

ARPA (*HORDEUM VULGARE* L.) ÇEŞİTLERİNİN  
HEKZAVALENT KROM STRESİNE KARŞI  
TOLERANSININ BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Behiye URUŞAK

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Haziran 2011

Bu tez çalışması **10.FENED.14** numaralı proje ile Afyon Kocatepe Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ARPA (*HORDEUM VULGARE* L.) ÇEŞİTLERİNİN HEKZAVALENT KROM  
STRESİNE KARŞI TOLERANSININ BELİRLENMESİ

Behiye URUŞAK

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

Haziran 2011

## ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Mustafa YILDIZ danışmanlığında, Behiye URUŞAK tarafından hazırlanan “Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Çeşitlerinin Hekzavalent Krom Stresine Karşı Toleransının Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 15 / 06 /2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

	Unvanı, Adı, SOYADI	Üniversite	İmza
<b>Başkan</b>	Doç. Dr. Yasemin EKMEKÇİ	Hacettepe Üniversitesi	
<b>Jüri</b> (Danışman)	Doç. Dr. Mustafa YILDIZ	Afyon Kocatepe Üniversitesi	
<b>Jüri</b>	Doç. Dr. Süleyman CENKÇİ	Afyon Kocatepe Üniversitesi	

Afyon Kocatepe Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetin Kurulu'nun  
...../...../..... tarih ve  
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mevlüt DOĞAN  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ARPA (*HORDEUM VULGARE* L.) ÇEŞİTLERİNİN HEKZAVALENT KROM STRESİNE KARŞI TOLERANSININ BELİRLENMESİ

Behiye URUŞAK

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mustafa YILDIZ

Bu araştırmada, Türkiye’de ekimi yapılan bazı arpa (*Hordeum vulgare* L.) çeşitlerinin hekzavalent kroma [Cr(VI)] karşı toleransı erken fide evresinde hidroponik kültür ortamında incelenmiştir.

Bu araştırmanın ilk aşamasında, sekiz arpa çeşidinin (Angora, Avcı-2002, Aydanhanım, Başgül, Bülbül-89, Orza-96, Tarm-92, Zeynelağa) gövde ve kök büyümesi üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının (0, 75, 150 ve 225 µM) etkisi incelenmiştir. Cr(VI) konsantrasyonunun artışına bağlı olarak arpa çeşitlerinin gövde ve kök uzunlukları, taze ve kuru ağırlıkları genellikle önemli düzeyde azalmıştır. Arpa çeşitlerinin Cr(VI) toleransındaki farklılıkları belirlemek için gövde ve kök kuru ağırlığının bir fonksiyonu olarak tolerans indeksi (%) değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, krom stresine en toleranslı arpa çeşidi Zeynelağa, en hassas çeşit ise Orza-96 olarak belirlenmiştir.

Araştırmanın ikinci aşamasında, Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinde Cr birikimi, fotosentetik pigment içeriği, δ-aminolevülinik asit dehidrataz (ALAD) aktivitesi, prolin içeriği, malondialdehit (MDA) içeriği, bazı antioksidant enzimlerin [süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), guaiakol peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT)] aktivitesi ve total çözünebilir proteinlerin iki-yönlü (2-D) elektroforetik profilleri üzerine Cr(VI) stresinin etkisi belirlenmiştir.

- 1) Arpa çeşitlerinin gövde dokusuna göre kök dokusunda daha fazla Cr birikmiştir. Cr-hassas Orza-96 arpa çeşidine göre Cr-toleranslı Zeynelağa arpa çeşidinin gövde dokusundaki Cr birikimi nispeten daha fazla belirlenirken, zıt durum kök dokusunda belirlenmiştir.
- 2) Cr-toleranslı Zeynelağa arpa çeşidinin toplam klorofil (klorofil *a* + *b*) içeriği kontrole göre 75 µM Cr(VI) konsantrasyonunda önemli düzeyde artarken, 225 µM Cr(VI) konsantrasyonunda önemli düzeyde azalmıştır. Buna karşın, Cr-hassas Orza-96 arpa çeşidinin toplam klorofil içeriği Cr(VI) konsantrasyonunun artışına bağlı olarak önemli düzeyde azalmıştır. Zeynelağa arpa çeşidine göre Orza-96 arpa çeşidinin karotenoid içeriği Cr(VI) stresinden daha fazla etkilenmiştir. Cr(VI) stresi her iki arpa çeşidinde ALAD aktivitesini önemli düzeyde azaltmış olmasına rağmen, iki arpa çeşidinin ALAD aktiviteleri arasında belirgin bir farklılık belirlenmemiştir.
- 3) Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin yaprak dokusunda prolin ve MDA içerikleri Cr(VI) konsantrasyonunun artışı ile önemli düzeyde artmıştır. Bu etki, Zeynelağa arpa çeşidine göre Orza-96 arpa çeşidinde daha belirgin bulunmuştur.
- 4) Cr(VI) stresi, Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin yaprak dokularında SOD, APX, POD ve CAT antioksidant enzim aktivitelerinde artışa neden olmuştur. Kontrole göre 225 µM Cr(VI) konsantrasyonunda SOD aktivitesi Zeynelağa arpa çeşidinde 2 kat daha yüksek bulunurken, Orza-96 arpa çeşidinde 3 kat daha yüksek bulunmuştur. APX aktivitesi Cr-toleranslı Zeynelağa arpa çeşidine göre Cr-hassas Orza-96 arpa çeşidinde daha fazla artış göstermiştir. Cr-toleranslı Zeynelağa arpa çeşidinin POD aktivitesi Cr-hassas Orza-96 arpa çeşidinkine göre daha fazla teşvik edilmiştir. Bununla birlikte, 75 ve 150 µM Cr(VI) konsantrasyonunda Zeynelağa arpa çeşidinin Orza-96 çeşidine göre önemli düzeyde daha yüksek CAT aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.
- 5) Protein analizlerinde, kontrol ve 225 µM Cr(VI) konsantrasyonuna maruz bırakılmış Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin yaprak dokularından ekstrakte edilen toplam çözünebilir proteinler, iki-yönlü (2-D) elektroforezi (İEF/SDS-PAJE) takiben gümüş boyama kullanılarak analiz

edilmiştir. Cr(VI) stresinin sonucu olarak, arpa çeşitlerinin yaprak dokusunda düşük moleküler ağırlıklı proteinler (<31.5 kDa) değerlendirilmiştir. Kontrole göre 225 µM Cr(VI) konsantrasyonunda, Zeynelağa ve Orza-96 arpa çeşidinde iki yeni protein (22.0 kDa, pI 6.6 ve 22.5 kDa, pI 6.9) sentezlenmiştir. Zeynelağa arpa çeşidinde 5 proteinin (21.0-23.9 kDa, pI 6.1-7.5) sentezi Cr(VI) stresi altında belirgin şekilde artarken, Orza-96 arpa çeşidinde 6 proteinin (21.0-23.9 kDa, pI 6.2-7.5) sentezi belirgin şekilde artmıştır. Bununla birlikte, Zeynelağa ve Orza-96 arpa çeşitlerinde sırasıyla 15 ve 16 proteinin (15.6-30.1 kDa, pI 5.7-7.0) miktarı belirgin şekilde azalmıştır.

**2011, 103 sayfa**

**Anahtar kelimeler:** *Hordeum vulgare* L., Cr(VI) stresi, Büyüme, Cr birikimi, Fotosentetik pigment, ALAD aktivitesi, Prolin, MDA, Antioksidant enzimler, 2-D protein profilleri

## ABSTRACT

M.Sc Thesis

### DETERMINATION OF CHROMIUM TOLERANCE OF BARLEY (*HORDEUM VULGARE* L.) CULTIVARS TO HEXAVALENT CHROMIUM STRESS

Behiye URUŞAK

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

In this research, hexavalent chromium [Cr(VI)] tolerance of some barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars grown in Turkey was investigated at early seedling stage in hydroponic culture.

In the first stage of this research, the effect of different Cr(VI) concentrations (0, 75, 150 and 225  $\mu$ M) on shoot and root growth of eight barley cultivars (Angora, Avcı-2002, Aydanhanım, Başgöl, Bülbül-89, Orza-96, Tarm-92, Zeynelağa) was examined. In general, the lengths, fresh and dry weights of shoots and roots of barley cultivars were significantly decreased with increasing Cr(VI) concentration. To determine differences in Cr(VI) tolerance of barley cultivars, the tolerance index (%), which is a function of shoot and root dry weights, was evaluated. As a result, the most Cr-tolerant barley cultivar, Zeynelağa, and the most Cr-sensitive barley cultivar, Orza-96, were determined.

In the second stage of this research, the effect of Cr(VI) stress on Cr accumulation, photosynthetic pigments content,  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) activity, proline content, malondialdehyde (MDA) content, activities of some antioxidant enzymes [superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX), guaiacol peroxidase (POD) and catalase (CAT)] and two-dimensional (2-D) electrophoretic profiles of total soluble proteins in Cr-tolerant Zeynelağa and Cr-sensitive Orza-96 barley cultivars.

- 1) Chromium was more accumulated in roots than shoots tissues of barley cultivars. Cr accumulation in shoot tissue of Cr-tolerant Zeynelağa was relatively higher than in Cr-sensitive Orza-96, while inverse pattern was determined in root tissue.
- 2) The total chlorophyll (chlorophyll *a* + *b*) content of Cr-tolerant Zeynelağa was significantly increased at 75  $\mu\text{M}$  Cr(VI), while it was significantly decreased at 225  $\mu\text{M}$  Cr(VI) compared to control. The total chlorophyll content of Cr-sensitive Orza-96 decreased significantly with an increase in Cr(VI) concentration. The carotenoid content of Orza-96 was more affected by Cr(VI) stress compared to Zeynelağa barley cultivar. Although Cr(VI) stress reduced significantly the ALAD activity compared to control, there was no consistent difference between ALAD activities of two barley cultivars.
- 3) Proline and MDA contents in leaf tissues of Cr-tolerant Zeynelağa and Cr-sensitive Orza-96 barley cultivars were significantly increased with an increasing Cr(VI) concentration. This effect was found more pronounced in Orza-96 than Zeynelağa.
- 4) Cr(VI) stress caused an increase in the activities of SOD, APX, POD and CAT antioxidant enzymes in leaf tissues of Cr-tolerant Zeynelağa and Cr-sensitive Orza-96 barley cultivars. The SOD activity was found 2 times higher in Zeynelağa, while it was found 3 times higher in Orza-96 at 225  $\mu\text{M}$  Cr(VI) compared to their control. The APX activity was more increased in Cr-sensitive Orza-96 than Cr-tolerant Zeynelağa cultivar. The POD activity of Cr-tolerant Zeynelağa was more induced than that of the Cr-sensitive Orza-96. However, Zeynelağa had significantly higher CAT activity than Orza-96 grown at 75 and 150  $\mu\text{M}$  Cr(VI).
- 5) In protein analysis, the total soluble proteins extracted from leaf tissues of Cr-tolerant Zeynelağa and Cr-sensitive Orza-96 subjected to control and 225  $\mu\text{M}$  Cr(VI) concentration were analyzed by two-dimensional (2-D) electrophoresis (IEF/SDS-PAGE) followed by silver staining. As a result of Cr(VI) stress, low molecular weight proteins (<31.5 kDa) in leaf tissues of barley cultivars were evaluated. Two proteins (22.0 kDa, pI 6.6 ve 22.5 kDa, pI 6.9) in Zeynelağa and Orza-96 barley cultivars were newly synthesized at 225  $\mu\text{M}$  Cr(VI) compared to



control. The synthesis of 5 proteins (21.0-23.9 kDa, pI 6.1-7.5) were markedly increased under Cr(VI) stress in Zeynelağa barley cultivar, while synthesis of 6 proteins (21.0-23.9 kDa, pI 6.2-7.5) were markedly increased in Orza-96. However, the amounts of 15 and 16 proteins (15.6-30.1 kDa, pI 5.7-7.0) were markedly decreased in Zeynelağa and Orza-96, respectively.

**2011, 103 pages**

**Keywords:** *Hordeum vulgare* L., Cr(VI) stress, Growth, Cr accumulation, Photosynthetic pigments, ALAD activity, Proline, MDA, Antioxidant enzymes, 2-D protein profiles

## TEŐEKKÖR

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarında dolayı tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Mustafa YILDIZ'a, araştırma ve yazım süresince yardımlarını esirgemeyen Doktora Öğrencisi Sayın Hakan TERZİ'ye, her konuda öneri ve eleştirileriyle yardımlarını gördüğüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teőekkr ederim.

Bu araştırma boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı aileme teőekkr ederim.

Behiye URUŞAK

AFYONKARAHİSAR, 2011

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ .....	4
2.1 Arpanın Taksonomisi, Morfolojisi ve İklim İstekleri .....	4
2.2 Ağır Metal Stresi.....	5
2.2.1 Krom.....	5
2.3 Bitkilerde Krom Alınımı, Taşınımı ve Birikimi .....	7
2.4 Bitkilerde Krom Stresinin Toksik Etkileri.....	9
2.4.1 Tohum Çimlenmesi .....	10
2.4.2 Büyüme ve Gelişme .....	11
2.4.3 Yaprak Yüzey Alanı.....	12
2.4.4 Biyokütle .....	12
2.4.5 Klorofil Biyosentezi ve Fotosentetik Pigmentler .....	13
2.5 Krom, Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri .....	15
2.5.1 Lipit Peroksidasyonu.....	21
2.6.1 Organik Asitler.....	24
2.6.2 Antioksidant Enzimler.....	24
2.6.3 Krom Stresi ve Prolin Birikimi .....	29
2.6.4 Metal Bağlayıcı Ligandlar.....	31

2.6.5 Alternatif Oksidaz Yolu .....	32
2.6.6 Ağır Metallerle İlişkili Stres Proteinleri.....	32
3. MATERYAL ve METOT .....	36
3.1 Kimyasallar .....	36
3.2 Tohumların Temini .....	36
3.3 Tohum Kabuk Yüzey Sterilizasyonu .....	36
3.4 Çimlenme ve Bitki Yetiştirme Koşulları .....	36
3.5 Büyüme Deneyleri ve Krom(VI) Toleransının Belirlenmesi.....	37
3.6 Toleranslı ve Hassas Arpa Çeşitlerinde Krom(VI) Stresine Karşı Oluşturulan Cevapların Belirlenmesi .....	38
3.6.1 Krom Birikiminin Belirlenmesi .....	38
3.6.2 Fotosentetik Pigment İçeriğinin Belirlenmesi.....	39
3.6.3 ALAD Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi .....	39
3.6.4 Prolin İçeriğinin Belirlenmesi .....	40
3.6.5 Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi .....	41
3.6.6 Antioksidant Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	41
3.6.6.1 Enzim Ekstraksiyonu .....	41
3.6.6.2 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Belirlenmesi.....	42
3.6.6.3 Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Belirlenmesi .....	42
3.6.6.4 Guaiakol Peroksidaz (POD) Aktivitesinin Belirlenmesi .....	42
3.6.6.5 Katalaz (CAT) Aktivitesinin Belirlenmesi .....	43
3.6.7 Protein Analizleri .....	43
3.6.7.1 Protein Ekstraksiyonu .....	43
3.6.7.2 Yaprak Örneklerinde Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi .....	44
3.6.7.3 İzoelektrik Fokuslama (İEF).....	45
3.6.7.4 İzoelektrik Noktasının (pI) Belirlenmesi .....	46

3.6.7.5 SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAJE).....	46
3.6.7.6 Proteinlerin Boyanması .....	48
3.6.7.7 Jellerin Fotoğraflanması .....	49
3.6.7.8 Jellerin Kurutulması .....	49
3.6.7.9 Jellerin Okunması .....	49
3.7 İstatistiki Analizler.....	49
4. BULGULAR .....	50
4.1 Arpa Çeşitlerinin Gövde ve Kök Büyümesi Üzerine Krom Stresinin Etkisi.....	50
4.1.1 Krom(VI) Stresine Maruz Kalan Arpa Çeşitlerinde Tolerans Sınıflandırması .....	54
4.2 Kroma Hassas ve Toleranslı Arpa Çeşitlerinde Cr(VI) Stresinin Etkisi .....	55
4.2.1 Gövde ve Kök Dokusunda Krom Birikimi Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi .	55
4.2.2 Fotosentetik Pigment İçeriği Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi .....	57
4.2.3 δ-Aminolevülinik Asit Dehidrataz Aktivitesi Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi.....	58
4.2.4 Prolin İçeriği Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi .....	59
4.2.5 Malondialdehit İçeriği Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi.....	59
4.2.6 Bazı Antioksidant Enzimlerin Aktivitesi Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi ....	60
4.2.6.1 Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi.....	60
4.2.6.2 Askorbat Peroksidaz Aktivitesi Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi .....	61
4.2.6.3 Guaiakol Peroksidaz Aktivitesi Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi .....	61
4.2.6.4 Katalaz Aktivitesi Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi .....	63
4.2.7 Protein Sentezi Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi .....	63
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	67
KAYNAKLAR.....	79
ÖZGEÇMİŞ.....	103

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

$\text{Cr}_2\text{O}_7^{-2}$	Dikromat
dH <sub>2</sub> O	Distile su
AgNO <sub>3</sub>	Gümüş nitrat
Cr(VI)	Hekzavalent krom
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
OH <sup>•</sup>	Hidroksil radikali
pI	İzoelektrik nokta
kDa	Kilodalton
$\text{CrO}_4^{-2}$	Kromat
mA	Miliamper
μM	Mikromolar
mM	Milimolar
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singlet oksijen
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Süperoksit radikali
Cr (III)	Trivalent krom

### Kısaltmalar

AOX	Alternatif oksidaz
ALA	δ-Aminolevülinik asit
ALAD	δ-Aminolevülinik asit dehidrataz
APX	Askorbat peroksidaz
AsA	Askorbik asit
BSA	Bovin serum albümin
DHAR	Dehidroaskorbat redüktaz
PC	Fitoşelatin
PSII	Fotosistem II
POD	Guaiakol peroksidaz
GSH	Glutasyon
GR	Glutasyon redüktaz
HCl	Hidroklorik asit
2-D	İki-yönlü
İEF	İzoelektrik fokuslama
İEFJÇ	İzoelektrik fokuslama jel çözeltisi
pI	İzoelektrik nokta
CAT	Katalaz
Klo <i>a</i>	Klorofil <i>a</i>
Klo <i>b</i>	Klorofil <i>b</i>
MDA	Malondialdehit
βME	β-Merkaptoetanol
MT	Metallotiyonein
MA	Moleküler ağırlık

MDHAR	Monodehidroaskorbat redüktaz
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NBT	Nitro blue tetrazolium
GSSG	Okside glutatyon
PAJE	Poliakrilamid jel elektroforez
PBG	Porfobilinojen
ROT	Reaktif oksijen türleri
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
NaOH	Sodyum hidroksit
SPSS	Statistical Packages for the Social Sciences
SOD	Süperoksit dismutaz
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamin
TBA	Tiyobarbütirik asit
TCA	Trikloroasetik asit

---

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1 Bitkilerde krom alınımı ve taşınımı ile ilgili hipotetik model.....	8
Şekil 2.2 Moleküler oksijenden (O <sub>2</sub> ) reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonu .....	16
Şekil 2.3 Ağır metal bağımlı reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretim yolları.....	17
Şekil 2.4 Bitki hücrelerinde ağır metal detoksifikasyonu ve toleransında potansiyel mekanizmalar. ....	23
Şekil 2.5 Bitkilerde reaktif oksijen türlerini uzaklaştıran askorbat-glutasyon döngüsü .	26
Şekil 2.6 Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun önlenmesinde alternatif oksidazın (AOX) fonksiyonu .....	33
Şekil 4.1 Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin klorofil <i>a + b</i> (A) ve karotenoid (B) içeriği üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının etkisi .....	57
Şekil 4.2 Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin δ-aminolevülinik asit dehidrataz (ALAD) aktivitesi üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının etkisi.....	58
Şekil 4.3 Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin yaprak prolin içeriği üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının etkisi. ....	59
Şekil 4.4 Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin yaprak MDA içeriği üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının etkisi.....	60
Şekil 4.5 Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının etkisi.....	61
Şekil 4.6 Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinde askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının etkisi.....	62



<b>Şekil 4.7</b> Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinde guaiakol peroksidaz (POD) aktivitesi üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının etkisi.....	62
<b>Şekil 4.8</b> Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinde katalaz (CAT) aktivitesi üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının etkisi.....	63
<b>Şekil 4.9</b> Kontrol ve 225 µM Cr(VI) uygulanmış Cr-toleranslı Zeynelağa arpa çeşidine ait fidelerin ilk yaprak dokusundan ekstrakte edilen toplam çözünebilir proteinlerin 2-D elektroforetik profilleri.....	65
<b>Şekil 4.10</b> Kontrol ve 225 µM Cr(VI) uygulanmış Cr-hassas Orza-96 arpa çeşidine ait fidelerin ilk yaprak dokusundan ekstrakte edilen toplam çözünebilir proteinlerin 2-D elektroforetik profilleri.....	66

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 2.1</b> Çevredeki krom konsantrasyonları .....	6
<b>Çizelge 2.2</b> Bitkilerde reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretim, savunma ve sakınım mekanizmaları .....	18
<b>Çizelge 3.1</b> İzoelektrik fokuslama jel çözeltisi (İEFJÇ) için gerekli kimyasallar ve miktarları .....	45
<b>Çizelge 3.2</b> SDS-poliakrilamid jel elektroforez için moleküler ağırlık standartları .....	47
<b>Çizelge 4.1</b> Erken fide evresindeki 8 arpa çeşidinin gövde ve kök uzunlukları üzerine Cr(VI) stresinin etkisi .....	51
<b>Çizelge 4.2</b> Erken fide evresindeki 8 arpa çeşidinin gövde ve kök taze ağırlıkları üzerine Cr(VI) stresinin etkisi .....	52
<b>Çizelge 4.3</b> Erken fide evresindeki 8 arpa çeşidinin gövde ve kök kuru ağırlıkları üzerine Cr(VI) stresinin etkisi .....	53
<b>Çizelge 4.4</b> Farklı Cr(VI) konsantrasyonlarına maruz bırakılan 8 arpa çeşidinin kuru ağırlık temelinde belirlenen tolerans indeksi (%) değerleri ve puanları .....	55
<b>Çizelge 4.5</b> Farklı Cr(VI) konsantrasyonlarına maruz bırakılan Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin gövde ve kök dokusunda krom birikimi .....	56
<b>Çizelge 4.6</b> Kontrole göre 225 µM Cr(VI) konsantrasyonunda, Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin ilk yaprak dokusundan ekstrakte edilen toplam çözünebilir proteinlerdeki polimorfizm .....	64

## 1. GİRİŞ

Arpa (*Hordeum vulgare* L.) verim bakımından dünyada buğday, mısır ve çeltikten sonra dördüncü sırada, serin iklim tahılları arasında ise buğdaydan sonra yer almaktadır (FAO 2007). Arpa daha çok hayvan yemi olarak kullanılmakla birlikte, kullanıldığı önemli alanlardan biri de malt sanayidir. Arpa, Türkiye’de 120 milyon dekar tahıl ekiliş alanının 30.1 milyon dekarını ve 33.5 milyon ton tahıl üretiminin 7.3 milyon tonu ile bitkisel üretimde yer alan önemli bir kültür bitkisidir (TÜİK 2009).

Madencilik, kentsel veya endüstriyel katı, gaz ve sıvı atıkları, pestisit ve yapay gübre kullanımı, boya sanayisi ve araba egzoz gazları doğaya aşırı miktarda ağır metallerin salınmasına neden olmaktadır. Çevresel kirleticilerin neden olduğu bu ağır metal stresi, bitkilerde büyümeyi sınırlamakta ve ürün verim ve kalitesini düşürmektedir. (Shanker *et al.* 2005). Bakır (Cu), çinko (Zn), demir (Fe), mangan (Mn), molibden (Mo), nikel (Ni) ve kobalt (Co) gibi bazı ağır metaller bitki büyüme ve gelişimi için gerekli mikro besin elementleridir. Buna karşın, arsenik (As), civa (Hg), kadmiyum (Cd), kurşun (Pb) ve krom (Cr) gibi bazı ağır metaller ise bitki gelişimi için gerekli olmayan elementlerdir (Niess 1999). Mikro besin elementi olsun ya da olmasın ağır metallerin, atmosferde, suda ve topraktaki konsantrasyonunun belli bir seviyenin üzerine çıkması, tüm canlılar için ciddi problemlere neden olmaktadır (Benavides *et al.* 2005).

Krom (Cr), dünyada en fazla bulunan yedinci elementtir (Cervantes *et al.* 2001). Kromun trivalent [kromik formu; Cr(III) veya  $Cr^{+3}$ ] ve heksavalent [kromat formu; Cr(VI) veya  $Cr^{+6}$ ] olarak adlandırılan çeşitli fitotoksik formları bulunur. Cr(VI), en toksik form olup; kromat ( $CrO_4^{-2}$ ) veya dikromat ( $Cr_2O_7^{-2}$ ) oksianyonları şeklinde genellikle oksijen ile ilişkili olarak oluşmaktadır. Oldukça toksik olan Cr membran zararlarına, organellerde yapısal değişimlere, metabolik aktivitede bozulmalara ve büyümede inhibisyona neden olmaktadır (Kimbrough *et al.* 1999). Krom stresine maruz kalan bitkilerde oluşan singlet oksijen, süperoksit radikali, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri (ROT’lar) lipitler, proteinler ve DNA gibi biyomoleküllerde oksidatif zarara neden olabilmektedir (Vajpayee *et al.* 2001). Krom stresi ile ilgili birçok araştırmada, yüksek ve düşük Cr konsantrasyonlarının bitki büyüme ve gelişimi üzerinde ciddi fitotoksik etkilere sahip olduğu ve hücrelerde

oksidatif zarara yol açtığı gösterilmiştir. Krom fitotoksitesisi tohum çimlenmesi ve fide gelişimini inhibe etmekte, besin ve su dengesini bozmakta, fotosentetik pigmentlerde bozulmalara ve antioksidant enzimlerin aktivitesinde değişimlere neden olmaktadır (Toppi *et al.* 2002, Panda *et al.* 2003, Panda and Choudhury 2005, Choudhury and Panda 2005, Pandey *et al.* 2009a, b, Ali *et al.* 2011). Bununla birlikte, Cr gibi ağır metaller ile kirlenmiş topraklarda büyüyen bitkilerde krom alımı, transportu, birikimi ve detoksifikasyonunu kapsayan temel mekanizmaların yanı sıra kromun fizyolojik etkilerinin moleküler ve genetik teknikler ile anlaşılmasının oldukça önemli olduğu bildirilmiştir (Zayed and Terry 2003).

Bitkilerde ağır metallere tolerans, bir genotip ve çevresi arasındaki etkileşim ile belirlenen ağır metal alınımındaki azalma veya içsel alıkoyma ile ilişkilidir. Ağır metallerin detoksifikasyonunda potansiyel mekanizmalara sahip olan bazı bitkiler ağır metallere toleranslı olarak ifade edilmektedir (Hall 2002). Ağır metallere karşı bitkiler tarafından geliştirilen korunma mekanizmaları familya, cins, tür, alttür ve çeşit seviyesinde farklılıklar gösterebilmektedir (Rout *et al.* 1997, Ekmekçi *et al.* 2008). Ağır metal toksisitesinden korunmak için bitkilerin geliştirdiği içsel savunma mekanizmaları henüz tam olarak anlaşılacakla beraber, bu mekanizmalar arasında vakuolar kompartımanlaşma, sıcaklık şoku proteinleri (Hall 2002) enzimatik ve nonenzimatik antioksidant sistemleri (Sinha *et al.* 2005, Panda 2007, Liu *et al.* 2008), fitoşelatin ve metalotiyonein gibi metal bağlayıcı ligandlar (Cobbett and Goldsbrough 2002) gösterilmektedir. Bununla birlikte, ağır metallerle kirlenmiş alanlarda ekimi yapılacak tür veya çeşitlerin geliştirilmesinde metal toleransı ile ilgili moleküler mekanizmaların ve genetik temellerin aydınlatılmasının önemli olduğu vurgulanmıştır (Cobbett 2000).

Bu araştırmada, Türkiye’de ekimi yapılan sekiz arpa (*Hordeum vulgare* L.) çeşidinde (Angora, Avcı-2002, Aydanhanım, Başgöl, Bülbül-89, Orza-96, Tarm-92, Zeynelağa) heksavalent kromun [Cr(VI)] bazı fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler parametreler üzerine etkisi erken fide evresinde incelenmiştir. Bazı fizyolojik büyüme parametreleri kullanılarak arpa çeşitleri Cr(VI) toleransı bakımından sınıflandırılmıştır. Buna göre, Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşidinde, kontrol ve farklı Cr(VI) konsantrasyonlarına maruz kalmış fidelerin gövde ve kök dokularında krom birikimi

analizi yapılmıştır. Bununla birlikte, kontrol ve farklı Cr(VI) konsantrasyonlarına maruz kalmış toleranslı ve hassas arpa çeşitlerinin fidelerine ait yaprak dokularında (1) fotosentetik pigment içeriği, (2)  $\delta$ -aminolevülinik asit dehidrataz (ALAD) aktivitesi, (3) prolin birikimi, (4) malondialdehit (MDA) içeriği, (5) bazı antioksidant enzimlerin [süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), guaiakol peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT)] aktivitesi ve (6) 2-D elektroforetik protein profillerindeki polimorfizmler belirlenmiştir.

## 2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

### 2.1 Arpanın Taksonomisi, Morfolojisi ve İklim İstekleri

Arpa, buğdaygiller (Poaceae) familyasından buğdayla beraber dünyanın en eski kültür bitkisidir. Buğdaygiller (*Graminae=Poaceae*) familyasının *Triticeae* oymağı, arpa (*Hordeum*), buğday (*Triticum*), yabani buğday (*Aegilops*), çavdar (*Secale*), brom (*Bromus*), ayırık otu (*Agropyron*) gibi cinsleri kapsar. Kültür ve yabani türleri kapsayan arpanın temel kromozom sayısı  $n=7$ 'dir. Bütün kültür arpaları diploid ( $2n=14$ ) iken yabani arparın ise diploid ( $2n=14$ ), tetraploid ( $2n=28$ ) ve hekzaploid ( $2n=42$ ) olanları vardır (Kün 1988).

Arpa serin iklim tahılları içerisinde buğdaydan sonra en çok ekimi yapılan bitkidir (TÜİK 2009). Tek yıllık, uzun gün bitkisi olan arpanın tür ya da çeşitleri farklı fotoperiyodik davranışlar gösterebilir. Diğer tahıllara göre daha fazla sayıda kardeşlenme gösteren arpa genellikle 5-8 kardeş oluşturur. Bitki boyu ortalama 35-100 cm kadardır. Başakları ortalama 8-15 cm boyunda olup; 2, 4 ve 6 sıralıdır. Çiçeği kavuz ve kapçık sarar, kavuzlu arpalarda bunlar taneye yapışiktir ve harmanda ayrılmazlar. Tane yapısında %9-13 protein, %67 kadar karbohidrat bulunur. Arpa daha çok hayvan yemi olarak kullanılır. Yemlik arpalarda protein oranının fazla olması istenir. Kullanıldığı önemli alanlardan biri de malt sanayidir. Bira üretimi için gerekli olan malt iki sıralı beyaz arpalardan elde edilmektedir. Biralık arpalarda protein oranının düşük olması gereklidir (Kün 1988).

Arpa, fazla soğuk ve fazla sıcak olmayan, nispi nemi yüksek olan yerlerde iyi gelişir. Sıcaklığı 0°C'nin altına düşmeyen ve 18-20°C'nin üzerine çıkmayan, nispi nemi %70-80 olan yerler arpa için çok uygundur. Arpa için en uygun topraklar, organik maddece zengin, milli, havalanması ve nemliliği uygun, nötr reaksiyonlu (pH 5-8) topraklardır (Kün 1988).

## 2.2 Ağır Metal Stresi

Çevre kirliliği yaratan kirleticiler arasında en tehlikeli olanı ağır metal kirliliğidir. Endüstriyel faaliyetler, motorlu taşıtların egzoz gazları, maden yatakları ve işletmeleri, volkanik faaliyetler, tarımda gübreleme ve ilaçlama gibi birçok faktör ağır metal kirliliğinin nedenleri arasında yer alır. Yoğunluğu  $5 \text{ g/cm}^3$ 'ün üzerinde olan çinko, krom, kadmiyum, nikel, bakır, kurşun, civa gibi metaller ağır metal olarak tanımlanır. Bununla beraber,  $2.75 \text{ g/cm}^3$  yoğunluğa sahip hafif metal olan alüminyum da diğer ağır metallere benzer zararlı etkileri gösterir (Petrucci and Harwood 1993). Ağır metaller arasında yer alan Mn, Fe, Cu, Zn ve Ni gibi elementler bitki büyümesi için gerekli elementlerdir (Nedelkoska and Doran 2000) ve metabolik öneme sahip birçok enzimin önemli bir bileşenini oluşturmaktadır (Dixit *et al.* 2002). Pb, Cd, Se ve Al gibi diğer metaller ise biyolojik olarak gerekli değildir ve belirli bir konsantrasyonun üzerinde toksiktir. Mikrobesein elementi olsun veya olmasın ağır metallerin bitkide aşırı birikimi fizyolojik strese, büyüme ve gelişmede azalmaya sebep olur (Phalsson 1989).

### 2.2.1 Krom

Dünyada Cr üretimi yılda yaklaşık 107 ton civarındadır (Han *et al.* 2004). Metal sanayi ve kimya endüstrisi gibi alanlarında yaygın kullanımından dolayı kromun farklı bileşikleri hızla çevreye yayılmaktadır. Krom bileşikleri deri işleme, paslanmaz çelik üretiminde, boya pigmenti ve kromik asit üretiminde büyük ölçüde kullanılmaktadır (McGrath 1995, Shanker *et al.* 2005).

Krom, periyodik cetvelin VI B grubunda yer alan bir geçiş metalidir. Bitki metabolizmasında herhangi bir rol oynamayan krom ( $7.2 \text{ g/cm}^3$ ), bitkiler için toksik bir element (Cervantes *et al.* 2001, Dixit *et al.* 2002) olup; toprak, su ve havada bulunmaktadır. Doğal olarak oluşan topraklarda krom konsantrasyonu ana kayaya bağlı olarak  $10\text{-}50 \text{ mg kg}^{-1}$  aralığında değişmektedir (Çizelge 2.1) (Zayed and Terry 2003).

**Çizelge 2.1** Çevredeki krom konsantrasyonları (Zayed and Terry 2003'den değiştirilerek)

Örnek tipi	Konsantrasyon
Doğal topraklar	5-1000 mg kg <sup>-1</sup> 5-3000 mg kg <sup>-1</sup> 5-1500 mg kg <sup>-1</sup> 30-300 mg kg <sup>-1</sup>
Serpentin topraklar	634-125.000 mg kg <sup>-1</sup>
Dünya toprakları	200 mg kg <sup>-1</sup>
Sediment	0-31.000 mg kg <sup>-1</sup>
Tatlı sular	0-117 µg L <sup>-1</sup>
Deniz suyu	0-0.5 µg L <sup>-1</sup>
Hava	1-545.000 ng m <sup>-3</sup>
Bitkiler	0.006-18 mg kg <sup>-1</sup>
Hayvanlar	0.3-1.6 mg kg <sup>-1</sup>

Farklı oksidasyon durumları gösteren kromun, trivalent [Cr(III)] ve heksavalent [Cr(VI)] türleri tamamen farklı kimyasal özellik gösteren en kararlı formlardır (Barnhart 1997). Kromun hem trivalent hem de heksavalent formları fitotoksiktir (Nichols *et al.* 2000, Bal and Kasprzak 2002, Dixit *et al.* 2002, Mei *et al.* 2002). Daha toksik form olarak düşünülen Cr(VI), kromat (CrO<sub>4</sub><sup>-2</sup>) ve dikromat (Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>-2</sup>) şeklinde iki oksianyon formu halinde bulunmaktadır. Buna karşın daha az mobil ve toksik olan Cr(III); oksitler, hidroksitler ve sülfatlar şeklinde veya toprakta ve sucul çevrelerde organik bileşiklere bağlı halde bulunmaktadır (Zayed and Terry 2003).

