

Kurşun (Pb) ve Bakır (Cu) Ağır Metal Stresi Uygulanan Enginar (*Cynara scolymus* L.) Tohumlarının
Fidelerinde Oluşan DNA Değişikliklerinin Belirlenmesi

Muhammet Burak Batır

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak 2014

Determination of DNA Changes in Seedlings of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) seeds exposed to
Copper (Cu) and Lead (Pb) Heavy Metal Stress

Muhammet Burak Batır

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

January 2014

Kurşun (Pb) ve Bakır (Cu) Ağır Metal Stresi Uygulanan Enginar (*Cynara scolymus* L.) Tohumlarının
Fidelerinde Oluşan DNA Değişikliklerinin Belirlenmesi

Muhammet Burak Batır

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. A. Pınar VATAN ÖZTOPCU

OCAK 2014

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Muhammet Burak BATIR'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Kurşun (Pb) ve Bakır (Cu) Ağır Metal Stresi Uygulanan Enginar (*Cynara scolymus* L.) Tohumlarının Fidelerinde Oluşan DNA Değişikliklerinin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. A. Pınar ÖZTOPCU VATAN

İkinci Danışman : Doç. Dr. Feyza CANDAN

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Doç. Dr. Mediha CANBEK

Üye : Doç. Dr. A. Pınar ÖZTOPCU VATAN

Üye : Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU

Üye : Doç. Dr. Feyza CANDAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Gökhan KUŞ

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Toprakların ağır metaller ile kontaminasyonu ve burada gelişimlerini sürdürmek zorunda olan bitkilerde yüksek konsantrasyonlar da ağır metal birikimi görülür. Bu durum kontaminasyona sahip bölgelerde yetişen bitkilerin hücre ve dokularında toksik hasarlara neden olur. Ayrıca, bitkilerde ağır metal kontaminasyonu genotoksik etki göstererek DNA profilinde mutasyon benzeri değişimlere yol açar.

Bu çalışmada, kurşun (Pb) ve bakır (Cu) kontaminasyonunun enginar (*Cynara scolymus* L.) fideleri üzerindeki etkisi fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler parametreler yardımıyla belirlenmesi amaçlanmıştır. Kurşun ve bakır etkisi belirli konsantrasyonlarda enginar fidelerinin kök bölgelerinin uzunluğunda ve toplam çözümlü protein miktarında düşüşe neden olmuştur. Moleküler parametrelerden biri olan PCR tabanlı RAPD parmak izi tarama yöntemi, ağır metal stresinin fideler üzerindeki genotoksik etkisinin incelenmesi için kullanılmıştır. Ekolojik ve genotoksik çalışmalarda RAPD yöntemi uygun bir biyobelirteç olarak bitkilerde kullanılmaktadır. RAPD analizi için, 17 farklı RAPD primerinin özgün polimorfik bant paternlerinden yararlanılmıştır. Farklı kurşun ve bakır konsantrasyonlarının kontaminasyonundan sonra kontrol fidelerine göre ağır metal stresi uygulanmış fidelerin RAPD profillerinde bant kazancı ve/veya kaybı gibi çeşitli değişiklikler gözlemlenmiştir. Sonuç olarak; kurşun ve bakır stresine maruz kalan enginar fidelerinin RAPD profillerine göre yapılan değerlendirmede genomik kalıp stabilitesinin değiştiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler : Enginar (*Cynara scolymus* L.), ağır metal, RAPD, genotoksisite.

SUMMARY

Contamination of the soil with heavy metals and the plants which have to maintain their development in this contaminated area shows accumulation of heavy metals with high dose. This situation causes toxic damage of plant cells and tissues, which is growth on contaminated area. On the other hand, contamination of plants with heavy metals could be shown genotoxic effect on DNA profile and cause damages like mutation.

In this study, the effects of lead (Pb) and copper (Cu) contamination on artichoke (*Cynara scolymus* L.) seedlings determined by physiological, biochemical and molecular parameters. Reduction of root growth and total soluble protein content in root of artichoke seedlings were observed with the under certain concentrations of lead and copper. For molecular research, PCR (Polymerase Chain Reaction) based RAPD fingerprinting techniques was used for investigate the genotoxic effects of metal stress on seedlings. In ecologic and genotoxic study, RAPD method was used as a proper biomarker for plants. Unique polymorphic band patterns of 17 different RAPD primers was used for the RAPD analysis. After the contamination of various concentrations of lead and copper, there was a change in RAPD profiles observed as variations like increment and/or loss of bands of seedlings which is implemented to heavy metal stress compared to control seedlings. Consequently, genomic template stability had changed according to the RAPD profiles of seedlings under heavy metal stress.

Key Words : Artichoke (*Cynara scolymus* L.), heavy metal, RAPD, genotoxicity.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden bilgilerini ve hoşgörülerini esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. A. Pınar VATAN ÖZTOPÇU, Doç. Dr. Feyza CANDAN ve Doç. Dr. Mediha CANBEK'e içtenlikle teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında laboratuvarındaki imkânlardan yararlanmamı sağlayan Prof. Dr. E. Sümer ARAS hocama ve çalışmalarım sırasında benden yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Öğr. Gör. İlker BÜYÜK'e teşekkür ederim.

Ayrıca bu süreç boyunca destekleriyle ve sevgileriyle bana moral veren aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Ağır Metaller	2
2.1.1. Ağır metallerin bitkilerdeki işlevi	2
2.1.2. Ağır metal kirliliği ve etkileri	3
2.2. Ağır Metaller ile Yapılan Çalışmalar	13
2.3. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA-Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Yöntemi ve Kullanım Alanları	15
2.4. Enginar (<i>Cynara scolymus</i> L.)	16
3. MATERYAL ve METOD	18
3.1. Materyal	18
3.2. Metod	18
3.2.1. Tohum yüzey sterilizasyonu	18
3.2.2. Çimlendirme yöntemi	18
3.2.3. Bitki kök uzunluğu belirlenmesi	19
3.2.4. DNA izolasyonu	19
3.2.5. RAPD protokolü	20
3.2.6. RAPD-PCR bileşenleri ve koşulları	21

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.7. Elektroforez	22
3.2.8. Toplam çözüner protein içeriği	23
3.2.9. İstatistiksel analizler	24
3.2.10. Genomik kalıp stabilitesi (GKS)	24
4. BULGULAR	25
4.1. Kurşun (Pb) ve Bakır (Cu) Stresinin Enginar Tohumlarının Çimlenmesi	
Üzerine Etkisi	25
4.2. Kurşun (Pb) ve Bakır (Cu) Stresinin Enginar Fidelerinin Kök Uzunluğu	
Üzerine Etkisi	25
4.3. Kurşun (Pb) ve Bakır (Cu) Stresinin Enginar Fideleri Kök Bölgesinde Toplam ...	
Çözüner Protein Miktarı Üzerine Etkisi	27
4.4. Kurşun (Pb) ve Bakır (Cu) Stresinin Enginar Fidelerinde RAPD Profili ve	
Genomik Kalıp Stabilitesi (GKS) Üzerine Etkisi	28
5. TARTIŞMA SONUÇ VE ÖNERİLER	41
KAYNAKLAR DİZİNİ	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonu	6
2.2 8-OHdGua, 8-oxodGua ve 8-oxodAde oluşum yolu	9
2.3 OH [•] 'in DNA şeker iskeletinden bir hidrojen atomu çalması sonucu DNA'da tek iplik kırığının meydana gelmesi	10
2.4 5',8-Siklo-2'-deoksिनुकлеозид'ler: (5'S)-5',8-cdAdo(1), (5'R)-5',8-cdAdo (2), 5(5'S)-5',8-cdGua (3), (5'R)-5',8-cdGua (4)	11
2.5 a) Hidrojen bağlarıyla bağlanmış çift iplikli heliks yapı, b) Hidrojen bağları, bakır iyonları (Cu ²⁺ , açık renk) ve civa iyonları (Hg ⁺² , koyu renk) ile bağlanmış çift iplikli heliks yapı	12
2.4 RAPD çalışma prensibi	16
4.1 14 gün farklı kurşun ve bakır konsantrasyonlarında gelişen enginar fidelerine ait kök uzunlukları (cm/fide)	26
4.2 14 gün farklı kurşun ve bakır konsantrasyonlarında gelişen enginar fidelerinde kurşun ve bakır metallerinin kök uzunluğuna etki oranları (%) ...	26
4.3 4 gün farklı kurşun ve bakır konsantrasyonlarında gelişen enginar fide köklerine ait toplam çözüner protein miktarları (mg/L)	27
4.4 14 gün farklı kurşun ve bakır konsantrasyonlarında gelişen enginar fidelerinde kurşun ve bakır metallerinin kök toplam çözüner protein miktarına etki oranları (%)	28
4.5 14 gün farklı kurşun ve bakır konsantrasyonlarında gelişen enginar fide köklerine ait DNA'lardan RAPD çalışmaları sonucu elde edilen polimorfizm oranları (%)	29
4.6 14 gün farklı kurşun ve bakır konsantrasyonlarında gelişen enginar fide örneklerine ait genomik kalıp stabilitesinin (GKS), kontrol fidesine göre karşılaştırılması	30
4.7 OP C02 primeriyle yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	32
4.8 OP C03 primeriyle yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	32

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.9 OP C05 primeriyle yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	33
4.10 OP C06 primeriyle yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	33
4.11 OP C07 primeriyle yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	34
4.12 OP C08 primeriyle yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	34
4.13 OP C09 primeriyle yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	35
4.14 OP C10 primeriyle yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	35
4.15 OP C11 primeriyle yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	36
4.16 OP C12 primeriyle yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	36
4.17 OP C13 primeriyle yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	37
4.18 OP C14 primeriyle yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	37
4.19 OP C15 primeriyle yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	38
4.20 OP C16 primeriyle yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	38
4.21 OP C18 primeriyle yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	39
4.22 OP C19 primeriyle yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	39
4.23 OP C20 primeriyle yapılan PCR'a ait jel görüntüsü	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Temel endüstrilerden çevreye atılan metal türleri	4
3.1. Kurşun ve bakır stresi altında yetiştirilmiş enginar bitkisinden elde edilen DNA'ya ait nanodrop ölçümleri	20
3.2. Çalışmada kullanılan primerler ve dizi bilgileri	21
4.1. RAPD çalışmaları sonucu elde edilen bantlar ve bant farklılıkları (K: kontrol, (x/y) x: kontrole göre kaybolan bant, y: kontrole göre yeni oluşan bant)	31

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Simgeler Açıklamalar**

³² P	Fosfor-32
g	Yerçekimsel kuvvet

Kısaltmalar Açıklamalar

A.B.D.	Amerika Birleşik Devletleri
Bkz.	Bakınız
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
cm	Santimetre
DNA	Deoksiribonükleik asit
g	Gram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
ng	Nanogram
nm	Nanomolar
PCR	Polimerase Chain Reaction
ppm	Parts per million
RNA	Ribonükleik asit
SNP	Single Nucleotide Polimorphism
V	Volt
vb.	Ve benzerleri

1. GİRİŞ

Günümüzde sanayi ve teknolojinin gelişmesi ile insanoğlu daha iyi yaşam koşullarına kavuşmuştur. Ancak bu gelişmeyle birlikte çevre sorunları da ortaya çıkmıştır. Bu çevre sorunlarından biride toprak ve su kaynaklarının ağır metaller ile kirlenmesidir. Toprakta ağır metal kontaminasyonu, tarım alanlarında hayvan gübresi, pestisit, fungusit kullanımına, metal kaplama, ilgili madenlerin çıkarılması ve işlenmesi, kömürün yakılması, pil depolama merkezlerinden kaynaklanan sızıntılardan ve kirliliğe sahip akarsu sistemleri ile sulama gibi nedenlerden kaynaklanmaktadır (Sharma, et al., 2007; Qishlaqi, et al., 2008; Vousta, et al., 1996; Zhang, et al., 2013). Dolayısıyla; ağır metal kontaminasyonuna sahip alanlarda yetiştirilen çeşitli bitkilerin kök uzunluğunda, gövde boyunda, toplam çözünür protein miktarında, toplam çözünür şeker miktarında, RNA seviyesinde azalma ve DNA profillerinde mutasyon benzeri değişimler görülmektedir (İbrahim, et al., 2013; Mengoni, et al., 2000).

Tez kapsamında, özellikle günümüzde önemli bir çevresel problem olan ağır metal kirliliği etkisini incelemek amacıyla ülkemiz ve Akdeniz bölgesi için ekonomik bir gelir kaynağı olan ve kültürünün yapıldığı alanlarda artan sanayi faaliyeti görülen Asteraceae familyasına dahil olan enginar (*Cynara scolymus* L.) bitkisiyle çalışılmıştır. Bu çalışmada enginar bitkisi fidelerinin kök bölgesinde artan konsantrasyonlarda ki kurşun ve bakır ağır metal etkilerinin PCR temelli moleküler parametrelerden biri olan RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA-Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) analizi ile incelenmesi, kök uzunluğunun ve toplam çözünür protein miktarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Enginar (*Cynara scolymus* L.) fidelerinde ağır metal etkisinin araştırılması az sayıdaki morfolojik düzey değişimlerinin gözlemlenmesi ile sınırlı kalmış olup, yapmış olduğumuz literatür araştırmalarında enginar bitkisinde ağır metal etkisiyle ilgili moleküler düzeyde bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamız ağır metal etkisinin enginar bitkisinde moleküler düzeyde incelenmesi açısından yapılan ilk araştırma olma özelliğini taşımaktadır. Tezin genel bilgiler kısmında ise tez çalışmasında kullanılan ağır metal, yöntem ve model bitki hakkında bilgiler verilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ağır Metaller

Yaklaşık olarak 60 yıldır “Ağır Metal” terimi bilim adamları tarafından kullanılmakta ve farklı tanımları yapılmaktadır. 1964 yılında 7 g/cm^3 'ten fazla element yoğunluğu gösteren, 1987 yıllarında yoğunluğu 4 g/cm^3 'ten fazla olan, 1992'de yoğunluğu 5 g/cm^3 'ten büyük olan ve metalik özellik gösteren, 1995'de ise yoğunluğu 6 g/cm^3 'ten büyük olan ve metalik özellik gösteren elementler ağır metal olarak sınıflandırılmıştır. Bazı bilim adamları ise ağır metalleri atom ağırlıklarına, atomik numaralarına, diğer kimyasal özelliklerine ve toksik özelliklerine göre sınıflandırmışlardır. Bu yüzden ağır metallerle ilgili net bir tanım bulunmamakta ve kimya üzerine yetkili kurumlardan olan ve periyodik cetvel sistemini elinde bulunduran Uluslararası Saf ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC) raporlarında ağır metal ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır. Biyolojik açıdan ise “Ağır Metal” terimi genellikle metallerin ve metalloidlerin çevre üzerine muhtemel kontaminasyonu ve toksisite veya ekotoksisite açısından kullanılmaktadır (Duffus, 2002).

2.1.1. Ağır metallerin bitkilerdeki işlevi

Bitkilerde, bazı ağır metallerin düşük düzeylerdeki kritik konsantrasyonları normal ve sağlıklı bitki gelişimi için gereklidir. Bu nedenle, ağır metaller canlılarda yaşamsal süreçlere katılımlarına göre esansiyel elementler ve esansiyel olmayan elementler olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Kobalt (Co), bakır (Cu), mangan (Mn), molibden (Mo), demir (Fe), nikel (Ni), çinko (Zn) bitkilerin gelişimi ve canlılık faaliyetleri için gerekli ağır metallerden olup esansiyel elementler olarak kabul edilirler. Baryum (Ba), kadmiyum (Cd), civa (Hg), antimon (Sb), kurşun (Pb) ve krom (Cr) gibi ağır metaller bitki ve canlı gelişimi için gerekli olmadığından esansiyel olmayan elementler olarak adlandırılırlar (Bera, et al., 2005).

Esansiyel elementler bir çok enzim sisteminde kofaktör olarak bulunur ve canlılarda biyolojik süreçlerin içerisinde yapısal bir bileşen olarak yer alır. Örneğin, esansiyel elementlerden olan bakır belirli konsantrasyonlarda normal bitki gelişimi ve büyümesi için gerekli bir elementtir. Bakır bitkilerde bir çok metalloprotein için esansiyel bir kofaktör olup, fotosentetik elektron transportunda, mitokondriyal solunumda, hücre duvarı metabolizmasında ve hormon sinyal iletim yollarında rol alır (Marschner, 1995; Raven, et al., 1999).

2.1.2. Ağır metal kirliliği ve etkileri

Günümüzde dünyanın karşılaşmış olduğu en büyük problemlerden biri çevre kirliliği olup her geçen gün artmaktadır. Hızla artan sanayileşme ve nüfus, atmosfer, pedosfer ve hidrosferde kirliliğe neden olup insan sağlığı ve çevre üzerinde ciddi boyutlarda tehlike oluşturmaktadır. Çevre kirliliğine neden olan etmenlerden biri olan ağır metaller, Amerika Birleşik Devletleri (A.B.D.) Çevre Koruma Ajansının 2011 yılı için listelemiş olduğu 650 toksik ve kirletici kimyasalın bulunduğu listede ki 129 tane öncelikli çevre kirleticilerinin içerisinde yer alır.

Volkanik faaliyetler gibi antropolojik nedenler dışında insan faaliyetleri yüzünden ağır metaller her gün atmosfere, pedosfere ve hidrosfere yayılmaktadır. Çimento fabrikaları ve termik santrallerin bacalarından çıkan uçucu küller, ağır metal içerikli boya kullanımı, yollarda araçlar tarafından salınan benzin ve araçlara ait balata gibi plastik kökenli atıklar, çöp ve atık çamur yakma tesisleri, tarım ilaçları, gübre, kağıt ve pil vb. endüstri atık ve ürünlerinin gelişi güzel bir şekilde doğaya yayılımı ağır metal kirliliğinin temel nedenleri arasında yer alır. Çizelge 2.1'de temel endüstrilerden atılan ağır metal türleri genel olarak gösterilmiştir (Robert, 1995; Dean, et al., 1972; Kahvecioğlu vd., 2004).

Çizelge 2.1. Temel endüstrilerden çevreye atılan metal türleri (Robert, 1995; Dean, et al., 1972; Kahvecioğlu vd., 2004).

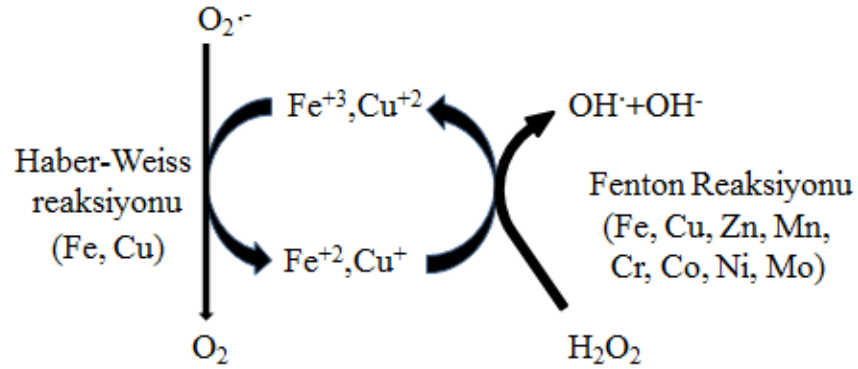
Endüstri	Metal Türleri				
	Cd	Cr	Cu	Pb	Hg
Organik Kimya Sanayii	X	X	-	X	X
İnorganik Kimya Sanayii	X	X	X	X	X
Lastik İmalat Sanayii	-	X	-	X	-
Kağıt Endüstrisi	-	X	X	X	X
Makine Endüstrisi	X	X	X	X	X
Boya Endüstrisi	X	X	X	X	X
Dokuma Sanayii	-	X	X	-	-
Demir-Çelik Sanayii	X	X	X	X	X
Enerji Üretimi (Termik)	X	X	X	X	X
Çimento Sanayii	X	X	X	X	-
Deri Sanayii	-	X	-	-	-
Petrokimya	X	X	-	X	X
Gübre Sanayii	X	X	X	X	X
Klor-Alkali Üretimi	X	X	-	X	X

Fabrika ve tesis bacalarından saçılan ağır metal içerikli partiküllerin tarım arazilerine inmesi, burada yağmurlar veya sulama aracılığıyla toprak içerisinde çözülmesi ya da endüstriyel atık suların karıştığı sularla tarım arazilerinin sulanması burada yetişen bitkilerde çeşitli hastalıklara yol açarak ürün kayıplarına neden olmakta ve tarım ekonomisine zarar vermektedir. Ayrıca, ağır metaller ile kontamine olmuş bu alanlarda gelişen bitkiler yüksek konsantrasyonlarda ağır metali bünyesinde biriktirebilir ve besin zinciri yoluyla hayvan ve insanlara ulaşarak sağlığa zarar verebilirler (Vousta, et al., 1996; Alloway, 1990; Forstner, 1984).

