, Ö., Kartal G., Güven A., Timur S., 2007, Metallerin Çevresel Etkileri-I, www.metalurji.org.tr/dergi/dergi136/d136_4753.pdf, [Ziyaret tarihi: 6 Nisan 2018].
- Kalt, W., 2005, Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, 70 (1), 11-19.
- Kambourakis, Draths, S.K.M., Frost, J.W., 2000, Synthesis of gallic acid and pyrogallol from glucose: replacing natural product isolation with microbial catalysis. *Journal of American Chemical Society*, 122 (37), 9042–9043.
- Kang, G.Z., Li, G.Z., Liu, G.Q., Xu, W., Peng, X.Q., Wang, C.Y., Zhu, Y.Z., Guo, T.C., 2013, Exogenous salicylic acid enhances wheat drought tolerance by influence on the expression of genes related to ascorbate-glutathione cycle, *Biologia Plantarum*, 57 (4), 718–724.
- Kim, K.Y., Huh, G.H., Lee, H.S., Kwon, S.Y., Hur, Y., Kwak, S.S., 1999, Molecular characterization of cDNAs for two anionic peroxidases from suspension cultures of sweet potato, *Molecular and General Genetics MGG, Genomics*, 261 (6), 941-947.
- Kinnersely, A.M., 1993, The role of phytochelates in plant growth and productivity, *Plant Growth Regulation*, 12, 207-217.
- Kılınç, M., Kutbay, G., 2004, Bitki Ekolojisi, *Palme*, Ankara, 333-348.
- Kün, E., 1988 Serin İklim Tahılları, *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*, Ankara, 299.
- Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680–685.
- Lefevre, I., Marchal, G., Correal, E., Zanuzzi, A., Lutts, S., 2009, Variation in response to heavy metals during vegetative growth in *Dorycnium pentaphyllum* Scop, *Plant Growth Regulation*, 59 (1), 1–11.
- Lehman, M.E., Blum, U., 1999, Evaluation of ferulic acid uptake as a measurement of allelochemical dose, Effective concentrations, *Journal of Chemical Ecology*, 25 (11), 2585-2600.

- Lewitt, J., 1980, Responses of Plants to Environmental Stress. Water, Radiation, Salt, Other Stress, Vol. II and Edition, *Academic Pres*, 1, 607.
- Li, D.M., Nie, Y.X., Zhang, J., Yin, J.S., Li, Q., Wang, X.J., Bai, J.G., 2013, Ferulic acid pretreatment enhances dehydration-stress tolerance of cucumber seedlings, *Biologia Plantarum*, 57 (4), 711–717.
- Lichtenthaler, H., K., 1998, The Stress Concept In Plants, An Introduction, Ann, Ny Acad, *Science*, 851, 18–198.
- Liu, X., Zhang, S., Shan X-Q., Christie P., 2007, Combined toxicity of cadmium and arsenate to wheat seedlings and plant uptake and antioxidative enzyme responses to cadmium and arsenate co-contamination, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68, 305–313.
- Liu, Z.J., Guo, Y.K., Bai, J.G., 2010, Exogenous hydrogen peroxide changes antioxidant enzyme activity and protects ultrastructure in leaves of two cucumber ecotypes under osmotic stress, *Journal of Plant Growth Regulation*, 29, 171-183.
- Long, X.X., Yang, X.E., Ni, W.Z., 2002, Current status, and prospective on phytoremediation of heavy metal polluted soils, *Journal of Applied Ecology.*, 13, 757–762.
- Lyons-Alcantara, M., Tarazona J.V., Mothersill C., 1996, The differential effect of cadmium exposure on the growth and survival of primary and established cells from fish and mammals, *Cell Biology and Toxicology*, 12 (1), 29-38.
- Madhava, R.K.V., Sresty, T.V.S., 2000, Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses, *Plant Science*, 157 (1), 113-128.
- Madlung, A., Comai, L., 2004, The Effect of Stress on Genom Regulation, Structure, *Annals of Botany*, 94, 481–495.
- Memişoğulları, R., 2005, Diyabette serbest radikallerin rolu ve antioksidanların etkisi, *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3, 30-39.
- Mittler, R., 2002, Oxidative stress, antioksidant and stress tolerance, *Trends in Plant Science*, 7, 405-410.
- Mittler, R., 2017, ROS are good, *Trends in Plant Science*, 11-19.
- Muir, A., Harrison, E., Wheals, A., 2011, A multiplex set of species-specific primers for rapid identification of members of the genus *Saccharomyces*, *FEMS Yeast Research*, 11 (7), 552-563.
- Mutlu, S., Karadagoglu, O., Atici, O., Nalbantoglu, B., 2013, Protective role of salicylic acid applied before cold stress on antioxidant system and protein pattern in barley apoplast, *Biologia Plantarum*, 57 (3), 507–513.