Oksidasyon-redüksiyon (redoks) reaksiyonları hem toprak hem de sucul ortamlarda meydana gelmektedir. Redoks reaksiyonları mobilite ve fitotoksitenin değiştirilmesinde önemlidir. Trivalent ve tetravalent durumdaki mangan Cr(III)'ü Cr(VI)'a okside ederken, topraktaki FeS ve organik maddeler Cr(VI)'u daha kararlı ve daha az fitotoksik olan Cr(III)'a indirgeyebilmektedir. Cr(III) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pH: 6-8 olduğu durumlarda (pH: 4 değil) DNA ipliklerinin kırılmasına neden olmakta ve Cr(III) ve Cr(II)'un Fenton reaksiyonlarına girdiği kabul edilmektedir (Strlic *et al.* 2003). Trivalent kromun oksidasyonu sırasında Cr(IV) ve Cr(V) aracılarının oluştuğu düşünülmektedir (Strlic *et al.* 2003). Yüksek pH'da (pH 8.9), Cr(III)'un oksidasyonu hızlıdır. Bu pH'da Cr(VI)'un konsantrasyonu sabitlenirken, Cr(IV) ve Cr(V) gibi okside



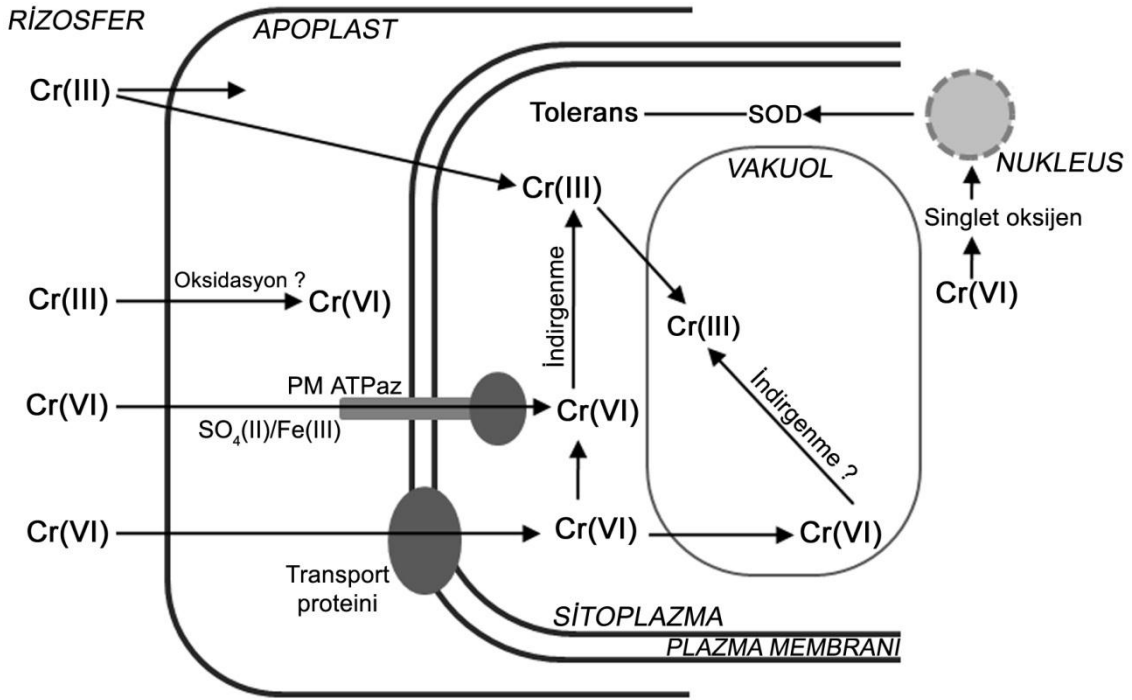
edici formların üretimi yavaş ve ölçülebilir oranda devam etmektedir (Strlic *et al.* 2003). Bu sonuç, Cr(IV) ve Cr(V)'un katalitik olarak aktif olduklarını ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türlerini oluşturma kapasitesine sahip olduklarını göstermektedir (Strlic *et al.* 2003). Yani, bir geçiş metali ve hidrojen peroksit gerektiren Fenton tipi reaksiyonlar hidroksil radikalinin oluşumuna neden olmaktadır (Goldstein and Czapki 1990). Fenton-benzeri reaksiyonlarda Cr(III)'un katalitik aktivitesi  $Co^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Ni^{+2}$ 'den daha yüksek ve  $Cu^{+2}$ 'dan daha düşük olup;  $Zn^{+2}$  ve  $Cd^{+2}$  ise herhangi bir katalitik aktivite göstermez (Strlic *et al.* 2003).

### 2.3 Bitkilerde Krom Alınımı, Taşınımı ve Birikimi

Metal alınımı ve taşınımı bitki türü ve metal çeşidine göre farklılıklar göstermektedir. Bitkiler, havada gaz halinde bulunan ağır metalleri stomaları aracılığıyla (Martin and Juniper 1970, Lindberg *et al.* 1992, Marschner 1995), kolloidlere tutunmuş, organik maddelere bağlı ve toprak çözeltisi içinde iyon halinde bulunan metalleri ise kökleri aracılığıyla almaktadır. Toprak sıcaklığı, organik madde miktarı ve diğer metallerin varlığı gibi toprak çözeltisindeki metal konsantrasyonunu değiştiren çevresel faktörler metal alınımını etkilemektedir (Greger 1999). Bununla birlikte, metal alınımı bitki türüne bağlı olarak farklılık göstermektedir. Köklerden alınan metaller ksilem aracılığı ile gövde ve yapraklara taşınmakta ve bu taşınım bitki türü ve metal çeşidine göre farklılıklar göstermektedir.

Bitkiler için toksik bir element olması nedeniyle krom alınımı için spesifik bir mekanizma bulunmamaktadır. Krom alınımı, bitki metabolizması için zorunlu diğer metallerin alınımında kullanılan taşıyıcılar ile gerçekleşmektedir. Kromun toksik etkisi, bu metalin alınımı, taşınımı ve birikimini belirleyen farklı iyonik formlara bağlıdır (Şekil 2.1). Zayed vd. (1998), kromat ( $CrO_4^{-2}$ ) şeklinde absorbe edilen kromun muhtemelen Fe(III) redüktaz enzimleri ile köklerde toksik olmayan Cr(III) formuna dönüştürüldüğünü ileri sürmüştür. Howe vd. (2003), köklerde Cr(VI)'un Cr(III)'a tamamen dönüştürülemediğini ve kromun vasküler dokulara girebildiğini ve Cr(III) ve Cr(VI) olarak yapraklara kolayca taşındığını rapor etmiştir. Bununla birlikte, hem Cr(VI) hem de Cr(III) simplast yol ile endodermisi geçmek zorunda olduğu için

hücrelerdeki Cr(VI), düşük Cr(VI) konsantrasyonunda kök korteks hücrelerinde tutulan Cr(III)'a kolaylıkla indirgenebilmekte (Şekil 2.1) ve bu durum Cr(III)'un düşük toksisitesini kısmen açıklamaktadır. Vasküler bitkiler Cr(VI)-redükleyici enzimleri içermemesine rağmen, bu enzimler bakteri ve funguslarda çok yaygın olarak bulunmuştur (Cervantes *et al.* 2001).



Şekil 2.1 Bitkilerde krom alınımları ve taşınımı ile ilgili hipotetik model (Shanker *et al.* 2005'den değiştirilerek)

Krom (VI) taşınımı sülfat gibi esansiyel anyonların taşıyıcıları ile gerçekleşen aktif bir mekanizmadır (Cervantes *et al.* 2001). Demir, kükürt, fosforun taşıyıcıya bağlanmada kromla rekabet ettiği bilinmektedir (Wallace *et al.* 1976). Cervantes vd. (2001), Cr(VI) alınımının sülfat translokasyon taşıyıcılarıyla hızlı ve aktif bir taşınım, Cr(III) alınımının ise pasif taşınım olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte, arpada metabolik inhibitörlerin Cr(VI) alınımını azaltırken, Cr(III) alınımını etkilemediği bildirilmiştir (Skeffington *et al.* 1976). Bu sonuç, Cr(VI) alınımının metabolik enerjiye bağlı olduğunu göstermekle birlikte (Skeffington *et al.* 1976), arpada her iki krom türünün aktif mekanizma ile alındığı bildirilmiştir (Ramachandran *et al.* 1980).

Bazı bitki türlerinde, Cr(III)'a göre Cr(VI) uygulamalarının daha fazla krom birikimine neden olduğu bildirilmiştir (Zayed *et al.* 1998). Bununla birlikte, farklı bitki dokularında krom birikimi bakımından farklılıklar olduğu gösterilmiştir. Vernay vd. (2008), 2 mM Cr(III) ve Cr(VI) uygulamalarında *Datura innoxia* köklerinde Cr(III)'a göre Cr(VI)'un yedi kat daha fazla biriktiğini göstermiştir. Benzer olarak, Cr(III) yerine Cr(VI)'a maruz bırakılan *Brassica juncea* ve *Salsola kali* bitkilerinin gövdelerine göre köklerinde krom birikiminin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Zayed *et al.* 1998, Gardea-Torresdey *et al.* 2004). Golovatyj vd. (1999), toprağın özelliğine ve krom konsantrasyonuna bağlı olmaksızın kromun kök dokusunda fazla, toprak üstü organlarda ise düşük seviyede biriktiğini ve bu nedenle de Cr dağılımının kararlı bir yapı gösterdiğini ifade etmiştir. Örneğin, fasulyede krom birikiminin tohumlarda %0.1 ve kök dokusunda ise %98 olduğu bulunmuştur (Huffman and Allaway 1973).

Kromun köklerden ksilem aracılığı ile yapraklara düşük oranda taşınımı, bu metalin hücre duvarındaki -COOH grupları ile kompleks oluşturması ve kök hücrelerinin vakuollerinde biriktirilmesinden kaynaklanabilmektedir (Shanker *et al.* 2004). Cr(III) hücre membranlarında birikirken, Cr(VI) membranları geçebilmekte ve sitoplazmadaki hücre-içi materyallerle etkileşime girebilmektedir (Gikas and Romanos 2006). Ağır metaller enzimlerin sülfidril gruplarına bağlanma eğiliminde olduğundan esansiyel biyolojik bileşiklerin fonksiyon görmesi baskılanmaktadır (van Assche and Clijsters 1990).

#### **2.4 Bitkilerde Krom Stresinin Toksik Etkileri**

Bitkilerde krom toksisitesi Fe<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> gibi iyonların değişen translokasyonu veya metal değiş-tokuşunun sonucu olarak iyonik dengesizliğe neden olmaktadır (Panda and Choudhury 2005, Shanker *et al.* 2005). Krom büyüme ve gelişme, enzimler ve diğer bileşikler üzerinde etkili olarak fitotoksik etki göstermektedir (Vajpayee *et al.* 2001, Zeid 2001, Panda *et al.* 2002, Samantaray 2002, Han *et al.* 2004, Shanker *et al.* 2005, Pandey *et al.* 2005, Scoccianti *et al.* 2006, Sinha *et al.* 2006, Vernay *et al.* 2007, Liu *et al.* 2008, Gupta *et al.* 2009).

Krom toksisitesinin domates, mısır (Toppi *et al.* 2002), arpa (Ali *et al.* 2004), fasulye (Hussain *et al.* 2006), çeltik (Panda 2007), ekmeçlik buğday (Sharma *et al.* 1995, Subrahmanyam 2008, Dey *et al.* 2009), bezelye (Pandey *et al.* 2009b) gibi birçok kültür bitkisinde, metabolizmayı etkileyerek büyümede inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir. Toksik seviyelerde kroma maruz kalan bitkilerde, fotosentez ve solunum gibi önemli metabolik olayların etkilenmesinden dolayı bitki büyümesinde azalma görölmektedir (Shanker *et al.* 2005). Bitki büyümesindeki inhibisyon, hücre bölünmesi sırasında kromozom aberasyonlarına bağılı olarak meydana gelen inhibisyondan kaynaklanabilmektedir (Liu *et al.* 1993). Bununla birlikte, Cr stresine maruz kalan birçok bitkide DNA içeriğinin arttığı ve DNA içeriğinin Cr konsantrasyonundaki artış ile paralellik gösterdiği belirtilmiştir (Zeid 2001).

#### **2.4.1 Tohum Çimlenmesi**

Krom toksisitesi bitkilerde tohum çimlenmesi ve radikula büyümesini azaltmaktadır (Corradi *et al.* 1993, Liu *et al.* 1993, Nayari *et al.* 1997, Panda *et al.* 2002). Cr toksisitesi  $\alpha$ - ve  $\beta$ -amilaz aktivitesini azaltarak embriyo ekseninin gelişimi için gerekli şekerlerin taşınımını engellemekte ve tohum çimlenmesini inhibe etmektedir. Peralta vd. (2001), tohum çimlenmesinin ilk fizyolojik basamak olması nedeniyle krom içeren bir ortamda tohum çimlenme yeteneğinin Cr toleransının belirlenmesinde indikatör olabileceğini bildirmiştir. Tohum çimlenmesi sırasında, amino asitlerin ve şekerlerin elde edilmesi için proteinlerin ve nişastanın hidrolizi gerçekleşmektedir. Çok düşük Cr konsantrasyonlarının  $\alpha$ -amilaz aktivitesinde bir artışa neden olduğu saptanmıştır. Diğer taraftan, proteaz aktivitesinde artışa neden olan krom uygulaması, Cr-uygulanmış tohumların çimlenmesinde azalmaya neden olmaktadır (Zeid 2001). Krom içeren deri sanayi atıklarından hazırlanan %25 ve %50 atık konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Oryza sativa*, *Acacia holosericea* ve *Leucaena leucocephala* bitkilerinde tohum çimlenmesinin inhibe olduğu, %75 ve %100 atık konsantrasyonlarında ise çimlenmenin tamamen engellendiğı belirlenmiştir (Karunyal *et al.* 1994).

#### 2.4.2 Büyüme ve Gelişme

Karuppanapandian ve Manoharan (2008), Cr(VI)'un fitotoksik etkilerinin kökler kadar gövde dokusunda da oldukça belirgin olduğunu; oysa Cr(III)'un sadece kök dokusunda toksik olduğunu bildirmiştir. Bu araştırmacılar, *Vigna mungo* L. Hepper cv. Co4 çeşidinin morfometrik büyüme parametreleri üzerine Cr(III) ve Cr(VI)'un 100 ve 125 µM'lık uygulamalarının aynı düzeyde etki ettiğini saptamıştır. Bununla birlikte, Cr(III)'a göre Cr(VI) uygulaması (100 µM) gövde büyüme parametreleri üzerinde önemli düzeyde azalmaya neden olmuştur (Karuppanapandian and Manoharan 2008). Shanker vd. (2005), diğer ağır metallere göre kromun kök uzunluğunu daha fazla inhibe ettiğini bildirmiştir. Cr stresi, kök hücrelerinde plazmolize ve solmaya neden olarak bitki köklerini etkileyebilmektedir (McGrath 1995). Yüksek krom konsantrasyonlarında kök büyümesindeki inhibisyon, besin ortamında kromun varlığında kökler tarafından suyun yeteri kadar alınamamasından kaynaklanmaktadır (Barcelo *et al.* 1986). Krom stresi altındaki çeltik fidelerinin kök uzunluğu kontrole göre 100 µM Cr(VI) uygulamasında tüm sürelerde azalmıştır. Bu etki, düşük konsantrasyonda (50 µM) 24 sa uygulamasında bir artma, 48 saatte ise bir azalma olarak saptanmıştır (Panda 2007). Pandey vd. (2009a), 20 µM Cr(VI) uygulaması bezelye bitkilerinin kök uzunluğunda çok az bir artışa, 200 µM Cr uygulamasının ise %18 oranında bir azalmaya neden olduğunu bildirmiştir. Cr(VI) konsantrasyonundaki bir artış (0-500 µM) ile *Brassica juncea* cv. Varuna'da bitki uzunluğunun 200 µM'da yaklaşık %50 oranında azaldığı saptanmıştır (Gupta *et al.* 2009). Krom stresinin neden olduğu kök büyümesindeki inhibisyon kök hücrelerinin bölünmesi ve uzamasındaki inhibisyondan veya hücre döngüsünün uzamasından kaynaklanabilmektedir (Shanker *et al.* 2005). Bununla birlikte, kök hücrelerinin büyümesindeki inhibisyonun fotosentetik oran üzerine kromun primer etkisi olarak düşünülmektedir (Panda and Choudhury 2005, Choudhury and Panda 2005). Kök büyümesindeki azalmanın kök yüzeyinin zarar görmesinden dolayı hücre içeriğinin dışarı sızmasından ve kök tüylerinin ve epidermal hücrelerin zarar görmesinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Castro *et al.* 2007). Scoccianti vd. (2006), kromun hücre çeperi ve plazma membranındaki bağlanma bölgelerinden Ca<sup>+2</sup>

gibi katyonların yer değiştirmesine neden olarak hücre fonksiyonlarında bozulmalara yol açabileceğini belirtmiştir.

### 2.4.3 Yaprak Yüzey Alanı

Yaprak büyümesi (yaprak yüzey alanı gelişimi ve toplam yaprak sayısı) bitki verimini belirlemektedir. Cr(VI) uygulaması yaprak yüzey alanı genişlemesini negatif olarak etkilemekte ve daha küçük yaprak oluşumuna neden olmaktadır (Dixit *et al.* 2002, Pandey *et al.* 2005). Krom içeren deri sanayi atıklarının farklı konsantrasyonlarına (%25-100) maruz bırakılan *Gossypium hirsutum*, *Vigna mungo*, *Vigna unguiculata* ve *Lycopersicon esculentum* bitkilerinde yaprak yüzey alanının kontrole göre %25'lik konsantrasyonda artış gösterdiği, buna karşın %75 ve 100'lük konsantrasyonlarda ise bitkilerin öldüğü bildirilmiştir (Karunyal *et al.* 1994). Buğdayda bitki başına yaprak sayısı, besin ortamına 0.5 mM Cr ilave edildiğinde %50 azalmıştır (Sharma and Sharma 1993). Ağır metal stresi altında, yaprak yüzey alanındaki azalmanın nedenini açıklamak için muhtemel mekanizmalardan biri su kullanımının kısıtlanmasıdır (Radin and Boyer 1982). Tripathi vd. (1999), *Albizia lebbek* fidelerinin yaprak yüzey alanı ve biyokütlesinin 200 ppm Cr(VI) konsantrasyonunda önemli düzeyde etkilendiğini bildirmiştir. Bu araştırıcılar, yaprak büyüme özelliklerinin ağır metal kirliliğinin uygun bir biyoindikatörü olduğunu ve toleranslı türlerin seleksiyonunda kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. Bununla birlikte, bezelye bitkilerinin toplam yaprak yüzey alanı 20–100 µM Cr konsantrasyonlarında önemli düzeyde azalmıştır (Pandey *et al.* 2009a, b).

### 2.4.4 Biyokütle

Bitkilerde yüksek verim kuru ağırlık bakımından biyokütle üretiminde bir artıştır. Bitkiler tarafından üretilen toplam kuru ağırlığın yaklaşık %80–90'ını karbon bileşikleri oluşturur (Bishnoi *et al.* 1993). Krom, kloroplast ve mitokondrinin yapı ve işlevlerinde oksidatif zarara yol açarak kuru ağırlık üretimi üzerinde dolaylı bir etkiye sahiptir (Dixit *et al.* 2002, Subrahmanyam 2008). Kromun toksik konsantrasyonlarında (0.1, 0.15 ve 0.25 mM), ekmeklik buğdayın farklı dokularında kuru ağırlıktaki azalmanın köke göre

gövdede daha belirgin olduğu bildirilmiştir (Subrahmanyam 2008). Cr(VI) konsantrasyonundaki bir artış (0-500 µM) ile *Brassica juncea* cv. Varuna'da taze ağırlık önemli düzeyde azalırken, kuru ağırlık kontrole göre 500 µM krom uygulamasında yaklaşık %57 daha yüksek bulunmuştur (Gupta *et al.* 2009). *Vallisneria spiralis*'de Cr birikimi ve biyokütle üretimi ile ilişkili toksisite değerlendirilmesinde, 2.5 µg/mL'nin üzerindeki Cr(VI) konsantrasyonlarında kuru ağırlık üretiminin olumsuz etkilendiği belirtilmiştir (Vajpayee *et al.* 2001). Zurayk vd. (2001), *Portulaca oleracea* bitkisinde tuzluluk ve Cr(VI) birikiminin kuru ağırlıkta azalmaya neden olduğunu bildirmiştir.

#### **2.4.5 Klorofil Biyosentezi ve Fotosentetik Pigmentler**

Krom toksisitesi elektron transportu, fotofosforilasyon, CO<sub>2</sub> fiksasyonu ve karbon indirgenme döngüsündeki enzimlerin aktivitesindeki değişikliklere neden olarak fotosentezi olumsuz etkilemektedir (Panda and Choudhury 2005, Shanker *et al.* 2005). Krom kloroplastlarda yapısal değişimlere neden olarak fotosentezde inhibisyona yol açmaktadır. *Taxithelium nepalense* bitkisinde krom ile yapılan çalışmalarda, kloroplast membran yapısındaki değişimlere tilakoid düzenlenişindeki değişimlerin eşlik ettiği gösterilmiştir. Üstelik yüksek Cr(VI) konsantrasyonlarında (1 mM) kloroplast membranındaki tam bir bozunma ile tilakoid düzenlenişindeki bozunmanın birlikte gözlenmesi, hegzavalent kromun şiddetli fitotoksik etkisini göstermektedir (Choudhury and Panda 2004). Bununla birlikte, krom Hill reaksiyonlarını inhibe ederek fotosentezin hem ışık hem de karbon indirgeme reaksiyonlarını etkilemektedir (Krupa and Baszynski 1995, Zeid 2001).

Bitkilerde Cr alınımı ve birikimi birçok fizyolojik ve biyokimyasal işlevi etkileyebilmektedir. Fotosentetik pigmentlerin (klorofil a, klorofil b ve karotenoidler) içeriğindeki azalmalar krom stresi altındaki bazı bitki türlerinde bildirilmiştir (Tripathi and Smith 2000, Panda and Khan 2003, Rai *et al.* 2004, Sinha *et al.* 2009).

Hem Cr (III) hem de Cr(VI) klorofil içeriğini azaltmakta ve böylece büyümeyi inhibe etmektedir (Panda *et al.* 2003, Rai *et al.* 2004, Sinha *et al.* 2009). Toplam klorofil içeriğinin buğday (Panda *et al.* 2003, Subrahmanyam 2008), mısır (Sharma *et al.* 2003),

ıspanak (Gopal *et al.* 2009) ve *Vigna mungo* (Hussain *et al.* 2006) gibi birçok bitki türünde krom stresine bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Diğer taraftan, krom stresinin fasulye ve *Brassica juncea* bitkilerinde toplam klorofil birikiminde önemli bir artışa neden olduğu bildirilmiştir (Zeid 2001, Gupta *et al.* 2009). Mung fasulyesinin kroma toleranslı çeşitlerinde (TARM-22 ve K-851) toplam klorofil içeriğinin kontrole göre krom uygulamalarında arttığı, hassas çeşitlerde (PDM-54 ve Sujata) ise azaldığı belirlenmiştir (Samantaray 2002). Cr(VI) stresinin klorofil a ve b’de önemli azalmalara neden olduğu ve klorofil a’ya göre klorofil b’deki azalmanın daha fazla olduğu saptanmıştır (Subrahmanyam 2008, Pandey *et al.* 2009b). Krom stresi altındaki birçok bitkide klorofil biyosentez yolundaki enzimlerin inaktivasyonu klorofil içeriğindeki azalmaya neden olmaktadır (Shanker *et al.* 2005). Krom stresinde klorofil a/b oranındaki azalma, fotosentetik anten kompleksinin periferal kısmının boyutundaki azalmadan kaynaklanmaktadır (Shanker 2003). Klorofil b içeriğindeki azalmanın periferal kısımdaki proteinlerin degradasyonundan kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Klorofil a/b oranındaki azalma, klorofil b’ye göre klorofil a’nın daha hızlı bozulması ve klorofil a’nın sentezinin azalmasının bir sonucu olabileceği vurgulanmıştır (Vajpayee *et al.* 2001, Appenroth *et al.* 2003, Vernay *et al.* 2007).

Krom stresinin *Spirodella polyrrhiza* ve *Vallisneria spiralis* gibi sucul bitki türlerinde ve *Brassica juncea*’da karotenoidlerin içeriğinde bir artışa neden olduğu bildirilmiştir (Tripathi and Smith 2000, Vajpayee *et al.* 2001, Gupta *et al.* 2009). Karotenoidlerin içeriğinin düşük krom konsantrasyonlarında arttığı, buna karşın yüksek krom konsantrasyonlarında azaldığı belirtilmiştir (Zeid 2001, Sinha *et al.* 2005). Fotosentetik pigmentlerin bir kısmını oluşturan karotenoidler stres koşulları altında klorofil pigmentinin korunmasında önemli rol oynamaktadır. Krom stresi altındaki bitkilerde singlet oksijen ve süperoksit gibi reaktif oksijen türlerinin üretimi artabilmektedir. Krom stresine bağlı olarak meydana gelen lipid peroksidasyonu fotosentetik pigmentlerin degradasyonuna neden olmaktadır (Somashekaraiah *et al.* 1992). Bir antioksidant molekül olan karotenoidler reaktif oksijen türleri ile etkileşime girerek lipid peroksidasyonu gibi oksidatif stres zararlarının başlamasını engellemektedir (Panda and Choudhury 2005).

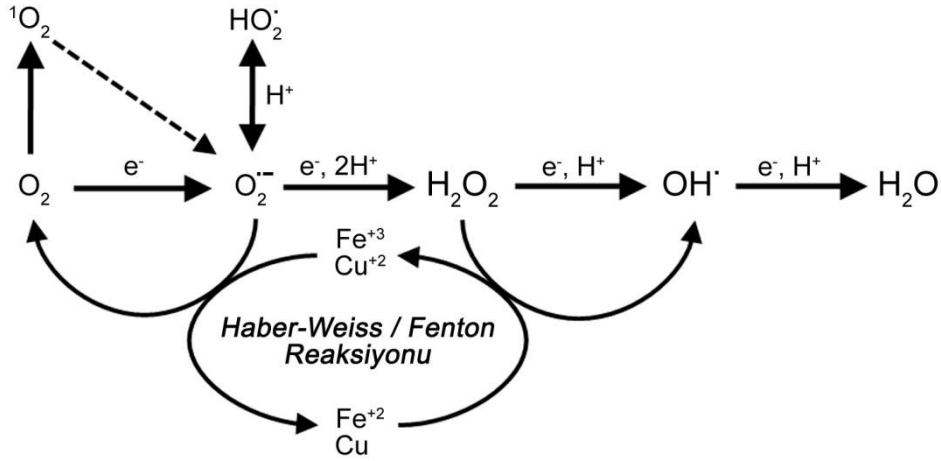


Yüksek krom konsantrasyonlarında klorofil içeriğindeki azalma, klorofil biyosentezi ve klorofilaz aktivitesi ile ilişkilidir (van Assche and Clijsters 1990). Krom, klorofil biyosentezinde görev alan önemli bir enzim olan  $\delta$ -aminolevülinik asit dehidratazi (ALAD) degrade edebilmekte ve böylelikle  $\delta$ -aminolevülinik asit (ALA) kullanımını etkileyerek bitki dokularında ALA birikimine ve klorofil içeriğinde azalmaya neden olmaktadır (Vajpayee *et al.* 2001). Bu sonuçlar, ALA sentezinin krom stresine hassas olmadığını, buna karşın porfobilinojen (PBG) oluşumunun krom stresine oldukça hassas olduğunu göstermektedir. Kromun genellikle hegzavalent formu birçok enzimin aktif bölgesindeki Mg iyonları ile yer değiştirmekte ve klorofil içeriğini azaltmaktadır (Vajpayee *et al.* 2001). Bir metalloenzim olan ALAD'ın aktivitesi, Mg iyonlarının kullanılabilirliğine bağlıdır (Ilag *et al.* 1994). Ayrıca, krom stresi bitkilerde demir eksikliğine neden olarak klorofil biyosentezinde bozulmalara neden olmaktadır (Barcelo *et al.* 1985). Demir eksikliği olan bitkilerde düşük krom konsantrasyonları klorozun azalmasına (Zayed *et al.* 1998) ve yüksek krom konsantrasyonları demir klorozuna neden olmaktadır (Schmidt 1996). Bununla birlikte, Fe eksikliği heme enzimlerinin aktivitesini azaltmaktadır (Chatterjee and Chatterjee 2000). Hegzavalent kroma maruz kalan bitkilerde demir kullanımının kısıtlanmasından dolayı klorofil içeriğindeki azalma, porfirinlerin öncüsü olan glisin ve süksinil Co-A'dan ALA'nın sentezi, koproporfirinojenin protoporfirin IX'a oksidasyonu veya Mg protoporfirinin protoklorofillite dönüştürülmemesinden kaynaklanmaktadır (Marschner 2002).

## 2.5 Krom, Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri

Ağır metaller, bitkilerde stres cevabı olarak reaktif oksijen türlerinin (ROT'lar) oluşumunu teşvik etmektedir (Dietz *et al.* 1999). ROT'lar, serbest radikallerin en yaygın formu olan "serbest oksijen radikalleri"dir. Moleküler oksijen, aşırı enerjiyle eşleşmemiş elektronlarından birinin ters dönmesiyle aktive olabilmekte ve singlet oksijen ( $^1O_2$ ) oluşmaktadır (Şekil 2.2). Bununla birlikte, moleküler oksijene bir, iki veya üç elektronun transferi sonrasında sırasıyla süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) veya hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) meydana gelmektedir. Son aşamada  $OH^{\cdot}$  radikale bir elektronun transferiyle birlikte su ( $H_2O$ ) oluşmaktadır. Hidroperoksil radikali ( $HO_2^{\cdot}$ ),  $O_2^{\cdot-}$ 'in konjuge asidi olarak reaksiyonda yerini almaktadır (Vranová *et al.* 2002).

Bununla birlikte, hücrelerde yükseltgenmiş formda bulunan metal iyonları ( $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ),  $\text{O}_2^{\cdot-}$  varlığında indirgenmekte ve böylece Fenton ya da Haber-Weiss reaksiyonları aracılığıyla  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'in  $\text{OH}^{\cdot}$  radikaline dönüşümü katalizlenmektedir (Şekil 2.2) (Vranová *et al.* 2002).

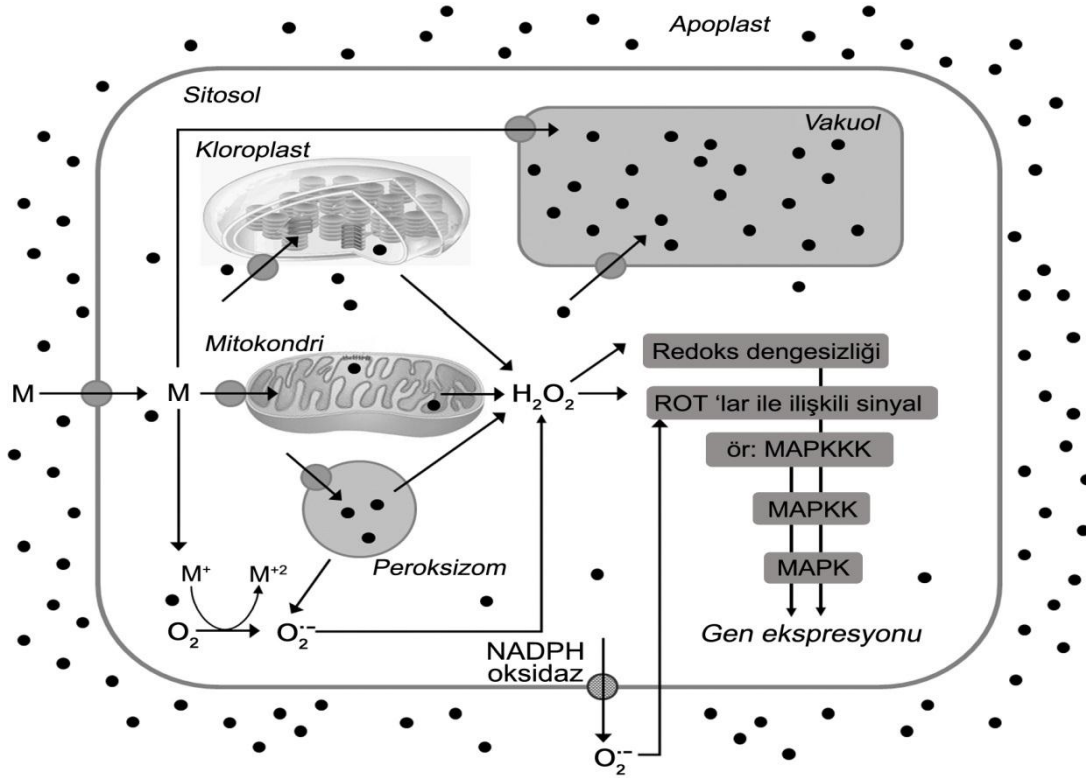


**Şekil 2.2** Moleküler oksijenden ( $\text{O}_2$ ) reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonu (Vranová *et al.* 2002'den değiştirilerek).

Hücredeki oksidatif stresin seviyesi reaktif oksijen türlerinin miktarı ile belirlenmektedir (Foyer and Noctor 2003). Abiyotik ve biyotik stresler tarafından oluşturulan metabolik dengesizliğe cevap olarak hücrel ROT üretimi artmakta ve sürdürülmektedir (Mithofer *et al.* 2004, Moller *et al.* 2007). Birçok abiyotik ve biyotik stresin ortak sonucu olan ROT'lar, krom toksisitesinin sonucu olarak da oluşmaktadır (Dixit *et al.* 2002, Choudhury and Panda 2004). Cr(VI)'un toksik etkisi, hücre membranlarındaki sülfat kanallarından geçebilen negatif yüklü Cr(VI) iyon komplekslerinin etkisiyle oluşan ROT'lardan kaynaklanmaktadır (Kaszycki *et al.* 2005). Stres koşullarında ROT'ların artan üretimi hücreler için bir tehdit olabilmekte; fakat ROT'ların stres cevabı ve savunma yollarının aktivasyonunda bir sinyal molekülü olarak fonksiyon gördüğü düşünülmektedir (Knight and Knight 2001). Bu nedenle, ROT'ların hücrel stres indikatörleri ve stres-cevap sinyal iletim yollarında sekonder mesajcı olduğu belirtilmiştir (Mittler 2002).

Reaktif oksijen türleri kimyasal reaktivite, redoks potansiyeli, yarılanma ömrü ve hücrel kompartımanlar arasında hareketliliğe bağlı olarak hücre bileşenleri ile

reaksiyona girmektedir. ROT'lar geri dönüşümlü veya dönüşümsüz olarak proteinlerde oksidatif modifikasyonlara neden olmaktadır. Bu aktivite organelle özgü şekilde farklılık gösterebilmektedir (Sharma and Dietz 2008). Örneğin, Cd stresine maruz kalmış bezelyede, peroksizomlardaki protein karbonilasyonunun toplam bitki ekstraktına göre daha yüksek seviyede olması, peroksizomlarda daha fazla ROT üretimi olduğunu açıklamaktadır (Romero-Puertas *et al.* 2002). Bitkilerde ROT'ların üretimi için kloroplast ve mitokondrilerin elektron transfer aktiviteleri ve peroksizomlardaki oksidatif metabolizma potansiyel kaynaklar olarak gösterilmektedir (Şekil 2.3, Çizelge 2.2). Diğer bir ifadeyle, ROT'ların üretimi fotosolunum, fotosentetik aparatlar ve mitokondriyal solunum gibi metabolik yollardan kaynaklanmaktadır (Hammond-Kosack and Jones 1996, Pei *et al.* 2000).



**Şekil 2.3** Ağır metal bağımlı reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretim yolları. Ağır metaller (M) taşıyıcılar tarafından hücre içine alınır ve ağır metal redoks aktivitesiyle veya subsektör bölgeye özgü şekilde metabolizmayı etkileyerek organellerde ROT'ların oluşumuna neden olmaktadır. Plazma membranında lokalize olmuş NADPH oksidaz enziminin ağır metal bağımlı aktivasyonu da ROT'ların üretilmesine neden olmaktadır. ROT'ların aşırı üretimi, bitki büyümesi inhibisyonuna ve hücre zararına neden olabilen redoks dengesizliklerine ve sinyal işlevlerinde (MAPK yolları gibi) bozukluklara neden olmaktadır. Siyah benekler, apoplastta ve hücre içinde ağır metal (M) dağılımını göstermektedir (Sharma and Dietz 2008'den değiştirilerek).