Bakır esansiyel bir element olmasına karşın, yüksek konsantrasyonları (bitki türlerine bağlı olarak) bitkiler için toksik özellik göstermektedir. Kurşun ise esansiyel bir element olmadığından her zaman bitkiler için toksik özellik göstermektedir. Ortamda bakır fazlalığı ve kurşun varlığı bitkilerde kök, gövde ve yaprak gelişimini negatif yönde etkiler (Zengin ve Munzuroğlu, 2004). Oksidatif hasara neden olduklarından lipid peroksidasyonuna (Keller and Hammer, 2004), hücre ve tilakoit membran yapısının bozulmasına, kloroplast yapısının değişmesine bağlı olarak klorofil miktarının azalmasına ve dolayısıyla klorozise neden olurlar (Braz, 2005). Proteinlerin

sülfidril (-SH) gruplarına bağlanarak enzim aktivitesinin inhibe olmasına (Van Assche and Clijsters, 1990), oksidatif DNA hasarına (Hernandez-Jimenez, et al., 2002; Banfalvi, 2011), kromozom anomalilerine (Candan, 2013) ve diğer esansiyel elementlerin eksikliğine neden olmaktadır (Meharg, 1994; Ouzounidou, 1998).

Reaktif oksijen türlerinden süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2), gibi reaktif oksijen türleri her zaman aerobik yaşam formlarıyla ilişki halindedir. Ayrıca normal koşullar altında hücreler, daha zararlı formlara dönüşmeden önce $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 reaktif oksijen türlerini ortamdan uzaklaştıran süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi çeşitli enzim mekanizmalarına sahiptirler. Fakat kuraklık, ağır metal, aşırı sıcak ve soğuk gibi çeşitli stres faktörleri genel olarak bitki dokularında reaktif oksijen türlerinin üretimini hızlandırarak ortamda $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 oranının artmasına ve buna bağlı olarak dokularda oksidatif stresin meydana gelmesine neden olurlar (Gill and Tuteja, 2010). Ağır metal toksisitesi bitkilerde redoks reaksiyonlarında dengesizliğe neden olarak reaktif oksijen türlerinin artmasına yol açar (Mourato, et al., 2012). Reaktif oksijen türleri içinde en zararlı olanları OH^{\cdot} (hidroksil radikali) ile 1O_2 (singlet oksijen) formudur. Hücrelerin bu formların eliminasyonunda kullanabilecekleri bir enzim sistemi yoktur. Bu nedenle oluşan bu formlar biyolojik moleküller ile etkileşime girerek hücrel faaliyetlerin aksamasına ve en sonunda durmasına neden olurlar. 1O_2 , elektron taşıma sisteminde görevli olan oksijen molekülünün fazladan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi sonucu oluşur (Arora, et al., 2002). OH^{\cdot} radikali ise H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ 'den metal iyonları varlığında Haber-Weiss (Cu^+ , Cu^{+2} , Fe^{+2} ve Fe^{+3} iyonları) ve fenton (Fe^{+2} ve diğer geçiş metallerinin Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo iyonları) reaksiyonları (Şekil 2.1) ile oluşur (Haber and Weiss, 1934; Fenton 1894).



Şekil 2.1. Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonu (Haber and Weiss, 1934; Fenton 1894).

Haber-Weiss ve fenton reaksiyonu sonucu oluşan hidroksil radikali organik substratların oksidasyonunu başlatarak yapılarının bozulmasına neden olur ve bu durum iki yolla gerçekleşir (Arora, et al., 2002):

1. Organik substrata hidroksil radikalinin eklenmesiyle;

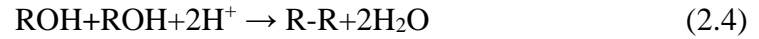
- Hidroksil radikalinin organik substrata bağlanması ile kararsız oksitlenmiş bir molekül oluşur.



- Kararsız okside molekülün hücrede demir iyonu (Fe³⁺) veya oksijen molekülü ile tepkimeye girmesi sonucu kararlı bir okside molekül oluşur.



- Kararlı okside ürünü haline gelen yapısı bozulmuş substratlar daha sonra birbirleri ile bağ yaparak hücre içinde birikim gösterirler. Bu birikim sonucunda hücre ve doku bütünlüğü bozulmaya başlar.



2. Hidroksil radikalinin organik substrattan bir hidrojen (H) atomu çalmasıyla;

- Organik substrattan hidroksil radikalinin bir hidrojen atomu çalması ile oluşan reaksiyonda bir molekül su ile bir organik radikal oluşur.



- Oluşan organik radikalde tek bir eşleşmemiş elektron bulunur. Eşleşmemiş elektron ise ortamda bulunan serbest oksijen molekülü ile reaksiyona girerek peroksi radikalini oluşturur.



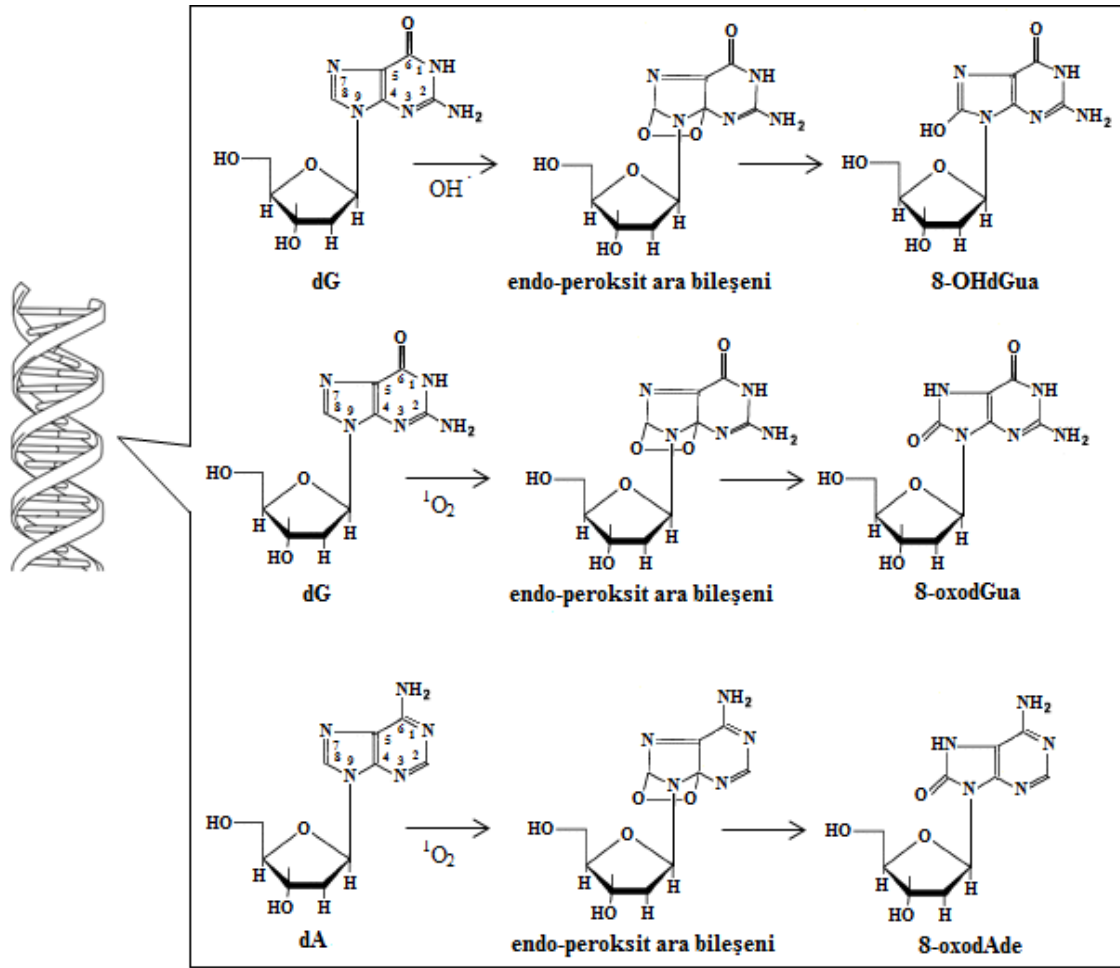
- Peroksi radikali tekrar bir organik substrattan hidrojen atomu çalarak ikinci bir organik radikal oluşmasını sağlar. Bu şekildeki zincirleme reaksiyon, reaktif oksijen türlerinin katalizlediği tüm reaksiyonlardan daha zararlıdır.



DNA'nın reaktif oksijen türlerine maruz kalması sonucu 30'dan fazla baz lezyonu karakterize edilmiştir (Kuraoka, et al., 2001). Reaktif oksijen türleri DNA üzerinde tekli nükleobaz lezyonlarına, tek iplik kırıklarına, çift iplik kırıklarına, iplik

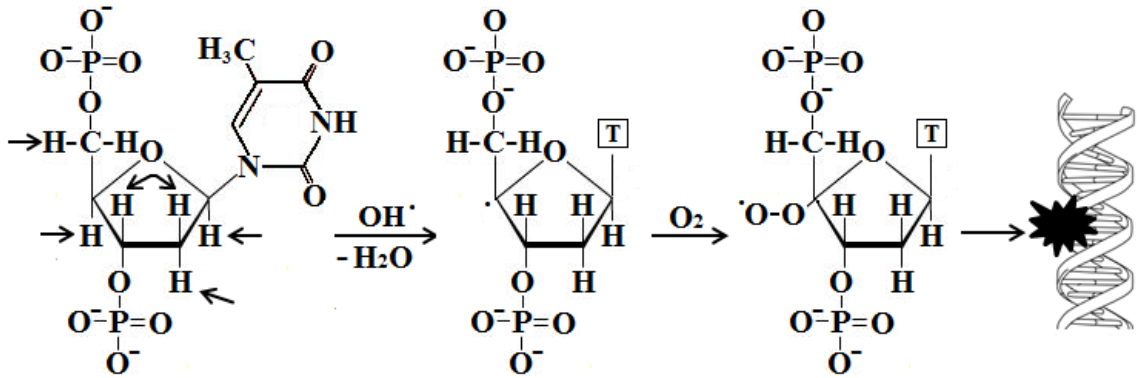
içinde baz bağlantıları gibi çeşitli oksidatif hasarlara sebep olabilirler (Cadet, et al., 2012).

OH[•] ve bir elektron oksidantları timin (T), sitozin (C), 5-metilsitozin, adenin (A) ve guanin (G) ile reaksiyona girerek farklı türlerde tekli okside bazları meydana getirirler (Cadet, et al., 2012). Örnek olarak, OH[•] hücrel DNA üzerinde guanin ile reaksiyona girerek bazın sekizinci karbon atomuna bağlı bulunan hidrojen atomu ile yer değiştirerek buraya bağlanır ve 8-Hidroksiguanin'in (8-OHGua) oluşumuna yol açar (Şekil 2.2). ¹O₂ formu da OH[•] gibi benzer şekilde guanin ve adenin ile reaksiyona girerek sekizinci karbon atomuna bir oksijen atomunun bağlanmasına yol açar. Sonuç olarak, Şekil 2.2'de görüldüğü gibi ¹O₂ formu bazların 8-Oxo-7,8-dihidroguanin (8-oxoGua) ve 8-Oxo-7,8-dihidroadenin'e (8-oxoAde) dönüşmesine neden olur (Cadet, et al., 2012). 8-Hidroksiguanin ve 8-Oxo-7,8-dihidroguanin özellik olarak birbirlerine benzerdirler. OH[•] ve ¹O₂'in guanin bazı üzerinde neden olduğu oksidasyon 'guaninin' 'timine' dönüşümüne yani transvers mutasyona sebep olur. Bu durum DNA replikasyonu sırasında "GC" baz çifti yerine "TA" baz çiftinin oluşumuna yol açar (Robert, 2011).



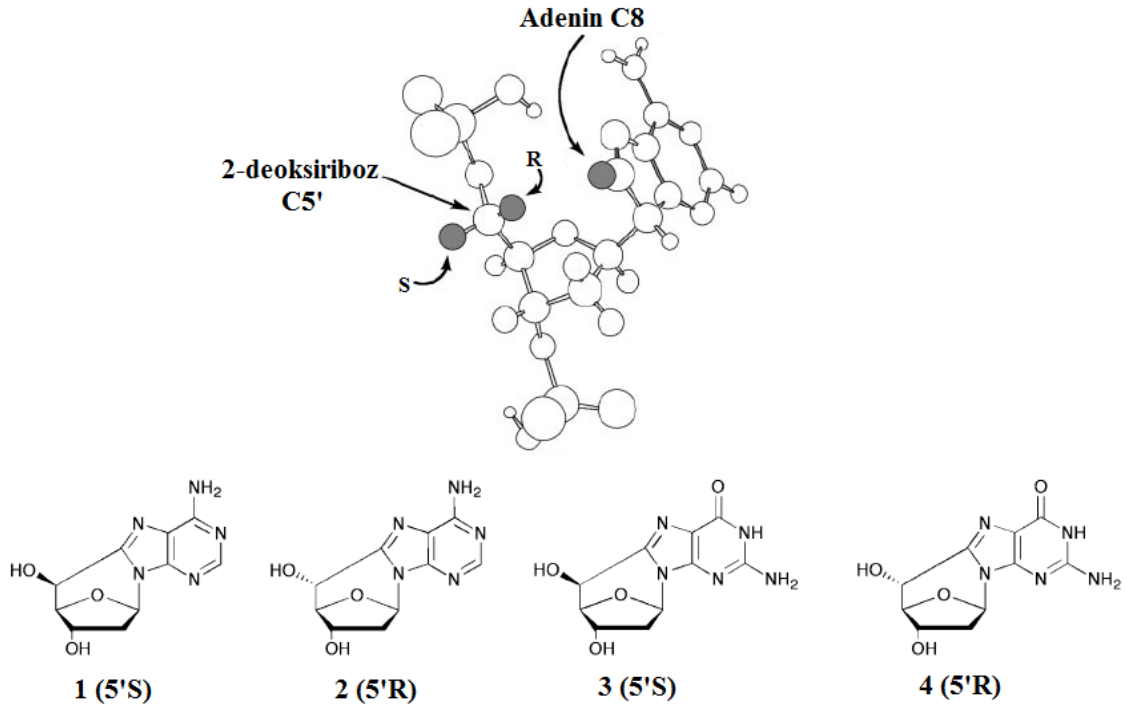
Şekil 2.2. 8-OHdGua, 8-oxodGua ve 8-oxodAde oluşum yolu (Cadet, et al., 2012).

DNA şeker-fosfat omurgasında bulunan 5'-karbonlu şeker bitkide stres şartları altında hidroksil radikalının öncelikli hedefidir. Hücrel DNA üzerinde tek iplik kırıklarının meydana gelmesi genellikle 2-deoksiriboz'un C1', C2', C3', C4' ve C5' pozisyonlarından $\text{OH}\cdot$ bağımlı hidrojen atomu çalınmasına (Şekil 2.3) bağlı olarak gerçekleşir (Cadet, et al., 2012; Dedon, 2008).



Şekil 2.3. OH^\cdot 'in DNA şeker iskeletinden bir hidrojen atomu çalması sonucu DNA'da tek iplik kırığının meydana gelmesi.

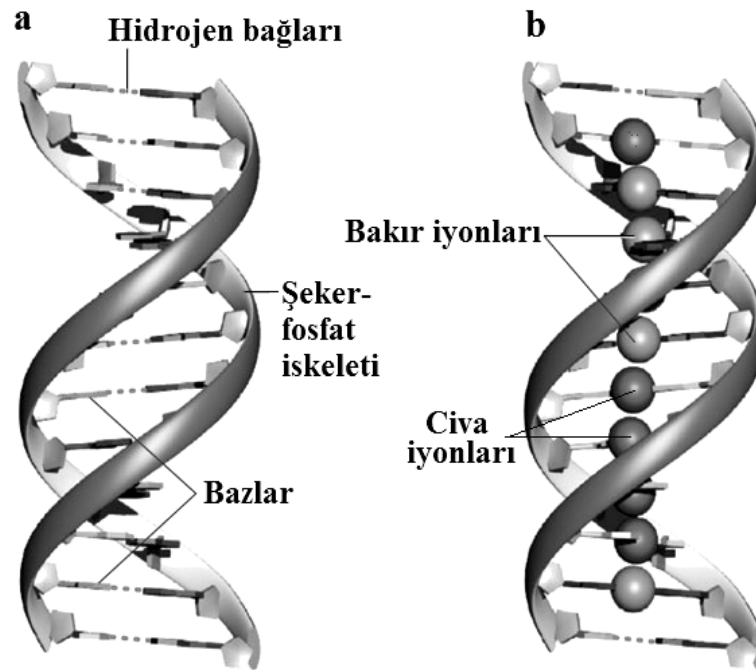
Bazı durumlarda OH^\cdot 2-deoksiribonükleozit'in 2-deoksiriboz kısmından C5' atomuna bağlı bulunan hidrojen atomlarından birini çalar. Bu durum, aynı 2-deoksiribonükleozit'in hem baz hem de şeker kısmına hasar vererek geleneksel baz-şeker (glikozit) bağının aksine, pürinin C8' pozisyonu ile 2-deoksiriboz'un C5' pozisyonu arasında başka bir baz-şeker bağı oluşumuna yol açar ve sonuç olarak DNA'da hasara neden olur (Chatgilialoglu, et al., 2011). Oluşan bu yapıya ise pürin 5',8-Siklo-2'-deksinükleozid adı verilir. OH^\cdot C5' atomuna bağlı bulunan 5'R (sol) veya 5'S (sağ) pozisyonundan hidrojen atomu çalarak (5'R-S)-5',8-Siklo-2'-deoksiadenozin ((5'R-S)-5',8-cdAdo) veya (5'R-S)-5',8-Siklo-2'-deoksiguanozin ((5'R-S)-5',8-cdGua) (Şekil 2.4) halkasal yapısının meydana gelmesine neden olur (Kuraoka, et al., 2001).



Şekil 2.4. 5',8-Siklo-2'-deoksinükleozid'ler: (5'*S*)-5',8-cdAdo(1), (5'*R*)-5',8-cdAdo (2), 5(5'*S*)-5',8-cdGua (3), (5'*R*)-5',8-cdGua (4) (Kuraoka, et al., 2001; Chatgililoglu, et al., 2011).