- Muzzalupo, I., Stefanizzi, F., Perri, E., Chiappetta, A., 2011, Transcript levels of CHL P gene, antioxidant and chlorophylls contents in olive (*Olea europaea* L.) pericarps, a comparative study on eleven olive cultivars harvested in two ripening stages, *Plant Foods for Human Nutrition*, 66, 1-10.
- Nakano, Y., Asada, K., 1981, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant and Cell Physiology*, 22, 867–880.
- Niki, E., 1987, Antioxidants in relation to lipid peroxidation, *Chemistry and Physics of Lipids*, 44 (2-4), 227-253.
- Noctor, G., Foyer, C., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 249- 279.
- Ossipov, V., Salminen J.P., Ossipova, S., Haukioja, E., Pihlaja, K., 2003, Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway, *Biochemical Systematics and Ecology*, 31 (1), 3-16.
- Ozfidan-Konakci, C., Yildiztugay, E., Kucukoduk, M., 2015, Upregulation of antioxidant enzymes by exogenous gallic acid contributes to the amelioration in *Oryza sativa* roots exposed to salt and osmotic stress, *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 1487–1498.
- Ozturk, A., Caglar, O., Sahin, F., 2003, Yield response of wheat and barley to inoculation of plant growth promoting rhizobacteria at various levels of nitrogen fertilization, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science.*, 166, 262–266.
- Parvaiz A., Shahid, U., Satyawati, S., 2010, Mechanism of free radical scavenging and role of phytohormones in plants under abiotic stresses, M. Ashraf et al, (Eds), *Plant Adaptation and Phytoremediation*, 99-118.
- Perez-Lopez, U., Robredo, A., Lacuesta, M., Sgherri, C., Munoz-Rueda, A., Navari-Izzo, F., Menna-Petite, A., 2009, The oxidative stress caused by salinity in two barley cultivars, mitigated by elevated CO₂, *Physiologia Plantarum*, 135 (1), 29-42.
- Pinto, P., Ribeiro, R., Sousa, L., Cabo Verde, S., Lima, M.G., Dinos, M., Santana, A., Botelho, M.L., 2004. Sanitation of chicken eggs by ionizing radiation: functional and nutritional assessment, *Radiation Physics and Chemistry*, 71, 33-36.
- Pohl, C., Croot, P.L., Hennings, U., Daberkow, T., Budeus, G., Loeff, M.R., 2011, Synoptic transects on the distribution of trace element (Hg, Pb, Cd, Cu, Ni, Zn, Co, Mn, Fe and Al) in surface waters of the Northern- and Southern East Atlantic, *Journal of Marine Systems*, 84, (1-2), 28-41.
- Polewski, K., Kniat, S., Slawinska, D., 2002, Gallic Acid a Natural Antioxidant in Aqueous and Micellar Environment: Spectroscopic Studies, *Current Topics in Biophysics*, 26 (2), 217-227.

- Prasad, M.N.V., 2004, Heavy metal stress in plants, *From Biomolecules to Ecosystem, Germany*, 182-183
- Radic, S., Radic-Stojkovic, M., Pevalek-Kozlina, B., 2006, Influence of NaCl and mannitol on peroxidase activity and lipid peroxidation in *Centaurea ragusina* L. roots and shoots, *Journal of Plant Physiology*, 163, 1284-1992.
- Rahman, A., Mostofa, M.G., Nahar, K., Hasanuzzaman, M., Fujita, M., 2016, Exogenous calcium alleviates cadmium-induced oxidative stress in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by regulating the antioxidant defense and glyoxalase systems, *Brazilian Journal of Botany*, 39 (2), 393–407.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956.
- Romheld, V., 1991, The role of phytosiderophores in acquisition of iron and other micronutrients in graminaceous species: An ecological approach, *Plant and Soil*, 130, 127-134.
- Saidi, S., Deratani, A., Belleville, M.P., Amar, R.B., 2014, Antioxidant properties of peptide fractions from tuna dark muscle protein by-product hydrolysate produced by membrane fractionation process, *Food Research International*, 65, 329-336.
- Sairam, R.K., Srivastava, G.C., 2002, Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress, *Plant Science*, 162 (6), 897–904.
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P.B.A., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I., Raksin, I., 1995, Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants, *Biotechnology*, 13, 468-474.
- Smart, R.E., Bingham, G.E., 1974, Rapid estimates of relative water content, *Plant Physiology*, 53, 258-260.
- Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gomes, M., Romero-Puertas, M., del Rio, L.A., 2001, Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants, *Journal of Experimental Botany*, 52, 2115–2126.
- Sanita-di Toppi, L., Gabbrielli, R., 1999, Response to cadmium in higher plants, *Environmental and Experimental Botany*, 41 (2), 105–130.
- Saruhan, G.N., Sağlam, A., Demiralay, M., Kadioğlu, A., 2012, Apoplastic and symplastic solute concentrations contribute to osmotic adjustment in bean genotypes during drought stress, *Turkish Journal of Biology*, 36, 151–160.
- Seckin, B., Sekmen, A.H., Turkan, I., 2009, An enhancing effect of exogenous mannitol on the antioxidant enzyme activities in roots of wheat under salt stress, *Journal of Plant Growth Regulation*, 28, 12–20.