**Çizelge 2.2** Bitkilerde reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretim, savunma ve sakınım mekanizmaları (Mittler 2002'den değiştirilerek)

<b>Mekanizma</b>	<b>Lokalizasyon</b>	<b>ROT'lar</b>
<b>Üretim</b>		
Fotosentetik ET, PSI, PSII	Klo*	$O_2^{\cdot-}$
Mitokondriyal ET	Mit	$O_2^{\cdot-}$
Glikolat oksidaz	Per	$H_2O_2$
Uyarılmış klorofil	Klo	$^1O_2$
NADPH oksidaz	PM	$O_2^{\cdot-}$
Yağ asidi $\beta$ -oksidasyonu	Per	$H_2O_2$
Oksalat oksidaz	Apo	$H_2O_2$
Ksantin oksidaz	Per	$H_2O_2, O_2^{\cdot-}$
Peroksidazlar, $Mn^{+2}$ ve NADH	HÇ	$O_2^{\cdot-}$
Amin oksidaz	Apo	$H_2O_2$
<b>Savunma</b>		
Süperoksit dismutaz	Klo, Sit, Mit, Per, Apo	$O_2^{\cdot-}$
Askorbat peroksidaz	Klo, Sit, Mit, Per, Apo	$H_2O_2$
Katalaz	Per	$H_2O_2$
Glutatyon peroksidaz	Sit	$H_2O_2, ROOH$
Peroksidazlar	HÇ, Sit, Vak	$H_2O_2$
Tiyoredoksin peroksidaz	Klo, Sit, Mit	$H_2O_2$
Askorbik asit	Klo, Sit, Mit, Per, Apo	$H_2O_2, O_2^{\cdot-}$
Glutatyon	Klo, Sit, Mit, Per, Apo	$H_2O_2$
$\alpha$ - tokoferol	Membranlar	$ROOH, ^1O_2$
Karotenoidler	Klo	$^1O_2$
<b>Sakınım</b>		
Anatomik adaptasyon	Yaprak yapısı, Epidermis	$O_2^{\cdot-}, H_2O_2, ^1O_2$
C4 veya CAM metabolizması	Klo, Sit, Vak	$O_2^{\cdot-}, H_2O_2$
Kloroplast hareketi	Sit	$O_2^{\cdot-}, H_2O_2, ^1O_2$
Fotosentezin baskılanması	Klo	$O_2^{\cdot-}, H_2O_2$
PS ve anten modülasyonu	Klo	$O_2^{\cdot-}, ^1O_2$
Alternatif oksidaz (AOX)	Klo, Sit	$O_2^{\cdot-}$

\*Apo: Apoplast, ET: Elektron transferi, HÇ: Hücre çeperi, Klo: Kloroplast, Mit: Mitokondri, Per: Peroksizom, PM: Plazma membranı, PS: Fotosistem, Sit: Sitosol, Vak: Vakuol

Fotosistemler arası elektron taşıyıcıları aşırı indirgendiğinde, PSII reaksiyon merkezindeki triplete uyarılmış P680 ve ışık toplayan anten sistemindeki triplet klorofiller oluşur. Bunun sonucu olarak singlet oksijen ( $^1O_2$ ) oluşmaktadır (Krieger-Liszkay 2005). Singlet oksijen fotosentetik membranlarda karotenoid ve tokoferoller tarafından elimine edilmektedir (Mittler *et al.* 2004, Van Breusegem and Dat 2006).

Stres koşullarına maruz kalan bitkilerde plazma membranına bağlı NADPH oksidazın önemli bir ROT kaynağı olduğu bildirilmiştir (Apel and Hirt 2004). Plazma membranına bağlı NADPH oksidazın, Cd stresine maruz kalan bezelye (Rodriguez-Serrano *et al.* 2006) ve Pb stresine maruz kalan bakla (Pourrut *et al.* 2007) bitkilerinde ROT oluşumundan sorumlu olduğu rapor edilmiştir.

Mitokondriler tarafından metabolize edilen  $O_2$ 'in yaklaşık %1-5'i reaktif oksijen türlerine dönüştürülmektedir (Moller *et al.* 2007). Bitkilerde toksik ve orta seviyedeki kromun mitokondrideki elektron transfer sistemine bağlandığı (Panda and Choudhury 2005) ve eşleşmemiş elektron transfer zincirini inhibe ettiği (Dixit *et al.* 2002) bildirilmiştir. Dixit vd. (2002), krom tarafından elektron transferindeki inhibisyonun, kromun elektron taşıyıcılarındaki Cu ve Fe ile etkileşime girmesinden kaynaklandığını belirtmiştir. Bu etkileşim elektron akışı sırasında redoks değişimlerine neden olmaktadır. Mitokondri sitokromları elektronları direkt olarak Cr'a transfer ederek kromu indirgemekte veya sitokromların indirgenmiş heme grupları Cr bağlanma bölgeleri olarak fonksiyon görmekte ve elektron transferini bloke edebilmektedir. Sitokrom oksidaz aktivitesinin aşırı inhibisyonu, kompleks IV'deki oksijen bölgesi olan sitokrom  $a_3$ 'e kromun bağlanmasından kaynaklanabilmektedir (Dixit *et al.* 2002). Diğer bir alternatif mekanizma mitokondrilerde süperoksit radikalinin üretimidir (Vranova *et al.* 2002). Farklı konsantrasyonlarda Cr uygulamalarına maruz kalan bezelye bitkilerinde, kök mitokondrilerinin sitokrom b bölgesinde (kompleks III) süperoksit üretiminin arttığı belirtilmiştir (Dixit *et al.* 2002).

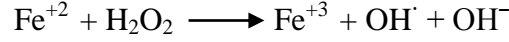
Birçok hücrel işlev sırasında üretilebilen süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ) bir dereceye kadar reaktif olup; biyolojik membranlardan geçememektedir (Choudhury and Panda 2005). Kloroplast ve mitokondrilere benzer olarak peroksizomlarda normal metabolizma

sonucu  $O_2^{\cdot-}$  radikallerini oluşturmaktadır. Diğer taraftan, ksantin oksidaz ve NADPH bağımlı oksidazın peroksizomal aktiviteleri  $O_2^{\cdot-}$ 'i oluşturmakta ve glikolat oksidaz, flavin oksidaz ve  $\beta$ -oksidasyon ile katalaz tarafından metabolize edilen  $H_2O_2$  üretilmektedir (del Rio *et al.* 2006). Ksantin oksidaz, ksantin ve hipoksantin ürik aside oksidasyonunu katalizler ve iyi bilinen bir  $O_2^{\cdot-}$  üreticisidir (Halliwell and Gutteridge 2000). Krom stresinin bezelye köklerinde NADPH oksidaz aktivitesi ve NADPH bağımlı  $O_2^{\cdot-}$  üretimini arttırdığı ve bu artışın yüksek lipid peroksidasyonu seviyesi ile ilişkili olduğunu belirtmiştir (Pandey *et al.* 2009a).

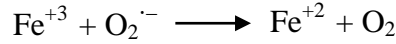
Birçok ökaryotik organizmada olduğu gibi bitki hücrelerinin peroksizomları hücre-içi  $H_2O_2$  üretiminin önemli merkezleridir. Peroksizomlarda  $H_2O_2$ 'in oluşumundan sorumlu temel metabolik işlevler fotosolunumdaki glikolat oksidaz reaksiyonu, yağ asidi  $\beta$ -oksidasyonu, flavin oksidazların enzimatik reaksiyonları ve  $O_2^{\cdot-}$  radikallerinin metabolize edilmesi gibi reaksiyonları içermektedir (Baker and Graham 2002, del Rio *et al.* 2002, Foyer and Noctor 2003).  $H_2O_2$  okside edici ajan olarak fonksiyon görebilmekte ve Cr(III)'ü Cr(VI)'a okside edebilmektedir (Rock *et al.* 2001). Diğer taraftan, L-sistein ve NADPH gibi biyolojik redüktanlar tarafından Cr(III) Cr(II)'a indirgenebilmektedir. Sonuçta, yeni oluşan Cr(II), köklerde doku zararına neden olan  $OH^{\cdot}$  radikalini oluşturmak üzere  $H_2O_2$  ile reaksiyona girmektedir (Vazquez *et al.* 1987). Krom stresine maruz kalan darı ve bezelye bitkilerinin kök ve yapraklarında  $H_2O_2$  seviyesinin arttığı bildirilmiştir (Shanker and Pathmanabhan 2004, Pandey *et al.* 2009a, b). Krom stresine maruz kalan birçok bitki türünde yüksek oranda  $H_2O_2$  ve  $O_2^{\cdot-}$  radikalinin oluştuğu ve bu metalin oksidatif stresin oluşumundan sorumlu olduğu bildirilmiştir (Dixit *et al.* 2002, Panda 2003, Panda and Khan 2003, Choudhury and Panda 2004, Panda 2007, Karuppanapandian and Manoharan 2008).

Hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ), hücre metabolizmasında  $O_2$ 'nin monovalent indirgenmesi ile oluşan oldukça reaktif bir radikal olup; bitkilerde oksijenin sitotoksik etkilerinden sorumludur (Halliwell and Gutteridge 1992). Oldukça kısa ömürlü olan  $OH^{\cdot}$  radikali, oluştuğu bölgeden birkaç nanometreden daha az uzaklıktaki difüzyon alanı kapsamında lokalize olan polisakkarit, protein ve nükleik asitlerde zarara neden olabilmektedir (Hippeli and Elstner 1997). Herbisit etkisi (Babbs *et al.* 1989), hücre ölümü (Tiedemann

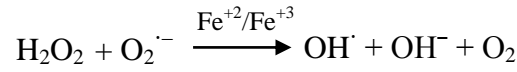
1997) ve patojen savunma reaksiyonları (McCormick *et al.* 1994) gibi hücrel olaylarda hidroksil radikali fonksiyon görmektedir. Genel olarak, OH<sup>·</sup>'in biyolojik sistemlerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den Fenton reaksiyonu ile oluşmaktadır:



Reaksiyondaki Fe<sup>+2</sup> süperoksitin oksidasyonu ile yeniden oluşturulabilmektedir:



Bu reaksiyonların kombinasyonu demir iyonları ile kataliz edilen Haber-Weiss reaksiyonu olarak ifade edilmektedir:



Krom stresine maruz kalan bezelye bitkilerinin yapraklarında OH<sup>·</sup> üretiminin arttığı bildirilmiştir (Pandey *et al.* 2009b). Bununla birlikte, DNA molekülü büyük ölçüde OH<sup>·</sup> ve <sup>1</sup>O<sub>2</sub> radikalleri tarafından okside olmasına karşın O<sub>2</sub><sup>·-</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in etkisi daha düşüktür (Breen and Murphy 1995).

### 2.5.1 Lipit Peroksidasyonu

Bitkilerde krom stresi, oksidatif strese ve lipit peroksidasyonuna neden olan reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olarak metabolik değişikliklere yol açmaktadır (Shanker *et al.* 2005, Sinha *et al.* 2005, Montes-Holguin *et al.* 2006). Hücre zarı lipitlerinin peroksidasyonu, membranların fonksiyonu ve bütünlüğünü olumsuz etkilemekte ve hücre fonksiyonlarında geri dönüşümsüz zarara neden olabilmektedir (Halliwell and Gutteridge 1989, Dixit *et al.* 2002, Panda 2002).

Lipit peroksidasyonu hücre membranı ve yapısında bulunan doymamış yağ asitlerinin oksidasyonudur. Bu yağ asitlerinin peroksidasyonunun bir sonucu olarak ortaya çıkan malondialdehit (MDA) gibi sitotoksik aldehitler DNA ve proteinler üzerinde önemli zararlara neden olmaktadır. MDA içeriği, lipit peroksidasyonunun bir indeksi olarak kabul edilmekte ve yüksek seviyede MDA birikimi aşırı lipit peroksidasyonunu göstermektedir (Panda and Choudhury 2005). Birçok araştırmada krom stresinin bitki dokularında MDA içeriğini arttırdığı belirlenmiştir (Sinha *et al.* 2005, Panda 2007, Liu *et al.* 2008, Pandey *et al.* 2009a, b). Krom stresine maruz kalan çeltik, darı ve hardal

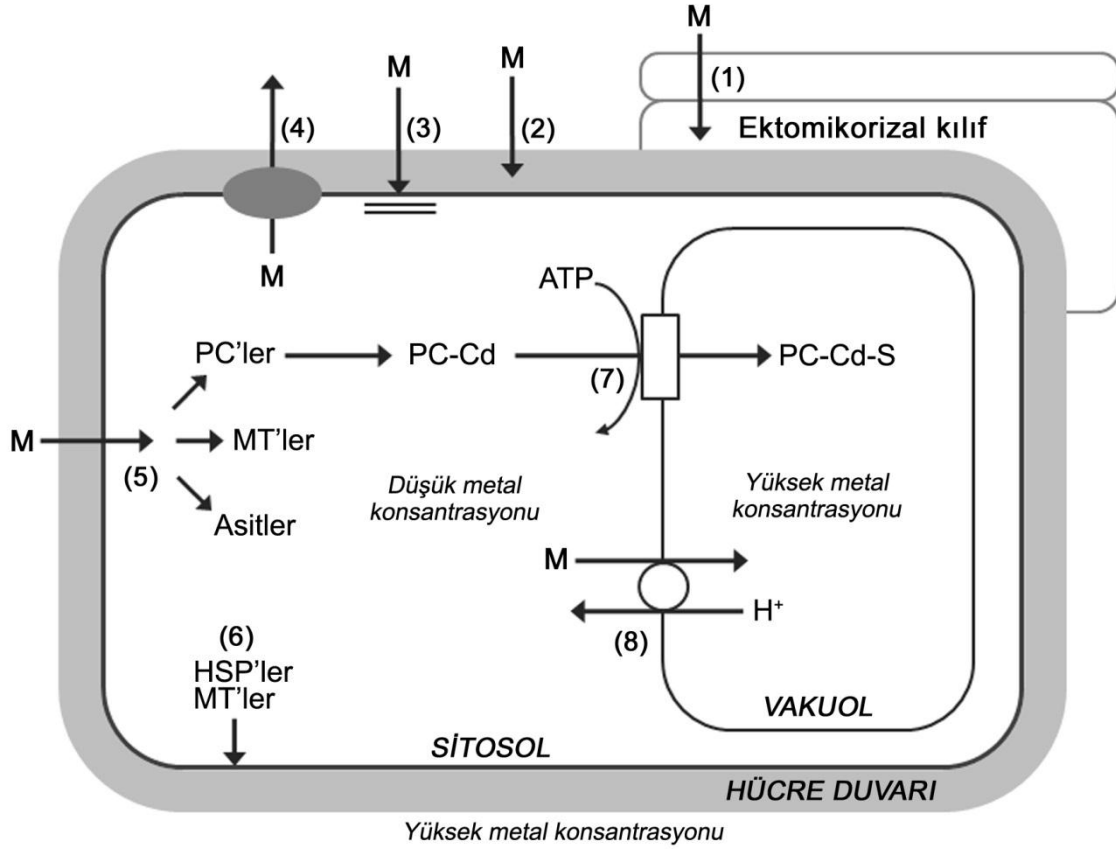
bitkilerinin kök ve yaprak dokularında MDA içeriğinin arttığı ve bu artışın yüksek  $O_2^{\cdot-}$  ve  $H_2O_2$  içeriği ve oldukça toksik olan  $OH^{\cdot}$  radikali ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Shanker and Pathmanabhan 2004, Choudhury and Panda 2005, Pandey *et al.* 2005, Panda 2007).

Birçok araştırmada, krom stresine bağlı olarak meydana gelen reaktif oksijen türlerinin üretimindeki artış ile lipid peroksidasyonundaki artışın birlikte gözlemlendiği bildirilmiştir (Dixit *et al.* 2002, Panda *et al.* 2003, Choudhury and Panda 2004, Pandey *et al.* 2005, Panda 2007). Panda vd. (2003), buğdayda farklı Cr konsantrasyonlarının (1, 10 ve 100 mM) lipid peroksidasyonunu başlattığı ve malondialdehit miktarının konsantrasyon ve süreye bağlı olarak arttığını bildirmiştir. *Taxithelium nepalense* ve *Polytichum commune* gibi türlerde de farklı krom uygulamalarının ROT oluşumuna bağlı olarak lipid peroksidasyonunu başlattığı belirtilmiştir (Choudhury and Panda 2004). Krom stresi uygulanmış bezelye köklerinde, membranların zarar görmesinin sonucu olarak elektrolit sızıntısının özellikle 200  $\mu$ M Cr(VI) uygulamasında lipid peroksidasyonuna bağlı olarak arttığı bildirilmiştir (Pandey *et al.* 2009a). Farklı Cr(VI) konsantrasyonu ve uygulama sürelerine maruz bırakılan çeltik bitkilerinin köklerinde MDA içeriğinin zamanın bir fonksiyonu olarak arttığı bildirilmiştir (Panda 2007). Liu vd. (2008),  $10^{-5}$  ve  $10^{-4}$  M Cr(VI) stresine maruz kalan *Amaranthus viridis* bitkisinde MDA içeriğinin sırasıyla %10.9 ve %25.4 oranında arttığı ve bu artışın bitki dokusunda Cr birikimindeki artışla paralellik gösterdiğini bildirmiştir. Buğday bitkisinin yaprak dokusunda MDA içeriğinin Cr(VI) konsantrasyonları (0.10, 0.15 ve 0.25 mM) ve sürelerinin (8 ve 14 sa) artışına bağlı olarak arttığı bildirilmiştir (Subrahmanyam 2008). Farklı konsantrasyon (0-200  $\mu$ M) ve sürelerde (1-7 gün) Cr(VI) stresine maruz bırakılan hiperakümülatör *Brassica juncea*'nın *Vigna radiata*'ya göre daha fazla krom biriktirdiği, buna karşın *Brassica juncea* gövdesinde MDA içeriğinin daha düşük oranda (%) arttığı belirtilmiştir (Diwan *et al.* 2010). Alüminyuma toleranslı Gebenia ve hassas Shang 70-119 arpa çeşitlerinde 100  $\mu$ M Cr(VI) uygulamasının kök ve yaprak dokularında MDA içeriğini arttırdığı ve bu artışın hassas çeşitte nispeten daha fazla olduğu bildirilmiştir (Ali *et al.* 2011).



## 2.6 Krom Detoksifikasyon Mekanizmaları

Bitkiler ağır metallerin detoksifikasyonu ve bu metallere karşı toleransı sağlayan kompleks hücresel mekanizmalara sahiptir (Cobbett and Goldsbrough 2002). Bu mekanizmalar, fitoşelatinler (PC'ler) ve metallothioneinler (MT'ler) olarak adlandırılan metal bağlayıcı ligandlar tarafından ağır metal iyonlarının şelatlanması ve alıkonulmasını kapsamaktadır (Cobbett 2002, Cobbett and Goldsbrough 2002). Bununla birlikte, ağır metallerin detoksifikasyonunda fonksiyon gören mekanizmalar arasında vakuolar kompartımanlaşma, sıcaklık şoku proteinleri, hücre çeperine veya kök salgılarına bağlanma ve mikorizalar tarafından köklere metal alımının kısıtlanması gösterilmektedir (Şekil 2.4) (Hall 2002).



**Şekil 2.4** Bitki hücrelerinde ağır metal detoksifikasyonu ve toleransında potansiyel mekanizmalar. (1) Mikorizalar tarafından köklere metal hareketinin azaltılması. (2) Hücre çeperi ve kök salgılarına bağlanma. (3) Plazma membranı tarafından hücre içine ağır metal alımının azaltılması. (4) Apoplastta aktif olarak ağır metallerin atılması. (5) Çeşitli ligandlar ile ağır metallerin sitosolde şelatlanması. (6) Plazma membranının korunması ve onarımı. (7) Vakuollere PC-Cd komplekslerinin transportu. (8) Ağır metallerin vakuolde biriktirilmesi (Marschner 1995'den değiştirilerek).

### 2.6.1 Organik Asitler

Kökler, toprakta çözünmez formda bulunan metallere bağlanan organik asitler içermektedir. Sitrik asit ve malik asit gibi karboksilik asitler ve histidin gibi amino asitler metaller için potansiyel ligandlardır ve detoksifikasyon ve toleransta önemli rol oynayabilmektedir (Rauser 1999, Clemens 2001).  $Al^{+3}$  ve  $Ni^{+2}$  detoksifikasyonunun düzenlenmesinde sitrik asidin rolü açıkça belirlenmiştir (Yang *et al.* 2003). Bununla birlikte, organik asitler toprakta hareketsiz halde bulunan metallerin ekstraksiyonunun artırılmasında kullanılmaktadır (Wu *et al.* 2003). Kök sızıntıları, eser metallerle kompleksler oluşturan ve bu metallerin redoks davranışlarını etkileyen önemli ajanlardır (Caltado *et al.* 1988). Kök sızıntıları Cr bileşikleri ile kompleksler oluşturarak bitki alınımı için kullanılabilir hale getiren organik asitler içermektedir (Barlett and James 1988). *Lycopersicum esculentum* bitkilerinde karboksilik asit ve amino asitlerin varlığında Cr alınımının arttığı gösterilmiştir (Srivastava *et al.* 1999). Bununla birlikte, amino asitlerin krom transportunda daha az etkili olduğu bulunmuştur (Srivastava *et al.* 1999). Sitrik asit, aspartik asit ve oksalik asit gibi organik asitler inorganik kromu organik olarak bağlı kroma dönüştürerek daha uzun süre çözünebilir ve dolayısıyla bitki için kullanılabilir hale getirmektedir (James and Barlett 1983). Krom stresine maruz kalan çeltik bitkilerinin kök dokularından salınan oksalik, malik ve sitrik asidin rizosfer pH'ını azalttığı ve bu durumunun Cr birikimini arttırdığı bildirilmiştir (Zeng *et al.* 2008). Bununla birlikte, *Albizzia amara*, *Casuarina equisetifolia*, *Tectona grandis* ve *Leucaena leucocephala* gibi bazı ağaç türlerinde 20 mM sitrik asit uygulamasının kök dokusunda Cr(III) ve Cr(VI) birikimini arttırdığı bildirilmiştir (Shanker *et al.* 2005). Benzer olarak, krom stresine maruz kalan *Datura innoxia* bitkilerinde sitrik asidin krom alınımlarını ve birikimlerini arttıran bir şelatör olduğu bildirilmiştir (Jean *et al.* 2008).

### 2.6.2 Antioksidant Enzimler

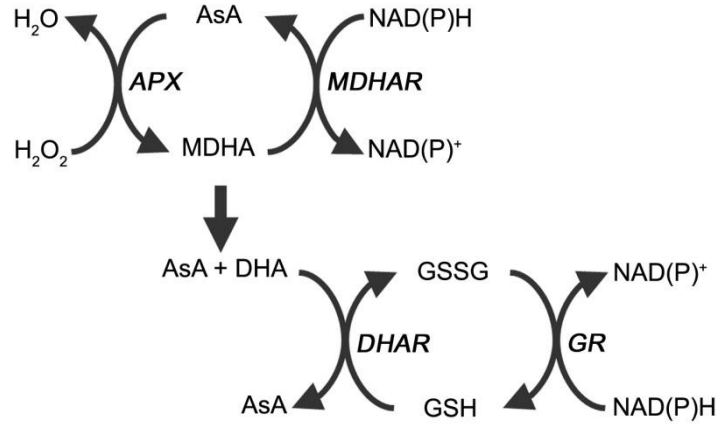
Birçok aerobik organizmada, çevresel streslerin sonucu olarak oluşan toksik reaktif oksijen türlerinin (ROT'lar) etkin şekilde elimine edilmesi gerekmektedir. Hücresel fraksiyonlardaki ROT'ların seviyesi, çoklu ROT üreten metabolik yollar (solunum, fotosentez, NADPH oksidaz, amin oksidaz ve hücre çeperine bağlı peroksidaz) ve

temel ROT döngüsünü oluşturan temizleme mekanizmaları arasındaki etkileşim ile belirlenmektedir (Mittler 2002, Liskay *et al.* 2004, Karuppanapandian *et al.* 2006a, b). Reaktif oksijen türlerinin seviyesini kontrol etmek ve hücreleri oksidatif zarardan korumak için bitkiler tarafından geliştirilen karmaşık antioksidant savunma sistemi çeşitli enzimleri ve enzimatik olmayan molekülleri içermektedir (Vranova *et al.* 2002). Bitkilerdeki antioksidant enzimler süperoksit dismutaz (SOD: EC 1.15.1.1), katalaz (CAT: EC 1.11.1.6), askorbat peroksidaz (APX: EC 1.11.1.11), guaiakol peroksidaz (POD: EC 1.11.1.7), glutatyon redüktaz (GR: EC 1.6.4.2), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR: EC 1.8.5.1) ve monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR: EC 1.6.5.4) gibi düşük molekül ağırlıklı enzimleri içermektedir (Noctor and Foyer 1998). Diğer taraftan, indirgenmiş glutatyon (GSH), askorbat (AsA), vitamin C ve E, lipoik asit, antosiyanin, karotenoidler ve tokoferoller gibi enzimatik olmayan antioksidantların oksidatif strese karşı koruma sağladığı bilinmektedir (Gupta *et al.* 2005).

Süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzimlerinin teşviki ve aktivasyonu bitkilerdeki önemli metal detoksifikasyon mekanizmalarındandır (Shanker *et al.* 2003). SOD ve CAT enzimlerinin kombine etkisi oksidatif stresin etkilerini hafifletmede önemlidir. Çünkü SOD enzimi  $O_2^{\cdot-}$ 'in diğer bir reaktif aracı olan hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) dönüştürülmesinde ve peroksizomlarda lokalize olan ve heme içeren CAT enzimi ise  $H_2O_2$ 'in  $H_2O$  ve  $O_2$ 'e dönüştürülmesinde etkilidir (Kono and Fridovich 1983, Liskay *et al.* 2004). Düşük Cr(VI) konsantrasyonu ( $1 \mu M$ ) uygulamalarının kök ve yaprak dokusunda SOD aktivitesinde önemli artışa neden olması, bu enzimin savunma mekanizmasındaki rolünü göstermektedir. Katalaza benzer olarak peroksidazlar (APX ve POD),  $H_2O_2$ 'in detoksifikasyonunda fonksiyon görmektedir; fakat bu detoksifikasyonu çeşitli organik ve inorganik indirgenmiş ko-substratların (askorbik asit, glutatyon) oksidasyonu ile gerçekleştirmektedir (Mittler 2002).

Kloroplastlar ve diğer hücresel bileşenlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunan askorbik asit (AsA) ve glutatyon (GSH) gibi antioksidantlar bitkilerin oksidatif strese karşı olan savunma sisteminde oldukça önemlidir (Noctor and Foyer 1998). Bitkilerde yüksek seviyede indirgenmiş/yükseltgenmiş AsA ve GSH oranlarının sürdürülmesi hücrelerde etkin şekilde ROT'ların temizlenmesi için zorunludur. Bu oran indirgeyici

güç olarak NADPH kullanan glutatyon redüktaz (GR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) enzimleri tarafından sağlanmaktadır (Şekil 2.5) (Noctor and Foyer 1998, Mittler 2002).



**Şekil 2.5** Bitkilerde reaktif oksijen türlerini uzaklaştıran askorbat-glutatyon döngüsü (Mittler, 2002'den modifiye edilerek alınmıştır).

GSH-GSSG redoks çifti, sadece yeterli NADPH'nin ve NADPH havuzunun devamlılığı için hücrel bir sensör olarak görev yapan GSH'un var olduğu durumlarda etkin şekilde fonksiyon görmektedir (Potters *et al.* 2002). GSH sitosol, kloroplast, endoplazmik retikulum, vakuol ve mitokondri gibi birçok hücrel yapıda tespit edilmiştir. Glutatyonun reaktivite özelliğine ek olarak kısmi kararlılık ve suda yüksek çözünürlüğe sahip olması, glutatyonu ağır metal stresine karşı bitkileri koruyan bir kimyasal yapmaktadır (Foyer and Noctor 2005, Rausch *et al.* 2007). Bitkilerde GSH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyesinin kontrol edilmesinde fonksiyon görmektedir (Foyer and Noctor 2005, Shao *et al.* 2008). Hidrojen peroksidin degradasyonu sırasında indirgenmiş formun (GSH) okside forma (GSSG) oranında görülen değişiklik redoks sinyal yollarında oldukça önemlidir (Millar *et al.* 2003). Artan stres koşullarında zamana bağlı olarak gözlenen daha yüksek GR aktivitesine karşın indirgenmiş glutatyon (GSH) ve toplam glutatyonun tüketimi artmaktadır. Aynı zamanda, askorbik asidi oluşturan DHAR ile GSH'un okside glutatyona (GSSG) dönüşümünün artmasıyla antioksidant savunma mekanizması gerçekleşmektedir. DHAR ile üretilen askorbik aside ilave olarak MDHA'nın orantsız, enzimatik olmayan dönüşümü ile oluşturulan askorbik asit, APX tarafından H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in direkt olarak detoksifikasyonunda kullanılabilir (Şekil 2.5) (Mittler 2002). Ağır metal stresinde, APX ekspresyonunun artışında GSH bir sinyal

aracısı olarak fonksiyon görmektedir (Pekker *et al.* 2002; Karuppanapandian *et al.* 2006a). Liu vd. (1995), yüksek konsantrasyonda Cr(VI)'a maruz kalan tohumuz ve tohumlu bitki dokularında, askorbat ve GSH varlığında Cr(VI)'un kararsız Cr(V) ve Cr(IV) formları ile kararlı Cr(III) formuna indirgenebildiğini bildirmişlerdir.

Farklı ağır metal tiplerine bağı olarak değişiklik gösteren ağır metal teşvikli oksidatif strese antioksidant cevap, bitki türüne göre de değişiklik göstermektedir. SOD, CAT, APX, GR ve POD gibi antioksidant enzimlerin aktivitesi üzerine krom stresinin etkisi bazı bitki türlerinde değerlendirilmiştir (Samantaray 2002, Panda *et al.* 2003, Panda 2007, Subrahmanyam 2008). Çeltik bitkisinde 50-100 µM Cr(VI) uygulamalarının kök dokusunda SOD aktivitesini arttırdığı, buna karşın POD ve GR aktivitesinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Panda 2007). Bununla birlikte, 14 gün süreyle 0.10, 0.15 ve 0.25 mM Cr(VI) stresine maruz kalan buğday fidelerinin gövde dokusunda SOD aktivitesinin arttığı; ancak CAT, APX ve GR aktivitesinin azaldığı saptanmıştır (Subrahmanyam 2008). Buğdayın kök ve gövde dokusunda SOD ve CAT aktivitesinin azaldığı ve POD aktivitesinin kök dokusunda azaldığı, ancak gövde dokusunda arttığı bildirilmiştir (Dey *et al.* 2009). Panda vd. (2003), buğday fidelerinin yaprak dokusunda SOD aktivitesinin düşük konsantrasyonlardaki (0.1 ve 1 mM) krom uygulamalarında artarken yüksek konsantrasyonlarda (10 ve 100 mM) azaldığını; fakat CAT aktivitesinin tüm krom uygulamalarında azaldığını belirtmiştir. Dixit vd. (2002), bezelye köklerinde 20 µM Cr(VI) uygulamasının SOD aktivitesini arttırdığı, 200 µM Cr(VI) uygulamasının ise SOD aktivitesinde önemli bir inhibisyona neden olduğunu bildirmiştir. Krom stresine karşı hassas mung fasulyesi çeşitlerinde (PDM-54 ve Sujata) SOD, CAT ve APX aktivitesinin belirgin bir şekilde arttığı, buna karşın toleranslı çeşitlerde (TARM-22 ve K-851) ise enzim aktivitelerinin azaldığı rapor edilmiştir (Samantaray 2002). Diğer taraftan, 1.5 ppm Cr stresine maruz kalan *Echinochloa colona* bitkilerinde CAT ve APX aktivitesinin hassaslara göre toleranslı kalluslarda daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Samantaray *et al.* 2001). Alüminyuma toleranslı Gebenia ve hassas Shang 70-119 arpa çeşitlerinde 100 µM Cr(VI) uygulamasının kök ve yaprak dokularında SOD, APX, POD, CAT ve GR aktivitelerinde önemli artışa neden olduğu bildirilmiştir (Ali *et al.* 2011). Diwan vd. (2010), farklı konsantrasyon (0-200 µM) ve sürelerde (1-7 gün) Cr(VI) stresine maruz bırakılan ve fazla krom biriktiren *Brassica juncea* ve daha

az krom biriktiren *Vigna radiata* bitkilerinde SOD ve CAT aktivitesinin arttığını bildirmiştir. Bununla birlikte, APX ve GR aktivitesinin *B. juncea* bitkisinde tüm Cr(VI) uygulamalarında arttığı, buna karşın *V. radiata* bitkisinde sadece bir günlük uygulama süresinin sonunda arttığı belirlenmiştir. Diğer taraftan, GSH içeriğinin *B. juncea*'da Cr(VI) uygulamalarına bağlı olarak arttığı, *V. radiata*'da ise azaldığı rapor edilmiştir (Diwan *et al.* 2010). Cr(III) ve Cr(VI) uygulamalarına maruz kalan *Vigna mungo* L. Hepper cv. Co4 köklerinde CAT enziminin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indirgenmesine katılmadığı, buna karşın SOD enziminin O<sub>2</sub><sup>-•</sup>'in temizlenmesinde aktif olarak fonksiyon gösterdiği bildirilmiştir (Karuppanapandian and Manoharan 2008). Aynı araştırmacılar, Cr(III) ve Cr(VI) stresine maruz kalan bitkilerde oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in parçalanmasında APX aktivitesinin CAT enzime göre daha etkin olduğunu belirtmişlerdir. Bu durum, Willekens vd. (1997) tarafından APX'in bir hücreyi baştanbaşa geçebilmesi ve bir indirgeyici olan askorbik asit varlığında yüksek substrat afinitesine sahip olmasına karşın, CAT'ın peroksizomlarda lokalize olması ve düşük substrat afinitesine sahip olması ile açıklanmıştır. *Vigna mungo* köklerinde 100 µM Cr(VI) uygulamasının zamana bağlı olarak DHAR, MDHAR ve GR aktivitelerinde önemli artışa neden olduğu rapor edilmiştir (Karuppanapandian and Manoharan 2008). Bu araştırma sonuçlarına göre Cr(III) veya Cr(VI) uygulanmış *Vigna mungo* köklerinde MDHAR aktivitesinde bir artış olmamasına karşın, DHA içeriğinde önemli bir artış olmasının nedeni Noctor ve Foyer (1998) tarafından bildirildiği gibi bu metabolitin enzimatik olmayan yolla oluşmasıdır. Bu durum monodihidroaskorbatın (MDHA) kısa ömürlü olmasından veya Cr tarafından MDHAR enziminin inhibisyonundan kaynaklanabilmektedir (Karuppanapandian and Manoharan 2008). Cr(VI) stresi altında DHAR aktivitesindeki artış, bu enzimin ve dolayısıyla AsA konsantrasyonunda artışla sonuçlanan aşırı ROT üretimi ile ilişkili olabilmektedir. Cr(VI) uygulamalarında artmış AsA içeriği DHAR enziminin döngüsel fonksiyonu ile açıklanabilmektedir (Karuppanapandian and Manoharan 2008).

Reaktif oksijen türlerinin (serbest radikal) oluşumu ve savunma mekanizmaları arasındaki denge, bitkilerin yaşam döngülerini sürdürebilmeleri için oldukça önemlidir. Antioksidant enzimlerin aktivitesindeki artış, elektron taşıma zincirinin Cr-teşvikli inhibisyonu ile oluşan serbest radikallere direkt bir cevap olabilmektedir. Bununla

birlikte, Cr konsantrasyonunun artışına bağlı olarak antioksidant enzimlerin aktivitesindeki azalma enzim sistemleri üzerine Cr iyonlarının inhibe edici etkisinden kaynaklanabilmektedir (Shanker *et al.* 2005).

### 2.6.3 Krom Stresi ve Prolin Birikimi

Bitkilerde prolin birikiminin tuzluluk, kuraklık, yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık, ağır metal, patojen enfeksiyonu, besin kıtlığı, atmosferik kirlenme ve UV ışına gibi stres durumlarında genellikle arttığı bildirilmiştir (Verbruggen and Hermans 2008, Vernay *et al.* 2008, Demirevska *et al.* 2010). Prolinin ağır metal stresi sonucu oluşan reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunda fonksiyon görerek stresi azalttığı vurgulanmıştır (Siripornadulsil *et al.* 2002).

Bitkilerde yaygın olarak bulunan ve diğer amino asitlere oranla daha fazla miktarda biriken prolin, kullanılabilir azot birikimini düzenlemektedir (Abraham *et al.* 2003). Bitki dokularında prolin birikimi;

- (1) Prolin degradasyonundaki azalma,
- (2) Prolin biyosentezindeki artma,
- (3) Protein sentezindeki veya prolin kullanımındaki azalma,
- (4) Proteinlerin hidrolizinden kaynaklanabilmektedir (Yoshida *et al.* 1997).

Prolin glutamat veya ornitinden sentez edilebilmesine rağmen, prolin öncelikli olarak glutamattan sentezlenmektedir. Prolin sentezinde üç enzimatik aktivite rol oynamaktadır:

- (1)  $\Delta^1$ -pirrolin karboksilat sentetazın  $\Delta^1$ - $\gamma$ -glutamil kinaz aktivitesi,
- (2)  $\Delta^1$ -pirrolin karboksilat sentetazın glutamik- $\gamma$ -semialdehid dehidrogenaz aktivitesi,
- (3)  $\Delta^1$ -pirrolin karboksilat redüktazın iki izogeni glutamatu proline dönüştürmektedir.