Nükleik asitlerin metal iyonları ile reaksiyonu oligomer veya monomerlerin bozulmasına ve aşırı stabilizasyonuna neden olabilir. Bununla birlikte, yanlış baz eşleşmeleri gibi dramatik etkiler ortaya çıkabilir (Eichhorn, et al., 1985). Ortamda yüksek konsantrasyonlarda metal iyonları, DNA üzerinde esas olarak fosfat gruplarındaki negatif yüklü oksijen atomları ile heterosiklik bazların azot ve oksijen gibi elektron donörü atomlarına bağlanır (Eichhorn, et al., 1985; Anastassopoulou, 2003). Fosfat gruplarındaki negatif yüklü oksijen gruplarına bağlanan metal iyonları, bu grupları nötralize ederek çift iplikli heliks yapısını stabilize eder (Eichhorn, et al., 1981). Metal iyonları tarafından gerçekleşen aşırı stabilizasyon yanlış baz eşleşmelerine neden olur (Eichhorn, et al., 1985). Ayrıca, alüminyum, bakır ve civa iyonları gibi metal iyonlarının DNA iplikleri arasında (Şekil 2.5) bağlantı kurabileceği ortaya konmuştur (Müller, 2006). Deneysel olarak *in vitro* ortamda gerçekleştirilen bir deneyde, yüksek konsantrasyonlarda metal iyonlarının bazların elektron donör kısmında bulunan

hidrojen bağıını oluşturan hidrojenler ile rekabet ettiği belirtilmiştir. Bunun sonucunda, bu bölgede karşılıklı bulunan hidrojen atomlarına bağlanan metal iyonları, hidrojen bağlarının yerine geçerek DNA'da iki iplik arasında metal bağlantısı oluşturdukları gözlemlenmiştir (Eichhorn, et al., 1985; Müller, 2006).



Şekil 2.5. a) Hidrojen bağlarıyla bağlanmış çift iplikli heliks yapısı, b) Hidrojen bağları, bakır iyonları (Cu²⁺, açık renk) ve civa iyonları (Hg²⁺, koyu renk) ile bağlanmış çift iplikli heliks yapısı (Müller, 2006).

Toprakların ağır metaller ile kontaminasyonu ve burada gelişimlerini sürdürmek zorunda olan bitkilerde yüksek konsantrasyonlarda ağır metallerin birikimi, bitkilerde genotoksik etki göstererek DNA profilinde mutasyon benzeri değişimlere yol açar. Dolayısıyla organizmadaki bu değişimlerin gözlenmesi ve ölçülmesi ile toprakta oluşan kirliliğin yoğunluğu arasında bir bağlantı kurulabilmektedir (Aras, et al., 2010).

2.2. Ağır Metaller ile Yapılan Çalışmalar

Günümüzde özellikle artan talep ve değişen iklim koşullarına bağlı olarak, bitki biyoteknolojisinde kuraklık, tuzluluk, donma, ağır metal kirlenmesi gibi etkenlere karşı daha dayanıklı tarım bitkilerinin yetiştirilmesi üzerine çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Yapılan bu çalışmaların temelinde şüphesiz ilk olarak farklı stres faktörlerinin farklı bitki türleri üzerinde oluşturdukları genotoksikite düzeylerinin saptanması yatmaktadır. Yakın zamana kadar stres faktörlerinin bitkiler üzerindeki etkilerinin incelenmesi hücresel ve fizyolojik düzeylerde kalmıştır.

Zengin ve Munzuroğlu (2004), 1,5 , 2 , 2,5 mM konsantrasyonda kurşun (Pb) ve bakır (Cu) stresine maruz bıraktıkları fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) fidelerinde kök, gövde ve yaprak dokularının gelişimlerini takip etmişlerdir. Her üç konsantrasyonda da Kurşun ve bakır stresinin fidelerin kök, gövde ve yaprak büyümesini önemli ölçüde azalttığını belirlemişlerdir.

Sresty and Rao (1999), bezelye bitkisinin kök hücrelerinde çinko (Zn) ve nikel (Ni) stresine yanıt olarak, nükleolus, nükleus, endoplazmik retikulum ve vakuollerde ultrayapısal değişimlerin meydana geldiğini belirlemişlerdir.

Soudek, et al. (2010), kurşun (Pb), nikel (Ni), bakır (Cu), çinko (Zn), kadmiyum (Cd), kobalt (Co), arsenik (As) ve krom (Cr) ağır metallerinin 0,01 , 0,05 , 0,1 , 0,5 ve 1 mM. konsantrasyonlarını keten (*Linum usitatissimum* L.) tohumlarına uygulamışlardır. Ağır metal konsantrasyon artışına paralel olarak çimlenen tohum sayısında ve kök uzunluğunda azalmalar belirlemişlerdir.

Genotoksik etkinin bitkiler üzerindeki etkisinin incelenmesi için yapılan bazı çalışmalarda tek hücre jel elektroforez yöntemi (comet assay), mikronükleus analizi veya sitogenetik analizlerine dayalı yöntemler kullanılmıştır.

Menke, et al. (2001), *Arabidopsis thaliana* (L.) bitkisinin kök bölgesini farklı sınıflardaki genotoksin etkisine maruz bırakmışlardır. Bitkide genotoksik hasar sonucu

meydana gelen hasarı tek hücre jel elektroforez yöntemi ile incelemiş ve başarılı bir şekilde kök hücre çekirdeklerinde meydana gelen mutajenik etkiyi göstermişlerdir.

Steinkellner, et al. (1999), Avusturya sınırları içinde bulunan endüstriyel kirliliğe maruz kalan yedi farklı su örneğini telgraf çiçeğine (*Tradescantia* sp.) uygulamışlar ve bitkinin kök bölgesinde bulunan hücrelerde meydana gelen kromozom değişimlerini mikronükleus analizi ile incelemişlerdir. Sonuçta, bitki kök hücrelerinde meydana gelen negatif değişimleri bildirmişlerdir.

Son yıllarda ise ağır metallerin DNA üzerindeki genotoksik etkilerini belirlemek için moleküler belirteçlerden olan RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA-Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) tekniğinden faydalanılmaktadır.

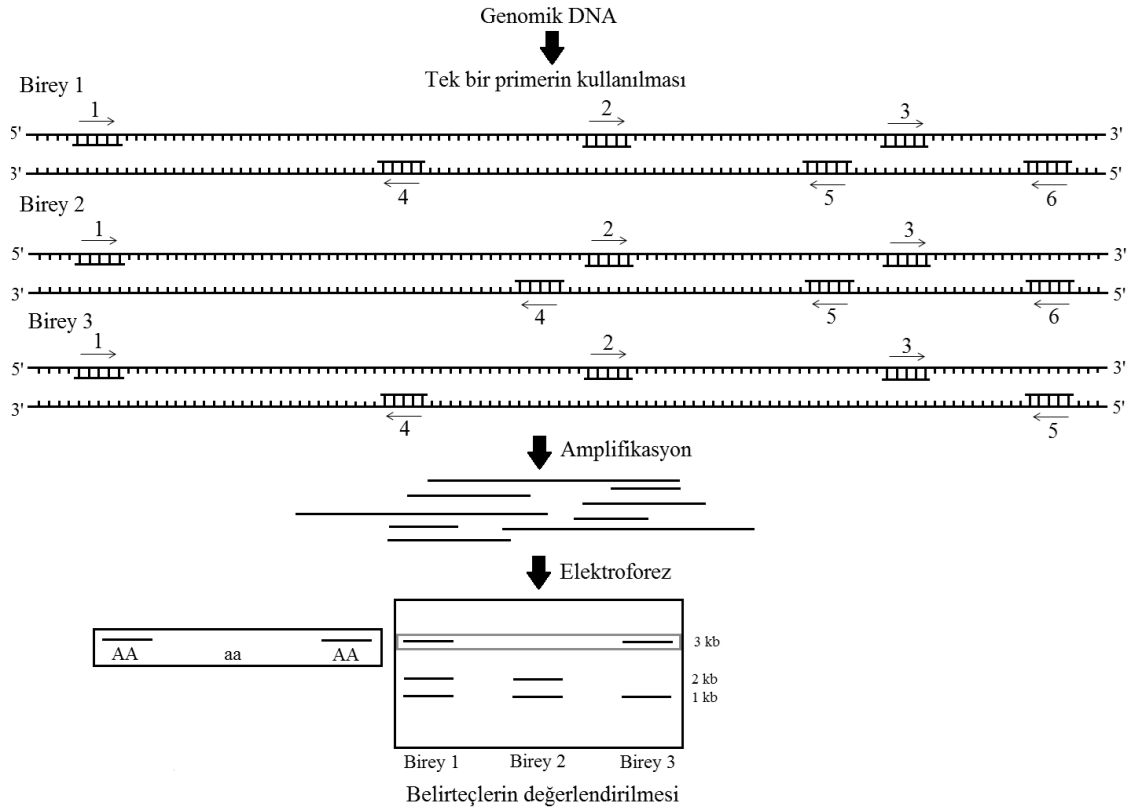
Ağır metallerin DNA üzerindeki etkilerini belirlemek için birçok araştırmacı RAPD tekniğini uygulamıştır (Cenkci, vd., 2009; Conte, et al., 1998; Liu et al. 2005; Cansaran, vd., 2011). Yapılan çalışmalara göre ağır metallerin konsantrasyon artışına paralel olarak PCR ürünlerindeki polimorfizm oranının arttığı tespit edilmiştir.

Körpe ve Aras (2011), patlıcan (*Solanum melongena* L.) tohumlarını farklı konsantrasyonlar da bakır (Cu) stresine maruz bırakmışlardır. RAPD analizleri sonucunda, ağır metal stresine bağlı olarak meydana gelen genotoksik etkiden dolayı bitkilerin genom profili kontrol grubuna göre farklılık gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Aynı zamanda artan ağır metal konsantrasyonu ile birlikte kök uzunluğunda, kök kuru ağırlığında ve toplam çözünür protein seviyelerinde azalma belirlemişlerdir. Bu araştırmayla, biyoindikatör olarak kullanılan organizma ile kirliliğin biyolojik etkisini kantitatif olarak tespit etmişlerdir.

2.3. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA-RAPD) Yöntemi ve Kullanım Alanları

RAPD ilk defa 1990'lı yıllarda keşfedilmiş bir yöntemdir. RAPD, uzunluğu 10 nükleotid olan primerler kullanılarak genom üzerinde rastgele bölgelerin DNA amplifikasyonu gerçekleştirilmesi esasına dayanan bir yöntemdir (Williams, et al., 1990). Aynı yıllarda diğer bir çalışma grubu tarafından uygulanmış ve AP-PCR olarak isimlendirilmiştir (Welsh, et al., 1990). 1991 yılında ise bu metotla aynı temele dayanan fakat farklı olarak 10 nükleotitten daha kısa primerlerle daha kompleks DNA parmakizi profili elde edilen ve DAF olarak isimlendirilen diğer benzer bir metot bir başka çalışma grubu tarafından yayınlanmıştır (Caetano-Anolles, et al., 1991). Bu analizlerde yalnızca bir tip primer kullanılır. Ancak, bu primerler her iki DNA ipliğinde de 5'→3' yönünde çalışır. Dolayısıyla kullanılan primerin DNA üzerinde birbirine yakın iki bölgeye bağlanabildiği genom bölgelerinin amplifikasyonu yapılır. Yani, RAPD yöntemiyle karşılıklı iki zincir üzerine nispeten yakın şekilde yerleşen primerlere homolog kısa DNA dizileri bulunduran genomik parçalar çoğaltılmaktadır. RAPD-PCR ürünlerinin polimorfizmi; tek ya da iki taraflı primer bağlanma bölgeleri arasındaki farklılıklar veya amplifiye (çoğaltılan) edilen parçada bulunan ekleme (insersiyon) ve çıkarma (delesyon) sayesinde tespit edilmektedir (Malyshev, et al., 1997). Amplifikasyon ürünleri agaroz jel elektroforezinde ayrılabilir ve nükleik asit boyama solusyonları ile görüntülenebilmektedir (Şekil 2.6). RAPD, genellikle bireyler arasında polimorfizm bantlarının varlığı/yokluğu şeklinde ifade edildiği dominant bir belirteçdir (Staub, et al., 1996). RAPD tekniği belirteç teknolojisinde uygulanmasındaki kolaylık, sentetik oligonükleotidlerin çok fazla sayıda bulunması, az miktarda ve düşük kalitede DNA'ya gereksinim duyulması gibi nedenlerden dolayı tercih edilen belirteçlerdendir.

RAPD tekniği haritalama ve karakterizasyon çalışmalarında daha az zamana, çalışmaya ve gidere gereksinim duyulması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir (Devos and Gale, 1992). Ayrıca, daha az miktardaki kalıp DNA'ya (5 ng) gereksinim duyulması sebebiyle tercih edilmekte ve birçok bitki türünde beklenen düzeyde sonuçlar vermektedir.



Şekil 2.6. RAPD çalışma prensibi.

RAPD belirteçleri; genom haritalama ve gen etiketleme, genetik parmak izi belirleme ve çeşit tanımlama, populasyon farklılığı, taksonomik ve filogenetik çalışmalar, akrabalık derecelerinin belirlenmesi gibi pek çok değişik amaçlı çalışmalarda kullanılmaktadır.

2.4. Enginar (*Cynara scolymus* L.)

Tez çalışmamızda, ağır metal etkisinin değerlendirilmesi için model bitki olarak seçilen enginar (*Cynara scolymus* L.) Asteraceae familyasına dahil olup tipik bir Batı ve Orta Akdeniz ülkeleri sebzesidir. Enginarda temel kromozom sayısının $2n=34$ olduğu belirtilmiştir (Foury, 1967; Ryder ve ark., 1983). Tarihte ilk kültüre alınmasının Batı Akdeniz Havzasında M.S. ilk yüzyılda olduğu bildirilmiştir (Foury, 1967). Enginar,

kapitulum eksen tablası (çiçek tablası) ve yapraklarından çeşitli şekillerde faydalanılan bir bitkidir. Besin değeri oldukça yüksek olan enginar, içerdiği besin maddelerinin zenginliği bakımından sebzeler arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Taze enginarın 100 g'ının tüketilmesi ile 86.5 g su, 9.9 g karbonhidrat, 2.8 g protein, 0.2 g yağ, 150 mg vitamin A, 8 mg vitamin C, 310 mg potasyum (K), 69 mg fosfor (P), 51 mg kalsiyum (Ca), 30 mg sodyum (Na) ve 11 mg demir (Fe) besin olarak alınır (Ryder ve ark., 1983). Genellikle taze ve konserve olarak tüketilen enginar tıbbi etkisinin yüksek olması nedeniyle de ilaç sanayiinde de oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Bayraktar, 1981). Enginar, besleyiciliğinin yanında insan vücudunun fizyolojik faaliyetlerine de etkide bulunur. Özellikle, kalp faaliyetlerinin düzenlenmesine ve kan dolaşımıyla kılcal damar direncine olumlu etkileri vardır. İçerdiği "ciarin" (1,5-dicaffeoyl-guinic acid) karaciğer, safrakesesi ve bağırsakların düzenli çalışmasını sağlar (Ryder ve ark., 1983). Ayrıca, sarılık tedavisinde vücuttaki ödemin giderilmesinde kullanıldığı belirtilmektedir (Koçer, 1993).

Enginar yetiştiriciliği dünyanın birçok yerinde yapılmakla birlikte, özellikle Akdeniz ülkelerinde ve bazı Amerika ülkelerinde yoğunluk kazanmaktadır. Türkiye'de ise enginar üretimi özellikle Ege ve Marmara bölgelerinde yoğunlaşmıştır. Ancak, Akdeniz bölgesinde yetiştiriciliği son yıllarda yayılım göstermektedir. Dünyada 121.509 hektar alanda yapılan 1.176.840 tonluk üretimde, İtalya 49.898 hektar alan ve 388.700 tonluk üretimiyle ilk sırada bulunmakta; Türkiye ise 2.400 hektar alan ve 26.000 tonluk enginar üretimiyle onbirinci sırada yer almaktadır (Ekbiç, 2005).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

Bu çalışmada Neobi Tohumcukluk'tan alınan ülkemiz genelinde en çok yetiştirilen iki çeşitten biri olan "bayrampaşa çeşidi" enginar (*Cynara scolymus* L.) tohumları kullanılmış ve yetiştirilmiştir.

3.2. Metod

Yetiştirilen enginar tohumlarının fidelerine kurşun ve bakır ağır metal stresi uygulanmıştır. Stres uygulamalarının ardından fidelerin kök boyu ölçülmüş, köklerden DNA izolasyonu yapılmış, RAPD-PCR yöntemi uygulanmış ve kök bölgelerinin toplam çözüner protein miktarları ölçülmüştür.

3.2.1. Tohum yüzey sterilizasyonu

Enginar tohumları, yüzey sterilizasyonunu sağlamak amacıyla %1'lik teknik sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltisi ile 5 dakika çalkalayıcı üzerinde muamele edilmiştir. Daha sonra distile su ile 5 dakikalık periyotlar halinde çalkalayıcı üzerinde 3 kere yıkanmıştır.

3.2.2. Çimlendirme yöntemi

Çalışma çerçevesinde öncelikle PCR çalışmalarında kullanılacak olan gerekli DNA materyallerinin elde edileceği Asteraceae familyasına dahil olan enginar (*Cynara scolymus* L.) tohumları çimlendirilmiş ve fideler elde edilmiştir. İçerisinde torf bulunan 119 gözlü viyoldeki her bir göze 1 adet benzer morfolojiye sahip enginar tohumu

ekilmiştir. Tohumların ekildiği viyol 7 gözlü gruplara ayrılmıştır. Viyol, kontrol için 1 grup, 8 farklı konsantrasyonda ki kurşun stres uygulaması için 8 grup ve 8 farklı konsantrasyonda ki bakır stres uygulaması 8 grup olmak üzere toplam 17 gruba ayrılmıştır. Viyol içerisinde bulunan gruplardaki enginar tohumları sırası ile herhangi bir ağır metal içermeyen kontrol distile suyu (K) ve kurşun ($Pb(CH_3COO)_2$), bakır ($CuSO_4$) çözeltilerinin 20, 40, 80, 160, 240, 320, 640, 1280 ppm (Pb 20, Pb 40, Pb 80, Pb 160, Pb 240, Pb 320, Pb 640, Pb 1280 ve Cu 20, Cu 40, Cu 80, Cu 160, Cu 240, Cu 320, Cu 640, Cu 1280) konsantrasyonları uygulanmıştır. Her uygulama 3 tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir. Tüm bu işlemlerin tohumlara uygulanmasına oda sıcaklığında 14 gün boyunca devam edilmiş ve fideler elde edilmiştir.

3.2.3. Bitki kök uzunluğu belirlenmesi

Ağır metal stresinin bitkiler üzerine etkilerini belirlemek amacıyla iki haftanın sonunda fizyolojik parametrelerden kök uzunluğu (cm/tohum), kök boğazından kökün ucuna kadar ölçülmüştür.

3.2.4. DNA izolasyonu

14 günlük yetiştirme işleminden sonra enginar fidelerinden elde edilen primer kökler sıvı azot ile eppendorf tüpü içinde ezilmiş ve DNA izolasyonu “GeneMATRIX Plant and Fungi” kiti ile belirtilen yönteme göre gerçekleştirilmiştir.

İzolasyon sonucu RAPD analizlerini gerçekleştirmek üzere elde edilen DNA’lar NanoDrop ND-100 ile incelenmiştir. Sonuç olarak, Çizelge 3.1’de belirtildiği gibi 4-13.1 ng/µl aralığında değişen miktarlarda ve 1.67-2.18 aralığında saflık gösteren DNA elde edildiği belirlenmiştir (A260/280 absorpsiyon oranı) (640 ve 1280 ppm Cu ürünleri için sayfa 25’e bakınız). Ayrıca, DNA kalitesi etidyum bromür varlığında agaroz jelde de incelenmiştir.

Çizelge 3.1. Kurşun ve bakır stresi altında yetiştirilmiş enginar bitkisinden elde edilen DNA'ya ait nanodrop ölçümleri.