- Sekmen, A.H., 2009, Tuz stresinin farklı tuz toleranslarına sahip iki *Plantago* türünün fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri üzerine etkisinin araştırılması, Doktora Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, 4-5.
- Sgherri, C., Quartacci, M.F., Izzo, R., Navari-Izzo, F., 2002, Relation between lipoic acid and cell redox status in wheat grown in excess copper, *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 591-597.
- Sharma, S.S., Dietz, K.J., 2006, The significance of amino acids and amino acid derived molecules in plant response and adaptation to heavy metal stress, *Journal of Experimental Botany*, 57, 711-726.
- Sheoran, I.S., Singal, H.R., Singh, R., 1990, Effect of cadmium and nickel on photosynthetic and the enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.), *Photosynthesis Research*, 23, 345-351.
- Shigeoka, S., Ishikawa, T., Tamol, M., Miyagawa, Y., Takeda, T., Yabuta, Y., Yoshimura, K., 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes, *Journal of Experimental Botany*, 53, 1305-1319.
- Singh, P.K., Chaturvedi, V.K., 2014, Impact of cinnamic acid on physiological and anatomical changes in maize plants (*Zea mays* L.) grown under salinity stress, *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 10, 44-54.
- Singh, A., Gupta, R., Pandey, R., 2017, Exogenous application of rutin and gallic acid regulate antioxidants and alleviate reactive oxygen generation in *Oryza sativa* L., *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23 (2), 301-309.
- Siripornadulsil, S., Train, S., Verma, D.P.S., Sayre, R.T., 2002, Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgeni microalgae, *Plant Cell*, 14, 2837-2847.
- Srivalli, B., Chinnusamy, V., Khanna-Chopra, R., 2003, Antioxidant defense in response to abiotic stresses in plants, *Journal of Plant Biology*, 30, 121-139.
- Stadtman, E.R., Barlett, B.S., 1997, Free radical-mediated modification of proteins, In: Wallace, K.B., (Ed), *Free Radical Toxicology*, CRC Press Boca Raton, 71-87.
- Stanely, P., Prince, M., Priscilla, H., Devika, P.T, 2009, Gallic acid prevents lysosomal damage in isoproterenol induced cardiotoxicity in Wistar rats, *European Journal of Pharmacology*, 139, 139-143.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2008, Bitki Fizyolojisi, Türkan, İ., (Eds), *Palme*, Ankara, 111-192.
- Thamayanthi, D., Sharavanan, P.S., Vijayaragavan, M., 2011, Effect of cadmium on seed germination, growth and pigments content of Zinnia plant, *Current Botany*, 2 (8), 8-13.
- Tiryaki, O., Canhilal, R., Horuz, S., 2010, Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitisi Dergisi*, Kayseri, 26 (2), 154-169.