Ağır metal stresi sonucu oluşan reaktif oksijen türleri çoklu doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek membran lipitlerinin peroksidasyonuna neden olmaktadır (Halliwell

and Gutteridge 2004). Lipit peroksidasyonunun neden olduğu hücre zararı, membran geçirgenliğini değiştirerek su stresine benzer koşullar oluşturmakta ve bu durum prolin sentezini teşvik etmektedir (Sinha and Gupta 2005). Kadmiyum (Cd) stresi altındaki bitkilerde prolin birikiminin su potansiyelindeki Cd-teşvikli azalma ile arttığı ve su kıtlığının prolin ile iyileştirilmesinin Cd toleransına katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Costa and Morel 1994). Şelatlama özelliği ile prolinin metal iyonlarını bağlayabilmesi, bitkilerin ağır metal stresi altında hayat döngülerini tamamlayabilmesine katkıda bulunmaktadır (Sinha and Saxena 2006). Maggio vd. (2002), adaptasyonda bir sinyal düzenleyici molekül olarak prolinin fonksiyon gördüğünü ileri sürmüştür. Proteinojenik bir amino asit olan prolin ozmolit, radikal temizleyicisi, makromolekül stabilize edici ve hücre duvarı bileşeni olarak fonksiyon görmektedir (Matysik *et al.* 2002). Prolinin, proteinlerin yapısını stabilize eden moleküler şaperonlar olarak fonksiyon gördüğü ve prolin birikiminin sitosolik pH'ı ve hücrenin redoks durumunu dengede tutabildiği düşünülmektedir. Prolin birikimi stres cevabını etkileyen stres sinyalinin bir parçası olabilmektedir (Maggio *et al.* 2002, Ashraf and Foolad 2007, Molinari *et al.* 2007).

Prolin krom gibi birçok ağır metal stresine cevap olarak yüksek miktarlarda bitki dokularında birikmektedir (Panda *et al.* 2003, Tripathi and Gaur 2004, Rai *et al.* 2004, Vernay *et al.* 2008, Ganesh *et al.* 2009). Krom stresine maruz kalan *Datura innoxia*'nın kök ve yaprak dokusunda prolin birikiminin krom konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı ve bu artışın Cr(III)'a göre Cr(VI) uygulamasında daha fazla olduğu bildirilmiştir (Vernay *et al.* 2008). Aynı araştırmacılar, prolin birikiminin krom toleransının bir göstergesi olmadığı, aksine krom toksisitesinin bir semptomu olduğunu ileri sürmüştür. Diğer taraftan, kroma toleranslı soya fasulyesi (*Glycine max* L. Merr.) genotiplerinde prolin içeriğinin yüksek olduğu ve krom konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak prolin içeriğinin kademeli olarak arttığı belirtilmiştir (Ganesh *et al.* 2009). Ozmotik düzenleme, sitoplazmik enzimlerin korunması, stres sonrası büyüme için karbon ve azot kaynağı olması, membranların daha kararlı hale getirilmesi, protein sentezinde görev alması ve redoks potansiyeli düzenlenmesi gibi birçok fonksiyona sahip olmasından dolayı prolin birikimi krom toksisitesinin üstesinden gelebilmek için bitkiler tarafından geliştirilmiş bir adaptasyon stratejisi olarak düşünülmektedir (Rout and Shaw 1998, Rai *et al.* 2004, Ganesh *et al.* 2009).



#### 2.6.4 Metal Bağlayıcı Ligandlar

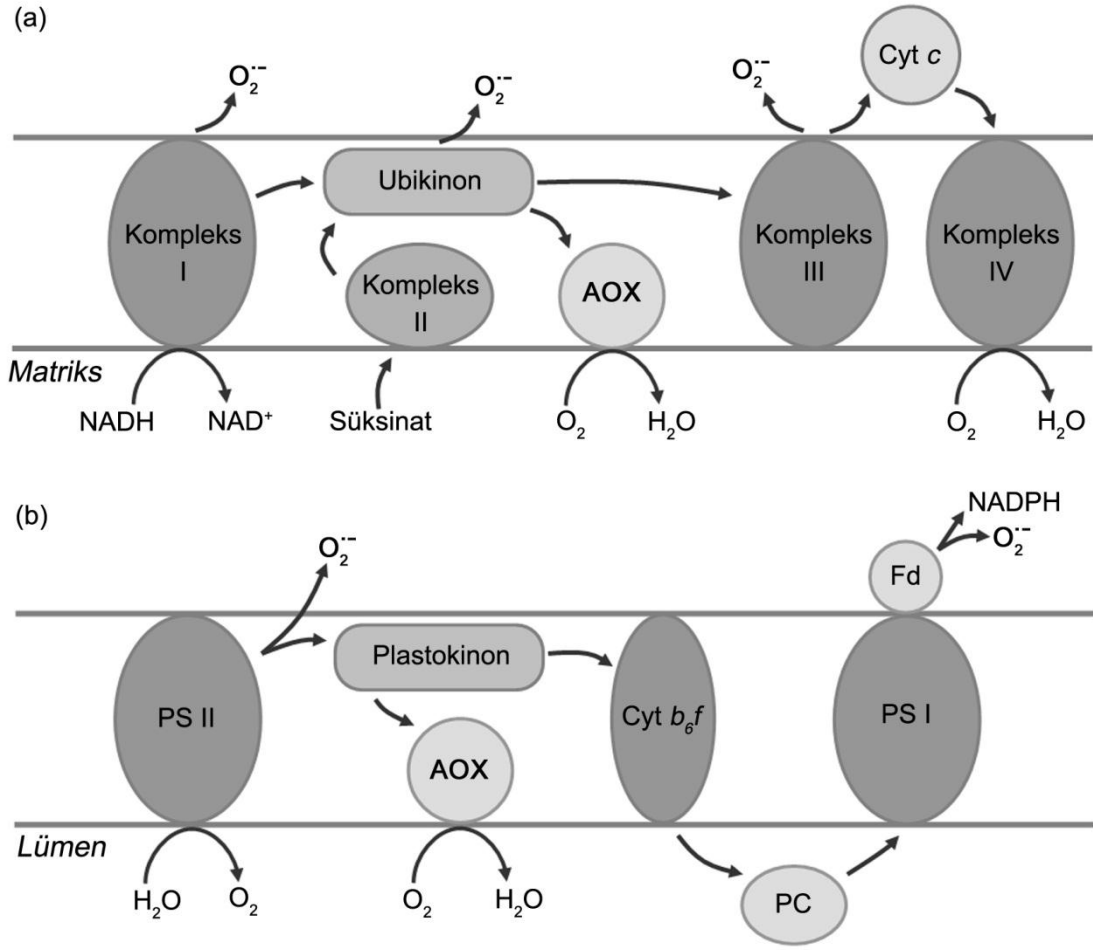
Metallotiyoneinler mRNA translasyon ürünleri olup; sisteyince zengin düşük moleküler ağırlıklı metal bağlayıcı proteinlerdir (Kagi 1991). Metallotiyoneinlerin bir sınıfı olan fitoşelatinler (PC'ler) ise gen ürünü olmayıp, yüksek oranda metal derişimlerine maruz kalan bitkilerde fitoşelatin sentetaz enzimi ile glutatyondan sentezlenen polipeptitlerdir (Cobbett 2000). MT'lerin antioksidantlar gibi fonksiyon göyerek metal metabolizmasında veya plazma membranlarının onarım mekanizmalarında rol oynadıkları düşünölmektedir (Labra *et al.* 2006). Krom stresi sonucu oluşan reaktif oksijen türleri, MT'lerin sentezini teşvik eden sinyal molekülleri olarak rol oynayabilmektedir. MT'ler bitkilerde Cr detoksifikasyonunda muhtemel bir role sahiptir ve Cr stresine maruz kalan *Sorghum* çeşitlerinde (duyarlı K 10 ve tolerant CO 27) MT benzeri proteinlerin eksprese edildiğı rapor edilmiştir (Shanker *et al.* 2004). Aynı araştırmacılar, kroma toleranslı ve hassas *Sorghum* çeşitlerinde *MT3* geninin ekspresyonu üzerine Cr(VI) etkisini değerlendirdiğinde, hassas çeşide göre toleranslı çeşitte ilgili gene ait bant yoğunluğunun daha fazla olduğunu göstermişlerdir (Shanker *et al.* 2004). Bu durum, Cr stresine karşı toleranslı çeşitte MT geninin yüksek transkripsiyon oranına sahip olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Cr uygulaması sonucu oluşan reaktif oksijen türlerinin, MT mRNA transkripsiyonu teşvik eden bir sinyal olabileceğı ileri sürölmüştür (Shanker *et al.* 2004). Hekzavalent kroma maruz bırakılan *Brassica juncea* ve *Vigna radiata* bitkilerinin kök ve gövde dokularında PC içeriğinin arttığı ve PC'lerin, sentezlenen antioksidant enzimlerle birlikte krom toleransına katkıda bulunabileceğı bildirilmiştir (Diwan *et al.* 2010). Benzer olarak, mısır bitkilerinde krom konsantrasyonunun artışına bağılı olarak MT'lerin seviyesindeki artışın krom stresine karşı tolerans sağladığı bildirilmiştir (Labra *et al.* 2006). MT'ler Cr iyonlarına bağlanıp, onları non-toksik hale getirerek bitkilerdeki Cr detoksifikasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Panda and Choudhury 2005). Cd, Hg ve Cu gibi ağır metaller ile mukayese edildiğinde bitkilerde Cr detoksifikasyonunda MT'lerin rolü ile ilgili olarak bu metal bağlayıcı ligandların ilişkisi hakkında çok az bilgi bulunmaktadır.

### 2.6.5 Alternatif Oksidaz Yolu

Bitkilerde mitokondriyal solunum, sitokrom yolu ve alternatif oksidaz (AOX) olarak adlandırılan iki yoldan oluşmaktadır (Juszczuk and Rychter 2003). Reaktif oksijen türlerinin üretimi, alternatif oksidaz (AOX) tarafından kloroplast ve mitokondriyal elektron transport zincirindeki elektronların alternatif bir yola sokulmasıyla azaltılabilmektedir. AOX, elektron transport zinciri boyunca hareket eden elektronları saptırmakta ve bu elektronları, oksijenin suya indirgenmesinde kullanmaktadır (Şekil 2.6). Böylelikle,  $O_2$ 'in  $O_2^{\cdot-}$ 'e indirgenmesi için gerekli elektronların önlenmesi ve ROT'ların oluşumu için substrat olan  $O_2$ 'in seviyesinin azaltılması ile ROT üretimi azalmaktadır. Mitokondriyal AOX miktarındaki azalma bitkilerin oksidatif strese hassasiyetini arttırmaktadır (Maxwell *et al.* 1999). AOX, sitosolik enerji yükünün yüksek olduğu durumlarda Krebs döngüsünün sürdürülmesi veya oksidatif strese karşı hücrelerin korunmasında muhtemel bir role sahiptir (Vanlerberghe and McIntosh 1997). APX ve/veya CAT enzimlerinden yoksun transjenik bitkilerde ve aşırı ışığa maruz kalan normal bitkilerde kloroplastik AOX'un teşvik edildiği belirtilmiştir (Rizhsky *et al.* 2002). Hezvalent kromun farklı konsantrasyonlarına (0–10 mg L<sup>-1</sup>) maruz kalan *Salvinia minima* bitkilerinin yapraklarında AOX kapasitesinin arttığı bildirilmiştir (Prado *et al.* 2010). Ağır metal stresi, alternatif solunum yolunun çalışma kapasitesini arttırmasına karşın (Castro-Guerrero *et al.* 2008; Prado *et al.* 2010), AOX ile ağır metal stresi arasındaki ilişki hakkında çok az bilgi mevcuttur (Garmash and Golovko 2009).

### 2.6.6 Ağır Metallerle İlişkili Stres Proteinleri

Bitkiler, hücresel seviyede ağır metallerin detoksifikasyonu ve toleransını kapsayan bir dizi potansiyel mekanizmaya sahiptir (Baker and Brooks 1989). Bitkilerin ağır metallere cevabı ile ilişkili birçok genin teşhisi moleküler yaklaşımlar ile ortaya konmuştur. Metalloiyonein (Garcia-Hernandez *et al.* 1998), tiyoredoksinler (Lemaire *et al.* 1999), glutatyon metabolizmasının proteinleri (Xiang and Oliver 1998), antioksidant enzimler (Cho and Park 2000) ve sıcaklık şoku proteinleri (Didierjean *et al.* 1996) gibi ağır metal teşvikli genlerin teşhisi, ağır metallere olan hücresel cevaplar ile ilişkili faktörlerin belirlenmesine kısmen katkıda bulunmuştur.



**Şekil 2.6** Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun önlenmesinde alternatif oksidazın (AOX) fonksiyonu. (a) Mitokondri ve (b) kloroplasttaki elektron transfer zincirinde,  $O_2$ 'nin  $O_2^{\cdot-}$ 'e indirgenmesinde kullanılabilen elektronları AOX alır ve bu elektronları  $O_2$ 'nin  $H_2O$ 'ye indirgenmesinde kullanır (Mittler 2002'den değiştirilerek).

Ağır metal stresine karşı metal iyonlarının immobilizasyonu, alınamaması, şelatlanması ve kompartımanlaşması ve metallothioneinler gibi metal bağlayıcı peptitlerin sentezi (Cobbett and Goldsbrough 2002) önemli cevapları oluşturmaktadır. Bununla birlikte, metal stresine karşı savunma mekanizmalarından biri de ağır metaller ile ilişkili stres proteinlerinin profilendirilmesi ve analizidir. Hajduch vd. (2001), çeltik yapraklarında ribuloz-1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz (RuBisCO) gibi fotosentetik işlevler ile ilişkili bazı proteinlerin kadmiyum stresinde degrade olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte, Cd stresine maruz kalan çeltik fidelerinde antioksidant ve diğer stresle ilişkili düzenleyici proteinlerin seviyesinde artış belirlenmiş ve bunların çimlenme evresinde homeostazın kurulmasında birlikte fonksiyon gördüğü belirtilmiştir (Ahsan *et al.* 2007).

Hiperakümülatör bir bitki olan *Thlaspi caerulescens*'in Cd'a toleranslı aksesyonlarında bazı antioksidant ilişkili proteinlerin seviyesinin Cd uygulamalarında önemli derecede arttığı ve bu proteinlerin toleranslı aksesyonlarda Cd toleransından sorumlu olduğu bildirilmiştir (Tuomainen *et al.* 2006). Bununla birlikte, Cu stresine maruz kalan çeltik bitkilerinde fotosentez ve glikolitik yol ile ilişkili proteinlerin seviyesinde azalma, buna karşın antioksidant savunma ve tohum depo proteinlerinin seviyesinde belirgin bir artışın olduğu rapor edilmiştir (Hajduch *et al.* 2001, Ahsan *et al.* 2007).

Ağır metallere maruz kalan bitkilerde sıcaklık şoku proteinlerinin (HSP) artan üretiminin bir ağır metal cevabı olduğu bildirilmiştir (Hall 2002). Moleküler ağırlıkları 10 ila 70 kDa arasında değişen birçok stres proteininin ağır metallerce teşvik edildiği belirtilmiştir (Delhaize *et al.* 1989). Sıcaklık şoku proteinleri, birçok abiyotik stres sırasında zarar gören proteinlerin korunması, onarımı ve/veya degradasyonunda fonksiyon gören genel stres proteinleridir (Parsell and Lindquist 1994, Downs *et al.* 1999, Hamilton and Heckathorn 2001). Ağır metallere cevap olarak HSP70 ve küçük HSP'lerin biriktiği ve bu proteinlerin hücre membranlarının korunmasında fonksiyon gördüğü belirtilmiştir (Hall 2002). İlginç olarak, ağır metal stresinden önce kısa süreli yüksek sıcaklık uygulamasının membran zararını engelleyerek ağır metal toleransını teşvik ettiği bildirilmiştir (Neumann *et al.* 1994). Çeltik bitkilerinde düşük moleküler ağırlıklı SŞP (16-20 kDa) mRNA seviyelerinin yüksek sıcaklık ve ağır metal stresinde arttığı bildirilmiştir (Tseng *et al.* 1993). Bununla birlikte, *Armeria maritima*, *Silene vulgaris* ve *Lycopersicon peruvianum* bitkilerinde HSP17'nin ağır metal stresine cevap olarak biriktiği bildirilmiştir (Neumann *et al.* 1995, Wollgiehn and Neumann 1999). Krom stresine maruz kalan domates fidelerinde sıcaklık şoku proteini HSP90-1'e ait genin ekspresyon seviyesinin arttığı ve HSP90-1 proteini hasarının iyileştirilmesi ve hücresel dengenin korunmasında rol oynadığı belirtilmiştir (Goupil *et al.* 2009). Sıcaklık şoku proteinleri, hücresel fonksiyonların yerine getirilmesinde görev yapan normal proteinlerin katlanmasında moleküler şaperonlar olarak fonksiyon görmekte ve supramoleküler yapıların oluşturulmasında veya polipeptitlerin çökmesinin engellenmesinde önemli fizyolojik rol oynayabilmektedir (del Razo *et al.* 2001). Diğer taraftan, alüminyum stresine maruz kalan toleranslı soya fasulyesi çeşidinde, Al stresi ile ilişkili 30 protein teşhis edilmiş ve bu proteinler arasında HSP'lerin protein

degradasyonu ve denatürasyonuna karşı proteinleri koruduğu ileri sürülmüştür (Zhen *et al.* 2007).

Abiyotik ve biyotik streslere cevap olarak ifade edilen gen veya proteinlerin teşhisi stres toleransı ile ilişkili moleküler mekanizmaların anlaşılması için temel basamağı oluşturmaktadır. Ağır metallere maruz kalan bitkilerde proteomik çalışmalara az rastlanmaktadır (Labra *et al.* 2006, Fagioni *et al.* 2009). Bu çalışmalarda, bitkilerin metal toleransında GSH-bağımlı yol ile ilişkili proteinler, antioksidant proteinler ve SŞP'lerin önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Labra vd. (2006), 300 ppm K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> uygulamasına maruz kalan mısır fidelerinde antioksidant, detoksifikasyon ve glikolitik yol ile ilişkili proteinlerin seviyesinde artış olduğu saptanmıştır. Ayrıca, mısır fidelerinde krom stresinin bir sonucu olarak seviyelerinde artış belirlenen glioksalaz 1 enziminin ve metalloproteinlerin kromun detoksifiye edilmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (Labra *et al.* 2006).

Bu araştırmada, Türkiye'de ekimi yapılan ve elit tohumluklarını kullandığımız sekiz arpa (*Hordeum vulgare* L.) çeşidinde (Angora, Avcı-2002, Aydanhanım, Başgül, Bülbül-89, Orza-96, Tarm-92, Zeynelağa) hegzavalent kromun [Cr(VI)] bazı fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler parametreler üzerine etkisi erken fide evresinde incelenmiştir. Erken fide evresinde, bazı fizyolojik büyüme parametreleri kullanılarak arpa çeşitleri Cr(VI) toleransı bakımından sınıflandırılmıştır. Krom(VI) toleransı sınıflandırmasına göre en toleranslı (Zeynelağa) ve hassas (Orza-96) arpa çeşidinde, kontrol ve farklı Cr(VI) konsantrasyonlarına maruz kalmış fidelerin gövde ve kök dokularında krom birikimi analiz edilmiştir. Bununla birlikte, kontrol ve farklı Cr(VI) konsantrasyonlarına maruz kalmış toleranslı ve hassas arpa çeşitlerinin fidelerine ait yaprak dokularında (1) fotosentetik pigment içeriği, (2) δ-aminolevülinik asit dehidrataz (ALAD) aktivitesi, (3) prolin birikimi, (4) malondialdehit (MDA) içeriği, (5) bazı antioksidant enzimlerin [süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), guaiakol peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT)] aktivitesi ve (6) 2-D elektroforetik protein profillerindeki polimorfizmler belirlenmiştir.

### **3. MATERYAL ve METOT**

#### **3.1 Kimyasallar**

Bu araştırmada, Sigma, Merck, Fluka ve Riedel de-Haën'in analitik grade ürünleri kullanılmıştır. Besin çözeltileri monodistile su ve diğer çözeltiler ise bidistile su ile hazırlanmıştır.

#### **3.2 Tohumların Temini**

Bu araştırmada kullanılan arpa (*Hordeum vulgare* L.) çeşitlerine (Angora, Avcı-2002, Aydanhanım, Başgöl, Bülbül-89, Orza-96, Tarm-92, Zeynelağa) ait elit tohumluklar Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir.

Elde edilen tohumlar, böceklenme ve enfeksiyonu önlemek için kullanılmaya kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir. Denemelerde kullanılan sağlıklı tohumlar yaklaşık aynı boyutta ve renkte olacak şekilde seçilmiştir.

#### **3.3 Tohum Kabuk Yüzey Sterilizasyonu**

Arpa çeşitlerine ait tohumların %5'lik sodyum hipokloritte 15 dakika süreyle yüzey sterilizasyonu sallayıcı üzerinde yapılmıştır. Sterilizasyonu takiben tohumlar 3 kez distile sudan geçirilmiştir.

#### **3.4 Çimlenme ve Bitki Yetiştirme Koşulları**

Steril edilen tohumlar kontrollü iklim kabininde (25±1°C, %60 nem), içerisinde distile su ile ıslatılmış iki kat filtre kağıdı bulunan 20×11.5×5 cm boyutlarında ve kapağında hava giriş çıkışına uygun yaklaşık 1 mm çapında delikler bulunan şeffaf plastikten yapılmış kaplarda 3 gün süre ile karanlıkta çimlendirilmiştir. Bu süre sonunda, yaklaşık aynı koleoptil ve kök uzunluğuna sahip olan etiyole fideler hidroponik kültür ortamına transfer edilmiştir. Hidroponik kültür ortamında kullanılacak Cr(VI) konsantrasyonları

ön denemeler sonucunda belirlenmiştir. Buna göre, en yüksek Cr(VI) konsantrasyonu (225 µM) değeri, fide büyümesinin önemli düzeyde inhibisyona uğradığı; fakat daha sonraki analizler için örneklemelerin yapılabileceği seviyede fide gelişiminin gözlemlendiği konsantrasyon değeri olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, düşük Cr(VI) konsantrasyonu (75 µM) değeri ise kontrol grubundan önemli düzeyde büyüme farklılığı gösteren fide gelişiminin gözlemlendiği konsantrasyon değeri olarak seçilmiştir. Bu iki konsantrasyon değeri arasında olacak şekilde 150 µM Cr(VI) konsantrasyonu da çalışmaya dahil edilmiştir. Bu üç konsantrasyon değeri, büyüme deneylerinin yanı sıra en toleranslı ve en hassas arpa çeşitlerinde Cr(VI) ağır metalinin toksisitesinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır. Hekzavalent krom [Cr(VI)] konsantrasyonları, ½ Hewitt besin çözeltisi ile hazırlanmış 75, 150 ve 225 µM potasyum dikromat (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) ile sağlanmıştır. Besin çözeltisinin pH'ı 0.1 N KOH kullanılarak 6.8'e ayarlanmış ve besin çözeltisi her iki günde bir yenilenmiştir. Hidroponik sisteme transfer edilen 3 günlük etiyolet fideler, 25°C'de ve 12 sa fotoperiyotta yaklaşık 13.000 lüks ışık şiddetinde (F15W/840, Cool White De Luxe, 950 lümen, 8 adet Sylvania Luxline Plus flüoresan lamba) 7 gün daha büyütülmüştür.

### 3.5 Büyüme Deneyleri ve Krom(VI) Toleransının Belirlenmesi

Üç-günlük etiyolet fideler, farklı Cr(VI) konsantrasyonlarına (75, 150 ve 225 µM) 7 gün maruz bırakıldıktan sonra gövde (kök ile gövdenin birleştiği noktadan ilk yaprağın ucuna kadar) ve en uzun embriyonal kök (kök ile gövdenin birleştiği noktadan en uzun embriyonal kökün ucuna kadar) uzunlukları ölçülmüştür (cm fide<sup>-1</sup>). Uzunlukları ölçülen fidelerin toplam gövde ve embriyonal kök taze ağırlıkları (TA) belirlendikten sonra, 80°C'lik etüvde 48 sa süreyle kurutulmuş ve bu süre sonunda kuru ağırlıkları (KA) alınmıştır.

Erken fide evresinde, arpa çeşitlerinin Cr(VI) toleransı bakımından genotipik çeşitliliği belirlemek için gövde ve kök kuru ağırlığının bir fonksiyonu olarak tolerans indeksi (%) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Bağcı *et al.* 2003):

$$\text{Tolerans indeksi (\%)} = \left[ \frac{(\text{Gövde ve kök KA})_{\text{Cr(VI)}}}{(\text{Gövde ve kök KA})_{\text{Kontrol}}} \right] \times 100$$

Her bir Cr(VI) konsantrasyonunda 8 arpa çeşidi için hesaplanan tolerans indeksi (%) değerleri, en düşükten (1 puan) en yükseğe (8 puan) doğru puanlandırılmıştır. Daha sonra, her bir arpa çeşidi için tüm konsantrasyonlardaki puanlar toplanmış ve toplam puanlar dikkate alınarak 8 arpa çeşidi Cr(VI) toleransları bakımından sınıflandırılmıştır.

### **3.6 Toleranslı ve Hassas Arpa Çeşitlerinde Krom(VI) Stresine Karşı Oluşturulan Cevapların Belirlenmesi**

Bu araştırmada, gövde ve kök kuru ağırlıklarındaki % azalma temelinde Cr(VI) stresine karşı en toleranslı Zeynelağa ve en hassas Orza-96 arpa çeşidinde krom içeriğinin yanı sıra fotosentetik pigment içeriği,  $\delta$ -aminolevülinik asit dehidrataz (ALAD) enzim aktivitesi, prolin içeriği, malondialdehit (MDA) içeriği, bazı antioksidant enzimlerin aktivitesi ve 2-D elektroforez profilleri analiz edilmiştir.

#### **3.6.1 Krom Birikiminin Belirlenmesi**

Kontrol ve farklı Cr(VI) konsantrasyonlarına maruz bırakılan toleranslı Zeynelağa ve hassas Orza-96 arpa çeşitlerine ait fideler, %10'luk HNO<sub>3</sub> ile yıkandıktan sonra 3 kez distile sudan geçirilmiştir. Bu işlemi takiben fidelerin gövde ve kök kısımları ayrılmış ve kuru materyalin elde edilmesi için 80°C'lik etüvde 48 sa inkübe edilmiştir. Kuru bitki örnekleri (600 mg), 10 mL %65'lik HNO<sub>3</sub> kullanılarak mikrodalga fırında (Berghof Products + Instruments, Germany) yakılmıştır. Yakma işlemi sonucunda örneklerin hacimleri bidistile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Stok Cr çözeltisi (1000 ppm) seyreltilerek hazırlanan kör dahil dört farklı konsantrasyondaki çözelti ile kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin korelasyon katsayısı ( $r^2 = 0.9999$  ve üzeri) ve örneklerin Cr konsantrasyonları, Winlab32 paket programı kullanan ICP/OES (Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry, Perkin Elmer 2100 DV) cihazı ile hesaplanmıştır. Gövde ve kökte krom birikimi  $\mu\text{g g}^{-1}$  KA olarak hesaplanmıştır.



### 3.6.2 Fotosentetik Pigment İÇeriğinin Belirlenmesi

Klorofil (Klo *a* ve Klo *b*) ve karotenoid pigment içerikleri üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının (75, 150 ve 225 µM) etkisi incelenmiştir. Klo *a*, Klo *b* ve karotenoidlerin ekstraksiyonu ve konsantrasyonlarının belirlenmesi Wellburn (1994)'e göre yapılmıştır. Kontrol ve farklı Cr(VI) konsantrasyonlarına maruz bırakılan fidelerin ilk yapraklarından yaklaşık 50 mg taze yaprak dokusu alınmıştır. Her bir arpa çeşidi ve Cr(VI) konsantrasyonu için 6 tekrarlı olacak şekilde örnekleme yapılmıştır. Küçük parçalara ayrılan dokular, 10 mL soğutulmuş metanol içeren ağzı kapaklı cam test tüplerine alınmıştır. Pigmentlerin tamamen metanole geçmesi için tüpler 48 sa süresince +4°C ve karanlıkta bekletilmiştir. Her uygulamaya ait çözeltinin Klo *a*, Klo *b* ve karotenoidlerin absorbansları sırasıyla 666, 653 ve 470 nm dalga boylarında, TU-1880 Double Beam UV-VIS spektrofotometre kullanılarak ölçülmüş ve konsantrasyonlar aşağıdaki formüllere göre taze ağırlık (TA) temelinde mg g<sup>-1</sup> TA olarak hesaplanmıştır (Wellburn 1994):

$$\text{Klorofil } a \text{ (Klo } a) = 15.65A_{666} - 7.34A_{653} \times S^*$$

$$\text{Klorofil } b \text{ (Klo } b) = 27.05A_{653} - 11.21A_{666} \times S$$

$$\text{Karotenoidler} = (1000A_{470} - 2.86\text{Klo } a - 129.2\text{Klo } b)/221 \times S$$

\* S: Seyreltme katsayısı

### 3.6.3 ALAD Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Kontrol ve Cr(VI) konsantrasyonlarına (75, 150 ve 225 µM) 7 gün süreyle maruz bırakılan Zeynelağa (toleranslı) ve Orza-96 (hassas) arpa çeşitlerine ait fidelerin ilk yaprak dokusunda δ-aminolevülinik asit dehidrataz (ALAD) enzim aktivitesi belirlenmiştir. Yaprak dokularından ALAD ekstraksiyonu Naito vd. (1980)'a göre yapılmıştır. Yaprak dokusu (1 g), soğutulmuş porselen havan içerisinde 0.1 mM ditiyoteritol (DTT) içeren 0.05 M Tris-HCl tamponunda (pH 8.2) homojenize edilmiştir. Homojenatlar, dört katlı gazlı bezden süzöldükten sonra 1.5 mL ependorf tüplerine alınmış ve +4°C'de 10.000 ×g'de 1 sa santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar, Scheneider (1970)'ın metoduna göre ALAD aktivitesi analizleri için enzim kaynağı

olarak kullanılmıştır. Tüplere birer mL olarak alınan süpernatantların üzerine 0.27 mL ALA (1 mg/mL), 1.35 mL Tris-HCl tamponu (0.05 M) ve 0.08 mL MgCl<sub>2</sub> (0.2 M) çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonra tüpler sirkülasyonlu sıcak su banyosunda (37°C) 2.5 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, karışımdaki reaksiyon 0.3 mL trikloroasetik asit (TCA, 3.0 M) eklenerek durdurulmuştur. Tüpler 2 dakika buz içerisinde soğutulduktan sonra 2000 ×g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant ile Ehrlich ayracı [1 g DAB (4-Dimetil Amino Benzaldehit), 30 mL asetik asit ve 16 mL %70'lik perklorik asit karıştırılıp son hacim 50 mL'ye asetik asit ile tamamlanarak hazırlanmış] 1:1 oranında karıştırıldıktan 10 dakika sonra absorbanslar 555 nm dalga boyunda TU-1880 Double Beam UV-VIS spektrofotometre ile belirlenmiştir. Bir enzim birimi, yukarıda belirtilen koşullar altında 2.5 saatte bir nanomol PBG oluşumuna neden olan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Özgül aktivite 37°C'de nmol PBG 2.5 sa<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein olarak ifade edilmiştir.

### 3.6.4 Prolin İçeriğinin Belirlenmesi

Krom(VI) stresine karşı toleranslı Zeynelağa ve hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin yaprak dokusunda prolin içeriği üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının etkisi incelenmiştir. Prolin analizleri, Bates vd. (1973)'nin bildirdiği metoda göre gerçekleştirilmiştir. Sıvı azotta dondurulmuş yaprak dokusu (200 mg) havanda dövülmüş ve proteinlerin çöktürülmesi için 1.5 mL %3'lük sülfosalisilik asit eklenmiştir. Örnekler ependorf tüplerine transfer edilmiş ve 8000 ×g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Her bir örnekten 500 µL süpernatant ağzı kapaklı cam test tüplerine alınmış ve tüplere 2 mL glasiyal asetik asit ve 2 mL asit ninhidrin [%60'luk 6 M fosforik asitte %3'lük (w/v) ninhidrin] eklenmiştir. Test tüpleri 95°C'de 1 sa tutulmuştur. Tüpler buzda soğutulduktan sonra 2 mL toluen tüplere eklenerek vortekslenmiş ve oluşan üst faz kuvars küvete alınarak 520 nm'de TU-1880 Double Beam UV-VIS spektrofotometre ile absorbansları okunmuştur. Prolin konsantrasyonları, hazırlanan prolin standardı (0-100 µg mL<sup>-1</sup>) kullanılarak hesaplanmıştır.

### 3.6.5 Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi

Krom(VI) stresine karşı toleranslı Zeynelağa ve hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin yaprak dokularındaki lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi Kosugi ve Kikugawa (1985)'nin bildirdiği metoda göre yapılmıştır. Kontrol ve Cr(VI) stresine maruz bırakılmış fidelerden alınan 250 mg yaprak dokusu 5 mL %5'lik trikloroasetik asit (TCA) ile homojenize edilmiştir. Homojenatlar +4°C ve 12.000 ×g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan 250 µL alınarak üzerine %0.5 tiyobarbütirik asit (TBA) içeren %20'lik TCA çözeltisi eklenmiştir. Bu karışım daha sonra 95°C'de 30 dakika su banyosunda tutulmuştur. Su banyosundan çıkarılan tüplerdeki reaksiyonları durdurmak için tüpler buz banyosuna konulmuştur. Sonrasında örnekler ependorf tüplere alınarak 10.000 ×g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar kuvars küvetlere alınarak 532 ve 600 nm'de TU-1880 Double Beam UV-VIS spektrofotometre ile absorbanları ölçülmüştür. Kör olarak örnek içermeyen ve %0.5 TBA ihtiva eden %20'lik TCA çözeltisi kullanılmıştır. Yaprak dokularının MDA içeriği molar ekstinksiyon katsayısı ( $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) kullanılarak  $\mu\text{mol g}^{-1}$  TA olarak belirlenmiştir.

### 3.6.6 Antioksidant Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

#### 3.6.6.1 Enzim Ekstraksiyonu

Kontrol ve farklı Cr(VI) konsantrasyonlarına maruz bırakılan toleranslı Zeynelağa ve hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin yaprak dokusu (500 mg) 1 mM EDTA, %1 (w/v) polivinilpirrolidon (PVP) ve 5 mM askorbik asit (yalnızca APX için) içeren 5 mL 50 mM potasyum fosfat tamponunda (pH 7.0) homojenize edilmiştir. Ekstrakt +4°C ve 14.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), guaiakol peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT) gibi antioksidant enzimlerin aktivitesinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Süpernatantlardaki protein miktarı Bradford (1976)'a göre belirlenmiştir.

### 3.6.6.2 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Belirlenmesi

Süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) aktivitesi, nitroblue tetrazolium (NBT) metoduna göre (Beauchamp and Fridovich 1971) NBT'nin fotoindirgenmesinin 560 nm'de ölçülmesi ile belirlenmiştir. Aktivite tayini için 50 mM fosfat tamponu (pH 7.8), 0.1 mM EDTA, 13 mM metionin, 75 µM NBT ve %1'lik Triton X-100 içeren karışıma 70 µl enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Daha sonra bu karışıma ve 2 µM riboflavin eklenmiş ve test tüplerinin 10 dakika için beyaz ışık kaynağı altına yerleştirilmesiyle reaksiyon başlatılmıştır. Örneklerin absorbans değerleri 560 nm dalga boyunda spektrofotometrik (TU-1880 Double Beam UV-VIS) olarak belirlenmiştir. Bir ünite SOD, deneysel koşullar altında NBT indirgenmesinde %50 inhibisyona neden olan enzim miktarı olarak ifade edilmiştir. Toplam SOD aktivitesi U mg<sup>-1</sup> protein olarak hesaplanmıştır.

### 3.6.6.3 Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesinin Belirlenmesi

Askorbat peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) aktivitesi Nakano ve Asada (1987)'ya göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 50 mM fosfat tamponu (pH 7.0), 0.1 mM EDTA, 0.25 mM askorbat, 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 20 µL enzim ekstraktından oluşmaktadır. Reaksiyon, 100 µL 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in ilavesi ile başlatılmıştır. Askorbik asidin oksidasyon oranı, spektrofotometre kullanılarak 3 dakika için 290 nm'de absorbanstaki azalmayı takiben belirlenmiştir. Toplam APX aktivitesi, askorbatın ekstinksiyon katsayısı ( $\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) kullanılarak µmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein olarak hesaplanmıştır.

### 3.6.6.4 Guaiakol Peroksidaz (POD) Aktivitesinin Belirlenmesi

Guaiakol peroksidaz (POD; EC 1.11.1.7) aktivitesi Mika ve Lüthje (2003)'e göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 25 mM sodyum-asetat-HCl (pH 5.0), 51.3 mM guaiakol, 12.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve enzim ekstraktı içermektedir. Reaksiyon enzim ekstraktının ilavesiyle başlatılmış ve absorbanstaki değişim 470 nm'de 3 dakika süre boyunca takip edilmiştir. Toplam POD aktivitesi, guaiakolun ekstinksiyon katsayısı ( $\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) kullanılarak µmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein olarak belirlenmiştir.