Örnek Adı Enginar	ng/ul (DNA Miktarı)	260/280 (DNA/Protein)	260/230 (DNA/RNA)
Kontrol	4,9	1,67	0,73
20 ppm Pb	5,1	1,69	0,67
40 ppm Pb	12,9	1,78	0,76
80 ppm Pb	4,5	1,7	0,74
160 ppm Pb	6,7	1,75	0,65
240 ppm Pb	6	1,76	0,67
320 ppm Pb	4,5	1,82	0,66
640 ppm Pb	7,9	2,07	0,62
1280 ppm Pb	13,1	1,75	0,79
20 ppm Cu	5,5	2,1	0,63
40 ppm Cu	4,6	1,8	0,66
80 ppm Cu	4	1,89	1,12
160 ppm Cu	6,7	2,12	0,7
240 ppm Cu	5,7	2,18	0,77
320 ppm Cu	6,5	1,84	0,76

3.2.5. RAPD protokolü

23 farklı primer (Çizelge 3.2) kullanılarak gerçekleştirilen RAPD uygulamalarında, tüm işlemler (PCR döngü şartları, kullanılan Taq polimeraz ve diğer PCR bileşenlerinin konsantrasyonları, elektroforez şartları ve jel konsantrasyonları) daha önce birçok bitki türü için denenmiş uygulamalardan sonra en iyi sonuçları verebilecek şekilde optimize edilmiş prosedürler kullanılmıştır (Beyaztaş, 2008; Aras, et al., 2010). Sonuç alınan deneyler birkaç defa aynı şartlarda tekrar edilmiştir. Kontaminasyondan korunmak için steril ekipmanlar kullanılmış ve her RAPD işlemi için DNA örneği içermeyen negatif kontrol kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan primerler ve dizi bilgileri.

Primer	Nükleotid dizisi (5' → 3')
OP A03	A G T C A G C C A C
OP B08	G T C C A C A C G G
OP C01	T T C G A G C C A G
OP C02	G T G A G G C G T C
OP C03	G G G G G T C T T T
OP C04	C C G C A T C T A C
OP C05	G A T G A C C G C C
OP C06	G A A C G G A C G A
OP C07	G T C C C G A C G A
OP C08	T G G A C C G T C C
OP C09	C T C A C C G T C C
OP C10	T G T C T G G G T G
OP C11	A A A G C T G C G G
OP C12	T G T C A T C C C C
OP C13	A A G C C T C G T C
OP C14	T G C G T G C T T G
OP C15	G A C G G A T C A G
OP C16	C A C A C T C C A G
OP C17	T T C C C C C C A G
OP C18	T G A G T G G G T G
OP C19	G T T G C C A G C C
OP C20	A C T T C G C C A C
OP O04	A A G T C C G C T C

3.2.6. RAPD-PCR bileşenleri ve koşulları

RAPD-PCR çalışması; her örnek için toplam 25'er µl reaksiyon hacmiyle gerçekleştirilmiştir. Aşağıdaki PCR reaksiyon bileşenlerine standart hacime ulaşacak şekilde ultra distile su eklenmiştir.

PCR reaksiyon bileşenleri;

- 25 ng genomik DNA
- 2.5 10x reaksiyon tamponu
- 2.5 mM MgCl₂
- 2.5 µM dNTPs
- 0.2 µM primer
- 1.0 ünite Taq polimeraz (Solis BioDyne)

PCR döngü koşulları; kapak sıcaklığı 105°C'de 35 döngü olacak biçimde (denatürasyon, bağlanma ve uzama işlemi) Biometra ısı döngü cihazında gerçekleştirilmiştir.

- 94°C'de 2 dakika ön denatürasyon
 - 94°C'de 30 saniye (denatürasyon)
 - 36°C'de 1 dakika (bağlanma)
 - 72°C'de 1 dakika 45 saniye (uzama)
 - 72°C'de 8 dakika (son uzama)
- } 35 döngü

3.2.7. Elektroforez

Elektroforez adımında kullanılacak olan agaroz jel hazırlandıktan sonra etidyum bromür jele ilave edilmiştir. Etidyum bromürün iyice karışması için jel bir süre dairesel olarak erlen-mayer içinde karıştırılıp kuyucukların oluşmasını sağlayan tarakların bulunduğu traye dökülmüştür. Bir süre sonra donan jelden taraklar çıkarılmış ve jel, içinde 1X TBE tamponu bulunan elektroforez tankına konmuştur. PCR sonucu elde edilen ürünler ve DNA ladder jelde bulunan kuyucuklara yüklenmiştir. Sonuçta, PCR ürünleri ve DNA moleküler boyut belirteçleri (M/marker) (Solis BioDyne) % 1,2 agaroz konsantrasyonu ve 0,5 µl /ml etidyum bromür içeren jellerde, 1xTBE (Tris Borat

EDTA) tamponu içerisinde 5 V/cm olacak şekilde yaklaşık 3 saat ayrıma tabi tutulmuştur. RAPD primerleri ile jellerde oluşan RAPD profilleri UV ışığı altında görüntülenmiş (Gene Genius, Syngene) ve fotoğrafları çekilmiştir (GyneSnap Software, Synoptics Ltd.).

3.2.8. Toplam çözüner protein içeriği

Kontrol grubuna ait örnekler ile kurşun ve bakır stresine maruz bırakılan grupların örneklerine ait 0.08 g olarak tartılan kök parçaları sıvı azotla havanda ezilerek 700 µl fosfat tamponu (0.2 M, pH 7.0) ile homojenize edilmiştir. 27000 g'de 20 dk. santrifüj edilmiş örneklerin süpernatantları eppendorf tüplerine aktarılmıştır (Omran, et al., 1980). Örneklerin toplam çözüner protein konsantrasyonları, Bradford metoduna göre belirlenmiştir (Bradford, 1976). Bu yöntemeye göre; 100 µl örnek çözeltisi ile 400 µl deiyonize su ile karıştırıldıktan sonra 5 ml 1X Bradford çözeltisine eklenmiştir. Blank (kör) olarak 500 µl deiyonize su ve 5 ml 1X Bradford karışımı kullanılmıştır. Bu karışımlar ~10 saniye vorteksenerek karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve absorbans değerleri 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede paralelli olarak blanke karşı okunmuştur. Standart BSA (Bovin Serum Albumin) ile hazırlanmıştır. Örneklerin toplam çözüner protein konsantrasyonununun hesaplanması:

$$\frac{\text{Spektrofotometrede okunan değer}}{\text{Standart eğrinin eğimi}} \times \text{Dilüsyon faktörü} \quad (3.1)$$

Bradford çözeltisinin hazırlanması için; 0.5 g Coomassie Blue G 50 ml suda çözülmüştür. Elde edilen çözeltinin üzerine 250 ml %96'lık etanol ve 500 ml %85'lik fosforik asit eklenip karıştırılarak 1 L'ye tamamlanmış ve sonuç olarak 5X'lik bradford çözelti elde edilmiştir. Elde edilen çözelti +4°C'de karanlıkta muhafaza edilmiştir.

3.2.9. İstatistiksel analizler

Elde edilen verileri değerlendirmek için SPSS (Statistic Program for Social Sciences 15.0) paket programı kullanılmıştır. İstatistiksel farklılıkları belirtmek içinse T-testi kullanılmıştır (farklılık açısından $p < 0,05$ $p < 0,01$, $p < 0,001$ değerleri anlamlıdır).

3.2.10. Genomik kalıp stabilitesi (GKS)

Veri analizleri kontrol örneğine ait RAPD profilinde gözlenen bantlar ile ağır metal stresi uygulanan örneklerin RAPD profillerinden elde edilen polimorfik bantların karşılaştırılması ile yapılmıştır. Yeni oluşan ve kaybolan bantlar polimorfizm olarak kabul edilip her bir primerde, her örnek için tespit edilmiş ve elde edilen veriler tablo halinde verilmiştir. Sonuçta; genomik kalıp stabilitesi (GKS) oranları RAPD profillerindeki polimorfizm ortalamalarından belirlenmiş ve aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$GKS = (1 - a/n) \times 100 \quad (3.2)$$

Bağlamda harfler;

a : her örnekteki ortalama polimorfik bant sayısı,

n : kontroldeki toplam bant sayısı,

anlamında kullanılmıştır.

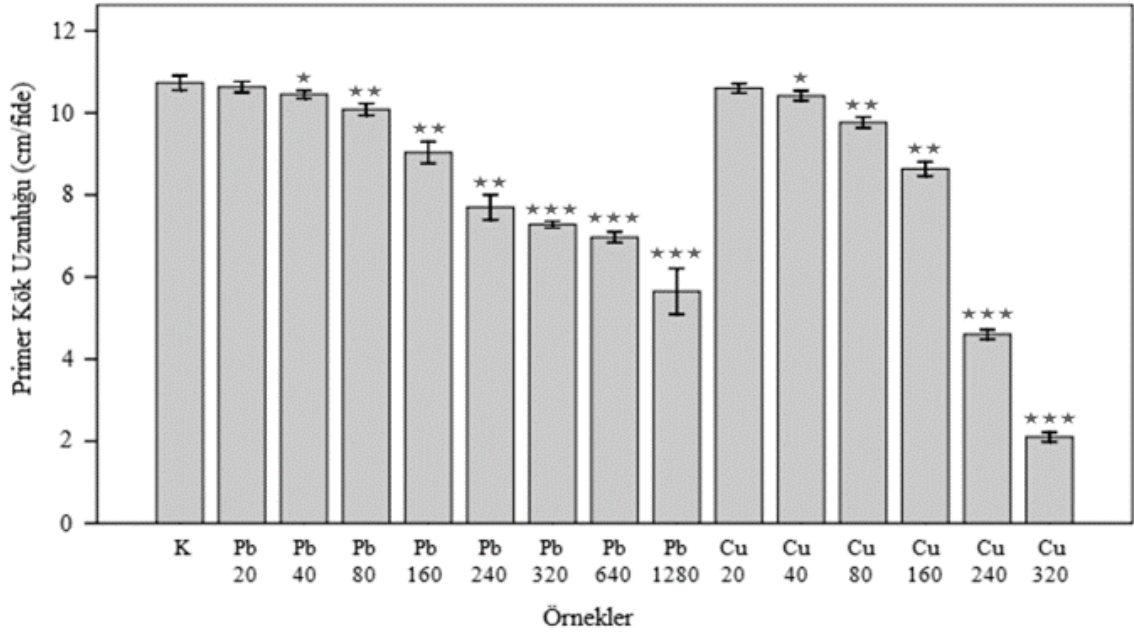
4. BULGULAR

4.1. Kurşun (Pb) ve Bakır (Cu) Stresinin Enginar Tohumlarının Çimlenmesi Üzerine Etkisi

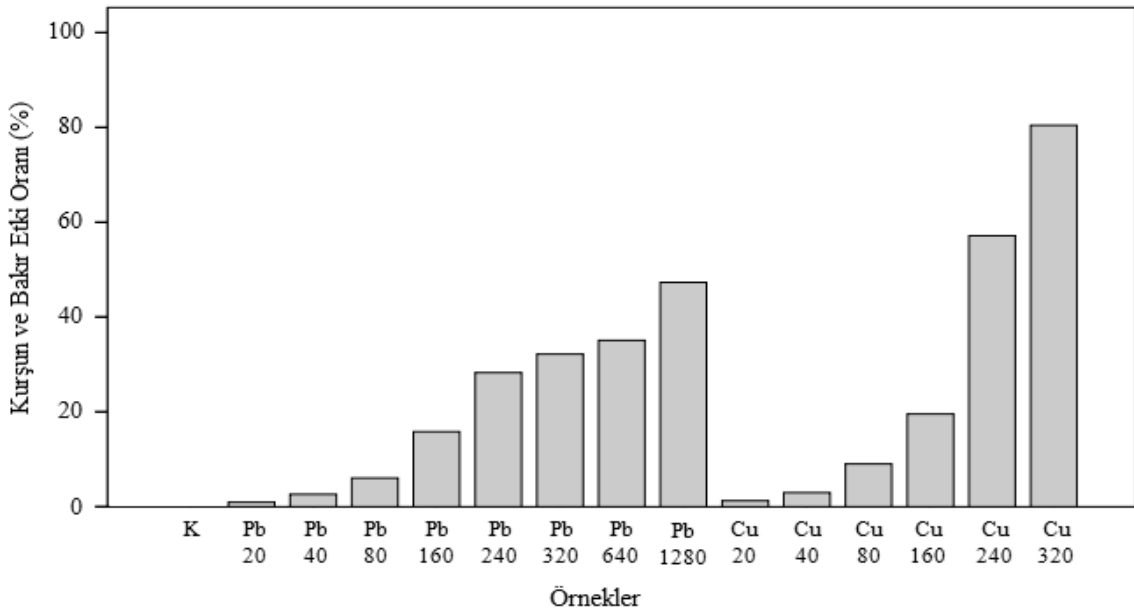
Enginar fidelerinin elde edilmesi ve stres etkisinin gözlemlenmesi amacıyla enginar tohumları kurşun ve bakır metal çözeltilerinin 20, 40, 80, 160, 240, 320, 640, 1280 ppm konsantrasyonları ile 14 gün süre ile sulanmıştır. 20, 40, 80, 160, 240, 320, 640, 1280 ppm konsantrasyonlarında kurşun çözeltileri ile sulanan tüm enginar tohumlarında çimlenme gözlemlenmiştir. 20, 40, 80, 160, 240, 320 ppm konsantrasyona sahip bakır çözeltileri ile sulanan enginar tohumlarında çimlenme gözlemlenirken, 640 ve 1280 ppm bakır konsantrasyonuna sahip bakır çözeltileri ile sulanan enginar tohumlarında aşırı metal stresi sonucu çimlenme gözlenmemiştir.

4.2. Kurşun (Pb) ve Bakır (Cu) Stresinin Enginar Fidelerinin Kök Uzunluğu Üzerine Etkisi

14 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda kurşun ve bakır çözeltileri ile sulanarak enginar fideleri elde edilmiştir. Kurşun ve bakır metallerinin elde edilen enginar fidelerinin kök uzunluğuna etkisi incelendiğinde; kurşun ve bakır konsantrasyonunun artışına bağlı olarak Şekil 4.1’de görüldüğü gibi kök uzunluğu (cm/fide) önemli derecede düşmüştür. Şekil 4.2’ de bu düşüşün etki oranları % olarak belirtilmektedir. Kurşun ve bakır metallerinin kök gelişimi üzerine etkisi incelendiğinde, en fazla negatif etkiyi bakır metali göstermiştir. Kök uzunluğu üzerine en az etkiyi kurşun ve bakırın 20 ppm konsantrasyona sahip çözeltileri, en fazla etkiyi ise bakırın 320 ppm konsantrasyona sahip çözeltisi göstermiştir. Kontrol örneklerinin kök uzunluğuna göre Pb 40 ve Cu 40 örneklerinin kök uzunluklarında $p < 0,05$, Pb 80, Pb160, Pb 240, Cu 80 ve Cu 160 örneklerinin kök uzunluklarında $p < 0,01$, Pb 320, Pb 640, Pb 1280, Cu 240 ve Cu 320 örneklerinin kök uzunluklarında ise $p < 0,001$ farklılık belirlenmiştir.



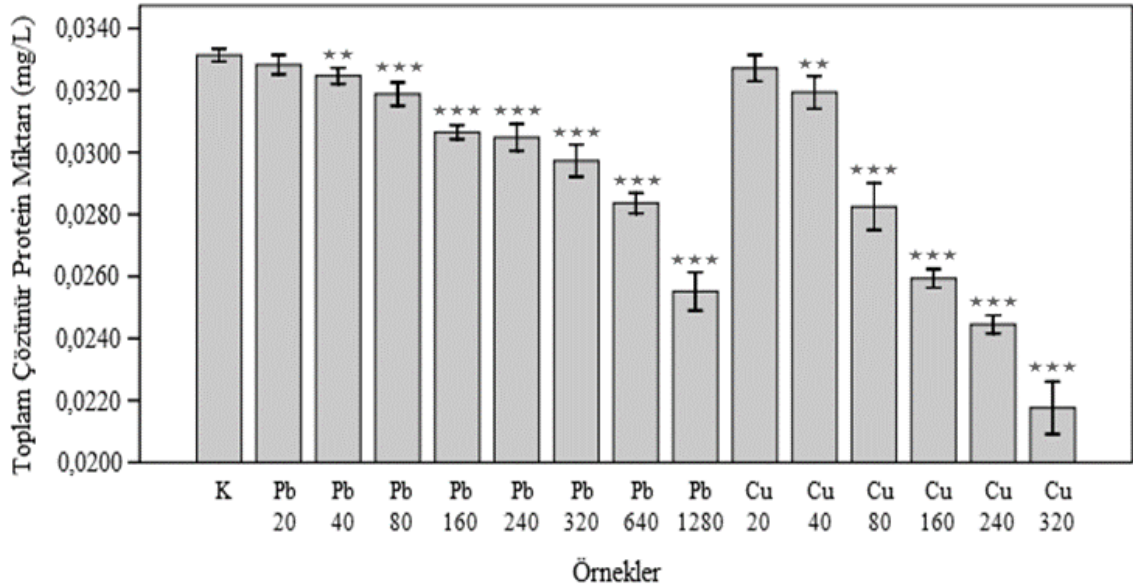
Şekil 4.1. 14 gün farklı kurşun ve bakır konsantrasyonlarında gelişen enginar fidelerine ait kök uzunlukları (cm/fide) (*= p<0,05; **= p<0,01; ***= p<0,001).



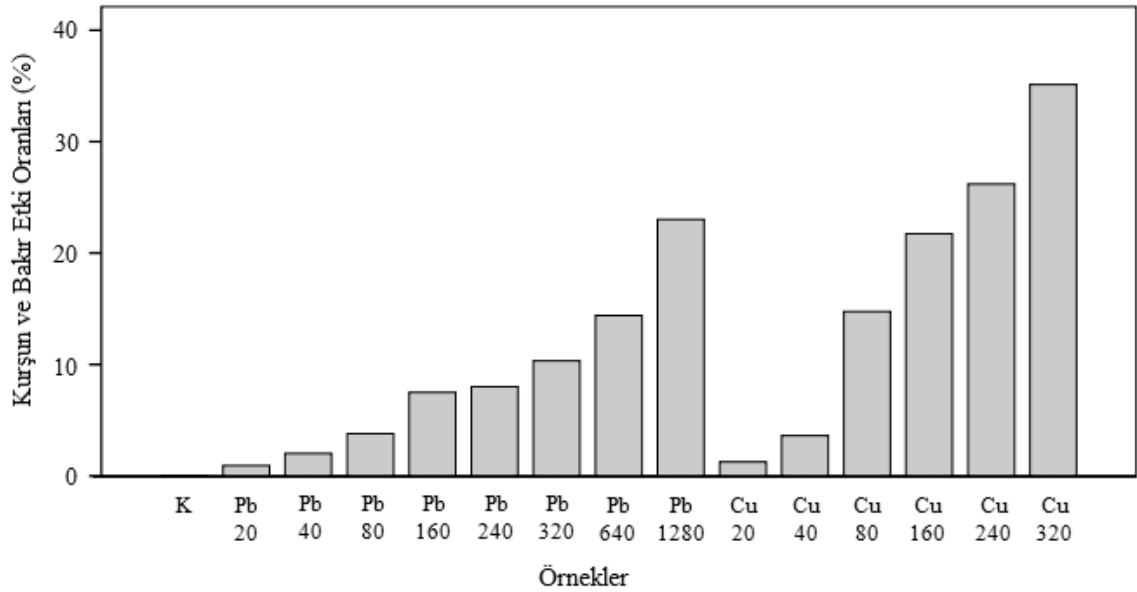
Şekil 4.2. 14 gün farklı kurşun ve bakır konsantrasyonlarında gelişen enginar fidelerinde kurşun ve bakır metallerinin kök uzunluğuna etki oranları (%).