- Tunalter, Z., Öztürk, N., Kosar, M., Baser, K. H., Duman, H., Kırimer, N., 2002, Bazı *Sideritis* türlerinin antioksidan etki ve fenolik bileşikler yönünden incelenmesi, 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, *Bildiri Kitapçığı*, 29 (31), 130-138.
- Üstün, F., Aydın, A.S., 2007, Tanenler 2 toksisiteyi, beslenme üzerine etkileri, detannifikasyon, *İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 33 (1), 33-41.
- Venkat Ratnam, D., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Ravi Kumar, M.N.V., 2006, Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective, *Journal of Controlled Release*, 113, 189–207.
- Vural H., 1993, Ağır Metal İyonlarının Gıdalarda Oluşturduğu Kirlilikler, *Çevre Dergisi*, 8, 3-8.
- Werner, I., Auel, H., Garrity, C., Hagen, W., 1999, Pelagic occurrence of the sympagic amphipod *Gammarus Wilkitzkii* in ice-free waters of the Greenland Sea-Dead end or part of life-cycle?, *Polar Biology*, 22 (1), 56-60.
- Wan, Y-Y., Chen, S-Y., Huang, Y-W., Li, X., Zhang, Y., Wang, X-J., Bar, J-G., 2014, Caffeic acid pre-treatment enhances dehydration tolerance in cucumber seedlings by increasing antioxidant enzyme activity and proline and soluble sugar contents, contents, *Scientia Horticulturae*, 173, 54–64.
- Wang, C.X., Mo, Z., Wang, H., Wang, Z.J., Cao Z.H., 2003, The transportation, Time dependent distribution of heavy metals in paddy crops, *Chemosphere*, 50, 717–723.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., 1997, Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants, *The EMBO Journal*, 16, 4806-4816.
- Wu, Z., Li, Q., Fortini, M.E., Fischer, J.A., 1999, Genetic analysis of the role of the *Drosophila* fat facets gene in the Ubiquitin pathway, *The Journal of Genetics and Development (GENESIS)*, 25 (4), 312-320.
- Yıldız, M., Terzi, H., Cenkci, S., Arıkan-Terzi, E.S., Uruşak, B., 2010, Bitkilerde tuzluluğa toleransın fizyolojik ve biyokimyasal markörleri, *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi-C (Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji)*, 1, 1-33.
- Yildiztugay, E., Ozfidan-Konakci, C., 2014, Profiling of rutin-mediated alleviation of cadmium-induced oxidative stress in *Zygophyllum fabago*, *Environmental Toxicology*, 30 (7), 816–35.
- You, B.R., Park, W.H., 2009, Gallic acid-induced lung cancer cell death is related to glutathione depletion as well as reactive oxygen species increase, *Department of Physiology*, 1356-1362.

- You, B.R., Park, W.H., 2010, Gallic acid-induced lung cancer cell death is related to glutathione depletion as well as reactive oxygen species increase, *Toxicology in Vitro*, 24 (5), 1356-1362.
- Young, I.S., McEneny, 2001, Lipoprotein oxidation and atherosclerosis, *Biochemical Society Transactions*, 29 (2), 358-362.
- Yürür, N., 1998, Serin İklim Tahılları-I, *Uludağ Üniversitesi Yayınları*., 7.
- Zengin, F., Munzuroğlu, Ö., 2005, Fasulye fidelerinin (*Phaseolus vulgaris* L. Strike) klorofil ve karotenoid miktarı üzerine bazı ağır metallerin (Ni^{+2} , Co^{+2} , Cr^{+3} , Zn^{+2}) etkileri, *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 17 (1), 164-172.
- Zhang, G., Breuer, M., Förster, A., Egger-Adam, D., Wodarz, A., 2009, Mars, a Drosophila protein related to vertebrate HURP, is required for the attachment of centrosomes to the mitotic spindle during syncytial nuclear divisions, *Journal of Cell Science*, 122 (4), 535-545.
- Zhang, J., Li, D-M., Sun, W-J., Wang, X-J., Bai, J-G., 2012, Exogenous p-hydroxybenzoic acid regulates antioxidant enzyme activity and mitigates heat stress of cucumber leaves, *Scientia Horticulturae*, 148, 235–245.
- Zhao, J., Khan, I.A., Fronczek, F.R., 2011, Gallic acid, *Acta Crystallographica Section*, 67, 31-317.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Münevver KABAKÇI
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Eskişehir, 1988
e-mail : sanmunevver@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Yunus Emre Lisesi, Eskişehir	2005
Üniversite	: Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Nevşehir	2012
Yüksek Lisans	: Necmettin Erbakan Üniversitesi, Konya	2018

KATILINAN ULUSLARARASI KONGRE/SEMPOZYUM

M. Kabakci, C. Ozfidan-Konakci, E. Yildiztugay, M. Kucukoduk 2016. The Effects of Exogenous Gallic Acid on Growth, Water Content and Antioxidant Isozyme Profiling in Wheat (*Triticum Aestivum*) Exposed to Cadmium Stress. Uluslararası Sempozyum, Geçmişten Günümüze Bozkır, 6-8 May 2016, Konya, TURKEY (Sözlü sunum)

KATILINAN ULUSAL KONGRE/SEMPOZYUM

M. Bahtiyar, C. Ozfidan-Konakci, E. Yildiztugay, M. Kuçukoduk, **M. Kabakci**, C. P. Baycan 2016. Humic acid compounds alleviate the cadmium-induced reduction of water status and photosynthetic efficiency in wheat (*Triticum aestivum*) II. Ulusal Bitki Fizyolojisi Sempozyumu, Bildiri Kitapçığı P-009, 31 Ağustos-3 Eylül 2016, MERSİN (Poster)

ALINAN BELGELER

IX. Ulusal Ekoloji Ve Çevre Kongresi Katılım Belgesi- Nevşehir (7-10 Ekim 2009)
 17. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi Katılım Belgesi- Ankara (14-17Temmuz 2010)