### 3.6.6.5 Katalaz (CAT) Aktivitesinin Belirlenmesi

Toplam katalaz aktivitesi (CAT; EC 1.11.1.6) Aebi vd. (1984)'ne göre belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) ve 10.6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içermektedir. Reaksiyon 25 µL enzim ekstraktının ilave edilmesi ile başlatılmıştır. CAT aktivitesi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in 3 dakika için 240 nm'de ( $\epsilon = 39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) bozunması ile  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  protein olarak belirlenmiştir.

### 3.6.7 Protein Analizleri

Krom(VI) stresine toleranslı Zeynelağa ve hassas Orza-96 arpa çeşitlerine ait üç günlük etiyole fideler, kontrollü iklim kabininde (25°C ve 12 sa fotoperiyot) 7 gün süreyle kontrol ve en yüksek Cr(VI) konsantrasyonuna (225 µM) maruz bırakılmıştır. İlk yaprak (500 mg) dokuları sıvı azotta dondurularak protein ekstraksiyonu yapılmaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

#### 3.6.7.1 Protein Ekstraksiyonu

Sıvı azotta dondurulan yaprak dokularından protein ekstraksiyonu Damerval vd. (1986)'a göre yapılmıştır: Dokular, soğutulmuş porselen havan içerisinde sıvı azot kullanılarak toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen dokular, 5 mL %0.07 β-merkaptolanol (βME) içeren asetonda hazırlanmış %10'luk trikloroasetik asit (TCA) çözeltisinde homojenize edildikten sonra ependorf tüplerine alınmıştır. Proteinlerin çöktürülmesi için -20°C'de 1 sa tutulan homojenatlar +4°C'de ve 10000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantın tamamı tüplerden uzaklaştırıldıktan sonra tüplere asetonda hazırlanmış %0.07 βME'den 0.5 mL ilave edilerek vortekslenmiştir. Üzerine de aynı çözeltiden 4.5 mL ilave edilerek en az -20°C'de 1 sa tutulmuştur. Daha sonra tüpler +4°C'de ve 10000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra tüpte kalan peletler desikatörde kurutulmuş kullanılmaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

### 3.6.7.2 Yaprak Örneklerinde Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Kontrol ve 225  $\mu\text{M}$  Cr(VI) konsantrasyonuna maruz bırakılan toleranslı (Zeynelağa) ve hassas (Orza-96) arpa çeşitlerinin yaprak dokusundan izole edilen protein konsantrasyonu, Bradford (1976) metodundaki modifikasyonunu kapsayan Ramagli ve Rodriguez (1985)'e göre tespit edilmiştir.

*Bradford stok çözeltisi (5X):*

Commase Brilliant Blue G-250	100 mg
%95 etanol (EtOH)	50 mL
%85'lik fosforik asit ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )	100 mL

Bu karışım 200 mL'ye tamamlandıktan sonra 1:3 oranında distile su ile seyreltilerek Whatman No.1 filtre kağıdı ile süzülmüştür. Standart için Bovin Serum Albumin (BSA) standart çözeltisi kullanılmıştır. Standart çözeltisi, 1 mg BSA urea karışımının (9 M urea, %2 amfolinler, %4 NP-40 ve %2  $\beta\text{ME}$ ) 200  $\mu\text{L}$ 'sinde çözülerek hazırlanmıştır (Ramagli and Rodriguez 1985). Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart çözeltisine (0-10  $\mu\text{L}$ ) uygun olarak urea karışımı (10-0  $\mu\text{L}$ ) ilave edilmiş ve 0-50  $\mu\text{g}$  BSA/10  $\mu\text{L}$  urea karışımı hazırlanmıştır. Daha sonra sırasıyla 10  $\mu\text{L}$  0.1 N HCl (hidroklorik asit), 80  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$  ve 3.5 mL Bradford çözeltisi (1:3 oranında seyreltilmiş) ilave edilmiştir. Standart için hazırlanan kör tüpü, BSA dışındaki çözeltileri içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Her bir uygulamaya ait protein peletinden 5 mg protein 200  $\mu\text{L}$  urea karışımında çözülmüştür. Protein örnek çözeltileri 3 dakika 12750 rpm'de santrifüj edildikten sonra süpernatanttan 10  $\mu\text{L}$  protein çözeltisi alınmıştır. Üzerlerine 10  $\mu\text{L}$  0.1 N HCl, 80  $\mu\text{L}$ ,  $\text{dH}_2\text{O}$  ve 3.5 mL Bradford çözeltisi (1:3 oranında seyreltilmiş) konulmuştur.

Üç tekrarlı olarak hazırlanan standart ve örnek çözeltilerin absorbanları 595 nm dalga boyunda TU-1880 Double Beam UVI-VIS Spektrofotometre ile belirlenmiştir. Standart grafiğinden (BSA) yararlanılarak örneklerin protein konsantrasyonları ve elektroforez

aşamasında kullanılacak her bir örneğin 70 µg çözünebilir protein içermesi için tartılacak miktarlar belirlenmiştir.

### 3.6.7.3 İzoelektrik Fokuslama (İEF)

İzoelektrik fokuslama jel çözeltisi (İEFJÇ) Hochstrasser vd. (1988)'ne göre hazırlanmıştır (Çizelge 3.1):

**Çizelge 3.1** İzoelektrik fokuslama jel çözeltisi (İEFJÇ) için gerekli kimyasallar ve miktarları

<b>Kimyasal</b>	<b>Miktarı</b>
Urea	10.0 g
dH <sub>2</sub> O	7.4 mL
Akrilamid/bis akrilamid stok çözeltisi	3.0 mL
CHAPS	0.3 g
NP-40	100.0 µL
Amfolin (pH:5-8)	200.0 µL
Amfolin (pH:3-10)	800.0 µL

İEFJÇ vakumlanıp, filtre edildikten sonra -20°C'de saklanmıştır. Örnek çözeltinin hazırlanması Naqvi vd. (1994)'ne göre yapılmıştır. Yaklaşık 70 µg protein konsantrasyonu içerecek şekilde tartılmış protein örneği 200 µL İEFJÇ'de yaklaşık 1 sa süresince oda sıcaklığında çözülmüştür. Bu süre sonunda 14000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda, süpernatanttan 50 µL alınarak İEFJÇ'ye katılmıştır. Çözeltiye %2.5'lik taze olarak hazırlanan amonyum persülfat (APS)'dan 1.5 µL ve 0.5 µL N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin (TEMED) katılarak kısa süre vortekslenmiştir.

Karışım iç çapı 1.5 mm, uzunluğu 18 cm olan izoelektrik fokuslama tüplerine mikropipet yardımıyla yüklenmiştir (O'Farrell 1975). Yükleme sonunda tüpler, bazik ucu parmak ile kapatılarak, asidik uç yukarıda kalacak şekilde dikey konumda tutulmuş ve bazik uca 1:1 oranında distile su ile seyreltilmiş İEFJÇ yüklenmiş ve jelin hava ile teması kesilerek polimerizasyon sağlanmıştır.

Protein örneği içermeyen kör tüp, pH gradientinin belirlenmesi amacıyla aynen örnek tüplerin hazırlandığı gibi hazırlanmıştır. İEF tüpleri genellikle son tüp doldurulup, tüm tüplerdeki jeller polimerleşinceye kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Elektroforez tankının üst çözeltisi 20 mM sodyum hidroksit (NaOH, katodik çözelti) çözeltisiyle, elektroforez tankının alt çözeltisi ise 100 mM fosforik asit (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, anodik çözelti) çözeltisiyle doldurulmuştur (O'Farrell 1975). Yürütme, 3 sa 400 voltu takiben 15 sa 800 volt sabit akımda (toplam 13200 volt/sa) gerçekleştirilmiştir. Yürütme tamamlandığında tüpler tanktan uzaklaştırılıp tüpün asidik ve bazik uçları parafilm ile hava almayacak şekilde kapatılmıştır. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAJE)'de kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

#### **3.6.7.4 İzoelektrik Noktasının (pI) Belirlenmesi**

Elektroforezden sonra kör tüpündeki jel, İEF tüplerinden şırınga yardımı ile çıkarılmıştır. Jelin asidik ve bazik uçlarından 0.5'er cm kesilerek atılmıştır. Geriye kalan kısım asidikten baziğe doğru 1'er cm'lik parçalara kesilmiştir. Kesilen parçalar, içerisinde 1.4 mL 1 M potasyum klorüre (KCl) alındıktan sonra +4°C'de gece boyunca tutulmuştur. pH ölçülmeden önce oda sıcaklığında 2 sa bekletilen KCl'deki kör jeli parçalarının pH'ı, asidikten baziğe doğru yine oda sıcaklığında belirlenmiştir. Belirlenen pH değerleri, proteinlerin izoelektrik noktalarını (pI) belirlemek için kullanılmıştır.

#### **3.6.7.5 SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforez (SDS-PAJE)**

İEF'de izoelektrik noktalarına göre ayrıştırılan protein örnekleri elektroforez tankında yürütülmüştür. SDS-PAJE, Laemmli (1970)'ye göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre, 10-70 kilodalton (kDa) moleküler ağırlıktaki (Çizelge 3.2) polipeptidlerin kolaylıkla ayrılabilceği %12'lik akrilamid jel kullanılmıştır (Copeland 1993).



**Çizelge 3.2** SDS-poliakrilamid jel elektroforez için moleküler ağırlık standartları

<b>Protein standartları*</b>	<b>Moleküler ağırlıkları (kDa)</b>
Bovin albumin	66.0
Yumurta albumini	45.0
Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz	36.0
Karbonik anhidraz	29.0
Tripsinojen	24.0
Tripsin inhibitör, Soya fasulyesi	20.1
$\alpha$ -Laktalbumin	14.2

\* Hazırlanan protein standartlarının her birinden 5'er  $\mu$ L çekilmiş, kaynayan suda 1 dakika tutulmuş ve toplam hacim 1:1 oranında 0.5 M Tris-HCl, pH:6.8 stok çözeltisi ile seyreltilmiştir.

Hazırlanan jel çözeltisi, 1.5 mm kalınlıkta boşluk içeren 160×160 mm boyutundaki iki cam plak arasına dökülmüştür. Üzerine tek dişli tarak yerleştirilmiştir. Polimerleşmeyi takiben tarak çıkarılmış ve filtre kağıdı ile iki cam arasındaki jelin üst yüzeyindeki sıvı çekilmiştir.

İzoelektrik fokuslama tüpündeki jel, şırınga yardımı ile parafilm üzerine çıkarılmıştır. İki cam arasındaki slab jelin üzerine asidik ve bazik kısımları esas alınarak, hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirilmiştir. Yürütme tamponu olarak tankın alt ve üst kısmına SDS'li Tris-Glisin çözeltisi konulmuştur. Tek dişli tarakla bazik tarafta açılan kuyucuğa standart moleküler ağırlık çözeltisinden 2  $\mu$ L yüklenmiştir. Elektroforez tankının iç soğutma sisteminden sürekli olarak çeşme suyu geçirilmiştir. Ayırıştırma ilk 30 dakika jel başına 10 mA, sonra yürüme izi jelin tabanına yaklaşık 1 cm kalıncaya kadar jel başına 25 mA sabit akımda gerçekleştirilmiştir. Yürütme işleminin bitiminde iki cam plak arasındaki jel, fiksatif (sabitleme) çözeltisine [%50 metanol : %12 glisial asetik asit : %0.05 formaldehit (%37'lik)] alınmıştır.

### 3.6.7.6 Proteinlerin Boyanması

Jellerin gümüş boyaması Blum vd. (1987)'a göre yapılmıştır:

**a) Fiksasyon (Sabitleme):** Fiksasyon çözeltisi metanol (%50), glasiyal asetik asit (%12) ve 0.5 mL formaldehit (%37) ile hazırlanmıştır. Jeller en az 1 sa veya 1 gece fikse edilmelidir.

**b) Yıkama:** Yıkama çözeltisi %50'lik etil alkoldür. Yıkama işlemi, 3 kez 20'şer dakika uygulanmalıdır.

**c) Ön-uygulama:** Çözeltisi, sodyum tiyosülfat  $5H_2O$  (0.2 g/L)'dır. Boyama zeminindeki artışı engellemek için uygulama fazla uzun sürmemeli, tam 1 dakika olmalıdır.

**d) Durulama:** Jel yüzeyindeki fazla sodyum tiyosülfatı uzaklaştırmak ve  $AgNO_3$  ile yüzey boyamasını sağlamak için 3 kez 20'şer saniye distile su ile yıkanır.

**e) Sabitleme:** Sabitleme çözeltisi  $AgNO_3$  (2 g/L) ve 0.75 mL formaldehit (%37) olup; uygulama zamanı 20 dakikadır.

**f) Durulama:**  $AgNO_3$  ile sabitlenen jelin yüzeyindeki fazla  $AgNO_3$ 'ı ve sodyum tiyosülfatı uzaklaştırmak için 2 kez 20'şer saniye distile su ile yıkanma yapılır.

**g) Geliştirme:** Geliştirme çözeltisi, sodyum karbonat (60 g/L), 0.5 mL formaldehit (%37) ve sodyum tiyosülfat. $5H_2O$  (4 mg/L) içerir. Protein benekleri yaklaşık 10 dakikada gelişir.

**g) Yıkama:** Uygulama, 2 kez 2'şer dakika distile su ile gerçekleştirilir.

**h) Durdurma:** Durdurma çözeltisi metanol (%50) ve glasiyal asetik asit (%12) ile hazırlanır. Uygulama süresi 10 dakikadır.

**i) Yıkama:** Yıkama çözeltisi %50'lik metanoldür ve uygulama süresi 10 dakikadan fazladır.

Proteinleri boyama aşamalarının tamamı, oda sıcaklığında ve sallayıcı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Boyamanın her aşamasında yeni şeffaf eldivenler kullanılmıştır. Boyama bitiminde jeller fotoğraflanmış ve kurutulmuştur.

### **3.6.7.7 Jellerin Fotoğraflanması**

Boyanmış jeller, Fujitsu S7000 FinePix 19x (6x Optical 3.2x Dijital) fotoğraf makinesi takılmış Uvitec-UV marka illüminatör sisteminde özel filtre üzerine konularak fotoğraflamıştır.

### **3.6.7.8 Jellerin Kurutulması**

Jeller, gümüş boyamadan sonra saklanmak üzere kurutulmuştur. Kurutma işlemi, Krishnan ve Nguyen (1990)'e göre yapılmıştır. Kurutmada, selofan ve kalınlığı 6 mm, dış boyutları 35x35 cm, iç boyutları 20x20 cm olan şeffaf fleksiglas çerçeve kullanılmıştır. Jel, fleksiglas çerçeve üzerine yerleştirilen distile su ile ıslatılmış iki selafon arasına hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirilmiştir. Jeller oda sıcaklığında kurutulmuştur.

### **3.6.7.9 Jellerin Okunması**

Kontrol jellerine göre 225 µM Cr(VI) konsantrasyonuna ait jellerde yeni sentezlenen, sentezi belirgin durumda artan veya azalan proteinlerin izoelektrik noktaları (pI) ve moleküler ağırlıkları (kilodalton, kDa) belirlenmiştir.

## **3.7 İstatistik Analizler**

Denemeler, tesadüf parselleri çeşitler × Cr(VI) konsantrasyonları faktöriyel düzeninde gerçekleştirilmiştir. Büyüme deneyleri, fotosentetik pigment içeriği, ALAD enzim aktivitesi, prolin içeriği, lipit peroksidasyonu ve antioksidant enzim analizleri için yapılan denemeler rasgele deneme deseninde 3 tekrarlı olacak şekilde düzenlenmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel varyans analizleri SPSS (versiyon 15.0) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen verilere ait ortalamalar arasındaki önemli düzeydeki farklılıklar Duncan Çoklu Karşılaştırma testi kullanılarak belirlenmiştir (P<0.05).

## 4. BULGULAR

### 4.1 Arpa Çeşitlerinin Gövde ve Kök Büyümesi Üzerine Krom Stresinin Etkisi

Bu araştırmada, erken fide gelişimi evresinde bazı arpa çeşitlerinin (Angora, Avcı-2002, Aydanhanım, Başgül, Bülbül-89, Orza-96, Tarm-92, Zeynelağa) gövde ve kök büyümesi (gövde ve kök uzunluğu, taze ve kuru ağırlık) üzerine Cr(VI) stresinin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, üç-günlük etiyole fideler 7 gün süreyle farklı Cr(VI) konsantrasyonlarına (kontrol, 75, 150 ve 225 µM) maruz bırakılmıştır. Bu süre sonunda, de-etiyole fidelerin gövde ve kök uzunlukları ile gövde ve kök taze ve kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Arpa çeşitlerinin gövde ve kök uzunlukları, taze ve kuru ağırlıkları üzerine çeşit ve Cr(VI) ana faktör etkileri ve bu faktörlere ait etkileşimler (çeşit×krom) önemli düzeyde bulunmuştur ( $P<0.001$ ) (Çizelge 4.1-3).

Erken fide evresindeki arpa çeşitlerinin gövde ve kök uzunlukları Cr(VI) konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak genellikle önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) azalmıştır (Çizelge 4.1). Arpa çeşitlerinin gövde ve kök uzunluklarındaki büyüme inhibisyonu kontrole göre tüm Cr(VI) konsantrasyonlarında %50'nin altında belirlenmiştir. Cr(VI) stresinde arpa çeşitlerinin gövde uzunluklarındaki büyüme inhibisyonu %0.3-19.7 (75 µM), %14.7-40.1 (150 µM) ve %31.1-47.9 (225 µM) aralığında değişmiştir (Çizelge 4.1). Bununla birlikte, kök uzunluklarındaki büyüme inhibisyonu %15.8-42.2 (75 µM), %26.1-46.4 (150 µM) ve %30.5-49.5 (225 µM) aralığında saptanmıştır (Çizelge 4.1).

Erken fide evresindeki arpa çeşitlerinin gövde ve kök taze ağırlıkları Cr(VI) konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak genellikle önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) azalmıştır (Çizelge 4.2). Arpa çeşitlerinin gövde taze ağırlıklarındaki azalma kontrole göre tüm Cr(VI) konsantrasyonlarında %11.9-68.8 aralığında belirlenmiştir. Cr(VI) stresinde arpa çeşitlerinin gövde taze ağırlıklarındaki azalma %11.9-41.5 (75 µM), %37.2-54.7 (150 µM) ve %52.4-68.8 (225 µM) aralığında değişmiştir (Çizelge 4.2). Bununla birlikte, arpa çeşitlerinin kök taze ağırlıklarındaki azalma kontrole göre tüm Cr(VI) konsantrasyonlarında %3.1-66.2 aralığında belirlenmiştir. Arpa çeşitlerinin kök taze ağırlıklarındaki azalma ise %3.1-33.7 (75 µM), %6.3-54.5 (150 µM) ve %22.1-66.2 (225 µM) aralığında saptanmıştır (Çizelge 4.2).

**Çizelge 4.1** Erken fide evresindeki 8 arpa çeşidinin gövde ve kök uzunlukları üzerine Cr(VI) stresinin etkisi

<i>Arpa çeşidi</i>	<i>Cr(VI) konsantrasyonu (<math>\mu</math>M)</i>	<i>Gövde uzunluğu (cm bitki<sup>-1</sup>)</i>	<i>Kök uzunluğu (cm bitki<sup>-1</sup>)</i>
Angora	0	23.2 ± 0.34 a	10.1 ± 0.13 a
	75	18.6 ± 0.30 b	8.0 ± 0.11 b
	150	13.9 ± 0.26 c	7.0 ± 0.13 c
	225	12.1 ± 0.30 d	7.0 ± 0.12 c
Avcı-2002	0	18.8 ± 0.21 a	9.9 ± 0.11 a
	75	16.2 ± 0.20 b	7.8 ± 0.19 b
	150	14.7 ± 0.20 c	6.8 ± 0.15 c
	225	12.1 ± 0.27 d	6.4 ± 0.12 d
Aydanhanım	0	18.7 ± 0.25 a	12.2 ± 0.26 a
	75	16.6 ± 0.26 b	7.0 ± 0.11 b
	150	14.4 ± 0.27 c	6.5 ± 0.13 c
	225	11.3 ± 0.22 d	6.1 ± 0.11 c
Başgül	0	22.9 ± 0.28 a	11.0 ± 0.18 a
	75	22.0 ± 0.37 a	7.9 ± 0.14 b
	150	18.2 ± 0.28 b	6.3 ± 0.12 c
	225	14.1 ± 0.39 c	5.9 ± 0.09 d
Bülbül-89	0	18.5 ± 0.15 a	8.4 ± 0.10 a
	75	18.4 ± 0.24 a	7.1 ± 0.21 b
	150	15.7 ± 0.29 b	6.2 ± 0.19 c
	225	12.7 ± 0.23 c	5.6 ± 0.17 d
Orza-96	0	21.3 ± 0.15 a	10.4 ± 0.20 a
	75	19.7 ± 0.21 b	7.5 ± 0.09 b
	150	14.9 ± 0.29 c	6.7 ± 0.13 c
	225	11.9 ± 0.24 d	6.3 ± 0.11 d
Tarm-92	0	20.1 ± 0.22 a	11.1 ± 0.28 a
	75	18.2 ± 0.32 b	8.0 ± 0.09 b
	150	14.9 ± 0.43 c	7.5 ± 0.14 c
	225	11.1 ± 0.35 d	7.2 ± 0.10 c
Zeynelağa	0	19.7 ± 0.26 a	11.5 ± 0.21 a
	75	18.9 ± 0.27 b	8.0 ± 0.15 b
	150	16.0 ± 0.14 c	7.3 ± 0.09 c
	225	13.0 ± 0.15 d	6.9 ± 0.13 c
<i>Ana etkiler ortalaması</i>			
Angora		17.0 ± 0.42 b	8.02 ± 0.13 ab
Avcı-2002		15.4 ± 0.25 cd	7.71 ± 0.15 bc
Aydanhanım		15.3 ± 0.28 d	7.96 ± 0.24 ab
Başgül		19.3 ± 0.36 a	7.77 ± 0.20 b
Bülbül-89		16.3 ± 0.24 bc	6.84 ± 0.13 d
Orza-96		17.0 ± 0.36 b	7.72 ± 0.16 bc
Tarm-92		16.1 ± 0.35 bcd	8.46 ± 0.17 a
Zeynelağa		16.9 ± 0.26 b	8.45 ± 0.18 a
	0	20.2 ± 0.13 a	10.4 ± 0.09 a
	75	18.5 ± 0.13 b	7.7 ± 0.05 b
	150	15.3 ± 0.12 c	6.7 ± 0.05 c
	225	12.3 ± 0.11 d	6.3 ± 0.05 d
<i>P değerleri</i>			
Çeşit (Ç)		<0.001	<0.001
Krom (K)		<0.001	<0.001
Ç × K		<0.001	<0.001

<sup>a-d</sup>; Bir kritere ait kolondaki farklı harfler, istatistiksel olarak ortalamalar arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ( $P < 0.05$ ). Her bir değer, üç tekrarlı 12 fidenin ( $n = 36$ ) ortalamasıdır. Standart hata ( $\pm$ SH).

**Çizelge 4.2** Erken fide evresindeki 8 arpa çeşidinin gövde ve kök taze ağırlıkları üzerine Cr(VI) stresinin etkisi

<i>Arpa çeşidi</i>	<i>Cr(VI) konsantrasyonu (<math>\mu</math>M)</i>	<i>Gövde taze ağırlığı (g)</i>	<i>Kök taze ağırlığı (g)</i>
Angora	0	3.12 $\pm$ 0.08 a	1.32 $\pm$ 0.01 a
	75	2.35 $\pm$ 0.07 b	1.21 $\pm$ 0.05 b
	150	1.62 $\pm$ 0.11 c	0.78 $\pm$ 0.03 c
	225	1.48 $\pm$ 0.04 c	0.75 $\pm$ 0.02 c
Avcı-2002	0	2.86 $\pm$ 0.04 a	0.98 $\pm$ 0.02 a
	75	1.67 $\pm$ 0.03 b	0.78 $\pm$ 0.01 b
	150	1.45 $\pm$ 0.04 c	0.67 $\pm$ 0.01 c
	225	1.16 $\pm$ 0.04 d	0.56 $\pm$ 0.01 d
Aydanhanım	0	3.29 $\pm$ 0.09 a	1.18 $\pm$ 0.03 a
	75	2.10 $\pm$ 0.04 b	0.87 $\pm$ 0.02 b
	150	1.71 $\pm$ 0.02 c	0.73 $\pm$ 0.01 c
	225	1.44 $\pm$ 0.03 d	0.65 $\pm$ 0.02 d
Başgül	0	3.65 $\pm$ 0.12 a	1.11 $\pm$ 0.04 a
	75	2.90 $\pm$ 0.09 b	0.91 $\pm$ 0.03 b
	150	2.04 $\pm$ 0.09 c	0.79 $\pm$ 0.03 c
	225	1.61 $\pm$ 0.04 d	0.59 $\pm$ 0.02 d
Bülbül-89	0	2.97 $\pm$ 0.14 a	1.46 $\pm$ 0.05 a
	75	2.62 $\pm$ 0.03 b	0.97 $\pm$ 0.07 b
	150	1.86 $\pm$ 0.04 c	0.66 $\pm$ 0.10 c
	225	1.37 $\pm$ 0.01 d	0.49 $\pm$ 0.03 d
Orza-96	0	3.69 $\pm$ 0.11 a	1.45 $\pm$ 0.02 a
	75	2.70 $\pm$ 0.06 b	1.06 $\pm$ 0.03 b
	150	1.69 $\pm$ 0.08 c	0.71 $\pm$ 0.04 c
	225	1.15 $\pm$ 0.01 d	0.58 $\pm$ 0.02 d
Tarm-92	0	3.26 $\pm$ 0.12 a	1.00 $\pm$ 0.06 a
	75	2.17 $\pm$ 0.08 b	0.88 $\pm$ 0.03 b
	150	1.48 $\pm$ 0.06 c	0.68 $\pm$ 0.04 c
	225	1.07 $\pm$ 0.10 d	0.60 $\pm$ 0.02 d
Zeynelağa	0	3.73 $\pm$ 0.08 a	0.98 $\pm$ 0.04 a
	75	2.83 $\pm$ 0.04 b	0.95 $\pm$ 0.05 a
	150	2.14 $\pm$ 0.03 c	0.92 $\pm$ 0.03 a
	225	1.67 $\pm$ 0.04 d	0.77 $\pm$ 0.02 b
<i>Ana etkiler ortalaması</i>			
Angora		2.14 $\pm$ 0.20 b	1.01 $\pm$ 0.08 a
Avcı-2002		1.78 $\pm$ 0.20 ab	0.75 $\pm$ 0.05 b
Aydanhanım		2.13 $\pm$ 0.21 ab	0.86 $\pm$ 0.06 ab
Başgül		2.55 $\pm$ 0.24 a	0.85 $\pm$ 0.06 ab
Bülbül-89		2.20 $\pm$ 0.19 ab	0.90 $\pm$ 0.11 ab
Orza-96		2.31 $\pm$ 0.29 ab	0.95 $\pm$ 0.10 ab
Tarm-92		2.00 $\pm$ 0.25 ab	0.79 $\pm$ 0.05 ab
Zeynelağa		2.59 $\pm$ 0.23 a	0.91 $\pm$ 0.03 ab
	0	3.23 $\pm$ 0.08 a	1.17 $\pm$ 0.04 a
	75	2.42 $\pm$ 0.08 b	0.97 $\pm$ 0.03 b
	150	1.76 $\pm$ 0.05 c	0.76 $\pm$ 0.02 c
	225	1.37 $\pm$ 0.04 d	0.64 $\pm$ 0.02 d
<i>P değerleri</i>			
Çeşit (Ç)		<0.001	<0.001
Krom (K)		<0.001	<0.001
Ç $\times$ K		<0.001	<0.001

<sup>a-d</sup>; Bir kritere ait kolondaki farklı harfler, istatistiksel olarak ortalamalar arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ( $P < 0.05$ ). Her bir değer, her tekrarda 12 fidenin örneklendiği üç tekrarin ortalamasıdır. Standart hata ( $\pm$ SH).

**Çizelge 4.3** Erken fide evresindeki 8 arpa çeşidinin gövde ve kök kuru ağırlıkları üzerine Cr(VI) stresinin etkisi

<i>Arpa çeşidi</i>	<i>Cr(VI) konsantrasyonu (<math>\mu</math>M)</i>	<i>Gövde kuru ağırlığı (mg)</i>	<i>Kök kuru ağırlığı (mg)</i>
Angora	0	313.7 $\pm$ 6.8 a	79.3 $\pm$ 1.2 a
	75	272.3 $\pm$ 10.1 b	86.7 $\pm$ 4.6 a
	150	211.7 $\pm$ 12.5 c	63.3 $\pm$ 4.7 b
	225	189.7 $\pm$ 5.0 c	60.7 $\pm$ 1.2 b
Avcı-2002	0	267.7 $\pm$ 8.4 a	76.3 $\pm$ 2.7 a
	75	199.0 $\pm$ 6.2 b	72.7 $\pm$ 1.8 a
	150	202.0 $\pm$ 13.1 b	68.0 $\pm$ 1.5 b
	225	177.7 $\pm$ 7.4 b	55.3 $\pm$ 0.9 c
Aydanhanım	0	310.7 $\pm$ 14.3 a	91.3 $\pm$ 1.8 a
	75	236.7 $\pm$ 4.5 b	75.3 $\pm$ 1.8 b
	150	235.3 $\pm$ 2.7 b	73.3 $\pm$ 2.2 b
	225	220.3 $\pm$ 5.0 b	68.7 $\pm$ 2.3 b
Başgül	0	359.0 $\pm$ 9.9 a	89.7 $\pm$ 1.9 a
	75	309.7 $\pm$ 7.9 b	83.7 $\pm$ 2.9 a
	150	248.7 $\pm$ 7.8 c	73.3 $\pm$ 2.8 b
	225	226.3 $\pm$ 7.4 d	58.7 $\pm$ 2.7 c
Bülbül-89	0	376.7 $\pm$ 20.8 a	105.3 $\pm$ 4.1 a
	75	366.0 $\pm$ 9.2 a	92.7 $\pm$ 3.5 b
	150	281.3 $\pm$ 2.4 b	64.7 $\pm$ 1.3 c
	225	241.5 $\pm$ 5.3 c	50.5 $\pm$ 1.3 d
Orza-96	0	440.7 $\pm$ 13.3 a	105.7 $\pm$ 1.2 a
	75	354.0 $\pm$ 7.1 b	95.0 $\pm$ 1.7 b
	150	259.7 $\pm$ 7.8 c	72.0 $\pm$ 3.6 c
	225	220.3 $\pm$ 6.4 d	62.3 $\pm$ 1.8 d
Tarm-92	0	332.7 $\pm$ 9.3 a	84.7 $\pm$ 3.2 a
	75	261.7 $\pm$ 11.6 b	82.3 $\pm$ 2.0 a
	150	223.0 $\pm$ 9.5 c	69.0 $\pm$ 5.0 b
	225	186.0 $\pm$ 6.4 d	56.0 $\pm$ 3.1 c
Zeynelağa	0	327.7 $\pm$ 2.2 a	86.3 $\pm$ 2.3 a
	75	288.3 $\pm$ 4.5 b	90.3 $\pm$ 4.1 a
	150	257.3 $\pm$ 2.3 c	82.3 $\pm$ 1.8 a
	225	228.0 $\pm$ 7.0 d	69.3 $\pm$ 2.8 b
<i>Ana etkiler ortalaması</i>			
Angora		246.8 $\pm$ 15.3 cb	72.5 $\pm$ 3.6 ab
Avcı-2002		211.6 $\pm$ 10.9 c	68.1 $\pm$ 2.5 b
Aydanhanım		250.8 $\pm$ 11.1 cb	77.2 $\pm$ 2.7 ab
Başgül		285.9 $\pm$ 16.1 ab	76.3 $\pm$ 3.7 ab
Bülbül-89		316.4 $\pm$ 17.9 a	78.3 $\pm$ 6.7 ab
Orza-96		318.7 $\pm$ 26.1 a	83.8 $\pm$ 5.3 a
Tarm-92		250.8 $\pm$ 16.9 bc	73.0 $\pm$ 3.8 ab
Zeynelağa		275.3 $\pm$ 11.3 ab	82.1 $\pm$ 2.7 a
	0	332.6 $\pm$ 10.6 a	87.9 $\pm$ 2.3 a
	75	286.0 $\pm$ 10.0 b	85.1 $\pm$ 1.6 a
	150	241.9 $\pm$ 5.4 c	70.9 $\pm$ 1.3 b
	225	211.5 $\pm$ 4.4 d	60.8 $\pm$ 1.3 c
<i>P değerleri</i>			
Çeşit (Ç)		<0.001	<0.001
Krom (K)		<0.001	<0.001
Ç $\times$ K		<0.001	<0.001

<sup>a-d</sup>; Bir kritere ait kolondaki farklı harfler, istatistiksel olarak ortalamalar arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ( $P < 0.05$ ). Her bir değer, her tekrarda 12 fidenin örneklendiği üç tekrarın ortalamasıdır. Standart hata ( $\pm$ SH).

Erken fide evresindeki arpa çeşitlerinin gövde ve kök kuru ağırlıkları Cr(VI) konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak genellikle önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) azalmıştır (Çizelge 4.3). Arpa çeşitlerinin gövde kuru ağırlıklarındaki azalma kontrole göre tüm Cr(VI) konsantrasyonlarında %2.8-50.0 aralığında belirlenmiştir. Cr(VI) stresinde arpa çeşitlerinin gövde kuru ağırlıklarındaki azalma %2.8-23.8 (75  $\mu$ M), %21.5-41.1 (150  $\mu$ M) ve %29.1-50.0 (225  $\mu$ M) aralığında değişmiştir (Çizelge 4.3). Bununla birlikte, arpa çeşitlerinin kök kuru ağırlıklarındaki azalma kontrole göre tüm Cr(VI) konsantrasyonlarında %2.8-52.1 aralığında belirlenmiştir. Arpa kök kuru ağırlıklarındaki azalma ise %2.8-17.5 (75  $\mu$ M), %4.6-38.6 (150  $\mu$ M) ve %19.7-52.1 (225  $\mu$ M) aralığında saptanmıştır (Çizelge 4.3).

#### **4.1.1 Krom(VI) Stresine Maruz Kalan Arpa Çeşitlerinde Tolerans Sınıflandırması**

Bu araştırmada, daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere Cr(VI) stresine en toleranslı ve en hassas arpa çeşidinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, her bir arpa çeşidine ait konsantrasyonlardaki gövde ve kök kuru ağırlıkları için tolerans indeksi (%) değerleri hesaplanmıştır. Her bir konsantrasyon için hesaplanan tolerans indeksi değerleri arpa çeşitleri arasında puanlandırılmıştır. Buna göre, tolerans indeksi değeri en düşük olan arpa çeşidine 1 puan, en yüksek olan arpa çeşidine 8 puan ve diğer çeşitlere de 2 ila 7 arasında puan verilerek değerlendirilmiştir (Çizelge 4.4). Her bir çeşidin gövde ve köküne ait tüm krom konsantrasyonlarında aldığı puanlar toplanmıştır. Toplam puanlara göre arpa çeşitlerinin Cr(VI) toleransındaki genotipik farklılıklar ortaya konulmuştur. Bu bağlamda, tolerans indeksi temel alınarak yapılan Cr(VI) toleransı sınıflandırılmasında en toleranslı arpa çeşidi Zeynelağa (45 puan), en hassas arpa çeşidi ise Orza-96 (13 puan) olarak saptanmıştır (Çizelge 4.4). Böylece Cr-toleranslı (Zeynelağa) ve Cr-hassas (Orza-96) olarak belirlenen arpa çeşitleri daha sonraki çalışmalarda kullanılmıştır.



**Çizelge 4.4** Farklı Cr(VI) konsantrasyonlarına maruz bırakılan 8 arpa çeşidinin kuru ağırlık temelinde belirlenen tolerans indeksi (%) değerleri ve puanları

Arpa Çeşitleri	Gövde			Kök			Toplam puan
	Tolerans indeksi (%)			Tolerans indeksi (%)			
	75 µM	150 µM	225 µM	75 µM	150 µM	225 µM	
Angora	86.8 (6)*	67.5 (3)	60.5 (3)	109.2 (8)	79.8 (3)	76.5 (7)	<b>30</b>
Avcı-2002	74.4 (1)	75.5 (6)	66.4 (6)	95.2 (5)	89.1 (7)	72.5 (5)	<b>30</b>
Aydanhanım	76.2 (2)	75.8 (7)	70.9 (8)	82.5 (1)	80.3 (4)	75.2 (6)	<b>28</b>
Başgül	86.3 (5)	69.3 (4)	63.1 (4)	93.3 (4)	81.8 (6)	65.4 (3)	<b>26</b>
Bülbül-89	97.2 (8)	74.7 (5)	64.1 (5)	88.0 (2)	61.4 (1)	47.9 (1)	<b>22</b>
Orza-96	80.3 (4)	58.9 (1)	50.0 (1)	89.9 (3)	68.1 (2)	59.0 (2)	<b>13**</b>
Tarm-92	78.7 (3)	67.0 (2)	55.9 (2)	97.2 (6)	81.5 (5)	66.1 (4)	<b>22</b>
Zeynelağa	88.0 (7)	78.5 (8)	69.6 (7)	104.6 (7)	95.4 (8)	80.3 (8)	<b>45**</b>

\* Parantez içindeki sayılar tolerans indeksi (%) değerlerine göre verilen puanlardır.