4.3. Kurşun (Pb) ve Bakır (Cu) Stresinin Enginar Fideleri Kök Bölgesinde Toplam Çözünür Protein Miktarı Üzerine Etkisi

Farklı konsantrasyonlarda enginar fidelerine uygulanan kurşun ve bakır çözeltilerinin kök bölgelerine ait toplam çözünür protein miktarı üzerine etkisi incelenmiştir. Artan kurşun ve bakır konsantrasyonuna bağlı olarak toplam çözünür protein miktarı (mg/L) Şekil 4.3’de belirtildiği gibi düşüş göstermektedir. Kurşun ve bakır çözeltilerinin kök bölgelerine ait toplam çözünür protein miktarı üzerine etki oranları % olarak Şekil 4.4’de gösterilmiştir. Toplam çözünür protein miktarına en az etkiyi kurşunun 20 ppm konsantrasyonu, en fazla etkiyi ise bakırın 320 ppm konsantrasyonu göstermiştir. Kontrol örneklerinin toplam çözünür protein miktarına göre Pb 40 ve Cu 40 örneklerinin toplam çözünür protein miktarında $p<0,01$, Pb 80, Pb160, Pb 240, Pb 320, Pb 640, Pb 1280, Cu 80, Cu 160, Cu 240 ve Cu 320 örneklerinin toplam çözünür protein miktarında ise $p<0,001$ farklılık belirlenmiştir.



Şekil 4.3. 14 gün farklı kurşun ve bakır konsantrasyonlarında gelişen enginar fide köklerine ait toplam çözünür protein miktarları (mg/L) (**= $p<0,01$; ***= $p<0,001$).

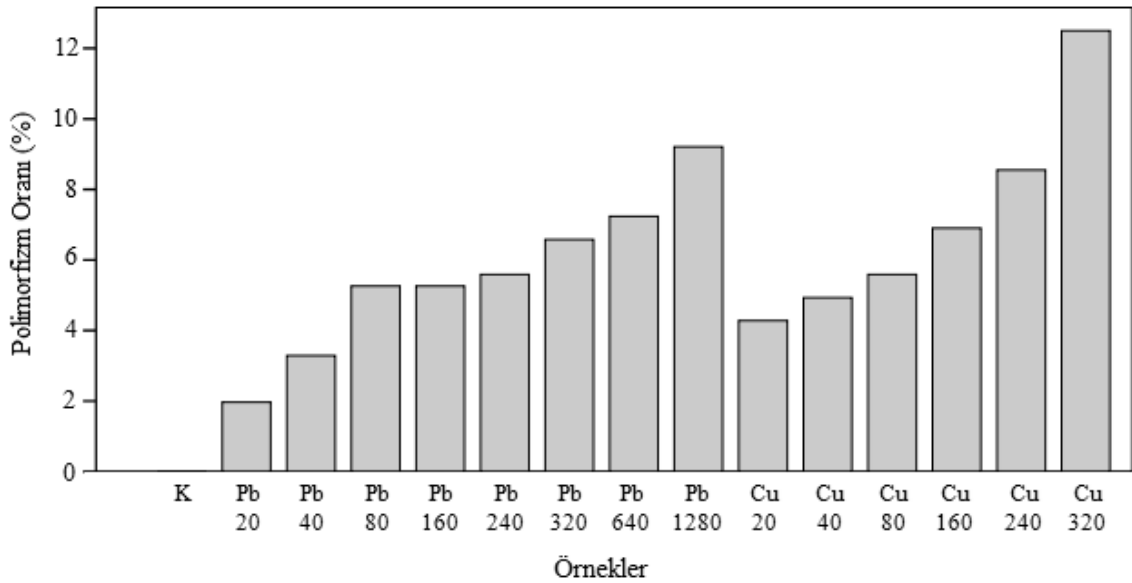


Şekil 4.4. 14 gün farklı kurşun ve bakır konsantrasyonlarında gelişen enginar fidelerinde kurşun ve bakır metallerinin kök toplam çözümlü protein miktarına etki oranları (%).

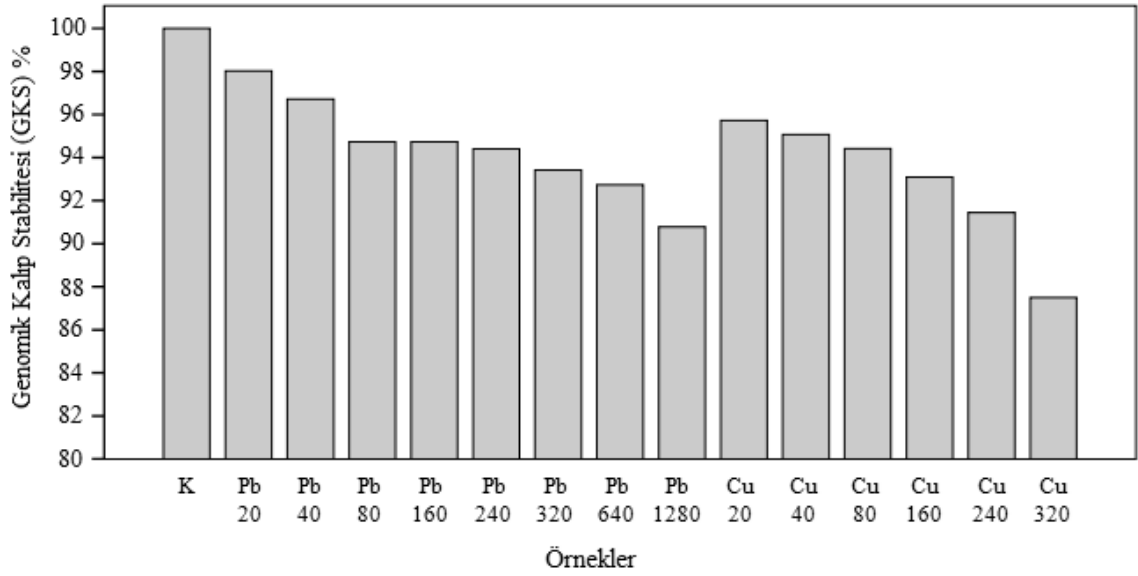
4.4. Kurşun (Pb) ve Bakır (Cu) Stresinin Enginar Fidelerinde RAPD Profili ve Genomik Kalıp Stabilitesi (GKS) Üzerine Etkisi

Çalışmada ağır metal etkisinin enginar fidelerinin kök bölgesi üzerine olan etkisinin incelenmesi amacıyla, kök bölgelerinden elde edilen DNA'lar toplam 23 farklı RAPD primeri ile çalışılmıştır. Kullanılan primerlerin 17'sinde polimorfik bant oluşumu gözlemlenmiştir. 6 (OP A03, OP B08, OP C01, OP C04, OP C17, OP O04) primer açısından bir değişim gerçekleşmemiş ve monomorfik bant paterni gözlemlenmiştir. Her primer için gözlemlenen polimorfizmlerin hesaplanması, kurşun ve bakır metal stresine maruz bırakılan örneklerin RAPD profillerinin kontrol örneklerinin RAPD profillerine göre karşılaştırılmasıyla yapılmıştır. Kontrole ait RAPD profilinde bulunup örneklerde bulunmayan ve/veya kontrol RAPD profiline göre yeni oluşan bantlar polimorfik olarak değerlendirilmiştir. Şekil 4.5'de belirtilen polimorfizm yüzdeleri, polimorfik bant sayısının kontrole ait toplam bant sayısına oranlanmasıyla hesaplanmıştır. Örneklerde, artan kurşun ve bakır metal konsantrasyonuna bağlı olarak polimorfizm oranının arttığı görülmüştür. Pb 20, Pb 40,

Pb 80, Pb 160, Pb 240, Pb 320, Pb 640, Pb 1280 gruplarına ait polimorfizm oranları sırasıyla: P (%): 1.97, 3.29, 5.26, 5.26, 5.59, 6.58, 7.24, 9.21'dir. Cu 20, Cu 40, Cu 80, Cu 160, Cu 240, Cu 320 gruplarına ait polimorfizm oranları ise sırasıyla: P (%): 4.28, 4.93, 5.59, 6.9, 8.55, 12.5'dir. En az polimorfizm 20 ppm kurşun çözeltisinin uygulandığı örneklerde gözlenirken, en fazla polimorfizm ise 320 ppm bakır çözeltisinin uygulandığı örneklerde görülmüştür. RAPD profilleri ile belirlenen GKS parametresinde ağır metal etkisi düşük konsantrasyonlarda kök uzunluğu ve toplam çözümlü protein miktarı parametrelerine göre Şekil 4.6'da görüldüğü gibi kontrole göre daha fazla değişime neden olmuştur.



Şekil 4.5. 14 gün farklı kurşun ve bakır konsantrasyonlarında gelişen enginar fide köklerine ait DNA'lardan RAPD çalışmaları sonucu elde edilen polimorfizm oranları (%).



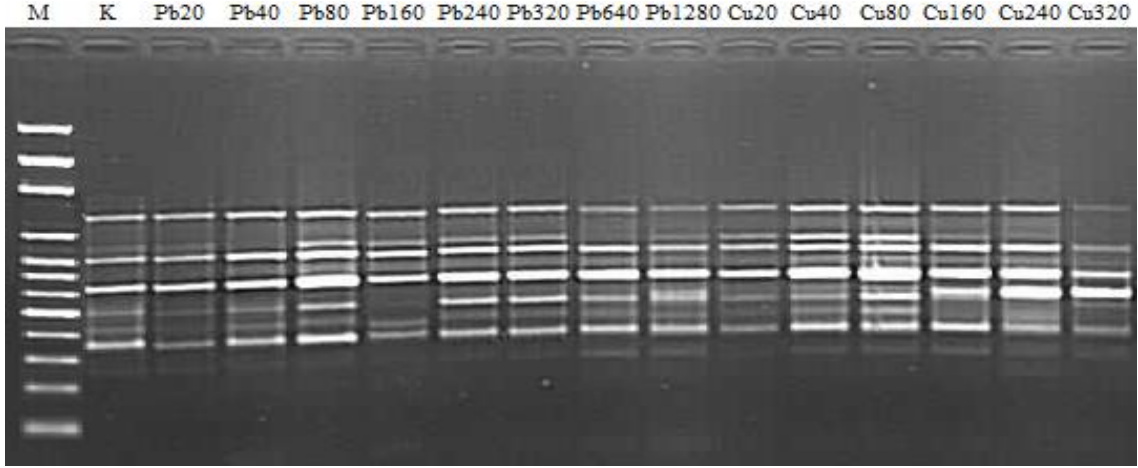
Şekil 4.6. 14 gün farklı kurşun ve bakır konsantrasyonlarında gelişen enginar fide örneklerine ait genomik kalıp stabilitesinin (GKS), kontrol fidesine göre karşılaştırılması.

Çizelge 4.1’de kontrol örneklerinin RAPD profillerine ait bant sayılarıyla, farklı kurşun ve bakır konsantrasyonlarında gelişen örneklerin kontrol profiline göre değişim gösteren RAPD profillerine ait bant sayıları verilmiştir. Çizelge 4.1’de x; kontrol RAPD profiline göre kaybolan bantları y; kontrol RAPD profiline göre yeni ortaya çıkan bantları belirtmek için kullanılmıştır.

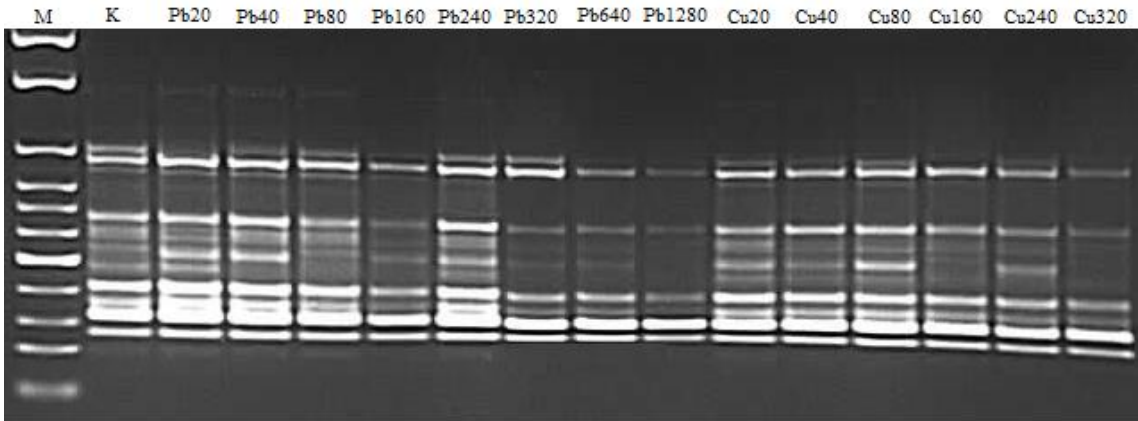
Çizelge 4.1. RAPD çalışmaları sonucu elde edilen bantlar ve bant farklılıkları (K: kontrol, (x/y) x: kontrole göre kaybolan bant, y: kontrole göre yeni oluşan bant).

	K	Pb 20 x/y	Pb 40 x/y	Pb 80 x/y	Pb 160 x/y	Pb 240 x/y	Pb 320 x/y	Pb 640 x/y	Pb 1280 x/y	Cu 20 x/y	Cu 40 x/y	Cu 80 x/y	Cu 160 x/y	Cu 240 x/y	Cu 320 x/y
OP C02	16	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1
OP C03	13	0/0	0/0	1/0	1/0	0/0	1/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	1/0
OP C05	22	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/1	0/1	0/1	0/2
OP C06	19	2/1	2/1	2/0	2/1	2/1	2/1	2/1	2/3	1/1	1/0	1/0	1/0	2/1	4/3
OP C07	21	0/0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/2	0/0	0/0	0/1	0/1	0/2	1/1
OP C08	16	0/0	0/0	0/0	0/1	0/2	0/2	0/2	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
OP C09	22	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	0/1	0/0	0/0	0/0	0/1	0/1	0/1
OP C10	19	0/0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2
OP C11	21	0/0	1/1	1/1	1/2	1/2	½	2/4	2/5	0/1	1/2	2/3	2/4	2/4	5/3
OP C12	20	0/0	0/0	2/0	2/1	2/2	2/1	2/2	2/1	2/1	2/1	2/1	1/2	2/1	2/2
OP C13	15	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0	2/0	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0	1/2
OP C14	20	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0
OP C15	14	0/0	0/0	0/1	0/1	0/0	0/0	0/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/2	0/0
OP C16	16	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1/2	0/0	0/1
OP C18	14	0/0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
OP C19	16	0/0	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/1	0/2	0/2
OP C20	20	1/0	0/0	0/1	0/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	1/0	1/0	1/0	1/0	1/1
Toplam	304	6	10	16	16	17	20	22	28	13	15	17	21	26	38

Şekil 4.7 ve 4.8’de enginar örneklerinin DNA’ları ile yapılan RAPD PCR sonucu, OP C02 ve OP C03 primerleri ile elde edilen PCR ürünlerine ait elektroforez sonuçları görülmektedir.

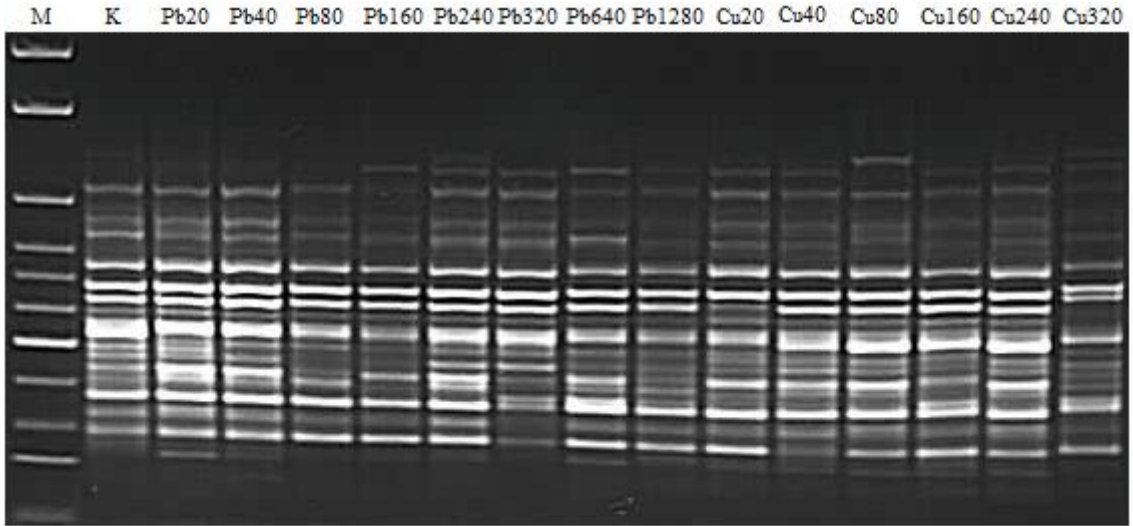


Şekil 4.7. OP C02 primeriyle yapılan PCR’a ait jel görüntüsü.

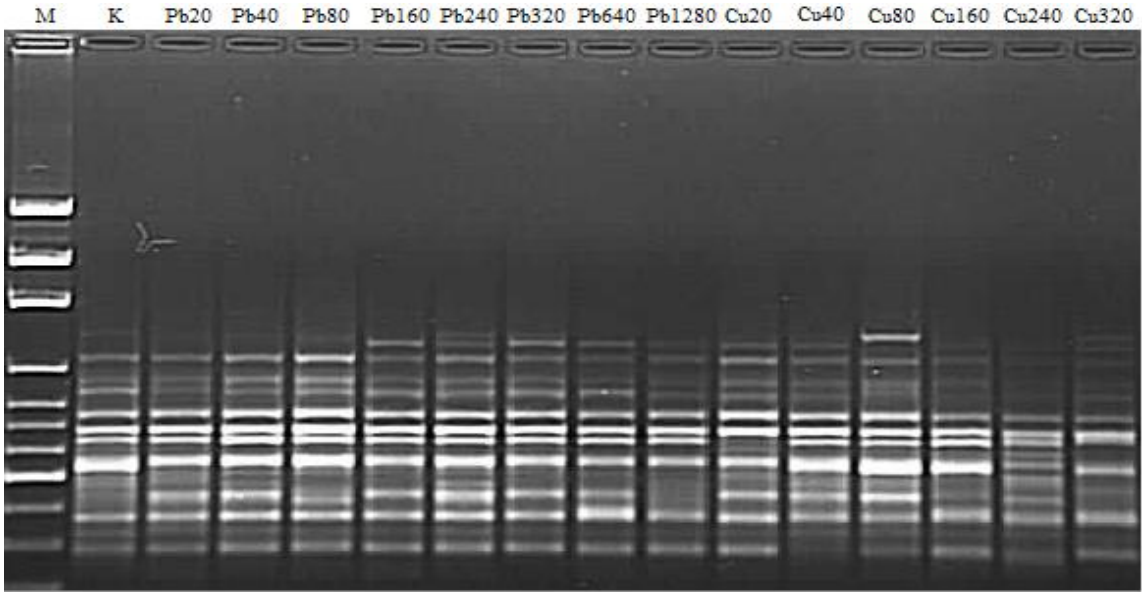


Şekil 4.8. OP C03 primeriyle yapılan PCR’a ait jel görüntüsü.

Şekil 4.9 ve 4.10'da enginar örneklerinin DNA'ları ile yapılan RAPD PCR sonucu, OP C05 ve OP C06 primerleri ile elde edilen PCR ürünlerine ait elektroforez sonuçları görülmektedir.