\*\* En yüksek puan en az zararı, en düşük puan ise en fazla zararı ifade etmektedir.

## 4.2 Kroma Hassas ve Toleranslı Arpa Çeşitlerinde Cr(VI) Stresinin Etkisi

Bu araştırmada, Cr(VI) stresine karşı oluşturulan hücrel cevapların belirlenmesi amacıyla gövde ve kök kuru ağırlığı temel alınarak hesaplanan tolerans indeksi değerlerine göre belirlenen Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinde krom birikimi, fotosentetik pigment içeriği (klorofil *a*, *b* ve karotenoidler), δ-aminolevülinik asit dehidrataz aktivitesi, prolin içeriği, malondialdehit içeriği, bazı antioksidant enzimlerin aktivitesi ve protein sentezi üzerine hegzavalent kromun etkisi değerlendirilmiştir.

### 4.2.1 Gövde ve Kök Dokusunda Krom Birikimi Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi

Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin gövde ve kök dokusunda krom birikimi, Cr(VI) konsantrasyonundaki (75, 150 ve 225 µM) artışa bağlı olarak önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) artmıştır (Çizelge 4.5). Kontrole göre en yüksek Cr(VI) konsantrasyonunda (225 µM), Orza-96 çeşidinin gövde dokusundaki Cr birikimindeki

artış 136 kat, Zeynelağa çeşidinde ise 158 kat olarak belirlenmiştir. Kontrole göre 225  $\mu\text{M}$  Cr(VI) konsantrasyonunda, Orza-96 çeşidinin kök dokusunda Cr birikimindeki artış 163 kat, Zeynelağa çeşidinde ise yaklaşık 215 kat olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, 225  $\mu\text{M}$  Cr(VI) konsantrasyonunda maksimum Cr birikimi gövde dokusunda 95  $\mu\text{g g}^{-1}$  KA ve kök dokusunda 1825  $\mu\text{g g}^{-1}$  KA olarak bulunmuştur. Bu bağlamda, her iki çeşidin kök dokusundaki Cr birikimi gövde dokusuna göre daha yüksek oranda saptanmıştır. Cr-toleranslı Zeynelağa çeşidi gövde dokusunda Cr-hassas Orza-96 çeşidine göre daha fazla krom biriktirirken, ters durum kök dokularında bulunmuştur (225  $\mu\text{M}$  hariç) (Çizelge 4.5).

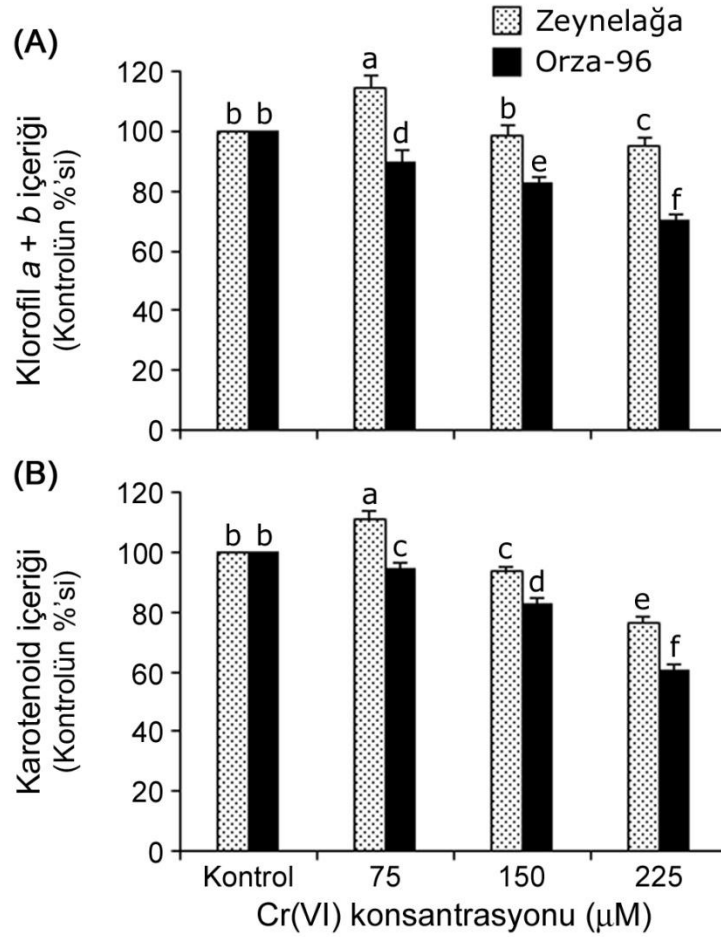
**Çizelge 4.5** Farklı Cr(VI) konsantrasyonlarına maruz bırakılan Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin gövde ve kök dokusunda krom birikimi

<i>Arpa çeşidi</i>	<i>Cr(VI) konsantrasyonu (<math>\mu\text{M}</math>)</i>	<i>Gövde Cr birikimi (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math> KA)</i>	<i>Kök Cr birikimi (<math>\mu\text{g g}^{-1}</math> KA)</i>
Orza-96	0	0.58 $\pm$ 0.007 a	10.6 $\pm$ 0.04 a
	75	11.2 $\pm$ 0.025 c	1626.3 $\pm$ 13.5 c
	150	33.2 $\pm$ 0.155 e	1808.8 $\pm$ 15.0 d
	225	79.7 $\pm$ 0.155 g	1732.9 $\pm$ 9.4 c
Zeynelağa	0	0.61 $\pm$ 0.009 a	8.5 $\pm$ 0.03 a
	75	16.3 $\pm$ 0.062 b	1351.8 $\pm$ 6.2 b
	150	36.4 $\pm$ 0.144 d	1641.4 $\pm$ 6.7 c
	225	95.3 $\pm$ 0.554 f	1825.0 $\pm$ 8.7 d
<i>Ana etkiler ortalaması</i>			
Orza-96		31.2 $\pm$ 7.8 a	1.294 $\pm$ 192.2 a
Zeynelağa		37.1 $\pm$ 9.3 a	1.206 $\pm$ 183.4 a
	0	0.59 $\pm$ 0.006 a	9.5 $\pm$ 0.4 a
	75	13.7 $\pm$ 0.96 b	1.489 $\pm$ 52.3 b
	150	34.7 $\pm$ 0.59 c	1.725 $\pm$ 32.5 c
	225	87.4 $\pm$ 2.97 d	1.779 $\pm$ 18.3 c
<i>P değerleri</i>			
Çeşit (Ç)		<0.001	<0.001
Krom (K)		<0.001	<0.001
Ç $\times$ K		<0.001	<0.001

<sup>a-g</sup>; Bir kritere ait kolondaki farklı harfler, istatistiksel olarak ortalamalar arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ( $P < 0.05$ ).

#### 4.2.2 Fotosentetik Pigment İçeriği Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi

Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin yaprak dokularında toplam klorofil (klorofil *a* + *b*) ve karotenoid içerikleri (kontrolün %'si) Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Zeynelağa ve Orza-96 arpa çeşitlerinin fotosentetik pigment içeriğinde önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) bazı farklılıklar belirlenmiştir. Orza-96 arpa çeşidinde toplam klorofil içeriği, kontrole göre 75, 150 ve 225 Cr(VI) konsantrasyonlarında sırasıyla %9.9, 16.9 ve 29.7 oranında önemli düzeyde azalmıştır. Buna karşın, kontrole göre 75  $\mu\text{M}$  Cr(VI) konsantrasyonunda Zeynelağa çeşidinin toplam klorofil içeriğinde önemli düzeyde artma (%15.2), 225  $\mu\text{M}$  Cr(VI) konsantrasyonunda ise önemli düzeyde azalma (%4.6) belirlenmiştir (Şekil 4.1A).

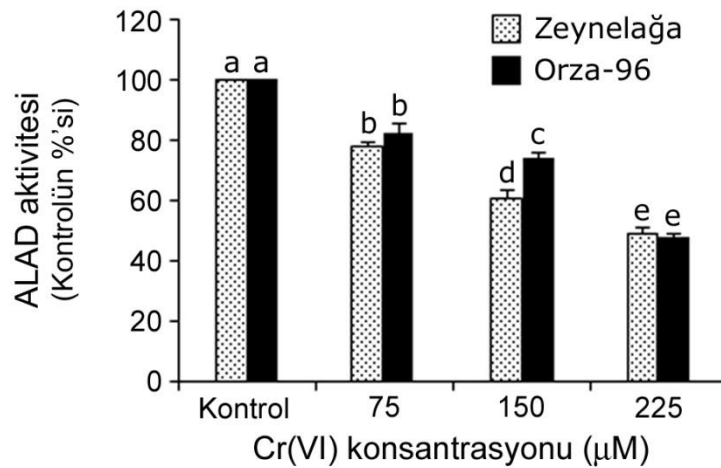


**Şekil 4.1** Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin klorofil *a* + *b* (A) ve karotenoid (B) içeriği üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının etkisi. Farklı harfler, Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre Cr(VI) konsantrasyonları arasında önemli düzeydeki ( $P<0.05$ ) farklılıkları göstermektedir.

Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin karotenoid içeriğinde krom stresine bağlı olarak önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) bazı değişiklikler belirlenmiştir (Şekil 4.1B). Zeynelağa arpa çeşidinde karotenoid içeriği kontrole göre 75  $\mu\text{M}$  Cr(VI) konsantrasyonunda %11.6 oranında artarken, 150 ve 225  $\mu\text{M}$  Cr(VI) konsantrasyonlarında sırasıyla %6.7 ve 23.9 oranında önemli düzeyde azalmıştır. Diğer taraftan, Orza-96 arpa çeşidinin karotenoid içeriği, kontrole göre 75, 150 ve 225 Cr(VI) konsantrasyonlarında sırasıyla %5.3, 17.3 ve 39.4 oranında önemli düzeyde azalmıştır (Şekil 4.1B).

#### 4.2.3 $\delta$ -Aminolevülinik Asit Dehidrataz Aktivitesi Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi

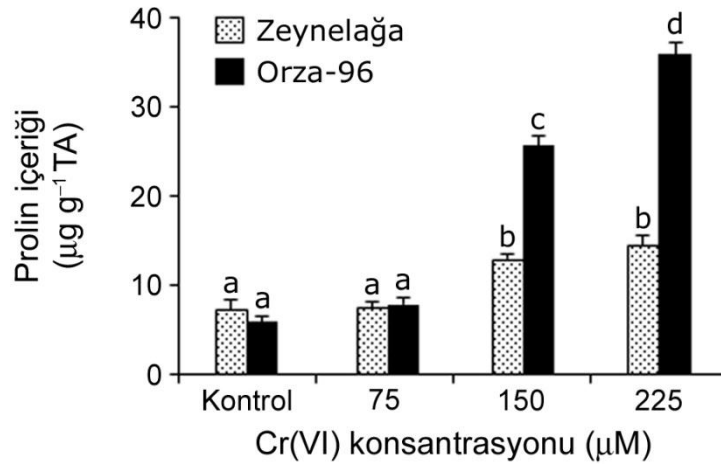
Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin ilk yaprak dokusunda Cr(VI) konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak  $\delta$ -aminolevülinik asit dehidrataz (ALAD) aktivitesinde önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) inhibisyon belirlenmiştir (Şekil 4.2). Zeynelağa arpa çeşidinde ALAD aktivitesi kontrole göre Cr konsantrasyonlarında sırasıyla %20.4, 38.2 ve 49.9 oranında azalırken, Orza-96 arpa çeşidinde sırasıyla %15.8, 24.4 ve 51.5 oranında azalmıştır. Bununla birlikte, iki arpa çeşidinin ALAD aktiviteleri arasında ayırt edici bir farklılık belirlenmemiştir (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2** Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin  $\delta$ -aminolevülinik asit dehidrataz (ALAD) aktivitesi üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının etkisi. Farklı harfler, Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre Cr(VI) konsantrasyonları arasında önemli düzeydeki ( $P<0.05$ ) farklılıkları göstermektedir.

#### 4.2.4 Prolin İçeriği Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi

Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin ilk yaprak dokusundaki prolin içeriğinde, kontrole göre Cr(VI) konsantrasyonlarında önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) bazı farklılıklar belirlenmiştir (Şekil 4.3). Her iki arpa çeşidinin prolin içeriğinde kontrollerine göre 75  $\mu\text{M}$  Cr(VI) konsantrasyonunda önemli bir farklılık bulunmamıştır. Zeynelağa arpa çeşidinde prolin içeriği 150 ve 225  $\mu\text{M}$  Cr(VI) konsantrasyonlarında yaklaşık 2'şer kat artış göstermiştir. Buna karşın, Orza-96 arpa çeşidinin yaprak prolin içeriği kontrole göre 150 ve 225  $\mu\text{M}$  Cr(VI) konsantrasyonlarında sırasıyla yaklaşık 4 ila 6 kat artış göstermiştir. Sonuç olarak, Cr-hassas Orza-96 arpa çeşidinin Cr-toleranslı Zeynelağa arpa çeşidine göre önemli düzeyde daha yüksek prolin içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3).

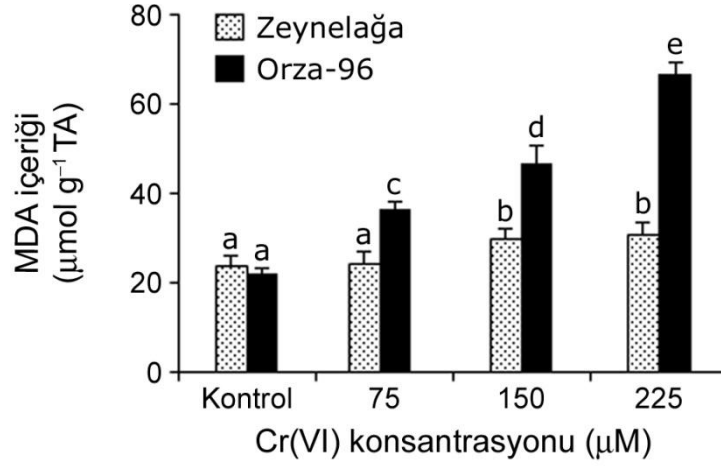


**Şekil 4.3** Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin yaprak prolin içeriği üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının etkisi. Farklı harfler, Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre Cr(VI) konsantrasyonları arasında önemli düzeydeki ( $P<0.05$ ) farklılıkları göstermektedir.

#### 4.2.5 Malondialdehit İçeriği Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi

Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin ilk yaprak dokusunda Cr(VI) stresine bağlı olarak malondialdehit (MDA) içeriklerinde önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) bazı farklılıklar belirlenmiştir (Şekil 4.4). Zeynelağa arpa çeşidinde MDA içeriği 150 ve 225  $\mu\text{M}$  Cr(VI) konsantrasyonlarında önemli bir artış gösterirken, Orza-96 arpa çeşidinde MDA içeriği Cr(VI) konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak kademeli

bir artış göstermiştir. Zeynelağa arpa çeşidinde MDA içeriği 150 ve 225  $\mu\text{M}$  Cr(VI) konsantrasyonlarında sırasıyla 1.2 ve 1.3 kat artış göstermiştir. Buna karşın, Orza-96 arpa çeşidinde MDA içeriği kontrole göre Cr(VI) uygulamalarında sırasıyla 1.6, 2.1 ve 3 kat artış göstermiştir (Şekil 4.4).

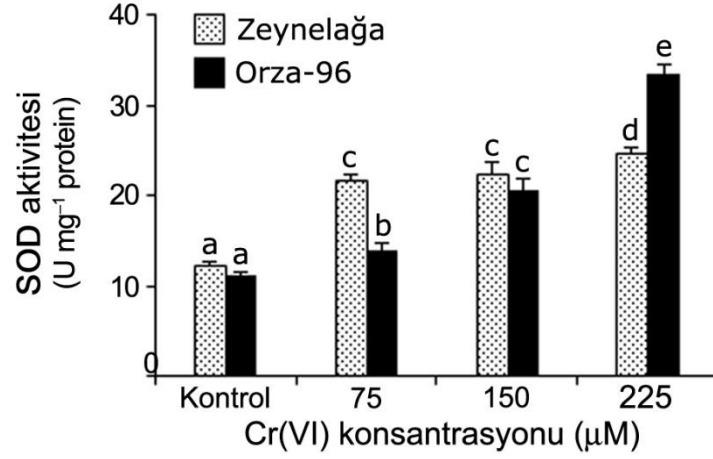


**Şekil 4.4** Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin yaprak MDA içeriği üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının etkisi. Farklı harfler, Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre Cr(VI) konsantrasyonları arasında önemli düzeydeki ( $P<0.05$ ) farklılıkları göstermektedir.

#### 4.2.6 Bazı Antioksidant Enzimlerin Aktivitesi Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi

##### 4.2.6.1 Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi

Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin ilk yaprak dokusunda Cr(VI) stresine bağlı olarak süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinde önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) bir artış saptanmıştır (Şekil 4.5). Zeynelağa arpa çeşidinin SOD aktivitesinde kontrole göre Cr(VI) konsantrasyonlarında sırasıyla 1.7, 1.8 ve 2 kat artış belirlenmiştir. Bununla birlikte, Orza-96 arpa çeşidinde SOD aktivitesi, Cr(VI) konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak kademeli bir artış göstermiş ve bu artış kontrole göre diğer konsantrasyonlarda (75, 150 ve 225  $\mu\text{M}$ ) sırasıyla 1.2, 1.8 ve 3 kat olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5).



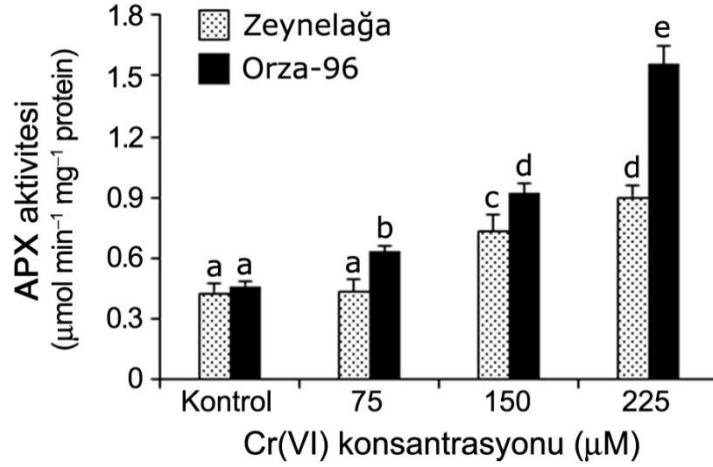
**Şekil 4.5** Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının etkisi. Farklı harfler, Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre Cr(VI) konsantrasyonları arasında önemli düzeydeki ( $P<0.05$ ) farklılıkları göstermektedir.

#### 4.2.6.2 Askorbat Peroksidaz Aktivitesi Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi

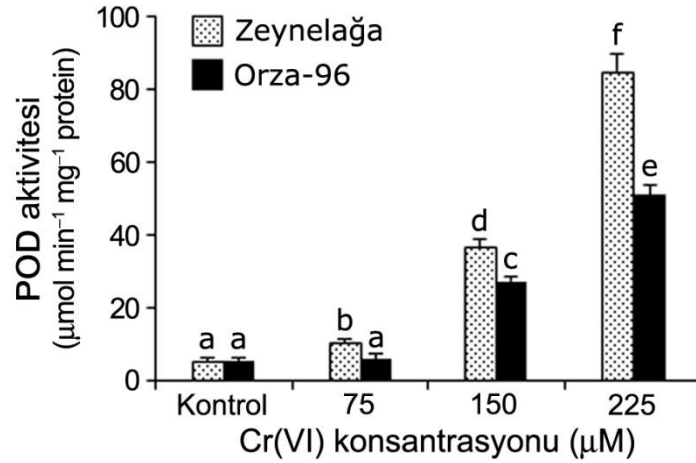
Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin ilk yaprak dokusunda, Cr(VI) stresi askorbat peroksidaz (APX) aktivitesinde önemli ( $P<0.05$ ) değişikliklere neden olmuştur (Şekil 4.6). Zeynelağa arpa çeşidinde APX aktivitesindeki artış kontrole göre 75 µM Cr(VI) konsantrasyonunda önemsizken, diğer Cr(VI) konsantrasyonlarındaki (150 ve 225 µM) artış sırasıyla 1.7 ve 2.1 kat olarak saptanmıştır. Bununla birlikte, Orza-96 arpa çeşidinde APX aktivitesi, Cr(VI) konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak kademeli bir artış göstermiş; bu artış kontrole göre diğer konsantrasyonlarda (75, 150 ve 225 µM) sırasıyla 1.4, 2 ve 3.4 kat olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6).

#### 4.2.6.3 Guaiakol Peroksidaz Aktivitesi Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi

Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin ilk yaprak dokusunda guaiakol peroksidaz (POD) aktivitesi Cr(VI) konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) artmıştır (Şekil 4.7). Bununla birlikte, Zeynelağa arpa çeşidinde POD aktivitesi, kontrole göre 75, 150 ve 225 µM Cr(VI) konsantrasyonlarında sırasıyla 1.9, 6.9 ve 15.9 kat artış göstermiştir. Orza-96 arpa çeşidinde POD aktivitesi, kontrole göre 150 ve 225 µM Cr(VI) konsantrasyonlarında sırasıyla 5 ve 9.3 kat artış göstermiştir (Şekil 4.7).



**Şekil 4.6** Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinde askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının etkisi. Farklı harfler, Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre Cr(VI) konsantrasyonları arasında önemli düzeydeki ( $P<0.05$ ) farklılıkları göstermektedir.

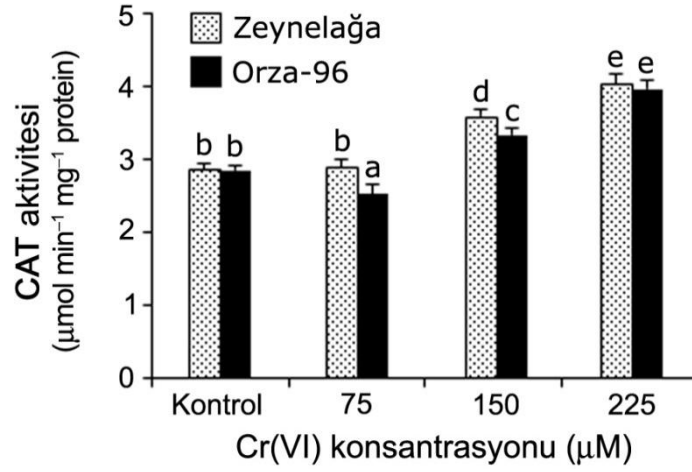


**Şekil 4.7** Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinde guaiakol peroksidaz (POD) aktivitesi üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının etkisi. Farklı harfler, Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre Cr(VI) konsantrasyonları arasında önemli düzeydeki ( $P<0.05$ ) farklılıkları göstermektedir.



#### 4.2.6.4 Katalaz Aktivitesi Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi

Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin ilk yaprak dokusunda Cr(VI) stresi katalaz (CAT) aktivitesinde önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) değişikliklere neden olmuştur (Şekil 4.8). Orza-96 arpa çeşidinde CAT aktivitesi, 75  $\mu\text{M}$  Cr(VI) konsantrasyonunda önemli düzeyde inhibe (%11.5) olurken, Zeynelağa arpa çeşidinde önemli bir fark belirlenmemiştir. Zeynelağa arpa çeşidinde CAT aktivitesi kontrole göre 150 ve 225  $\mu\text{M}$  Cr(VI) konsantrasyonlarında sırasıyla %25 ve 41 artış gösterirken, Orza-96 arpa çeşidinde bu oran %17 ve 39 olarak bulunmuştur (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinde katalaz (CAT) aktivitesi üzerine farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının etkisi. Farklı harfler, Duncan Çoklu Karşılaştırma testine göre Cr(VI) konsantrasyonları arasında önemli düzeydeki ( $P<0.05$ ) farklılıkları göstermektedir.

#### 4.2.7 Protein Sentezi Üzerine Cr(VI) Stresinin Etkisi

Bu araştırmada, Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerine ait fideler, kontrol ve örneklenebilecek düzeyde yaprak gelişimine izin veren en yüksek Cr(VI) konsantrasyonuna (225  $\mu\text{M}$ ) maruz bırakılmıştır. Arpa çeşitlerinin yaprak dokusundan izole edilen proteinler izoelektrik fokuslama (IEF) yöntemiyle izoelektrik noktalarına (pI) ve sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAJE) yöntemiyle moleküler ağırlıklarına (MA, kDa) göre ayrıştırılmış ve gümüş boyama metodu ile görünür hale getirilerek değerlendirilmiştir. Protein profillerinde; yeni sentezlenen, sentez miktarı belirgin şekilde artan veya azalan düşük moleküler ağırlıklı

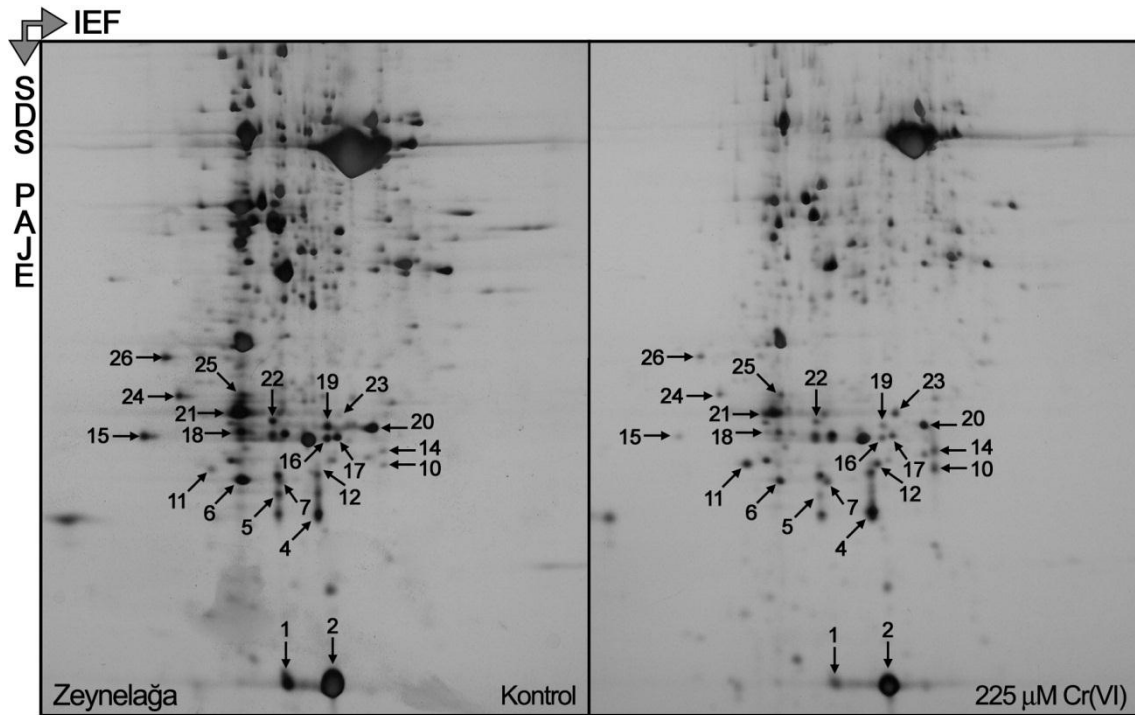
(DMA, 15.6-30.1 kDa) proteinler değerlendirilmiş ve bu proteinlerin pI değerleri 5.7 ila 7.5 arasında belirlenmiştir (Şekil 4.9 ve 4.10, Çizelge 4.6).

**Çizelge 4.6** Kontrolle göre 225 µM Cr(VI) konsantrasyonunda, Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin ilk yaprak dokusundan ekstrakte edilen toplam çözünebilir proteinlerdeki polimorfizm

Protein no	MA (kDa)	pI	Arpa Çeşitleri	
			Zeynelağa	Orza-96
1	15.6	6.6	↓*	↓
2	15.6	7.0	↓	↓
3	21.0	6.6	-	↓
4	21.0	6.9	↑	↑
5	21.6	6.6	↓	↓
6	22.0	6.3	↓	↓
7	22.0	6.6	+	+
8	22.1	6.6	↔	↓
9	22.1	6.9	↔	↑
10	22.4	7.5	↑	↑
11	22.5	6.1	↑	↔
12	22.5	6.9	+	+
13	22.6	6.2	↔	↑
14	22.8	7.5	↑	↑
15	23.0	5.6	↓	↓
16	23.0	7.0	↓	↓
17	23.0	7.1	↓	↓
18	23.1	6.3	↓	↓
19	23.3	7.0	↓	↓
20	23.4	7.4	↓	↓
21	23.9	6.3	↓	↓
22	23.5	6.6	↓	↓
23	23.9	7.1	↑	↑
24	25.2	5.8	↓	↓
25	25.2	6.3	↓	↔
26	30.1	5.7	↓	↓

\* ↓: Sentezi azalan protein, ↑: Sentezi artan protein, +: Yeni sentez, ↔: Değişim göstermeyen

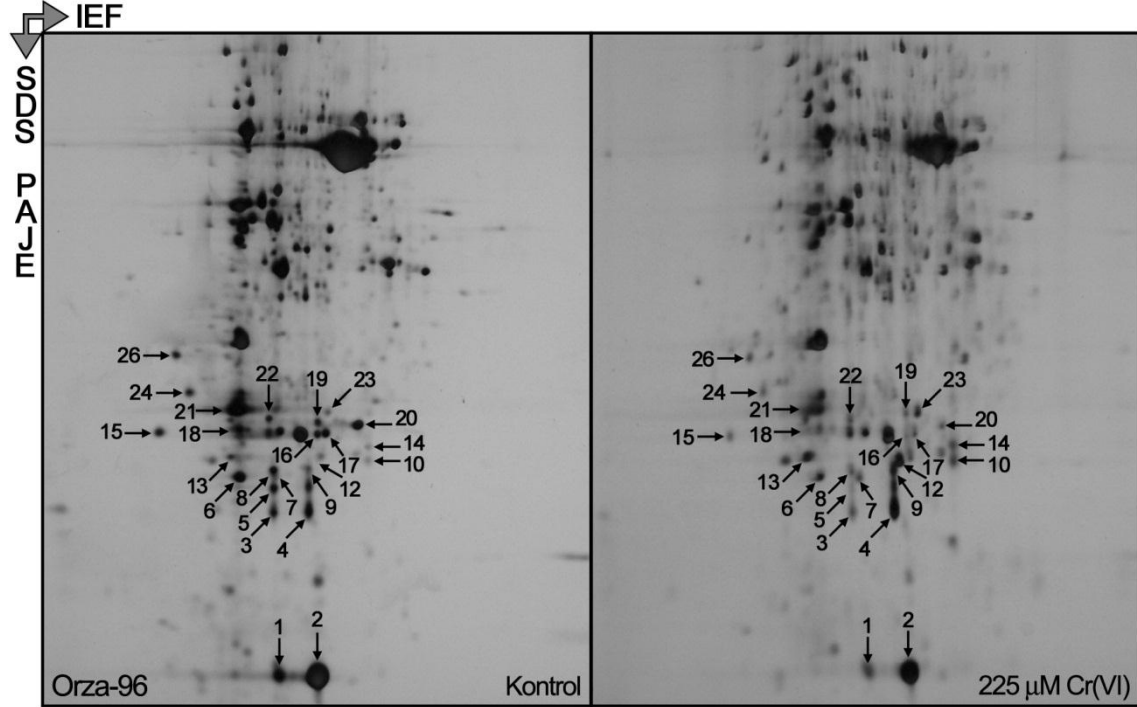
Cr-toleranslı Zeynelağa arpa çeşidinin ilk yaprak dokusunda, kontrole göre 225  $\mu\text{M}$  Cr(VI) konsantrasyonunda 22.0 kDa (pI 6.6, protein no:7) ve 22.5 kDa (pI 6.9, protein no: 12) moleküler ağırlığında iki yeni protein sentezi belirlenmiştir (Şekil 4.9, Çizelge 4.6). Bununla birlikte, moleküler ağırlıkları 21.0-23.9 kDa ve pI'ları 6.1-7.5 arasında değişen 5 proteinin (protein no: 4, 10, 11, 14 ve 23) sentezinde belirgin bir artış belirlenmiştir. Moleküler ağırlıkları 15.6-30.1 kDa ve pI'ları 5.7-7.0 arasında değişen 15 proteinin (protein no: 1, 2, 5, 6, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25 ve 26) sentezinde belirgin bir azalma belirlenmiştir (Şekil 4.9, Çizelge 4.6).



**Şekil 4.9** Kontrol ve 225  $\mu\text{M}$  Cr(VI) uygulanmış Cr-toleranslı Zeynelağa arpa çeşidine ait fidelerin ilk yaprak dokusundan ekstrakte edilen toplam çözünebilir proteinlerin 2-D elektroforetik profilleri. Kontrole göre 225  $\mu\text{M}$  Cr(VI) konsantrasyonunda yeni sentezlenen ve sentez miktarında belirgin bir artma veya azalma gözlenen proteinler (Çizelge 4.6) her iki jelde de oklar ile gösterilmiştir.

Cr-hassas Orza-96 arpa çeşidinin ilk yaprak dokusunda, kontrole göre 225  $\mu\text{M}$  Cr(VI) konsantrasyonunda 22.0 kDa (pI 6.6, protein no:7) ve 22.5 kDa (pI 6.9, protein no: 12) moleküler ağırlığında iki yeni protein sentezi belirlenmiştir (Şekil 4.10, Çizelge 4.6). Bununla birlikte, moleküler ağırlıkları 21.0-23.9 kDa ve pI'ları 6.2-7.5 arasında değişen 6 proteinin (protein no: 4, 9, 10, 13, 14 ve 23) sentezinde belirgin bir artış belirlenmiştir. Moleküler ağırlıkları 15.6-30.1 kDa ve pI'ları 5.7-7.0 arasında değişen 16 proteinin

(protein no: 1, 2, 3, 5, 6, 8, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24 ve 26) sentezinde belirgin bir azalma belirlenmiştir (Şekil 4.6 Çizelge 4.10).



**Şekil 4.10** Kontrol ve 225 µM Cr(VI) uygulanmış Cr-hassas Orza-96 arpa çeşidine ait fidelerin ilk yaprak dokusundan ekstrakte edilen toplam çözünebilir proteinlerin 2-D elektroforetik profilleri. Kontrole göre 225 µM Cr(VI) konsantrasyonunda yeni sentezlenen ve sentez miktarında belirgin bir artma veya azalma gözlenen proteinler (Çizelge 4.6) her iki jelde de oklar ile gösterilmiştir.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bitki büyüme ve gelişimi için gerekli bir element olmayan krom (Cr), yaygın endüstriyel kullanımından dolayı önemli bir çevresel kirleticidir (Shanker *et al.* 2005). Çevrede her fazda bulunabilen Cr, doğal olarak oluşan topraklarda 10 ila 50 mg kg<sup>-1</sup> konsantrasyonlarda bulunabilmektedir (Zayed and Terry 2003). Mikromolar aralıktaki Cr(VI) stresi, şiddetli fitotoksik semptomlara neden olabilmektedir (Panda and Parta 1997, Choudhury and Panda 2005).

Bitkilerde Cr toksisitesinin, bu elementin türüne ve besin ortamındaki konsantrasyonuna bağlı olduğu belirtilmiştir (Vernay *et al.* 2008). Bitki büyümesi, içsel ve dışsal büyüme faktörlerini oluşturan genotip ve çevrenin bir fonksiyonu olarak düşünülmektedir (Shanker *et al.* 2005). Birçok çalışmada, farklı konsantrasyonlarda uygulanan Cr(VI)'un bitki büyümesinde inhibisyona neden olduğu rapor edilmiştir (Samantary 2002, Panda 2007, Vernay *et al.* 2008, Gupta *et al.* 2009). Mevcut araştırmada, sekiz arpa çeşidinin (Angora, Avcı-2002, Aydanhanım, Başgül, Bülbül-89, Orza-96, Tarm-92, Zeynelağa) fide gelişimi üzerine Cr(VI) stresinin etkilerinin belirlenmesinin yanı sıra Cr(VI) stresine en hassas ve en toleranslı arpa çeşidinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, arpa çeşitlerine ait üç-günlük etiyole fideler 75, 150 ve 225 µM Cr(VI) konsantrasyonlarına 7 gün süreyle maruz bırakılmıştır. Bu süre sonunda, de-etiyole arpa fidelerinin gövde ve kök uzunlukları ile taze ve kuru ağırlıkları Cr(VI) konsantrasyonunun artmasıyla genellikle önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) azalmıştır. Cr(VI) stresi, gövde uzunluğuna göre kök uzunluğunu genellikle daha fazla olumsuz etkilemiştir. Tüm arpa çeşitlerinde, kontrole göre Cr(VI) konsantrasyonlarında gövde uzunlukları %0.3-47.9 aralığında, kök uzunlukları ise %15.8-49.5 aralığında azalma göstermiştir. Krom stresine bağlı olarak büyümedeki inhibisyon ve gövde dokusuna göre kök dokusunun daha fazla hassasiyeti *Miscanthus sinensis*, *Sorghum bicolor*, *Triticum aestivum*, *Vigna radiata* ve *Spinacea oleracea* gibi bitki türlerinde belirlenmiştir (Shanker and Pathmanabhan 2004, Shanker *et al.* 2004, Arduini *et al.* 2006, Gopal *et al.* 2009). Bununla birlikte, farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının (50-200 µM) *Brassica juncea* bitkilerinin gövde uzunluğunu etkilemediği; fakat kök uzunluğunun yalnızca 200 µM Cr(VI) konsantrasyonunda önemli düzeyde azaldığı

bildirilmiştir (Diwan *et al.* 2010). Besin ortamı ve toksik elementler ile direkt etkileşim içinde olan köklerin genel olarak daha duyarlı olduğu belirtilmiştir (Hagemeyer 1999). Kök büyümesindeki azalmanın su ve besin elementlerinin alınımının yavaşlamasına neden olduğu ve bu durumun tüm bitki büyümesini inhibe ettiği belirtilmiştir (Vernay *et al.* 2008). Bununla birlikte, köklerde yüksek seviyelerde ağır metal birikimi ve/veya herhangi bir ağır metal translokasyon mekanizmasının olmamasından dolayı köklerde ağır metal miktarı artmakta ve kök büyümesi azalmaktadır (Lu *et al.* 2004).

Hekzavalent kromun gövde ve kök taze ve kuru ağırlıkları üzerine olan olumsuz etkisi *Vigna radiata* (Shanker *et al.* 2004), çeltik (Panda 2007), buğday (Subrahmanyam 2008), *Datura innoxia* (Vernay *et al.* 2008), bezelye (Pandey *et al.* 2009a, b), domates (Henriques 2010) ve arpa (Ali *et al.* 2011) gibi bitki türlerinde de belirlenmiştir. Araştırmamızda, arpa çeşitlerinin gövde ve kök taze ve kuru ağırlıkları Cr(VI) konsantrasyonunun artmasıyla genellikle önemli düzeyde azalmıştır. Gupta vd. (2009), Cr(VI) stresinin *Brassica juncea* bitkilerinin gövde taze ağırlığında önemli düzeyde bir azalmaya, buna karşın araştırma sonuçlarımıza zıt olarak Cr(VI) stresinin gövde kuru ağırlığında önemli düzeyde bir artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Bezelye bitkilerinde 20 µM Cr(VI) uygulaması gövde ve kök kuru ağırlıklarında önemli bir etkiye neden olmadığı, ancak 200 µM gibi yüksek Cr(VI) uygulamasının kuru ağırlıklarda önemli inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir (Dixit *et al.* 2002, Pandey *et al.* 2009a).

Mevcut araştırmada, Cr(VI) stresi tüm arpa çeşitlerinin köküne göre gövde taze ve kuru ağırlıklarını genellikle daha fazla olumsuz etkilemiştir. Sonuçlarımıza zıt olarak, Vernay vd. (2008), *Datura innoxia* bitkisinde kök kuru ağırlığının gövde kuru ağırlığından daha fazla etkilendiğini bildirmiştir. Kök büyümesindeki bu inhibisyon durumu, fotosentetik oran üzerine metal iyonlarının primer etkisi olarak değerlendirilmiştir (Panda and Patra 1997, Panda and Choudhury 2005, Choudhury and Panda 2005). Bununla birlikte, mevcut çalışmadan farklı olarak süreye bağlı Cr(VI) stresi çalışmasında, ağır metallere toleranslı *Lolium perenne* L. bitkisinde, 15 günlük uygulama sonunda sadece 500 µM, 45 gün sonunda ise tüm Cr(VI) uygulamalarında toplam kuru ağırlıkta inhibisyonun gözlemlendiği belirtilmiştir (Vernay *et al.* 2007). Krom stresine bağlı olarak gövde ve

kökün taze ve kuru ağırlık üretimindeki azalmanın doku geçirgenliğindeki artış, hücre bölünmesindeki inhibisyona bağlı olarak büyümedeki azalma veya farklı bitki dokularındaki Cr birikiminden kaynaklanabildiği bildirilmiştir (Dube *et al.* 2003, Diwan *et al.* 2010). Bazı araştırmacılar, krom stresinin kloroplast ve mitokondrinin yapı veya işlevlerinde neden olduğu oksidatif zarar sonucu, kuru ağırlık üretiminin olumsuz etkilendiğini bildirmişlerdir (Dixit *et al.* 2002, Subrahmanyam 2008).

Potansiyel olarak toksik metallerin varlığında büyümenin sürdürülmesi, birçok mekanizmayı kapsayan “ağır metal toleransı” olarak ifade edilmektedir (Clemens 2006). Bu nedenle, araştırmamızda Cr(VI) stresine toleranslı ve hassas arpa çeşitlerinin belirlenmesinde büyüme parametreleri değerlendirilmiştir. Diwan vd. (2010), kök büyümesini ağır metal toleransının sınıflandırılmasında önemli bir parametre olarak değerlendirmişlerdir. Rout vd. (1997), farklı Cr(VI) konsantrasyonlarına maruz bırakılan 8 mung fasulyesi (*Vigna radiata* L.) genotipini gövde ve kök uzunluklarındaki inhibisyonlar temel alınarak hesaplanan tolerans indeksi (%) değerlerine göre sınıflandırmıştır. Kroma toleransta farklılık gösteren Cr-hassas mung fasulyesi (*Vigna radiata* L.) çeşitlerinde (PDM-54 ve Sujata) Cr(VI) stresine bağlı olarak gövde ve/veya kök uzunluklarındaki azalmanın, Cr-toleranslı çeşitlere (TARM-22 ve K-851) göre daha fazla olduğu bildirilmiştir (Rout *et al.* 1997, Samantaray 2002). Diğer taraftan, Bağcı vd. (2003), strese maruz kalan bir türe ait bazı çeşitlerin daha uzun gövde ve köklere sahip olmalarına karşın yeteri kadar kuru ağırlık üretmediklerini, bazı çeşitlerin ise nispeten daha kısa kök ve gövdeye sahip olmalarına karşın daha iyi şekilde kuru ağırlık ürettiklerini ve bu nedenle toleranslı ve hassas çeşitlerin seleksiyonunda kuru ağırlığın kullanılmasının daha uygun bir kriter olacağını ileri sürmüşlerdir. Benzer olarak bulgularımız ışığında da, Cr(VI) stresinden sadece kök dokusunun değil, aynı zamanda gövde dokusunun da olumsuz etkilenmesi nedeniyle gövde ve kök kuru ağırlıklarının birlikte değerlendirilmesinin daha uygun olduğu görülmektedir. Bu nedenle, araştırmamızda Cr(VI) stresine maruz bırakılan 8 arpa çeşidinin gövde ve kök kuru ağırlıklarındaki inhibisyonlar temel alınarak tolerans indeksi (%) değerleri hesaplanmış ve 8 arpa çeşidi Cr(VI) stresine toleransları bakımından sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırma temelinde, çalışılan mevcut arpa çeşitleri arasında Cr(VI) stresine en toleranslı arpa çeşidi Zeynelağa, en hassas arpa çeşidi ise Orza-96 olarak belirlenmiştir.

En yüksek Cr(VI) konsantrasyonunda (225 µM), Cr-toleranslı Zeynelağa arpa çeşidinde gövde ve kök kuru ağırlığındaki azalmalar sırasıyla yaklaşık %30 ve 20 olarak belirlenmiştir. Cr-hassas Orza-96 arpa çeşidinde ise bu değerler sırasıyla %50 ve 41 olarak saptanmıştır. Diwan vd. (2010), farklı Cr(VI) konsantrasyonlarının (50-200 µM) *Vigna radiata* bitkisinin taze ve kuru ağırlıklarını azalttığını, *Brassica juncea* bitkisinde ise önemli bir etkiye neden olmadığını bildirmişlerdir. Bu nedenle, *B. juncea* türünü *V. radiata* türüne göre nispeten Cr(VI)'a daha toleranslı genotip olarak değerlendirmişlerdir. Cr(VI) stresi altında, alüminyuma toleransta farklılık gösteren Al-toleranslı Gebenia arpa çeşidinin kuru ağırlığındaki azalmanın Al-hassas Shang 70-119 arpa çeşidine göre nispeten daha düşük olduğu belirtilmiştir (Ali *et al.* 2011).

Krom, bitkiler için mutlak gerekli olmayan toksik bir element olduğundan bitkiler herhangi bir spesifik Cr taşınım mekanizmasına sahip olmayabilir (Shanker *et al.* 2004). Yüksek bitkilerde Cr(VI) alınımının muhtemelen sülfat translokasyon taşıyıcıları aracılığıyla oldukça hızlı ve aktif bir mekanizmayla oluştuğu belirtilmiştir (Barceló and Poschenrieder 1997, Cervantes *et al.* 2001). Mevcut araştırmada, Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinde Cr birikimi Cr(VI) konsantrasyonundaki artışla artmıştır. Samantaray (2002), Cr(VI) konsantrasyonunun artışıyla mung fasulyesinin Cr-toleranslı çeşitlerinde (TARM-22 ve K-851) Cr birikiminin azaldığını, buna karşın Cr-hassas çeşitlerde (PDM-54 ve Sujata) ise Cr birikiminin arttığını bildirmiştir. Araştırmamızda, maksimum Cr birikimi Zeynelağa arpa çeşidinin gövde dokusunda 95 µg Cr g<sup>-1</sup> KA ve kök dokusunda 1825 µg Cr g<sup>-1</sup> KA, Orza-96 arpa çeşidinin gövde ve kök dokusunda ise sırasıyla 80 ve 1809 µg Cr g<sup>-1</sup> KA olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, Cr birikiminin gövde dokusuna göre kök dokusunda daha yüksek bulunması muhtemelen Cr'un kökler tarafından absorbe edildikten sonra köklerde tutulduğu ve düşük oranda gövdeye transloke olduğunu göstermektedir. Benzer sonuçlar, farklı Cr(VI) konsantrasyonlarına maruz bırakılan buğday (Subrahmanyam 2008), sorgum (Shanker and Pathmanabhan 2004), bezelye (Pandey *et al.* 2009a), *Brassica juncea* ve *Vigna radiata* (Shanker *et al.* 2004, Pandey *et al.* 2005, Diwan *et al.* 2010) gibi bitki türlerinde de belirlenmiştir. Keza, Cr iyonlarının gövde dokularına düşük orandaki translokasyonunun, kök hücrelerinin vakuollerinde alıkonmasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Diwan *et al.* 2010). Bununla birlikte,



kromat şeklinde alınan Cr'un köklerde bulunan Fe(III)-redüktaz enzimi tarafından daha az toksik olan Cr(III)'a dönüştürüldüğü ileri sürülmüştür. Köklerden gövdeye düşük orandaki Cr translokasyonunun diğer bir nedeni de Cr(III)'un hücre çeperlerinin karboksil (-COOH) grupları ile kompleksler oluşturmasıdır (Shanker *et al.* 2004). Araştırmamızda, Cr(VI) konsantrasyonunun artışına bağlı olarak Orza-96 arpa çeşidine göre Zeynelağa arpa çeşidinin gövde dokusunda Cr birikiminin daha yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir. Zeynelağa arpa çeşidi daha yüksek oranda Cr biriktirmesine karşın nispeten daha az büyüme inhibisyonu ve malondialdehit (MDA) içeriği göstermiştir. Bu durum, toleranslı Zeynelağa arpa çeşidinin muhtemelen daha etkin translokasyon işlevine ve toprak üstü organlarda içsel alıkoyma mekanizmalarına sahip olabileceğini göstermektedir.

Klorofil biyosentezinde  $\delta$ -aminolevülinik asidi (ALA) porfobilinojene (PBG) dönüştüren  $\delta$ -aminolevülinik asit dehidrataz (ALAD) enzimi Cr(VI) tarafından degrade olması nedeniyle klorofil biyosentezi olumsuz etkilenmektedir (Vajpayee *et al.* 2000). Mevcut araştırmada, klorofil *a + b* içeriğindeki azalma Cr-hassas Orza-96 çeşidinde tüm Cr(VI) konsantrasyonlarında ve Cr-toleranslı Zeynelağa çeşidinde ise yalnızca 225  $\mu$ M Cr(VI) konsantrasyonunda önemli düzeyde bulunmuştur. Bununla birlikte, yalnızca Cr-hassas Orza-96 arpa çeşidinin yaprak uçlarında solma ve klorozun oldukça belirgin olduğu gözlenmiştir. Samantaray (2002), mung fasulyesinin (*Vigna radiata* L.) kroma hassas çeşitlerinde (PDM-54 ve Sujata) klorofil içeriğinin Cr(VI) konsantrasyonunun artışına bağlı olarak azaldığını, kroma toleranslı çeşitlerde (TARM-22 ve K-851) ise klorofil içeriğinin arttığını bildirmiştir. Hekzavalent kromun klorofil içeriği üzerine olan olumsuz etkisi *Lolium perenne* (Vernay *et al.* 2007), *Datura innoxia* (Vernay *et al.* 2008), buğday (Subrahmanyam 2008) ve mısır (Zou *et al.* 2009) gibi bitki türlerinde de belirlenmiştir. Buna karşın, Cr(VI) stresine maruz bırakılan *Brassica juncea* (cv. Varuna) kotiledonlarında klorofil içeriğinin kontrol bitkilerine göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Gupta *et al.* 2009). Cr(VI)'a maruz bırakılmış sucul nilüfer bitkisinde, klorofil içeriğindeki azalmanın sadece ALAD aktivitesindeki azalmadan değil, aynı zamanda ağır metal teşvikli reaktif oksijen türlerinin (ROT) membranlarda neden olduğu oksidatif zarardan da kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Vajpayee *et al.* 2000). Bununla birlikte, ALAD aktivitesindeki azalmanın klorofil biyosentezi için gerekli olan

PBG miktarındaki azalma ile sonuçlandığı belirtilmiştir (Prasad and Prasad 1987). Keza, Vajpayee vd. (2000), ALAD enziminin kroma oldukça hassas olduğunu bildirmişlerdir. Sonuçlarımız, hem Cr-toleranslı Zeynelağa hem de Cr-hassas Orza-96 arpa çeşidinde ALAD aktivitesinin önemli düzeyde azaldığını göstermiştir. Üstelik Cr-hassas Orza-96 arpa çeşidinde tüm konsantrasyonlarda, Cr-toleranslı Zeynelağa arpa çeşidinde ise yalnızca 225 µM Cr(VI) konsantrasyonunda klorofil içeriği ile ALAD aktivitesi arasında azalan yönde pozitif bir korelasyon belirlenmiştir. Bu sonuçlar, incelenen arpa çeşitlerinde ALAD aktivitesinin Cr(VI) toksisitesine karşı oldukça hassas olduğunu göstermektedir. ALAD aktivitesindeki azalmanın ALAD enziminin aktif bölgesindeki Mg iyonlarının Cr(VI) ile yer değiştirmesi (Ilag *et al.* 1994) ve klorofil biyosentezindeki engellenmenin ise Cr(VI) stresinin Fe eksikliğine neden olması sonucu (Barcelo *et al.* 1985) meydana geldiği bildirilmiştir. Diğer taraftan, karotenoidler stres koşulları altında klorofillerin korunmasında önemli rol oynayan fotosentetik pigmentlerdir (Knox and Dodge 1985). Mevcut çalışmada, Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin karotenoid içerikleri Cr(VI) konsantrasyonunun artışıyla genellikle azalmış ve bu azalma Orza-96 arpa çeşidinde daha fazla bulunmuştur. Karotenoid içeriği her iki çeşitte de klorofil içeriği ile pozitif korelasyon göstermiştir. Her iki arpa çeşidinde farklı düzeylerdeki klorofil içeriğindeki azalma, karotenoidlerin oksidatif stresin olumsuz etkilerini azaltmadaki rolünden kaynaklanabilir. Cr-toleranslı çeşitlerin belirlenmesinde, ALAD enzim aktivitesine göre fotosentetik pigment içeriğinin daha etkili bir markör olduğu sonucuna varılabilir. Bu bilgiler ışığında, fotosentetik pigment içeriğindeki azalmanın muhtemelen fotosentetik aktivitede azalmaya neden olarak özellikle Cr-hassas Orza-96 arpa çeşidinin kuru ağırlığında önemli bir inhibisyona yol açtığı ileri sürülebilir.

Strese karşı savunmada rol oynayan bir antioksidant olan prolinin, Cr(VI) stresine cevap olarak sentezinin arttığı belirtilmiştir (Rai *et al.* 2004, Vernay *et al.* 2008). Kroma toleranslı soya fasulyesi (*Glycine max* L. Merr.) genotiplerinde prolin içeriğinin yüksek olduğu ve krom konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak prolin içeriğinin kademeli olarak arttığı bildirilmiştir (Ganesh *et al.* 2009). Araştırmamızda, Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin yaprak dokusundaki prolin içeriği Cr(VI) konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak artmıştır. Bu artış, Zeynelağa arpa

çeşidine göre Orza-96 arpa çeşidinde 150 ve 225 µM Cr(VI) konsantrasyonlarında sırasıyla 2 ve 3 kat daha fazla bulunmuştur. Bu sonuçlar, Cr(VI) stresine maruz kalmış arpa çeşitlerinin yapraklarında prolin birikiminin Cr toleransının bir göstergesinden ziyade Cr toksisitesinin bir semptomu olabileceğini ileri sürmektedir. Ağır metal stresi altındaki bitkilerde prolin birikiminin kesin mekanizması ve önemi henüz tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır (Panda *et al.* 2003). Bununla birlikte, Rout ve Shaw (1998), prolinin ozmotik düzenleme, serbest radikal temizleme, sitoplazmik enzimlerin korunması, stres sonrası büyüme için azot ve karbon kaynağı olma ve redoks potansiyelinin düzenlenmesi gibi birçok fonksiyona sahip olmasından dolayı, prolin birikiminin krom toksisitesinin üstesinden gelebilmede bitkilerin bir adaptasyon stratejisi olabileceği belirtmiştir. Prolinin şelatlama yeteneği sayesinde metal iyonlarını bağlayarak bitkilerin hayatta kalmalarına katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Sinha and Saxena 2006).

Oksidatif stresin bir göstergesi olarak lipit peroksidasyonu, krom toksisitesinin bir sonucu olarak oluşan reaktif oksijen türleri (ROT) tarafından teşvik edilebilmektedir (Diwan *et al.* 2008). Süperoksit radikalının protonlanması, membranlardaki yağ asitlerini biyolojik membranları parçalayan toksik lipit peroksitlerine dönüştürebilen hidroksil radikallerini (OH<sup>·</sup>) oluşturabilmektedir (Foyer *et al.* 1994). Lipit peroksidasyonu ürünü olan malondialdehit (MDA) seviyesinin belirlenmesi oksidatif stresin hassas bir indikatörü olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Smirnoff 1993, Metwally *et al.* 2005, Diwan *et al.* 2010). Mevcut araştırmada, Cr-toleranslı Zeynelağa arpa çeşidinde MDA içeriği 150 ve 225 µM Cr(VI) konsantrasyonlarında sırasıyla 1.2 ve 1.3 kat artış gösterirken, Cr-hassas Orza-96 arpa çeşidinde MDA içeriği kontrole göre 75, 150 ve 225 µM Cr(VI) konsantrasyonlarında sırasıyla 1.6, 2.1 ve 3 kat artış göstermiştir. Zeynelağa ve Orza-96 arpa çeşitlerinin yaprak dokularındaki MDA içeriğindeki artış, Cr(VI) stresi altında artan ROT üretiminin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Tüm Cr(VI) konsantrasyonlarında, Orza-96 arpa çeşidinin Zeynelağa arpa çeşidine göre daha fazla MDA içeriğine sahip olması, büyümede sınırlı inhibisyon gösteren Cr-toleranslı Zeynelağa arpa çeşidinin daha az oksidatif strese maruz kaldığını ve stresin olumsuz etkilerini azaltıcı özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Ali vd. (2011), alüminyuma toleranslı Gebenia arpa çeşidine göre hassas Shang 70-119 arpa çeşidinin

kök ve yaprak dokularında MDA içeriğinin 100 µM Cr(VI) konsantrasyonunda nispeten daha yüksek seviyede olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, oksidatif stresin bir göstergesi olan MDA içeriğindeki artış Cr(VI) stresine maruz kalan arpa (Ali *et al.* 2011), buğday (Panda *et al.* 2002, Subrahmanyam 2008, Dey *et al.* 2009), *Brassica juncea* (Pandey *et al.* 2005, Diwan *et al.* 2010), *Vigna radiata* (Shanker *et al.* 2004), *Amaranthus viridis* (Liu *et al.* 2008) ve *Pistia stratiotes* (Sinha *et al.* 2005) gibi bitki türlerinde de belirlenmiştir.

Ağır metal stresine bağlı olarak meydana gelen oksidatif zarar, ROT üretiminin potansiyel olarak yetersiz düzenlenmesinden kaynaklanmaktadır. Bitki hücreleri ROT'ların temizlenmesi için antioksidant savunma mekanizmalarına sahiptir. Enzimatik mekanizmalar süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), guaiakol peroksidaz (POD), katalaz (CAT) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidant enzimleri kapsamaktadır (Meloni *et al.* 2003, Zou *et al.* 2009, Diwan *et al.* 2010). Araştırmamızda, SOD, APX, POD ve CAT aktiviteleri Cr(VI) stresi altındaki Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin yaprak dokularında kontrole göre artış göstermiştir. Benzer sonuçlar, Cr(VI) stresine maruz bırakılan arpa ve buğday gibi bitkilerin yapraklarında da belirlenmiştir (Zou *et al.* 2009, Ali *et al.* 2011). Zıt olarak, Subrahmanyam (2008), Cr(VI) stresinin HD 2329 buğday çeşidinin yapraklarında APX ve CAT aktivitesini azalttığını bildirmiştir. Antioksidant enzimlerin aktivitesindeki değişimler, yeni izozimlerin sentezinden veya ROT metabolizması için mevcut enzimlerin aktivitesindeki artıştan kaynaklanabilmektedir (Kang *et al.* 1999). Reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonunun ilk aşamasında, süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ) SOD aktivitesi ile  $H_2O_2$  ve  $O_2$ 'e dönüştürülmektedir. Bulgularımız ışığında, her iki arpa çeşidinde SOD aktivitesinin kontrole göre tüm Cr(VI) konsantrasyonlarında artması, Cr(VI)'un oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir. Farklı arpa çeşitlerinin SOD aktivitesinde varyasyon belirlenmiştir. Zıt olarak, Dixit vd. (2002), bezelye bitkilerinde 200 µM Cr(VI) konsantrasyonunun SOD aktivitesinde önemli bir inhibisyona neden olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmamızda, en yüksek Cr(VI) konsantrasyonunda (225 µM), Zeynelağa arpa çeşidine göre Orza-96 arpa çeşidinin SOD aktivitesi daha fazla artmıştır. Bu sonuç ile SOD aktivitesindeki artışın süperoksit radikallerinin yeterli düzeyde detoksifiye edilememesinden dolayı Orza-96 arpa çeşidinin Cr(VI) stresine

karşı daha hassas olduğu söylenebilir. SOD aktivitesi sonucu oluşan  $H_2O_2$  hücreler için toksik olup; APX, POD ve CAT enzimleri tarafından detoksifiye edilmektedir (Foyer *et al.* 1994, Zou *et al.* 2009). Peroksidazlar ve CAT,  $H_2O_2$  birikimini ve hücre membranlarından  $H_2O_2$ 'in difüzyonunu en aza indirerek hücre bileşenlerini oksidatif zarardan korumaktadır (Pandey *et al.* 2005). Mevcut araştırmada, Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinde APX ve POD aktivitesi Cr(VI) konsantrasyonundaki artışla önemli düzeyde artmıştır. Cr(VI)-teşvikli oksidatif stres koşullarında peroksidazların aktivitesindeki artış kroma toleranslı *Brassica juncea* ve kroma hassas *Vigna radiata* türleri ile alüminyuma toleranslı (cv. Gebenia) ve hassas (cv. Shang 70-119) arpa çeşitlerinde de gösterilmiştir (Diwan *et al.* 2010, Ali *et al.* 2011). Bununla birlikte, SOD, POD ve CAT aktivitesinin mung fasulyesinin kroma hassas çeşitlerinde (PDM-54 ve Sujata) arttığı, toleranslı (TARM-22 ve K-851) çeşitlerinde ise enzim aktivitelerinin azaldığı bildirilmiştir (Samantaray 2002). Mevcut araştırmada, Cr-toleranslı Zeynelağa arpa çeşidinin Orza-96 arpa çeşidine göre daha yüksek POD ve daha düşük APX aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.  $H_2O_2$  detoksifiye eden enzimler arasında CAT aktivitesindeki artış APX ve POD enzimlerine göre daha düşük bulunmuştur. Bu sonuç, Willekens vd. (1997) tarafından CAT enziminin sadece peroksizomlarda bulunması ve eşzamanlı olarak iki molekül  $H_2O_2$  gerektirdiğinden düşük substrat afinitesine sahip olmasıyla açıklanmıştır. Cr(VI) stresi koşullarında, antioksidant enzim aktivitelerinin incelenen Cr-toleranslı ve Cr-hassas arpa çeşidinde varyasyon gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum, mevcut arpa çeşitlerinin farklı antioksidant cevaplarına ilişkin bir göstergedir. Sonuçlarımıza göre Cr-toleranslı Zeynelağa arpa çeşidinde POD aktivitesinin Cr(VI) stresi altında  $H_2O_2$ 'in detoksifiye edilmesinde APX ve CAT enzimlerine göre daha etkili olduğu ileri sürülebilir.

Bitkiler, hücresele seviyede ağır metallerin detoksifikasyonu ve toleransını kapsayan bir dizi potansiyel mekanizmaya sahiptir (Baker and Brooks 1989). Abiyotik ve biyotik streslere cevap olarak ifade edilen gen veya proteinlerin teşhisi stres toleransı ile ilişkili moleküler mekanizmaların anlaşılması için temel basamağı oluşturmaktadır. Krom stresine maruz kalan bitkilerde proteomik çalışmalara az rastlanmaktadır (Labra *et al.* 2006). Mevcut araştırmada, kontrol ve 225  $\mu$ M Cr(VI) konsantrasyonuna maruz bırakılmış Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin yaprak

dokularından ekstrakte edilen toplam çözünebilir proteinler, iki-yönlü (2-D) elektroforezi (İEF/SDS-PAJE) takiben gümüş boyama kullanılarak analiz edilmiştir. Kontrole göre 225 µM Cr(VI) uygulamasında yeni sentezlenen, sentez miktarı artan veya azalan normal hücresel proteinlerin moleküler ağırlıkları (MA, kDa) ve izoelektrik noktaları (pI) belirlenmiştir. Farklı sentez durumlarına sahip olan bu proteinlerin düşük moleküler ağırlıklı (15.6-30.1 kDa) ve çoğunlukla asidik (pI 5.6-6.9) karakterde olduğu belirlenmiştir. Ağır metal stresinde, çeltik bitkilerinde düşük moleküler ağırlıklı SŞP (16-20 kDa) mRNA seviyelerinin (Tseng *et al.* 1993) ve *Armeria maritima*, *Silene vulgaris* ve *Lycopersicon peruvianum* bitkilerinde SŞP17'nin (Neumann *et al.* 1995, Wollgiehn and Neumann 1999) strese cevap olarak biriktiği bildirilmiştir. Ağır metallere maruz kalan bitkilerde sıcaklık şoku proteinlerinin (SŞP'ler) artan üretiminin bir ağır metal cevabı olduğu bildirilmiştir (Hall 2002). Moleküler ağırlıkları 10 ila 70 kDa arasında değişen birçok stres proteininin ağır metallerce teşvik edildiği belirtilmiştir (Delhaize *et al.* 1989). Sıcaklık şoku proteinleri, birçok abiyotik stres sırasında zarar gören proteinlerin korunması, onarımı ve/veya degradasyonunun yanı sıra hücresel fonksiyonların yerine getirilmesinde görev yapan normal proteinlerin katlanmasında moleküler şaperonlar olarak fonksiyon görmekte, supramoleküler yapıların oluşturulmasında veya polipeptitlerin çökmesinin engellenmesinde önemli rol oynamaktadır (Parsell and Lindquist 1994, Downs *et al.* 1999, del Razo *et al.* 2001, Hamilton and Heckathorn 2001). Bu çalışmada, kontrole göre 225 µM Cr(VI) uygulamasına maruz bırakılan Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin iki bağımsız denemesinden elde edilen ilk yaprak dokularında toplam çözünebilir proteinlerin 2-D elektroforetik profillerindeki polimorfizm belirlenmiştir. Zeynelağa ve Orza-96 arpa çeşitlerinde aynı moleküler ağırlık ve izoelektrik noktasına sahip yeni sentezlenen iki protein (22.0 kDa, pI 6.6 ve 22.5 kDa, pI 6.9) belirlenmiştir. Cr(VI) stresi altında, 21.0-23.9 kDa, pI 6.2-7.5 aralığında Zeynelağa arpa çeşidinde 5, Orza-96 arpa çeşidinde ise 6 proteinin sentezinde belirgin artış saptanmıştır. Bununla birlikte, Zeynelağa ve Orza-96 arpa çeşitlerinde sırasıyla 15 ve 16 proteinin (15.6-30.1 kDa, pI 5.7-7.0) miktarı belirgin şekilde azalmıştır. Labra vd. (2006), 300 ppm K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> uygulamasına maruz kalan mısır fidelerinde sentezlenen proteinleri fonksiyonlarına göre antioksidant enzimler, şeker metabolizmasında fonksiyon gören proteinler ve diğer stres proteinleri olarak sınıflandırmıştır. Bu araştırmacılar, bu proteinlerden bazılarının

kromun detoksifiye edilmesinde rol oynadığını bildirmişlerdir (Labra *et al.* 2006). Bu bağlamda, araştırmamızda farklı sentez durumlarında belirlenen proteinlerin, incelenen arpa çeşitlerinde Cr(VI) toleransında önemli rol oynayabileceği ileri sürülebilir.

Sonuç olarak, bu araştırmada Cr-toleranslı Zeynelağa ve Cr-hassas Orza-96 arpa çeşitlerinin gövde ve kök dokularında önemli miktarlarda Cr ağır metalini erken fide evresinde biriktirdiği saptanmıştır. Bununla birlikte, her iki çeşitte Cr birikimi gövdeye göre kök dokusunda daha fazla belirlenmiştir. Büyüme verileri dikkate alındığında Cr(VI) oldukça fitotoksiktir. Bitki hücre ölümüne neden olan bir dizi reaksiyonun yol açtığı morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler, kök ve gövde uzamasının inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır. Cr-toleranslı çeşitlerin belirlenmesinde, ALAD enzim aktivitesine göre fotosentetik pigment içeriğinin daha etkili bir markör olduğu sonucuna varılabilir. Cr(VI) stresine maruz kalmış arpa çeşitlerinin yapraklarında prolin birikiminin Cr toleransının bir göstergesinden ziyade Cr toksisitesinin bir semptomu olduğu ileri sürülebilir. Zeynelağa ve Orza-96 arpa çeşitlerinin yaprak dokularındaki MDA içeriğindeki artış, Cr(VI) stresi altında artan ROT üretiminin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Tüm Cr(VI) konsantrasyonlarında, Orza-96 arpa çeşidinin Zeynelağa arpa çeşidine göre daha fazla MDA içeriğine sahip olması, büyümede sınırlı inhibisyon gösteren Cr-toleranslı Zeynelağa arpa çeşidinin daha az oksidatif strese maruz kaldığını ve stresin olumsuz etkilerini azaltıcı özelliklere sahip olabileceğini göstermektedir. Cr(VI)-teşvikli oksidatif stres, antioksidant savunma sisteminin aşırı aktivitesiyle incelenen arpa çeşitleri tarafından tolere edilmiştir. Cr(VI)-teşvikli oksidatif strese bağlı olarak oluşması muhtemel  $O_2^{\cdot-}$  radikali SOD enzimi  $H_2O_2$ 'e dönüştürülmüş ve oluşan  $H_2O_2$  ise muhtemelen APX ve POD aktivitesi ile detoksifiye edilmiştir. Bununla birlikte, çalışmamızda CAT aktivitesinin Cr(VI) konsantrasyonuna bağlı olarak APX ve POD enzimlerine göre daha az artış göstermesi, bu enziminin sadece peroksizomlarda bulunmasının yanı sıra eşzamanlı olarak iki molekül  $H_2O_2$ 'e gereksinim duyması nedeniyle detoksifikasyonda daha az etkin olduğu söylenebilir. Oksidatif stresin boyutu arpa çeşidine bağlı olarak değişim göstermiştir. Bu bağlamda, Cr-toleranslı Zeynelağa arpa çeşidine göre Cr-hassas Orza-96 arpa çeşidinde daha fazla oksidatif zarar gözlenmiştir.

Kroma toleranslı tür ve çeşitlerin belirlenmesi; fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler seviyede tolerans mekanizmalarının aydınlatılması, özellikle krom biriktiren bitkilerin fitoremediasyonda kullanılması, kromun geri kazanımı ve böylece krom kirlenmesine bağlı toksisitenin önlenmesinde önemli rol oynayacaktır. Daha sonraki çalışmalarda, krom stresine cevap olarak sentezinde değişiklik belirlenen hedef proteinlerin proteomik çalışmalarla kimliklendirilmesi sonucu Cr toleransına ilişkin genotipik farklılıkların belirlenmesi önemli olacaktır.



## KAYNAKLAR

- Abraham, E., Rigo, G., Szekely, G., Nagy, R., Koncz, C. and 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.
- Aebi, H. (1984). “Catalase *in vitro*”, *Methods in Enzymology*, **105**: 121–126.
- Ahsan, N., Lee, S.H., Lee, D.G., Lee, H., Lee, S.W., Bahk, J.D. and Lee, B.H. (2007). “Physiological and protein profiles alternation of germinating rice seedlings exposed to acute cadmium toxicity”, *Comptes Rendus Biologies*, **330**: 735–746.
- Ali, N.A., Ater, M., Sunahara, G.I. and Robidoux, P.Y. (2004). “Phytotoxicity and bioaccumulation of copper and chromium using barley (*Hordeum vulgare* L.) in spiked artificial and natural forest soils”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **57**: 363–374.
- Ali, S., Bai, P., Zeng, F., Cai, S., Shamsi, I.H., Qiu, B., Wu, F. and Zhang, G. (2011). “The ecotoxicological and interactive effects of chromium and aluminum on growth, oxidative damage and antioxidant enzymes on two barley genotypes differing in Al tolerance”, *Environmental and Experimental Botany*, **70**: 185–191.
- Apel, K. and Hirt, H. (2004). “Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction”, *Annual Review of Plant Biology*, **55**: 373–399.
- Appenroth, K.J., Keresztes, A., Sarvari, E., Jaglarz, A. and Fischer, W. (2003) “Multiple effects of chromate on *Spirodela polyrhiza*: electron microscopy and biochemical investigations”, *Plant Biology*, **5**: 315–323.
- Arduini, I., Masoni, A. and Ercoli, L. (2006). “Effects of high chromium applications on miscanthus during the period of maximum growth”, *Environmental and Experimental Botany*, **58**: 234–243.
- Ashraf, M. and Foolad, M.R. (2007). “Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance”, *Environmental and Experimental Botany*, **59**: 206–216.

- Babbs, C.F., Pham, J.A. and Coolbaugh, R.C. (1989). “Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants”, *Plant Physiology*, **90**: 267–270.
- Bağcı, S.A., Ekiz, H. and Yılmaz, A. (2003). “Determination of the salt tolerance of some barley genotypes and the characteristics affecting tolerance”, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, **27**: 253-260.
- Baker, A.J.M. and Brooks, R.R. (1989). “Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements: A review of their distribution”, *Ecology and Phytochemistry, Biorecovery*, **1**: 81–126.
- Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Reeves, R.D. and Smith, J.A.C. (2000). “Metal hyperaccumulator plants: A review of the ecology and physiology of a biochemical resource for phytoremediation of metal polluted soil”, In: Terry, N. and Baneulos, G., (Eds.), *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*, Lewis Publications, Boca Raton, 85–107.
- Baker, A. and Graham, I. (2002). “Plant peroxisomes”, *Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Bal, W. and Kasprzak, K.S. (2002). “Induction of oxidative DNA damage by carcinogenic metals”, *Toxicology Letters*, **127**: 55–62.
- Barnhart, J. (1997). “Occurrences, uses and properties of chromium”, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **26**: 3–7.
- Barcelo, J., Poschenrieder, C. and Gunse, J. (1985). “Effects of chromium (VI) on mineral element composition of bush beans”, *Journal of Plant Nutrition*, **8**: 211–217.
- Barcelo, J., Poschenrieder, C. and Gunse, B. (1986). “Water relations of chromium VI treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender) under both normal and water stress conditions”, *Journal of Experimental Botany*, **37**: 178–187.
- Barcelò, J. and Poschenrieder, C. (1997). “Chromium in plants”, In: Carati, S., Tottarelli, F., Sequeeni, P., (Eds.), *Chromium Environmental Issue*, Milan: Francoteengati Press, 101–129.