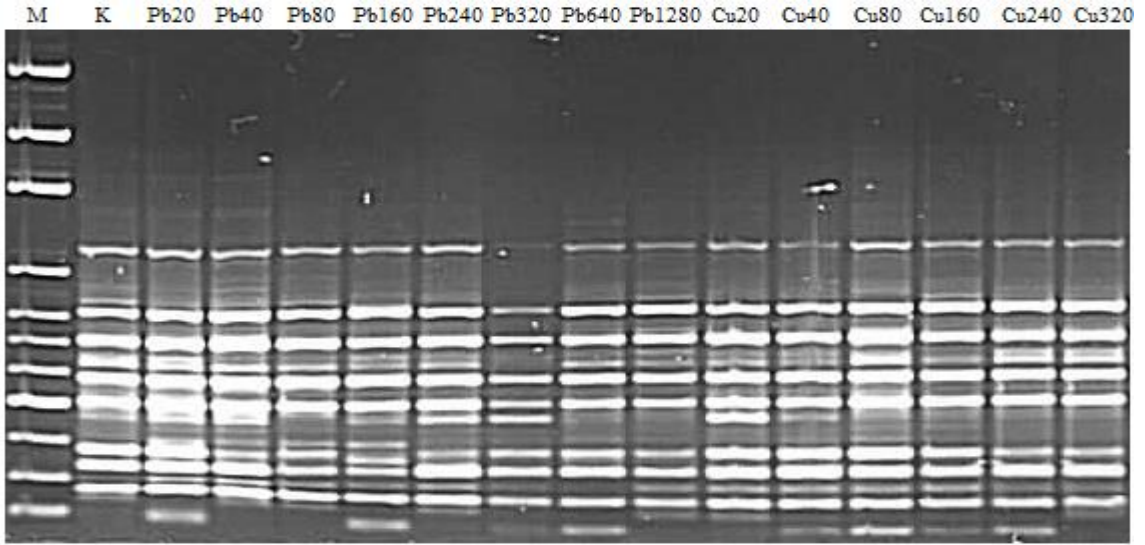


Şekil 4.9. OP C05 primeriyle yapılan PCR'a ait jel görüntüsü.

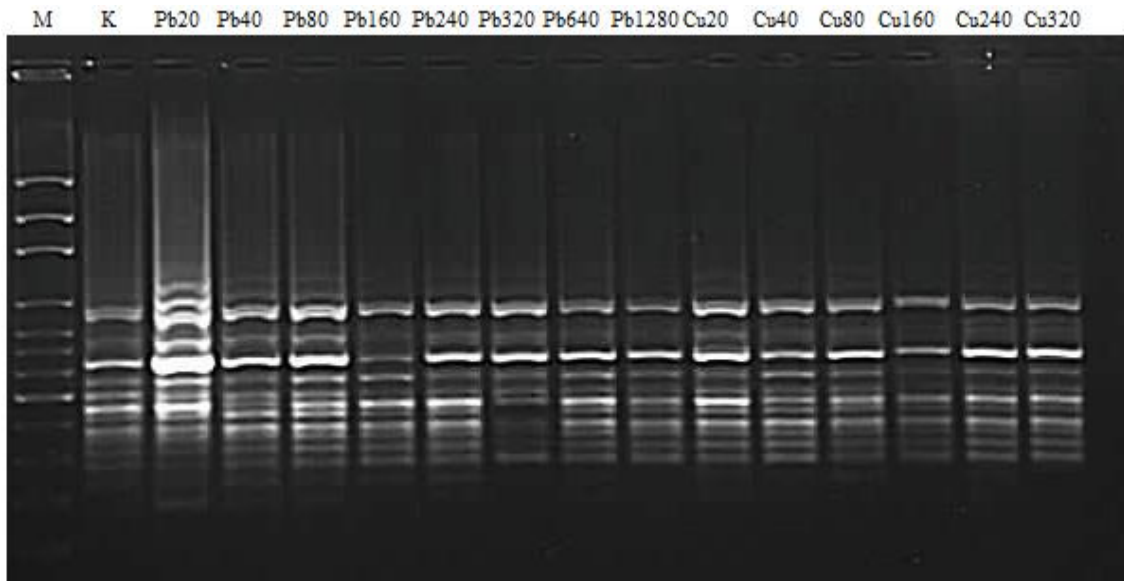


Şekil 4.10. OP C06 primeriyle yapılan PCR'a ait jel görüntüsü.

Şekil 4.11 ve 4.12’de enginar örneklerinin DNA’ları ile yapılan RAPD PCR sonucu, OP C07 ve OP C08 primerleri ile elde edilen PCR ürünlerine ait elektroforez sonuçları görülmektedir.

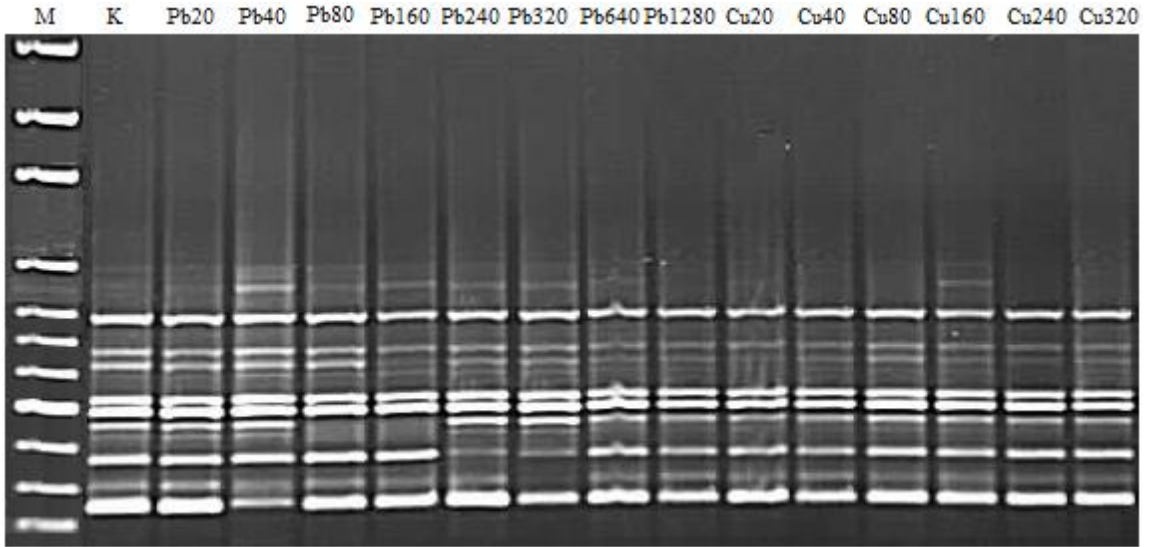


Şekil 4.11. OP C07 primeriyle yapılan PCR’a ait jel görüntüsü.

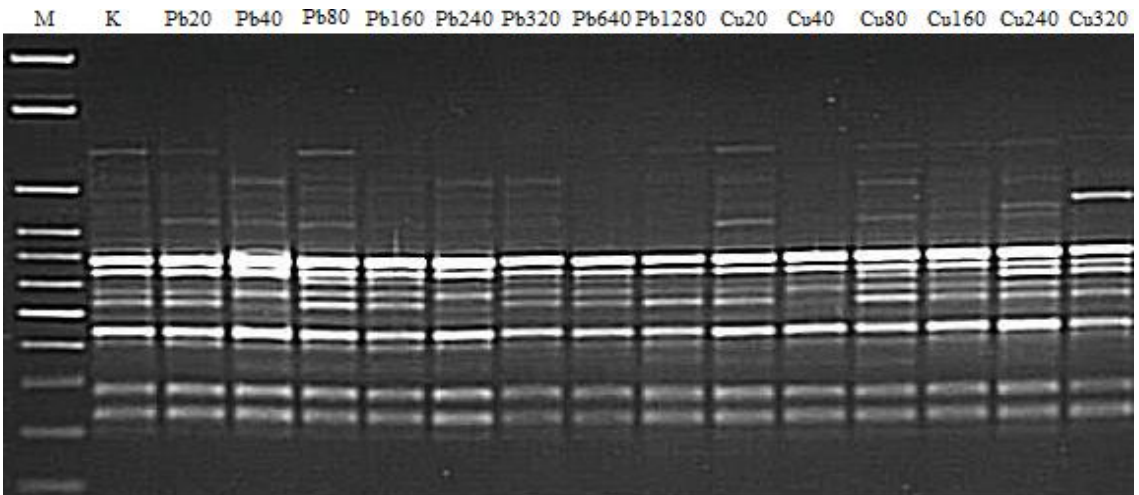


Şekil 4.12. OPC 08 primeriyle yapılan PCR’a ait jel görüntüsü.

Şekil 4.13 ve 4.14’de enginar örneklerinin DNA’ları ile yapılan RAPD PCR sonucu, OP C09 ve OP C010 primerleri ile elde edilen PCR ürünlerine ait elektroforez sonuçları görülmektedir.

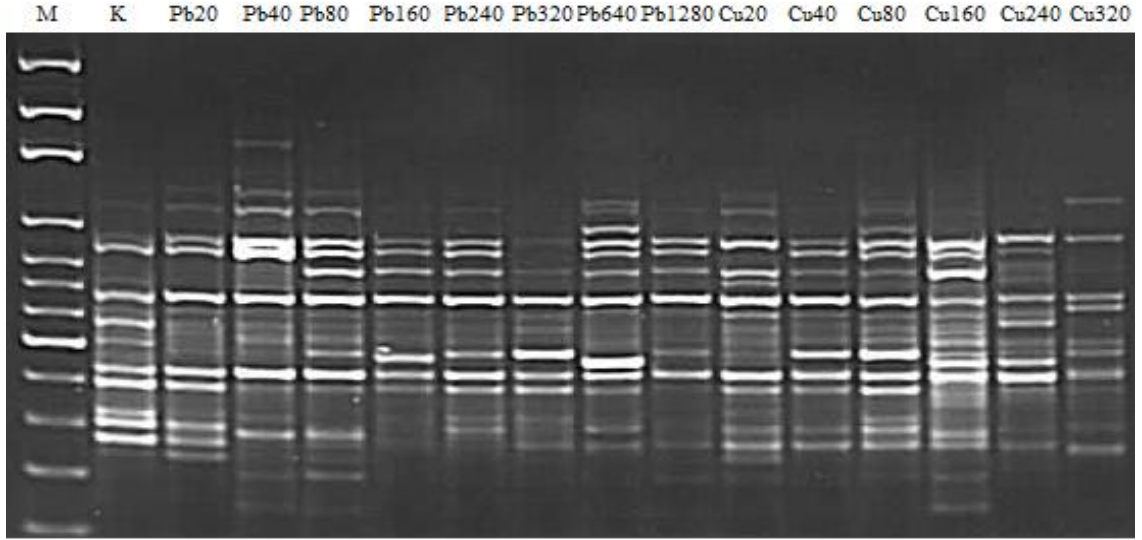


Şekil 4.13. OPC 09 primeriyle yapılan PCR’a ait jel görüntüsü.

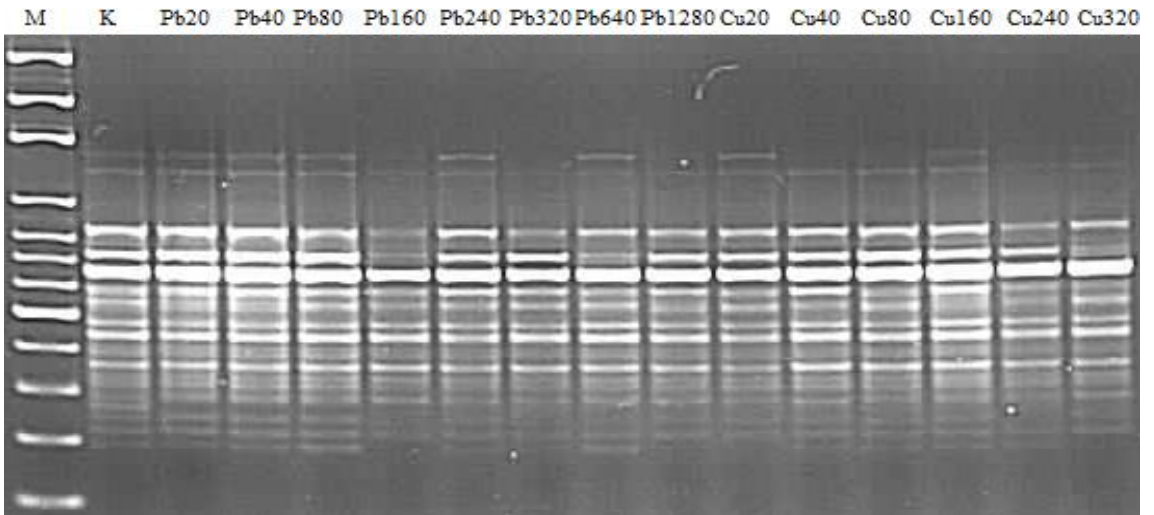


Şekil 4.14. OP C10 primeriyle yapılan PCR’a ait jel görüntüsü.

Şekil 4.15 ve 4.16'de enginar örneklerinin DNA'ları ile yapılan RAPD PCR sonucu, OP C11 ve OP C12 primerleri ile elde edilen PCR ürünlerine ait elektroforez sonuçları görülmektedir.

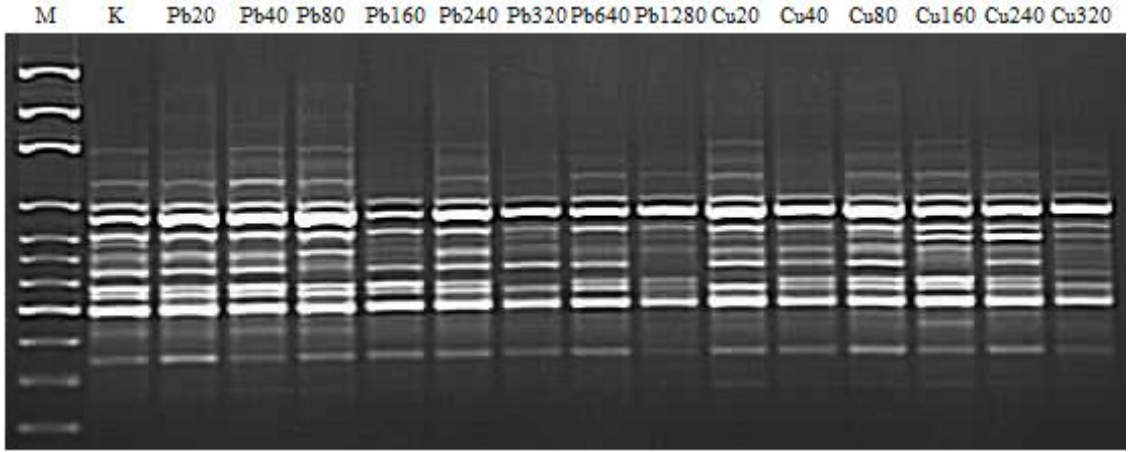


Şekil 4.15. OP C11 primeriyle yapılan PCR'a ait jel görüntüsü.

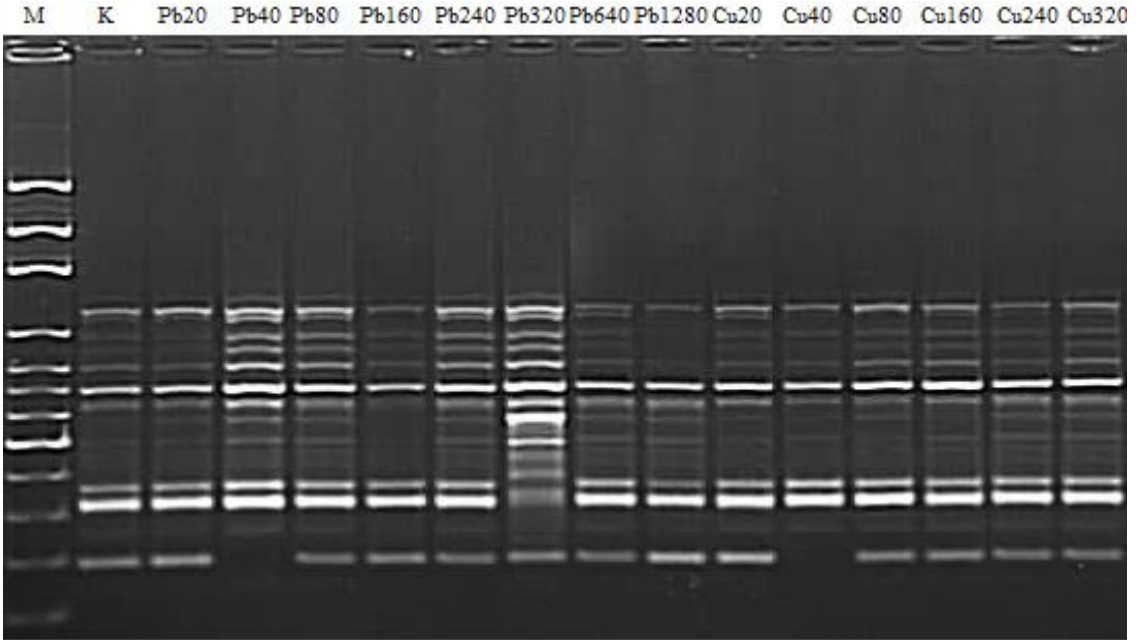


Şekil 4.16. OP C12 primeriyle yapılan PCR'a ait jel görüntüsü.

Şekil 4.17 ve 4.18’de enginar örneklerinin DNA’ları ile yapılan RAPD PCR sonucu, OP C13 ve OP C14 primerleri ile elde edilen PCR ürünlerine ait elektroforez sonuçları görülmektedir.

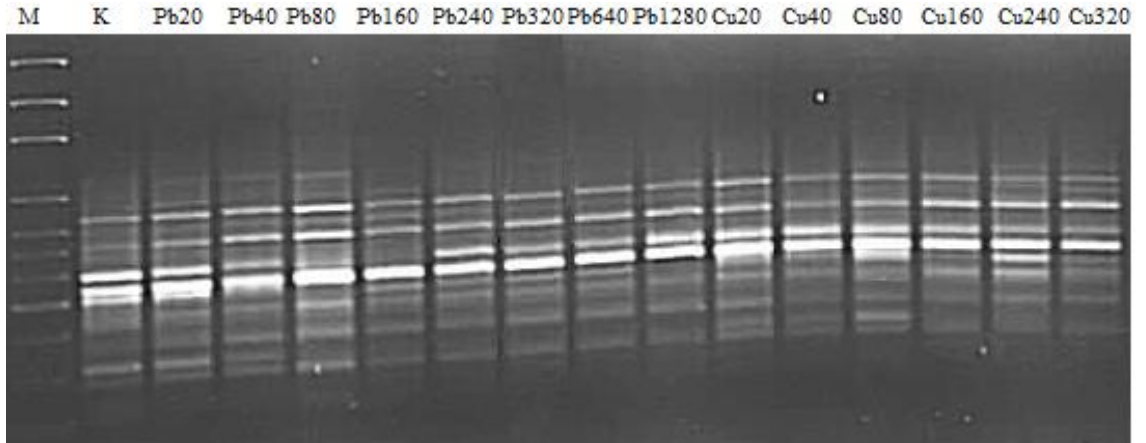


Şekil 4.17. OP C13 primeriyle yapılan PCR’a ait jel görüntüsü.

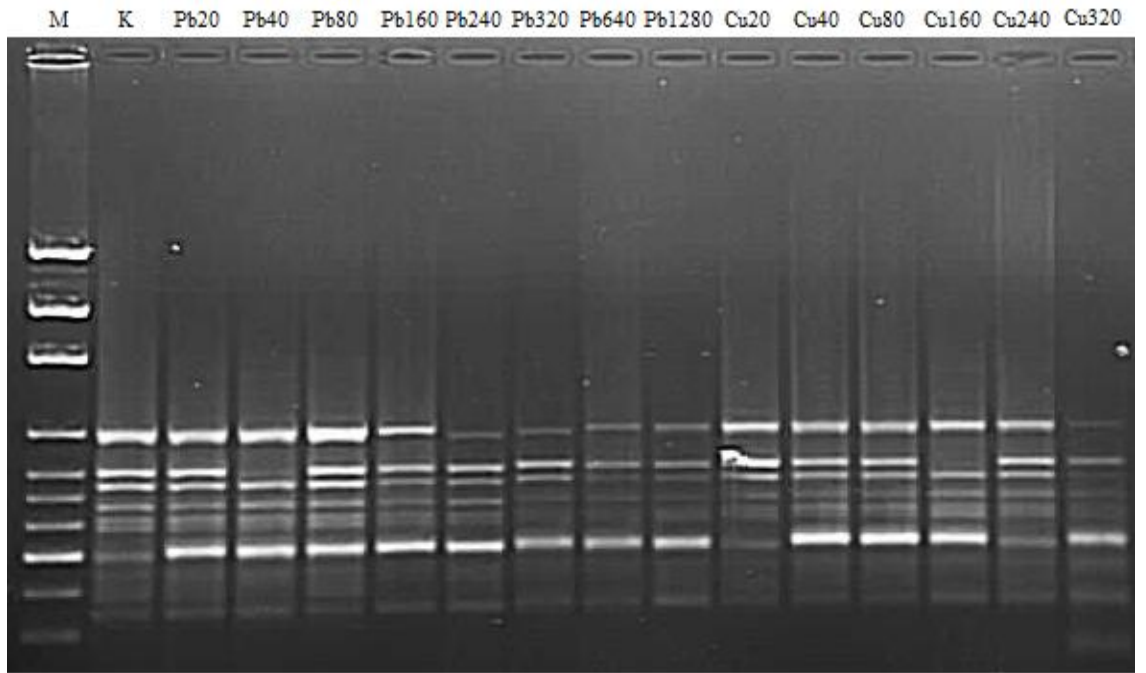


Şekil 4.18. OP C14 primeriyle yapılan PCR’a ait jel görüntüsü.

Şekil 4.19 ve 4.20’de enginar örneklerinin DNA’ları ile yapılan RAPD PCR sonucu, OP C15 ve OP C16 primerleri ile elde edilen PCR ürünlerine ait elektroforez sonuçları görülmektedir.

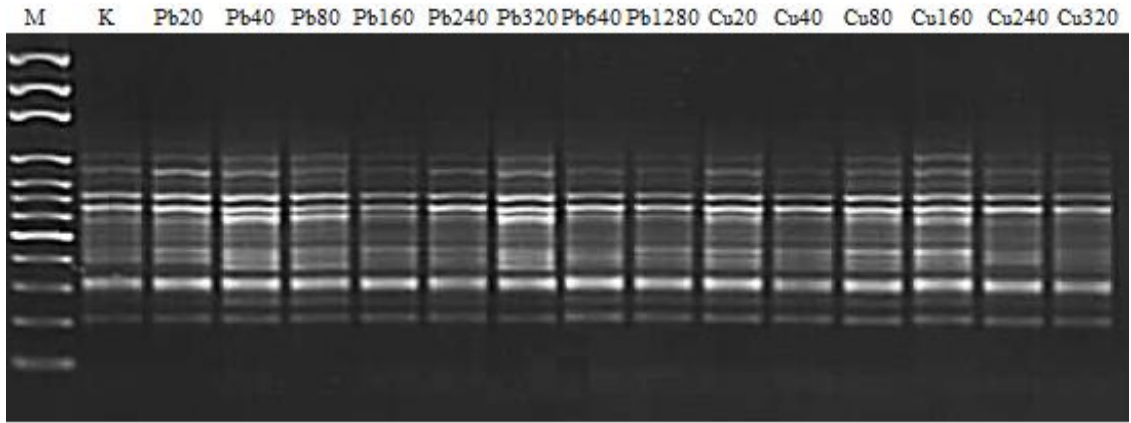


Şekil 4.19. OP C15 primeriyle yapılan PCR’a ait jel görüntüsü.

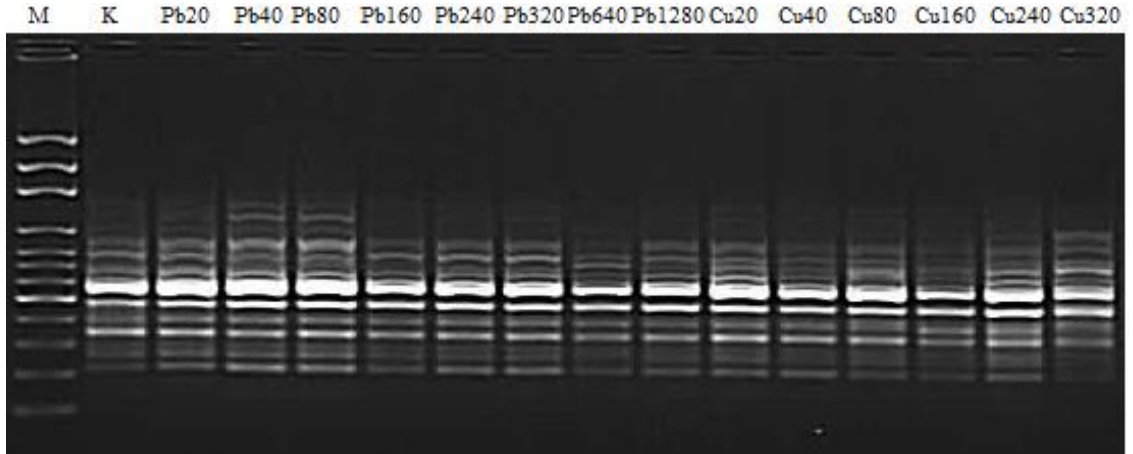


Şekil 4.20. OP C16 primeriyle yapılan PCR’a ait jel görüntüsü.

Şekil 4.21 ve 4.22’de enginar örneklerinin DNA’ları ile yapılan RAPD PCR sonucu, OP C18 ve OP C19 primerleri ile elde edilen PCR ürünlerine ait elektroforez sonuçları görülmektedir.

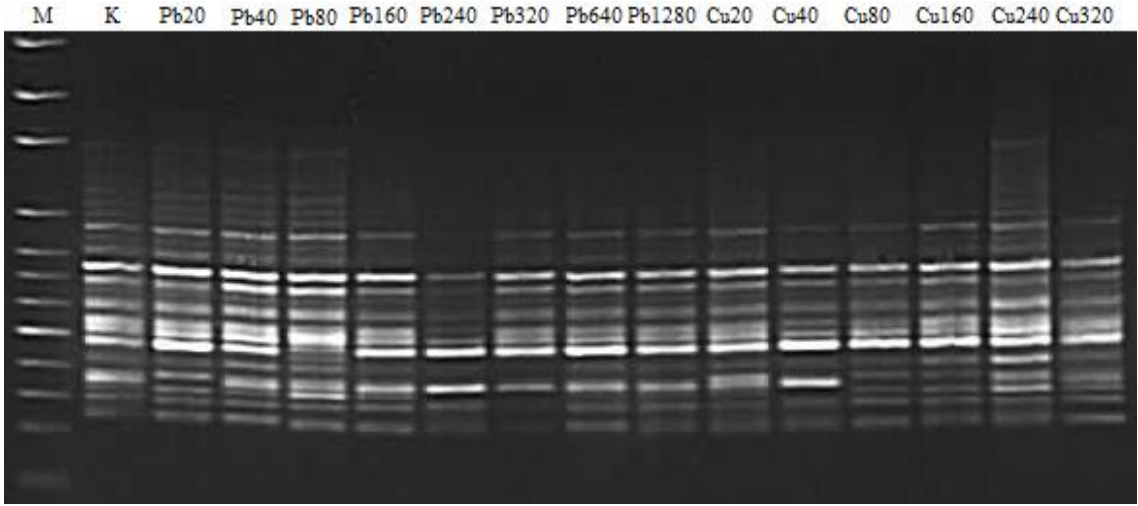


Şekil 4.21. OP C18 primeriyle yapılan PCR’a ait jel görüntüsü.



Şekil 4.22. OP C19 primeriyle yapılan PCR’a ait jel görüntüsü.

Şekil 4.23’de enginar örneklerinin DNA’ları ile yapılan RAPD PCR sonucu, OP C20 primeri ile elde edilen PCR ürünlerine ait elektroforez sonuçları görülmektedir.



Şekil 4.23. OP C20 primeriyle yapılan PCR’a ait jel görüntüsü.

5. TARTIŞMA SONUÇ VE ÖNERİLER

Toprak ve sudaki ağır metal kirliliği endüstrileşmiş ülkelerdeki en önemli çevresel sorunlardan biridir. Deri, boya, gübre, dokuma, çimento ve kimya sanayisi gibi çeşitli endüstriyel kuruluşlardan kadmiyum, kurşun, bakır, civa, krom gibi çeşitli ağır metal türleri toprak ve akuatik ortama bırakılmakta ve çevre kirliliğine neden olmaktadır (Nriagu and Pacyna, 1988; Boyer, 1984). Ağır metallerin büyük bir kısmı buldukları ortamda biyodegradasyona uğramadıklarından kolaylıkla birikebilmekte ve çok kompleks yapılar oluşturarak canlılar üzerindeki toksik etkilerini arttırabilmektedirler (Kabat and Pendias, 1984).

Yüksek yapılı bitkiler doğadaki değişimlere karşı uyum sağlayabilecek gelişmiş özelliklerle donatılmış olup, bunlardan biri de metalin köklerde tutulmasıdır (Fernandes and Henriques, 1991). Bitkilerde metallerin köklerde tutulup biriktirilmesi gövde ve yaprak gelişimine oranla kök bölgesinde ve tohum çimlenmesi üzerinde daha fazla negatif etki göstermektedir. Zengin ve Munzuroğlu (2004), kurşun (Pb) ve bakır (Cu) çözeltilerinin artan konsantrasyonlarına maruz bıraktıkları fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) fidelerinde gövde ve yaprak gelişiminin negatif yönde etkilendiğini fakat en fazla etkinin fidelerin kök bölgesinde olduğunu belirtmişlerdir. Soudek, et al. (2010), kurşun (Pb), nikel (Ni), bakır (Cu), çinko (Zn), kadmiyum (Cd), kobalt (Co), arsenik (As) ve krom (Cr) ağır metallerinin farklı konsantrasyonlarını keten (*Linum usitatissimum* L.) tohumlarına uygulamışlar ve ağır metal stresinin çimlenen tohum sayısında ve fidelerin kök gelişiminde azalmaya neden olduğunu belirtmişlerdir. Bitkilerde ağır metal stresinin kök uzunluğu üzerindeki negatif etkisi, kök bölgesindeki hücrelerin bölünmesinin veya hücre döngüsünün uzamasından kaynaklanabilmektedir (Soudek, et al., 2010). Ayrıca, oksidatif hasar sonucu hücrelerin membran yapısının bozulması dolayısıyla kök yüzeyini oluşturan epidermal hücrelerin zarar görmesi kök gelişimini negatif yönde etkiler (Yamamoto, et al., 1997; Souza-Santos, et al., 2001).

Bu çalışmada literatür verilerini destekler şekilde, kurşun ve bakır konsantrasyonunun artışıyla paralel olarak enginar fidelerinin kök uzunluklarında düşüş

tespit edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda kurşun metal stresine maruz bırakılan enginar fidelerinin kök uzunluklarında, kontrole göre % 0,9-47 düşüş gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 4.2). Yine, farklı konsantrasyonlarda bakır metal stresine maruz bırakılan enginar fidelerinin kök uzunluklarında ise kontrole göre % 1,2-80 düşüş gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil 4.2). Kontrol fidelerine göre istatistiki anlamlılık bakımından farklılık enginar fidelerinde hem kurşun hem de bakır için 20 ppm'den sonra gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). Enginar fidelerinde 20 ppm'den sonra kurşun ve bakırın artan konsantrasyonuna bağlı olarak kök uzunluklarında kademeli bir düşüş gözlemlenmiştir ($p < 0,05$). 160 ppm konsantrasyonda kurşun ve bakır enginar fidelerinin kök uzunluklarında benzer negatif etkiyi göstermiştir ($p < 0,05$). Fakat 160 ppm konsantrasyondan sonra bakır fidelerin kök uzunluğu üzerinde kurşuna göre daha fazla negatif etkiye neden olmuştur. Kurşunun 1280 ppm konsantrasyonu ile bakırın 240 ppm konsantrasyonu enginar fidelerinde benzer negatif etkiyi göstermiştir ($p < 0,05$). Ağır metal toksisitesi tohumlarda alfa ve beta amilaz aktivitesini azaltarak embriyo ekseninin gelişimi için gerekli olan şekerlerin aktarımını engeller ve tohum çimlenmesini inhibe eder (Yıldız vd., 2011). Kurşunun tüm konsantrasyonlarında enginar tohumları çimlenme gösterirken, bakırın 640 ve 1280 ppm konsantrasyonlarında enginar tohumlarında çimlenme gözlemlenmemiştir. Ayrıca; kurşunun 320, 640, 1280 ve bakırın 240, 320 ppm konsantrasyonunun uygulandığı enginar fidelerinin köklerinde kahverengileşmeler gözlemlenmiştir. Kahverengileşme, ağır metal stresine bağlı olarak kök yüzeyinde suberin miktarının artmasıyla meydana gelmektedir (Mohanpuria, et al., 2007; Steudle, 2000). Suberin hidrofobik özelliğinden dolayı bitkilerde su alımını sınırlandırmakta ve bitki gelişimini azaltmaktadır (Steudle, 2000).

Kök uzunluğunda gözlemlendiği gibi artan metal konsantrasyonuna bağlı olarak tüm enginar fidelerinin köklerine ait toplam çözünür protein miktarı da azalmıştır. Artan kurşun ve kadmiyum konsantrasyonunun fasulye bitkisinde (Bhardwaj, et al., 2009) ve bakırın domates bitkisi çeşitlerinde (Mazhoudi et al. 1997) toplam çözünür protein miktarında azalmaya neden olduğu belirtilmiştir. Literatür verileri ile benzer şekilde örneklere ait köklerden elde edilen toplam çözünür protein miktarı ile artan metal konsantrasyonu arasında ters yönde bir ilişki saptanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda

kurşun metal stresine maruz bırakılan enginar fidelerinde toplam çözümlenebilir protein miktarı % 0,9-23, bakır stresine maruz bırakılan enginar fidelerinde toplam çözümlenebilir protein miktarı ise % 1,2-35 düşüş göstermiştir (Bkz. Şekil 4.4). Enginar fidelerinin toplam çözümlenebilir protein miktarında hem kurşunun hem de bakırın 20 ppm konsantrasyonuna kadar kontrole göre istatistiksel bir farklılık gözlemlenmemiştir ($p<0,01$).

Bitkilerde ağır metal toksisitesi nükleik asit biyosentezi (Doncheva, et al., 1996) ve DNA yapısının bozulması (Cadet, et al., 2012) gibi çeşitli gelişme işlevlerinde hasarlara neden olmaktadır. Günümüzde, moleküler biyolojide meydana gelen dikkate değer ilerlemeler ve gelişmeler, DNA üzerinde meydana gelen hasarların tespitini mümkün kılmıştır (Menke, et al., 2001). Moleküler biyolojideki bu gelişmelerden biri olan belirteç sistemleri içinde yer alan RAPD ve AFLP gibi parmak izi tarama yöntemleri, ağır metal stresi gibi çevresel etkilerin DNA üzerinde meydana getirdiği değişimlerin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Mengoni, et al., 2000; Muller, et al., 2004). Bu düşüncelerden yola çıkarak tez kapsamında, farklı kurşun ve bakır konsantrasyonlarının enginar fideleri üzerindeki etkisi moleküler parametrelerden biri olan RAPD ile incelenmiştir. RAPD profili birçok canlıda genotoksitenin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Aydın vd., 2012). DNA hasarının tespitinde RAPD belirteçlerinin kullanılmasının pek çok avantajı vardır; radyoaktif değildir, az miktarda DNA yeterlidir, aynı anda birçok örnekle çalışmak mümkündür ve hızlı bir tekniktir.

Birçok çalışmada RAPD belirteçleri kullanılarak farklı bitki ve organizmalarda çeşitli genotoksik ajanların etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmaların bir kısmında genotoksik ajanlar laboratuvar koşullarında kontrollü olarak uygulanmış, bir kısmında genotoksik ajanlara doğal yaşam alanlarında maruz kalan bitki ve organizmalar incelenmiştir. Liu, et al. (2005), kadmiyumun farklı konsantrasyonlarını arpa (*Hordeum vulgare* L.) fidelerine uygulamışlar ve RAPD yönteminin kadmiyumun (Cd) genotoksik etkisinin bitkide belirlenmesi için uygun bir biomarker olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, artan kadmiyum konsantrasyonuna bağlı olarak fidelerin RAPD profillerinde polimorfizm oranının arttığını göstermişlerdir. Cenkci, vd. (2009), fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) bitkilerine civa (Hg), bor (B), krom (Cr) ve çinko (Zn) ağır metallerinin

farklı konsantrasyonlarını uygulamışlardır. Araştırmacılar; bitkilerden aldıkları kök ile yaprak örneklerinden elde ettikleri DNA örneklerini RAPD analiziyle incelemişlerdir. Analiz sonucunda kontrol grubuna göre ağır metal uygulanan bitkilerin RAPD profillerinde farklı bant paterni ve artan polimorfizm oranı tespit etmişlerdir. Cansaran, vd. (2011), *Evernia prunastri* L. Ach. liken türü üzerinde hava ve ağır metal kirliliğinin etkilerini kullanmış oldukları RAPD yönteminde DNA bant varyasyonlarının tanımlanması aracılığıyla belirlemişlerdir. Bunun sonucunda, likenlerde ağır metal birikimi ile DNA polimorfizm oranının ilişkili olduğunu saptamışlar ve RAPD yönteminin çevresel toksisite değerinin belirlenmesi için etkili bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Conte, et al. (1998), *Arabidopsis thaliana* L. bitkisini artan konsantrasyonlarda kadmiyum (Cd), kurşun (Pb) ve mangan (Mn) gibi ağır metallerin stresine maruz bırakmışlardır. Sonuç olarak, yüksek konsantrasyonlu çözeltilere maruz kalan örneklerin kontrol örneklerine göre RAPD profillerinin değiştiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar; artan ağır metal konsantrasyonunun bitkilerde genotoksik ve mutasyonel etkisine bağlı olarak RAPD profilinin değiştiğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde bu çalışmada, enginar fidelerine artan konsantrasyonlarda ki kurşun ve bakır çözeltilerinin uygulanması örneklere ait RAPD bant profillerinde polimorfizme yol açmıştır. Farklı konsantrasyonlarda kurşun metal stresine maruz bırakılan örneklerde polimorfizm oranları % 2-9,2, bakır stresine maruz bırakılan örneklerde ise polimorfizm oranı % 4,3-12,5 olarak tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.5). Tüm metal stres şartları içinde en fazla polimorfizm % 12,5 ile 320 ppm bakıra maruz kalmış örneklerde görülmüştür (Bkz. Şekil 4.5). GKS'ler karşılaştırıldığında, enginar örneklerinde bakır stresinin daha düşük ppm konsantrasyonları yüksek ppm konsantrasyonlarında ki kurşun stresine benzer negatif etkiyi göstermiştir. Örneklerin GKS oranları için, bakırın 80 ppm konsantrasyonu ile kurşunun 240 ppm konsantrasyonu benzer GKS oranı göstermiştir. Kurşun ve bakır metal stresi uygulanan örneklere ait RAPD profillerinde bulunan bant paternlerindeki farklılıklar en fazla OP C11 primerinde görülmüştür (Bkz. Çizelge 4.1; Şekil 4.15). RAPD profillerinde meydana gelen bant modifikasyonları yani var olan bant kaybı ve/veya yeni bant oluşumu bir ya da daha fazla durumların bir araya gelmesinden kaynaklanabilir. Bu durumlar aşağıda sırası ile verilmiştir.

1. Ağır metal stresine bağlı olarak fidelerde oksidatif DNA hasarı sonucu primerlerin kalıp DNA üzerindeki bağlanma bölgelerinde meydana gelebilecek değişimler sonucu eski bağlanma bölgeleri yok olabilir. Ayrıca, daha büyük ya da küçük bir amplifiye ürün verecek yeni bir bağlanma bölgesi oluşabilir.
2. Oksidatif DNA hasarı sonucu tek ya da çift iplik kırıklarına bağlı olarak primer bağlanma bölgeleri yok olabilir ve bant kaybı yaşanabilir.
3. Hücre içi artan metal yoğunluğu; nükleik asitlerin metal iyonları ile reaksiyonu oligomer veya monomerlerin bozulmasına ve yanlış baz eşleşmeleri gibi etkilere neden olarak bant kayıplarına neden olabilir.

Bakır, hem esansiyel hem de toksik bir elementtir. Yüksek dozlarda iz element olmayan kadmiyuma göre daha toksiktir (Ralph and Burchett, 1998; Mediouni, et al., 2006). Bu durum, bakırın iz element olmasından dolayı reaktif oksijen türlerin oluşumuna (süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^*) direk etki etmesiyle açıklanmaktadır. Bakır ve demir geçiş metalleri hücrelerde oksidoredüksiyon reaksiyonlarında görev aldığından reaktif oksijen türlerinin oluşumlarını hızlandıran katalizör vazifesi görmektedirler. Bu çalışmalarda olduğu gibi, araştırmamızda da enginar fidelerini negatif yönde en fazla etkileyen metal türü bakır olmuştur. Bu nedenle, kök uzunluğuna, toplam çözünür protein miktarı ve genomik kalıp stabilitesine en fazla negatif etki bakır çözeltilerinin uygulandığı gruplarda görülmüştür.

Ağır metallerle kontamine olmuş alanların fitoremediasyonu için uygun tür veya çeşitlerin geliştirilmesinde metal toleransı ile ilgili moleküler mekanizmaların ve genetik temellerin aydınlatılmasının önemli olduğu vurgulanmıştır (Cobbet, 2000; Rascio and Navari-Izzo, 2011). Bu temellerin aydınlatılmasında şüphesiz ilk olarak ağır metal stresinin farklı bitki türleri üzerinde oluşturdukları genotoksisite düzeylerinin saptanması yatmaktadır. Stres faktörlerinin tolerans düzeylerinin genomik düzeyde

saptanması gelecekte yapılacak olan biyoteknolojik çalışmalar açısından önemlidir (Aydın vd., 2012).

Sonuç olarak, gerçekleştirilen bu çalışmada kurşun ve bakırın Asteraceae familyasına dahil olan enginar bitkisinin fideleri üzerinde strese neden olduğu ve oluşan genotoksisite sonucunda bitkilerin kök uzunluğunda ve toplam çözünür protein miktarında düşüş meydana geldiği gözlenmiştir. Enginar fidelerine ait RAPD profillerindeki bant modifikasyonlarının, kurşun ve bakır stresinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Metal stresi sonucu enginar fidelerine ait kök uzunluğu ve toplam çözünür protein miktar parametrelerine ait düşüş ile GKS'ye ait değişimlerin birbirleri ile orantılı olduğu ve GKS verilerinin düşük konsantrasyonlarda ki metal kirliliğine karşı daha hassas olduğu bulunmuştur. Bu durum, çalışmada seçilen, özellikle OP C11, RAPD primerlerinin genotoksik değerlendirmede uygun kullanıma sahip primerler olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, literatür verilerinde yer alan buğday, salatalık, fasulye, sarımsak ve arpa türleri ile karşılaştırıldığında çalışma için seçilen enginar bitkisinin diğer yüksek yapılı bitki türlerine göre ağır metal stresine karşı daha hassas olduğu görülmektedir (Liu, et al., 2005; Meng, et al., 2007; Munzuroğlu ve Geckil, 2002; Zengin ve Munzuroğlu, 2004). Bu da enginar bitkisini ortamdaki ağır metal kirliliğinin ölçülmesi için uygun bir biyoindikatör tür yapmaktadır.

Bu çalışmada, fiziksel, biyokimyasal ve moleküler biomarkerların birlikte kullanılabilirliği gösterilmiştir. Ağır metal etkisinin bitkiler üzerinde meydana getirdiği genotoksik hasarın belirlenmesinde RAPD yöntemi güçlü metodlardan biridir. Bu sayede, RAPD yöntemi ile enginar fidelerinde kurşun (Pb) ve bakırın (Cu) genotoksik etkisi hassas bir şekilde incelenebilmiştir. Aynı zamanda, çalışma için seçilen enginar türü uygun bir biyoindikatör tür olarak tespit edilmiştir. Ağır metallere maruz kalan farklı bitkilere ait genomik çalışmalara az rastlanılmaktadır.

Gelecekte yapılacak olan farklı araştırmalarda, ağır metal uzaklaştırması ve toleransı mekanizmalarının aydınlatılmasında, hiperakümülatör bitki, fitoremediasyon ve metal stres toleranslı bitkilerin belirlenmesi kapsamında genomik çalışmaların yapılması önemli veriler sağlayacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alloway, B. J., 1990, Heavy Metal in soils Blackie Glasgow UK, 368 p.
- Anastassopoulou, J., 2003, Metal–DNA interactions, Journal of Molecular Structure, 651, 653, 19–26.
- Aras, S., Kanlıtepe, Ç., Cansaran, D., Halıcı, M.G., Beyaztaş, T., 2010, Assessment of air pollution genotoxicity by molecular markers in the exposed samples of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. in the Province of Kayseri (Central Anatolia), Journal of Environmental Monitoring, 12, 536-543.
- Arora, A., Sairam, R. K. and Srivastava, G. C., 2002, Oxidative stress and antioxidative system in plants, Current Science, 82, 10, 1227-1238.
- Aydın, S. S., Gökçe, E., Büyük, İ., Aras, S., 2012, Characterization of copper and zinc induced stress on cucumber (*Cucumis sativus* L.) by molecular and population parameters, Mutation Research, 746, 1, 49-55.
- Banfalvi, G., 2011, Cellular Effects of Heavy Metals, Springer, 348 p.
- Baron, M., Arellano, J.B. and Gerge, L., 1995, Copper and photosystem II: a controversial relationship, Physiologia Plantarum, 94, 174-180.
- Bayraktar, K., 1981, Sebze Yetiştirme, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 3, 169-172.
- Bera, A. K., BERA, A. and Roy, S. B., 2005, Impact of heavy metal pollution in plants, development in physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plants, 1, 105-124.
- Beyaztaş, T., 2008, Karabük civarında bulunan *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. var. *furfuracea* liken türünde ağır metal kirliliğinin atomik absorpsiyon spektroskopisi ve RAPD analizi ile incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 64 s. (yayımlanmış).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Bhardwaj, P., Chaturvedi, A. K. and Prasad, P., 2009, Effect of enhanced lead and cadmium in soil on physiological and biochemical attributes of *Phaseolus vulgaris* L., *Nature and Science*, 7, 8, 63-75.
- Boyer, H.A., 1984, Trace elements in the water, sediments, and fish of the Upper Mississippi River, Twin Cities metropolitan area in Wiener, Boston, Butterworth Publishers, 11, 195-230.
- Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 254-284.
- Braz, J., 2005, Copper in plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 145-146.
- Cadet, J., Loft, S., Olinski, R., Evans, M. D., Bialkowski, K., Wagner, J. R., Dedon, P. C., Møller, P., Greenberg, M. M., Cooke, M. S., 2012, Biologically relevant oxidants and terminology, classification and nomenclature of oxidatively generated damage to nucleobases and 2-deoxyribose in nucleic acids, *Free Radical Research*, 46, 4, 367-381.
- Caetano-Anolles, D., Bassam, B. J. and Gresshoff, P. M., 1991, DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers, *Biotechnology*, 9, 553-557.
- Candan, F., 2013, Some observations on plant karyology and investigation methods, *Current Progress in Biological Research*, 394 p.
- Cansaran, D. D., Beyaztaş, T., Atakol, O., Aras, S., 2011, assesment of the air pollution genotoxicity by RAPD in *Evernia prunastri* (L.) Ach. province of iron-steel factory in Karabük, Turkey, *Journal of Environmental Sciences*, 23, 7, 1171-1178.
- Cenkci, S., Yıldız, M., Ciğerci, I.H., Konuk, M., Bozdağ, A., 2009, Toxic chemicals-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings, *Chemosphere*, 76, 900-906.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Chatgialiloglu, C, Ferreri, C, Terzidis, M. A., 2011, Purine 5', 8-cyclonucleoside lesions: chemistry and biology, *Chem. Soc. Rev.*, 40, 1368–1382.
- Cobbett, C.S., 2000, Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification, *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 211-216.
- Conte, C., Muti, I., Puglisi, P., Ferrarini, A., Regina, G.R.G., Maestri, E., Marmioli, N., 1998, DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution, *Chemosphere*, 37, 2739-2749.
- Dean, J. G., Bosqui, F. L. and Lanouette, V. H., 1972, Removing heavy metals from waste water: *Environmental Science and Technology*, 6, 518-522.
- Dedon, P. C., 2008, The chemical toxicology of 2-deoxyribose oxidation in DNA, *Chem. Res. Toxicol.*, 21, 206–219.
- Devos, K. M. and Gale, M. D., 1992, The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat, *Theor. Appl. Genetics*, 84, 567-572.
- Doncheva, S., Nikolov, B. and Ogneva, V., 1996, Effect of excess copper on the morphology of the nucleus in maize root meristem cells, *Physiologia Plantarum*, 96, 1, 118-122.
- Duffus, J. H., 2002, Heavy metals a meaningless term, *Pure Appl. Chem.*, 74, 5, 793-807.
- Eichhorn, G. L., 1981, *Advances in inorganic biochemistry*, Elsevier, 3, 2.
- Eichhorn, G. L., Butzow, J. J., Shin, Y. A., 1985, Some effects of metal ions on DNA structure and genetic information transfer, *Suppl. J. Biosci.*, 8, 3, 4, 527-535.
- Ekbiç, I. E., 2005, Sakız Enginar Çeşidinde Meydana Gelen Dönüşüm Üzerine Araştırmalar, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Fenton, H. J. H., 1894, Oxidation of tartaric acid in presence of iron, J. Chem. Soc., 65, 65, 899–911.

Fernandes, J.C. and Henriques, F.S., 1991, Biochemical, physiological and structural effect off excess copper in plants, The Botanical Review, 57, 246-273.

Forstner, U., 1984, Changing metal cycles and human health, Springer Verlag, Berlin, 71-94.

Foury, C., 1967, Study of floral biology of artichoke *Cynara scolymus* L. with application of selection, Part I, Ann. Amelior. Plantes, 17, 357-373.

Gill, S. S. and Tuteja, N., 2010, Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, Plant Physiology and Biochemistry, 48, 12, 909-930.

Haber, F. and Weiss, J., 1934, Haber-Weiss reaction, Proc. R. Soc. London A 147, 332-351.

Hernandez-Jimenez, M. J., Lucas, M. M. and de Felipe, M. R., 2002, Antioxidant defence and damage in senescing lupin nodules, Plant Physiol. Biochem., 40, 645–657.

<http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/pollutants.cfm>

Kabat, P. A. and Pendias, H., 1984, Changing metal cycles and human health Nnagu, JO (ed), Springer, Verling Berlin.

Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., 2004, Metallerin çevresel etkileri-I, Metalurji Dergisi, 136, 47-53.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Keller, C. and Hammer, D., 2004, Metal availability and soil toxicity after repeated croppings of *Thlapsi caerulescens* in metal contaminated soils, *Environmental Pollution*, 131, 243-254.
- Koçer, G., 1993, Sakız enginar çeşidinde (*Cynara scolymus* L. cv. Sakız) verim dağılımına bitki yaşı, uyandırma sulaması veriliş zamanı ve gibberillik asit uygulamalarının etkilerinin belirlenmesi üzerinde bir araştırma, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, 226 s.
- Körpe, D. A. ve Aras, S., 2011, Evaluation of copper-induced stress on eggplant (*Solanum melongena* L.) seedlings at the molecular and population levels by use of various biomarkers, *Mutat. Res.*, 719, 29-34.
- Kuraoka, I., Robins, P., Masutani, C., Hanaoka, F., Gasparutto, D., Cadet, J., Wood, R. D. and Lindahl T., 2001, Oxygen free radical damage to DNA, *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 52, 28, 49283–49288.
- Liu, W., Li, P., Qi, X.M., Zhou, Q., Zheng, L., Sun, T., Yang, Y., 2005, DNA changes in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis, *Chemosphere*, 61, 158-167.
- Malyshev, S. V. and Kartel, N. A., 1997, Molecular markers in mapping plant genomes, *Molecular Biology*, 31, 2, 163-171.
- Marschner, H., 1995, Mineral nutrition of higher plants, Academic Press, 899 p.
- Mazhoudi, S., Chaoui, A., Habil Ghorbal, M. and El Ferjani, E., 1997, Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.), *Plant Science*, 127, 2, 129-137.
- Meharg, A. A., 1994, Integrated tolerance mechanisms constitutive and adaptive plant responses to elevated metal concentrations in the environment, *Plant Cell Environ.*, 17, 989-993.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Meng, Q.M., Zou, J., Zou, J.H., Jiang, W.S., Liu, D.H., 2007, Effect of Cu²⁺ concentration on growth, antioxidant enzyme activity and malondialdehyde content in Garlic (*Allium sativum* L.), Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica, 49, 95-101.
- Mengoni, A., Gonnelli, C., Galardi, F., Gabbrielli, R., Bazzicalupo, M., 2000, Genetic diversity and heavy metal tolerance in populations of *Silene paradoxa* L. (Caryophyllaceae): a random amplified polymorphic DNA analysis, Molecular Ecology, 9, 1319-1324.
- Menke, M., Chena, P., Angelis, K. J. and Schubert, I., 2001, DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* (L.) as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins, Mutation Research, 493, 87–93.
- Mohanpuria, P., Rana, N. K. and Yadav, S. K., 2007, Cadmium induced oxidative stress influence on glutathione metabolic genes of *Camellia sinensis* (L.), Environ. Toxicol., 22, 368-374.
- Mourato, M., Reis, R., and Martins, L. L., 2012, Characterization of Plant antioxidative system in response to abiotic stresses: A focus on heavy metal toxicity, Advances in Selected Plant Physiology Aspects, 542 p.
- Muller, L.A.H., Lambaerts, M., Vangronsued, J., Colpaert, J.V., 2004, AFLP-based assessment of the effects of environmental heavy metal pollution on the genetic structure of Pioneer populations of *Suillus luteus*, New Phytologist, 164, 297-303.
- Munzuroğlu, O., and Geckil, H., 2002, Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 43, 203-213.
- Müller, J., 2006, Metals line up for DNA, Nature, 444.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Nriagu, J.O. and Pacyna, J.M., 1988, Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals, *Nature*, 333, 134–139.
- Omran, R. G., 1980, Peroxide levels and the activities of catalase, peroxidase and indoleacetic acid oxidase during and after chilling cucumber seedlings, *Plant Physiology*, 65, 407-408.
- Ouariti, O., Boussama, N. and Zarrouk, M.i, 1997, Cadmium and copper induced changes in tomato membran lipids, *Photochemistry*, 45, 7, 1343-1350.
- Ouzounidou, G., Ilias, I., Tranopoulou, H. and Karataglis, S., 1998, Amelioration of copper toxicity by iron on spinach physiology, *Journal of Plant Nutrition*, 21, 2089-2101.
- Ralph, P.J. and Burchett, M.D. 1998. Photosynthetic response of *Halophila ovalis* to heavy metal stress. *Environmental Pollution*, 103; 91-101.
- Rascio, N. and Navari-Izzo, F., 2011, Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting?, *Plant Science*, 180, 169-181.
- Raven, J.A., Evans, M. C. W. and Korb, R. E., 1999, The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms, *Photosynth. Res.*, 60, 111-149.
- Robert, H. M., 1995, *Contaminants in the Upper Mississippi River*: Boston, Butterworth Publishers, 195-230.
- Robert J. B., 2011, *Genetics: analysis & principles - 4th ed.*, 868 p.
- Ryder, E. J., Devos, N. E. and Bari, M. A., 1983, The globe artichoke (*Cynara scolymus* L.), *HortScience*, Vol. 18, 5, 646-653.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Sharma, R. K., Agrawal, M., Marshall, F., 2007, Heavy metal contamination of soil and vegetables in suburban areas of Varansi, India, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66, 258–266.
- Soudek, P., Katrusakova, A., Sedlacek, L., Petrova, S., Koci, V., Marsik, P., Griga, M., Vanek, T., 2010, Effect of heavy metals on inhibition of root elongation in 23 cultivars of flax (*Linum usitatissimum* L.), *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 59, 194–203.
- Souza-Santos, P., Ramos, R.S., Ferreira, S.T., Carvalho-Alves, P.C., 2001, Iron-induced oxidative damage of corn root plasma membrane H⁺ATPase, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1512, 357-366.
- Sresty, T. V. S. and Rao, K. V. M., 1999, Ultrastructural alterations in response to zinc and nickel stress in the root cells of pigeonpea, *Environmental and Experimental Botany*, 41, 3–13.
- Steinkellner, H., Kassie, F. and Knasmuller, S., 1999, Tradescantia-micronucleus assay for the assessment of the clastogenicity of Austrian water, *Mutat. Res.*, 426, 113–116.
- Staub, J.E., Serquen, F.C. and Gupta, M. 1996, Genetic markers, map construction and their application in plant breeding, *Hortscience*, 31, 5, 729-741.
- Steudle, E., 2000, Water uptake by roots: effects of water deficit, *Journal of Experimental Botany*, 51, 350, 1531-1542.
- Qishlaqi, A., Moore, F., Forghani, G., 2008, Impact of untreated wastewater irrigation on soils and crops in Shiraz suburban area, SW Iran. *Environ. Monit. Assess.*, 141, 257-273
- Van Assche, F. and Clijsters, H., 1990, Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.*, 13, 195-206.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Vousta, D., Grimmanins, A., Sammara, C., 1996, Trace elements in vegetable grown in an industrial areas in relation to soil and air particulate matter, Environ. Pollut., 94, 3, 325–335.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Meyer, W., 1995, DNA fingerprinting in plants and fungi, CRC Press Inc., 322 p.
- Welsh, J., McClelland, M., 1990, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, Nucleic Acids Research, 18, 7213-7218.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V., 1990, DNA polimorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, Nucl. Acids Res., 18, 6531-6535.
- Ibrahim, Z. M., Ghazi, S. M., Nabawy, D.M., 2013, Alleviation of heavy metals toxicity in waste water used for plant irrigation, International Journal of Agronomy and Plant Production, 4, 5, 976-983.
- Zengin, F. K. ve Munzuroğlu, O., 2004, Effect of lead and copper (Cu) on the growth of root, shoot and leaf of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings, G.U. Journal of Science, 17, 1-10.
- Zhang, C. X., Appel, E. and Qiao, Q. Q., 2013, Heavy metal pollution in farmland irrigated with river water near a steel plant-magnetic and geochemical signature, Geophysical Journal International, 192, 3, 963-974.
- Yamamoto, Y., Hachiya, A., Matsumoto, H., 1997, Oxidative damage to membranes by a combination of aluminum and iron in suspension-cultured tobacco cells, Plant Cell Physiol., 38, 1333–1339.
- Yıldız, M., Terzi, H., Uruşak, B., 2011, Bitkilerde krom toksisitesi ve hücre sel cevaplar, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 27, 2, 163-176.