- Barlett, J.R. and James, B.R. (1988). "Mobility and bioavailability of chromium in soils", In: Nriagu, J.O., Nieboer, E., (Eds.), *Chromium in Natural and Human Environment*, John Wiley and Sons Inc, New York, 267–304.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D. (1973). "Rapid determination of proline for water stress studies", *Plant and Soil*, **39**: 205–207.
- Beauchamp, C. and 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. and Tomaro, M.L. (2005). "Cadmium toxicity in plants", *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **17**: 21–34.
- Bishnoi, N.R., Chugh, L.K. and Sawhney, S.K. (1993). "Effect of chromium on photosynthesis, respiration and nitrogen fixation in pea (*Pisum sativum* L.) seedlings", *Journal of Plant Physiology*, **142**: 25–30.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J. (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels", *Electrophoresis*, **8**: 93–99.
- Bradford, 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**: 248–254.
- Breen, A.P. and Murphy, J.A. (1995). "Reactions of oxyl radicals with DNA", *Free Radical Biology and Medicine*, **18**: 1033–1077.
- Caltado, D.A., McFadden, K.M., Thomas, R. and Garland Wilddung R.E. (1988). "Organic constituent and complexation of nickel(II), cadmium(II) and plutonium(VI) in soybean xylem exudates", *Plant Physiology*, **86**: 734–739.
- Castro, R.O., Trujillo, M.M., Bucio, J.L., Cervantes, C. and Dubrovsky, J. (2007). "Effects of dichromate on growth and root system architecture of *Arabidopsis thaliana* seedlings" *Plant Science*, **172**: 684–691.
- Castro–Guerrero, N.A., Rodríguez–Zavala, J.S., Marín–Hernández, A., Rodríguez–Enríquez, S. and Moreno–Sánchez, R. (2008). "Enhanced alternative oxidase and antioxidant enzymes under Cd<sup>2+</sup> stress in *Euglena*", *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **40**: 227–235.

- Cervantes, C., Garcia, J.C., Devars, S., Corona, F.G., Tavera, H.L., Torres–Guzman, J.C. and Moreno-Sanchez, R. (2001). “Interactions of chromium with microorganisms and plants”, *FEMS Microbiology Reviews*, **25**: 335–47.
- Chatterjee, J. and Chatterjee, C. (2000). “Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower”, *Environmental Pollution*, **109**: 69–74.
- Cho, U.H. and Park, J.O. (2000). “Mercury–induced oxidative stress in tomato seedlings”, *Plant Science*, **156**: 1–6.
- Choudhury, S. and Panda, S.K. (2004). “Role of salicylic acid in regulating cadmium induced oxidative stress in *Oryza sativa* L. roots”, *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, **30**: 95–110.
- Choudhury, S. and Panda, S.K. (2005). “Toxic effect, oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithegium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under lead and chromium toxicity”, *Water, Air and Soil Pollution*, **167**: 73–90.
- Clemens, S. (2001). “Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis”, *Planta*, **212**: 475–486.
- Clemens, S. (2006). “Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants”, *Biochimie*, **88**: 1707–1719.
- Cobbett, C.S. (2000). “Phytochelatin biosynthesis and function in heavy–metal detoxification”, *Current Opinion in Plant Biology*, **3**: 211–216.
- Cobbett, C.S. (2002). “Phytochelatin and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis”, *Annual Review of Plant Biology*, **53**: 159–182.
- Cobbett, C. and Goldsbrough, P.B. (2002). “Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis”, *Annual Review of Plant Biology*, **53**: 159–182.
- Copeland, R.A. (1993). “Methods for Protein Analysis, A Practical Guide to Laboratory Protocols”, Chapman and Hall, New York, 228.
- Corradi, M.G., Bianchi, A. and Albasini, A. (1993). “Chromium toxicity in *Salvia sclarea*. L.: Effects of hexavalent chromium on seed germination and seedling development”, *Environmental and Experimental Botany*, **33**: 405–413.

- Costa, G. and Morel, J.L. (1994). "Water relations, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce", *Plant Physiology and Biochemistry*, **32**: 561–570.
- Damerval, C., de Vienne, D., Zivy, M. and Thiellement, H. (1986). "Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins", *Electrophoresis*, **7**: 52–54.
- Delhaize, E., Robinson, N.J. and Jackson, P.J. (1989). "Effects of cadmium on gene expression in cadmium-tolerant and cadmium-sensitive *Datura innoxia* cells", *Plant Molecular Biology*, **12**: 487–497.
- del Razo, L.M., Quintanilla-Vega, B., Brambila-Colombres, E., Calderón-Aranda, E.S., Manno, M. and Albores, A. (2001). "Stress proteins induced by arsenic", *Toxicology and Applied Pharmacology*, **177**: 132–148.
- del Rio, L.A., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Gomez, M. and Barroso, J.B. (2002). "Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes", *Journal of Experimental Botany*, **53**: 1255–1272.
- del Rio, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, J., Palma, J.M. and Barroso, J.B. (2006). "Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling", *Plant Physiology*, **141**: 330–335.
- Demirevska, K., Simova-Stoilova, L., Fedina I., Georgieva, K. and Kunert, K. (2010). "Response of oryzacystatin I transformed tobacco plants to drought, heat and light stress", *Journal of Agronomy and Crop Science*, **196**: 90–99.
- Dey, S.K., Jena, P.P. and Kundu, S. (2009). "Antioxidative efficiency of *Triticum aestivum* L. exposed to chromium stress", *Journal of Environmental Biology*, **30**: 539–544.
- Didierjean, L., Frendo, P., Nasser, W., Genevieve, G., Marivet, J. and Burkard, G. (1996). "Heavy metal-responsive genes in maize: Identification and comparison of their expression upon various forms of abiotic stress", *Planta*, **199**: 1–8.
- Dietz, K.J., Baier, M. and Kramer, M. (1999). "Free radicals and reactive oxygen species as mediator of heavy metal toxicity in plants", In: Prasad, M.N.V.,

- Hagemeyer, J., (Eds.), Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystem, Berlin, Springer, 73–79.
- Dixit, V., Pandey, V. and Shyam, R. (2002). “Chromium ions inactivate electron transport and enhance superoxide generation in vivo in pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad) root mitochondria”, *Plant, Cell and Environment*, **25**: 687– 690.
- Diwan, H., Ahmad, A. and Iqbal, M. (2008). “Genotypic variation in the phytoremediation potential of Indian mustard for chromium”, *Environmental Management*, **41**: 734–741.
- Diwan, H., Khan, I., Ahmad, A. and Iqbal, M. (2010). “Induction of phytochelatin and antioxidant defence system in *Brassica juncea* and *Vigna radiata* in response to chromium treatments”, *Plant Growth Regulation*, **61**: 97–107.
- Downs, C.A., Ryan Anns, S.L. and Heckathorn, A. (1999). “The chloroplast small heat-shock protein: evidence for a general role in protecting photosystem II against oxidative stress and photoinhibition”, *Journal of Plant Physiology*, **155**: 488–496.
- Dube, B.K., Tewari, K., Chatterjee, J. and Chatterjee, C. (2003). “Excess chromium alters uptake and translocation of certain nutrients in citrullus”, *Chemosphere*, **53**: 1147-1153.
- Ekmekçi, Y., Tanyolaç, D. and Ayhan, B. (2008) “Effects of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars”, *Journal of Plant Physiology*, **165**: 600–611.
- Fagioni, M., D’Amici, G.M., Timperio, A.M. and Zolla, L. (2009). “Proteomic analysis of multiprotein complexes in the thylakoid membrane upon cadmium treatment”, *Journal of Proteome Research*, **8**: 310–326.
- FAO. (2007). “Statistical Databases”, <http://apps.fao.org>.
- Foyer, C.H., Lelandais, M. and Kunert, K.J. (1994). “Photooxidative stress in plants”, *Physiologia Plantarum*, **92**: 696–717.
- Foyer, C.H. and Noctor, G. (2003). “Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria”, *Physiologia Plantarum*, **119**: 355–364.

- Foyer, C.H. and Noctor, G. (2005). “Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses” *Plant Cell*, **17**: 1866–1875.
- Ganesh, K.S., Baskaran, L., Chidambaram, A.L.A. and Sundaramoorthy, P. (2009). “Influence of chromium stress on proline accumulation in soybean (*Glycine max* L. Merr.) genotypes”, *Global Journal of Environmental Research*, **3**: 106–108.
- Garcia–Hernandez, M., Murphy, A. and Taiz, L. (1998). “Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in *Arabidopsis*”, *Plant Physiology*, **118**: 387–397.
- Gardea–Torresdey, J.L., Perata–Videa, J.R., Montg, M., De La Rosa, G. and Corral–Diaz, B. (2004). “Bioaccumulation of cadmium, chromium and copper by *Convolvulus arvensis* L., impact on plant growth and uptake of nutritional elements”, *Bioresource Technology* **92**: 229–235.
- Garmash, E.V. and Golovko, T.K. (2009). “Effect of cadmium on growth and respiration of barley plants grown under two temperature regimes”, *Russian Journal of Plant Physiology*, **56**: 343–347.
- Gikas, P. and Romanos, P. (2006). “Effects of trivalent (Cr(III)) and hexavalent (Cr(VI)) chromium on the growth of activated sludge”, *Journal of Hazardous Materials*, **133**: 212–217.
- Golovatyj, S.E., Bogatyreva, E.N. and Golovaty, S.E. (1999). “Effect of levels of chromium content in a soil on its distribution in organs of corn plants”, *Soil Research Fertilizer*, **99**: 197–204.
- Goldstein, S. and Czapki, G. (1990). “Transition metals and oxygen radicals”, In: Richter, G., Solez, K., Aisen, P., Cohen, G., (Eds.), *International Review of Experimental Pathology*, Academic Press, New York, 133–164.
- Gopal, R., Rizvi, A.H. and Nautiyal, N. (2009), “Chromium alters iron nutrition and water relations of spinach”, *Journal of Plant Nutrition*, **32**: 1551–1559.
- Goupil, P., Souguir, D., Ferjani, E., Faure, O., Hitmi, A. and Ledoigt G. (2009). “Expression of stress–related genes in tomato plants exposed to arsenic and chromium in nutrient solution”, *Journal of Plant Physiology*, **166**: 1446–1452.

- Greger, M. (1999). "Metal availability and bioconcentration in plants", In: Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J. (Eds.), "Heavy Metal Stress in Plants—From Molecules to Ecosystems", Springer, Berlin, 1–27.
- Gupta, K.J., Stoimenova, M. and Kaiser, W.M. (2005) "In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, *in vitro* and *in situ*", *Journal of Experimental Botany*, **56**: 2601–2609.
- Gupta, S., Srivastava, S. and Saradhi, P.P. (2009). "Chromium increases photosystem 2 activity in *Brassica juncea*", *Biologia Plantarum*, **53**: 100–104.
- Hajdich, M., Rakwal, R., Agrawal, G.K., Yonekura, M. and Pretov, A. (2001). "High-resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal-stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaves: drastic reductions/fragmentation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stress-related proteins", *Electrophoresis*, **22**: 2824–2831.
- Hall, J.L. (2002). "Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance", *Journal of Experimental Botany*, **53**: 1–11.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1989). "Free Radicals In Biology and Medicine", 2nd Edition Clarendon Press, Oxford, UK.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1992). "Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation an update", *FEBS Letters*, **307**: 108–112.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2000). "Free Radicals in Biology and Medicine", Oxford University Press, Oxford.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (2004). "Free Radicals in Biology and Medicine", Clarendon Press, Oxford.
- Hamilton, E.W. and Heckathorn A. (2001). "Mitochondrial adaptations to NaCl stress: Complex I is protected by antioxidants and small heat shock proteins, whereas Complex II is protected by proline and betaine", *Plant Physiology*, **126**: 1266–1274.
- Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G. (1996). "Resistance gene-dependent plant defense Responses", *Plant Cell*, **8**: 1773–1791.



- Han, F.X., Maruthisridhar, B.B., Monts, D.L. and Su, Y. (2004). “Phyto availability and toxicity of trivalent and hexavalent chromium to *Brassica juncea*”, *New Phytology*, **162**: 489–499.
- Hagemeyer, J. (1999). “Structural and ultrastructural changes in heavy metal exposed plants”, In: Prasad M.N.V., Hagemeyer, J. (Eds.), *Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems*, Springer, Berlin, 157–181.
- Henriques, F.S. (2010). “Changes in biomass and photosynthetic parameters of tomato plants exposed to trivalent and hexavalent chromium”, *Biologia Plantarum*, **54**: 583–586.
- Hippeli, S. and Elstner, E.F. (1997). “OH–radical–type reactive oxygen species: a short review on the mechanisms of OH–radical and peroxynitrite toxicity”, *Zeitschrift Für Naturforschung*, **52**: 555–563.
- Hochstrasser, D.F., Harrington, M.G., Hochstrasser, A–C., Miller, M.J. and Merrill, C.R. (1988). “Methods for increasing the resolution of two–dimensional protein electrophoresis”, *Analytical Biochemistry*, **173**: 424–435.
- Howe, J.A., Loeppert, R.H., Derose, V.J., Hunter, D.B. and Bertsch, P.M. (2003). “Localization and speciation of chromium in subterranean clover using XRF, XANES, and EPR spectroscopy”, *Environmental Science and Technology*, **37**: 4091–4097.
- Huffman, E.W.D. and Allaway, H.W. (1973). “Chromium in plants: Distribution in tissues, organelles, and extracts and availability of bean leaf Cr to animals”, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **21**: 982–986.
- Hussain, M., Ahmad, M.S.A. and Kausar, A. (2006). “Effect of lead and chromium on growth, photosynthetic pigments and yield components in mash bean [*Vigna mungo* (L.) Hepper]”, *Pakistan Journal of Botany*, **38**: 1389–1396.
- Ilag, L.L., Kumar, A.M. and Soll, D. (1994). “Light regulation of chlorophyll biosynthesis at the level of 5–aminolevulinate formation in *Arabidopsis*”, *Plant Cell*, **6**: 265–275.

- James, B.R. and Barlett, R.J. (1983). "Behavior of chromium in soils VI. Interactions between oxidation–reduction and organic complexation", *Journal of Environmental Quality*, **12**: 173–176.
- Jean, L., Bordas, F., Gautier–Moussard, C., Vernay, P., Hitmi, A. and Bollinger, J.C. (2008). "Effect of citric acid and EDTA on chromium and nickel uptake and translocation by *Datura innoxia*", *Environmental Pollution*, **153**: 555–563.
- Juszczuk, I.M. and Rychter, A.M. (2003). "Alternative oxidase in higher plants", *Acta Biochimica Polonica*, **50**: 1257–1271.
- Kagi, J.H.R. (1991). "Overview of metallothionein", *Methods in Enzymology*, **205**: 613–626.
- Kang, K.S., Lim, C.J., Han, T.J., Kim, J.C. and Jin, C.D. (1999). "Changes in the isozyme composition of antioxidant enzymes in response to aminotriazole in leaves of *Arabidopsis thaliana*", *Journal of Plant Biology*, **42**: 187–193.
- Karunyal, S., Renuga, G. and Paliwal, K. (1994). "Effects of tannery effluent on seed germination, leaf area, biomass and mineral content of some plants", *Bioresource Technology*, **47**: 215–218.
- Karuppanapandian, T., Sinha, P.B., Kamarul, H.A., Premkumar, G. and Manoharan, K. (2006a). "Differential antioxidative responses of ascorbate–glutathione cycle enzymes and metabolites to chromium stress in green gram (*Vigna radiata* L. Wilczek) leaves", *Journal of Plant Biology*, **49**: 440–447.
- Karuppanapandian, T., Sinha, P.B., Kamarul, H.A., Premkumar, G. and Manoharan, K. (2006b). "Aluminium–induced changes in antioxidative enzyme activities, hydrogen peroxide content and cell wall peroxidase activity in green gram (*Vigna radiata* L. cv. Wilczek) Roots", *Journal of Plant Biology (India)*, **33**: 241–246.
- Karuppanapandian, T. and Manoharan, K. (2008). "Uptake and translocation of tri– and hexa–valent chromium and their effects on black gram (*Vigna mungo* L. Hepper cv. Co4) roots", *Journal of Plant Biology*, **51**: 192–201.
- Kaszycki, P., Gabrys, H., Appenroth, K.J., Jaglarz, A., Sedziwy, S., Walczak, T. and Koloczek, H. (2005). "Exogenously applied sulphate as a tool to investigate

- transport and reduction of chromate in the duckweed *Spirodela polyrhiza*”, *Plant Cell and Environment*, **28**: 260–268.
- Kimbrough, D.E., Cohen, Y., Winer, A.M., Creelam, L. and Mabuni, C. (1999). “A critical assessment of chromium in the environment”, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **29**: 1–46.
- Knight, H. and Knight, M.R. (2001). “Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk”, *Trends in Plant Science*, **6**: 262–267.
- Knox, J.P. and Dodge, A.D. (1985). “Singlet oxygen and plants”, *Phytochemistry*, **24**: 889–896.
- Kono, Y. and Fridovich, I. (1983). “Functional significance of manganese catalase in *Lactobacillus plantarum*”, *Journal of Bacteriology*, **155**: 742–746.
- Kosugi, H. and Kikugawa, K. (1985). “Thiobarbituric acid reaction of aldehydes and oxidized lipids in glacial acetic acid”, *Lipids*, **20**: 915–920.
- Krieger–Liszkay, A. (2005). “Singlet oxygen production in photosynthesis”, *Journal of Experimental Botany*, **56**: 337–346.
- Krishnan, M. and Nguyen, H.T. (1990). “Drying acrylamide slab gels for fluorography without using gel drier and vacuum pump”, *Analytical Biochemistry*, **187**: 51–53.
- Krupa, Z. and Baszynski, T. (1995). “Some aspects of heavy metal toxicity towards photosynthetic apparatus—direct and indirect effects on light and dark reactions”, *Acta Physiologiae Plantarum*, **17**: 177–190.
- Kün, E. (1988). “Serin İklim Tahılları,” Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları: 1032, Ders Kitabı: 299.
- Labra, M., Gianazza, E., Waitt, R., Eberini, I., Sozzi, A., Regondi, S., Grassi, F. and Agradi, E. (2006). “*Zea mays* L. protein changes in response to potassium dichromate treatments”, *Chemosphere*, **62**: 1234–1244.
- Laemmli, U.K. (1970). “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”, *Nature*, **227**: 680–685.
- Lemaire, S., Keryer, E., Stein, M., Schepens, I., Issakidis–Bourguet, E., Ge’Rard–Hirne, C., Miginiac–Maslow, M. and Jacquot, J.P. (1999). “Heavy–metal

- regulation of thioredoxin gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*”, *Plant Physiology*, **120**: 773–778.
- Lindberg, S., Meyers, T.P., Taylor, G.E.J., Turner, R.R. and Schroeder, W.H. (1992). “Atmosphere–surface exchange of mercury in a forest: results of modeling and gradient approaches”, *Journal of Geophysics Research*, **97**: 2519–2528.
- Liszakay, A., Van Der Zalm, E. and Schopfer, P. (2004). “Production of reactive oxygen intermediates ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , and OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth”, *Plant Physiology*, **136**: 3114–3123.
- Liu, D.H., Jaing, W.S. and Li, M.X. (1993). “Effect of chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*”, *Israel Journal of Plant Science*, **42**: 235–243.
- Liu, K.J., Jiang, J., Shi, X., Gabrys, H., Walczak, T. and Swartz, H.M. (1995). “Low frequency EPR study of chromium(V) formation from chromium(VI) in living plants”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **206**: 829–834.
- Liu, D.H., Zou, J.H., Wang, M. and Jiang, W.S. (2008). “Hexavalent chromium uptake and its effects on mineral uptake, antioxidant defence system and photosynthesis in *Amaranthus viridis* L.”, *Bioresource Technology*, **99**: 2628–2636.
- Lu, X., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P. and Hompok, K. (2004). “Removal of cadmium and zinc by water hyacinth, *Eichhornia crassipes*”, *Science Asia*, **30**: 93–103
- Maggio, A., Miyazaki, S., Veronese, P., Fujita, T., Ibeas, J.I., Damsz, B., Narasimhan, M.L., Hasegawa, P.M., Joly, R.J. and Bressan, R.A. (2002). “Does proline accumulation play an active role in stress–induced growth reduction?”, *Plant Journal*, **31**: 699–712.
- Marschner, H. (1995). “Mineral Nutrition of Higher Plants”, Second Ed. Academic Press/Harcourt Brace & Co., New York.
- Marschner, H. (2002). “Mineral Nutrition of Higher Plants”, London: Academic Press.
- Martin, T.J. and Juniper, E.B. (1970). “The Cuticles of Plants”, Edward Arnolds, Edinburgh.

- Matysik, J., Alai Bhalu, B. and Mohanty, P. (2002). “Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants”, *Current Science*, **82**: 525–532.
- Maxwell, D.P., Wang, Y. and McIntosh, L. (1999). “The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells”, *Proceedings of The National Academy Science of USA*, **96**: 8271–8276.
- McCormick, M.L., Roeder, T.L., Railsback, M.A. and Britigan, B.E. (1994). “Eosinophil peroxidase–dependent hydroxyl radical generation by human eosinophils”, *Journal of Biological Chemistry*, **269**: 27914–27919.
- McGrath, S.P. (1995). “Chromium and nickel”, In: Alloway, B.J. (Ed.), *Heavy Metal in Soils*, Second Ed. Chapman and Hall, Great Britain, 152–178.
- Mei, B., Puryear, J.D. and Newton, R.J. (2002). “Assessment of Cr tolerance and accumulation in selected plant species”, *Plant and Soil*, **247**: 223–231.
- Meloni, D.A., Oliva, M.A., Martinez, C.A. and Cambraia, J. (2003). “Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress”, *Environmental and Experimental Botany*, **49**: 69–76.
- Metwally, A., Safronova, V.I., Belimov, A.A. and Dietz, K.J. (2005). “Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum* L.”, *Journal of Experimental Botany*, **56**: 167–178.
- Mika, A. and L uthje, S. (2003). “Properties of guaiacol peroxidase activities isolated from corn root plasma membranes”, *Plant Physiology*, **132**: 1489–1498.
- Millar, A.H., Mittova, V., Kiddle, G., Heazlewood, J.L., Bartoli, C.G., Theodoulou, F.L. and Foyer, C.H. (2003). “Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses”, *Plant Physiology*, **133**: 443–447.
- Mithofer, A., Schulze, B. and Boland, W. (2004). “Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals”, *FEBS Letters*, **566**: 1–5.
- Mittler, R. (2002). “Oxidative stress”, *Trends in Plant Science*, **7**: 405–410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Breusegem, F. (2004). “The reactive oxygen gene network in plants”, *Trends in Plant Science*, **9**: 490–498.

- Molinari, H.B.C., Marur, C.J., Darcos, E., Bespalhok, M.K., Carvalho, P.J., Filho, J.C., Pereira, L.F.P. and Vieira, L.G.E. (2007). “Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* Spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress”, *Physiologia Plantarum*, **130**: 218–229.
- Moller, I.M., Jensen, P.E. and Hansson, A. (2007). “Oxidative modifications to cellular components in plants”, *Annual Review of Plant Biology*, **58**: 459–481.
- Montes-Holguin, M.O., Peralta-Videa, J.R., Meitzner, G., Martinez-Martinez, A., de la Rosa, G., Castillo-Michel, H.A. and Gardea-Torresdey, J.L. (2006). “Biochemical and spectroscopic studies of the response of *Convolvulus arvensis* L. to chromium(III) and chromium(VI) stress”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **25**: 220–226.
- Naito, K., Ebato, T., Endo, Y. and Shimizu, S. (1980). “Effect of benzyladenine on  $\delta$ -aminolevulinic acid synthetic ability and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase: differential responses to benzyladenine according to leaf age”, *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie*, **96**: 95–102.
- Naqvi, S.M.S., Ozalp, V.C., Oktem, H.A. and Yucel, M. (1994). “Two-dimensional electrophoresis of proteins with a different approach to isoelectric focusing”, *Analyst*, **119**: 1341–1344.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1987). “Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts”, *Physiologia Plantarum*, **115**: 393–400.
- Nayari, H.F., Szalai, T., Kadar, I. and Castho, P. (1997). “Germination characteristics of pea seeds originating from a field trial treated with different level of harmful elements”, *Acta Agronomica Hungarica*, **45**: 147–154.
- Nedelkoska, T.V. and Doran, P.M. (2000). “Characteristics of heavy metal uptake by plants species with potential for, phytoremediation and phytomining”, *Minerals Engineering*, **13**: 549–561.

- Neumann, D., Lichtenberger, O., Gunther, D., Tschiersch, K. and Nover, L. (1994). "Heat shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants", *Planta*, **194**: 360–367.
- Neumann, D., Nieden, U.Z., Lichtenberger, O. and Leopold, I. (1995). "How does *Armeria maritime* tolerate high heavy metal concentrations", *Journal of Plant Physiology*, **146**: 704–717.
- Nichols, P.B., Couch, J.D. and Al Hamdani, S.H. (2000). "Selected physiological responses of *Salvinia minima* to different chromium concentrations", *Aquatic Botany*, **68**: 313–319.
- Niess, D.H. (1999). "Microbial heavy-metal resistance", *Applied Microbiology and Biotechnology*, **51**: 730–750.
- Noctor, G. and Foyer, C.H. (1998). "Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control", *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **49**: 249–279.
- O'Farrell, P.H. (1975). "High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins", *The Journal of Biological Chemistry*, **10**: 4007–4021.
- Panda, S.K. and Parta, H.K. (1997). "Physiology of chromium toxicity in plants-A Review", *Plant Physiology and Biochemistry*, **24**: 10-17.
- Panda, S.K. (2002). "The biology of oxygen stress in green cells: A Review", In: Panda, S.K., (Eds.), *Advances in Stress Physiology in Plants*, Scientific Publishers, India 1–13.
- Panda, S.K., Mahapatra, S. and Patra, I.I.K. (2002). "Chromium toxicity and water stress simulation effects in intact senescing leaves of green gram (*Vigna radiata* L. var Wilckzeck K<sub>851</sub>)", In: Panda, S.K., (Ed.), *Advances in Stress Physiology of Plants*, Scientific Publishers, India, 129–136.
- Panda, S.K. (2003). "Heavy metal phytotoxicity induces oxidative stress in *Taxithelium* Sp.", *Current Science*, **84**: 631–633.
- Panda, S.K. and Khan, M.H. (2003). "Antioxidant efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) leaves under heavy metal toxicity", *Journal of Plant Biology*, **30**: 23–29.

- Panda, S.K., Choudhury, I. and Khan, M.H. (2003). "Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves", *Biologia Plantarum*, **46**: 289–294.
- Panda, S.K. and Choudhury, S. (2005). "Chromium stress in plants", *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **17**: 95–102.
- Panda, S.K. (2007). "Chromium-mediated oxidative stress and ultrastructural changes in root cells of developing rice seedlings", *Journal of Plant Physiology*, **164**: 1419–1428.
- Pandey, V., Dixit, V. and Shyam, R. (2005). "Antioxidative responses in relation to growth of mustard (*Brassica juncea* cv. Pusa Jaikisan) plants exposed to hexavalent chromium", *Chemosphere*, **61**: 40–47.
- Pandey, V., Dixit, V. and Shyam, R. (2009a). "Chromium (VI) induced changes in growth and root plasma membrane redox activities in pea plants", *Protoplasma*, **235**: 49–55.
- Pandey, V., Dixit, V. and Shyam, R. (2009b). "Chromium effect on ROS generation and detoxification in pea (*Pisum sativum*) leaf chloroplasts", *Protoplasma*, **236**: 85–95.
- Parsell, D.A. and Lindquist, S. (1994). "Heat shock proteins and stress tolerance", In: Morimoto, R., Tissieres, A., Georgopoulos, C., (Eds.), *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 457–494.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klüsener, B., Allen, G.J., Grill, E. and Schroeder, J.I. (2000). "Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells", *Nature*, **406**: 731–734.
- Pekker, I., Elisha, T.O. and Mittler, R. (2002). "Reactive oxygen intermediates and glutathione regulate the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during iron-mediated oxidative stress in bean", *Plant Molecular Biology*, **49**: 429–438.
- Peralta, J.R., Gardea Torresdey, J.L., Tiemann, K.J., Gomez, E., Arteaga, S. and Rascon, E. (2001). "Uptake and effects of five heavy metals on seed germination



- and plant growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.)”, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **66**: 727–734.
- Petrucci, R.H. and Harwood, W.S. (1993). “General Chemistry: Principles and Modern Applications”, 6th Edition, Macmillan Publishing Company, New York.
- Phalsson, A.M.B. (1989). “Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants”, *Water, Air and Soil Pollution*, **47**: 287–319.
- Potters, G., Gara, L.D., Asard, H. and Horemans, N. (2002). “Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime?”, *Plant Physiology and Biochemistry*, **40**: 537–548.
- Pourrut, B., Perchet, G., Silvestre, J., Cecchi, M., Guiresse, M. and Pinelli, E. (2007). “Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots”, *Journal of Plant Physiology*, **65**: 571–579.
- Prado, C., Rodríguez-Montelongo, L., González, J.A., Pagano, E.A., Hilal, M. and Prado, F.E. (2010). “Uptake of chromium by *Salvinia minima*: Effect on plant growth, leaf respiration and carbohydrate metabolism”, *Journal of Hazardous Materials*, **177**: 546–553.
- Prasad, D.D.K. and Prasad, A.R.K. (1987). “Effect of lead and mercury on chlorophyll synthesis in mung bean seedlings”, *Phytochemistry*, **26**: 881–883.
- Radin, J.W. and Boyer, J.S. (1982). “Control of leaf expansion by nitrogen nutrition in sunflower plants: Role of hydraulic conductivity and turgor”, *Plant Physiology*, **69**: 771–775.
- Rai, V., Vajpayee, P., Singh, S.N. and Mehrotra, S. (2004). “Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L.”, *Plant Science*, **167**: 1159–1169.
- Ramachandran, V., D’Souza, T.J. and Mistry, K.B. (1980). “Uptake and transport of chromium in plants”, *Journal of Nuclear Agriculture and Biology*, **9**: 126–129.

- Ramagli, L.S. and Rodriguez, L.V. (1985). “Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer”, *Electrophoresis*, **6**: 559–563.
- Rausch, T., Gromes, R., Liedschulte, V., Muller, I., Bogs, J., Galovic, V. and Wachter, A. (2007). “Novel insight into the regulation of GSH biosynthesis in higher plants”, *Plant Biology*, **9**: 565–572.
- Rauser, W.E. (1999). “The structure and function of metal chelators produced by plants”, *Cell Biology and Biophysics*, **31**: 19–48.
- Rizhsky, L., Liang, H. and Mittler, R. (2002). “The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco”, *Plant Physiology*, **130**: 1143–1151.
- Rock, M.L., James, B. and Helz, G.R. (2001). “Hydrogen peroxide effects on Cr oxidation state and solubility in four diverse, Cr-enriched soils”, *Environmental Science and Technology*, **35**: 4054–4059.
- Rodriguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., Zabalza, A., Corpas, F.J., Gomez, M., Del Rio, L.A. and Sandalio, L.M. (2006). “Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*”, *Plant Cell and Environment*, **29**: 1532–1544.
- Romero-Puertas, M.C., Palma, J.M., Gómez, M., Del Río, L.A. and Sandalio, L.M. (2002). “Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants”, *Plant Cell and Environment*, **25**: 677–686.
- Rout, G.R., Samantaray, S. and Das, P. (1997). “Differential chromium tolerance among eight mung bean cultivars grown in nutrient culture”, *Journal of Plant Nutrition*, **20**: 341–347.
- Rout, N.P. and Shaw, B.P. (1998). “Salinity tolerance in aquatic macrophytes: probable role of proline, the enzymes involved in its synthesis and C4 type of metabolism”, *Plant Science*, **136**: 121–130.

- Samantaray, S., Rout, G.R. and Das, P. (2001). "Induction, selection and characterization of Cr and Ni-tolerant cell lines of *Echinochloa colona* (L) *in vitro*", *Journal of Plant Physiology*, **158**: 1281–1290.
- Samantaray, S. (2002). "Biochemical responses of Cr-tolerant and Cr-sensitive mung bean cultivars grown on varying levels of chromium", *Chemosphere*, **47**: 1065–1072.
- Schneider, H.A.W. (1970). "Activities and properties of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase in greening tissue cultures of *Nicotiana tabacum* cv Samsun", *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie*, **62**: 133–145.
- Schmidt, W. (1996). "Influence of chromium (III) on root-associated Fe (III) reductase in *Plantago lanceolata* L.", *Journal of Experimental Botany*, **47**: 805–810.
- Scoccianti, V., Crinelli, R., Tirillini, B., Mancinelli, V. and Speranza, A. (2006). "Uptake and toxicity of Cr(III) in celery seedlings", *Chemosphere*, **64**: 1695–1703.
- Shanker, A.K. and (2003). "Physiological, biochemical and molecular aspects of chromium toxicity and tolerance in selected crops and tree species", PhD Thesis, India, Coimbatore: Tamil Nadu Agricultural University.
- Shanker, A.K., Sudhagar, R. and Pathmanabhan, G. (2003). "Growth, Phytochelatin SH and Antioxidative Response of Sunflower as Affected by Chromium Speciation", 2nd International Congress of Plant Physiology on Sustainable Plant Productivity Under Changing Environment, New Delhi, India.
- Shanker, A.K., Djanaguiraman, M., Sudhagar, R., Chandrashekar, C.N. and Pathmanabhan, G. (2004). "Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek. cv. CO4) roots", *Plant Science*, **166**: 1035–1043.
- Shanker, A.K. and Pathmanabhan, G. (2004). "Speciation dependant antioxidative response in roots and leaves of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench cv. CO27) under Cr(III) and Cr(VI) stress", *Plant and Soil*, **265**: 141–151.

- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza–Tavera, H. and Avudainayagam, S. (2005). “Chromium toxicity in plants”, *Environment International*, **31**: 739–753.
- Shao, H.B., Chu, L.Y., Lu, Z.H. and Kang, C.M. (2008). “Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells”, *International Journal of Biological Science*, **4**: 8–14.
- Sharma, D.C. and Sharma, C.P. (1993). “Chromium uptake and its effects on growth and biological yield of wheat”, *Cereal Research Communications*, **21**: 317–321.
- Sharma, D.C., Chatterjee, C. and Sharma, C.P. (1995). “Chromium accumulation and its effects on wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Dh2204) metabolism”, *Plant Science*, **111**: 145–151.
- Sharma, D.C., Sharma, C.P. and Tripathi, R.D. (2003). “Phototoxic lesions of chromium in maize”, *Chemosphere*, **51**: 63–68.
- Sharma, S.S. and Dietz, K.J. (2008). “The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance”, *Trends in Plant Science*, **14**: 43–50.
- Sinha, S., Saxena, R. and Singh, S. (2005). “Chromium induced lipid peroxidation in the plants of *Pistia stratiotes* L., role of antioxidants and antioxidant enzymes”, *Chemosphere*, **58**: 595–604.
- Sinha, P., Dube, B.K. and Chatterjee, C. (2006). “Manganese stress alters phytotoxic effects of chromium in green gram physiology (*Vigna radiata* L.) cv. PU19”, *Environmental and Experimental Botany*, **57**: 131–138.
- Sinha, S. and Saxena, R. (2006). “Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and non–enzymatic antioxidants and bacoside, a content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L.”, *Chemosphere*, **62**: 1340–1350.
- Sinha, S., Basant, A., Malik, A. and Singh, K.P. (2009). “Multivariate modeling of chromium–induced oxidative stress and biochemical changes in plants of *Pistia stratiotes* L.”, *Ecotoxicology*, **18**: 555–566.
- Siripornadulsil, S., Traina, S., Verma, D.P.S. and Sayre, R.T. (2002). “Molecular mechanisms of proline–mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae”, *Plant Cell*, **14**: 2837–2847.

- Skeffington, R.A., Shewry, P.R. and Petersen, P.J. (1976). "Chromium uptake and transport in barley seedlings *Hordeum vulgare*", *Planta*, **132**: 209–214.
- Smirnoff, N. (1993). "The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation", *New Phytologist*, **125**: 27–58.
- Somashekaraiah, B.V., Padmaja, K. and Prasad, A.R.K. (1992). "Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation", *Physiologia Plantarum*, **85**: 85–89.
- Srivastava, S., Srivastava, S., Prakash, S. and Srivastava, M.M. (1999). "Fate of trivalent chromium in presence of organic acids", *Chemical Speciation and Bioavailability*, **10**: 147–150.
- Strlic, M., Kolar, J., Selih, V.S., Kocar, D. and Pihlar, B. (2003). "A comparative study of several transition metals in fenton like reaction system at circum-neutral pH", *Acta Chimica Slovenica*, **50**: 619–632.
- Subrahmanyam, D. (2008). "Effects of chromium toxicity on leaf photosynthetic characteristics and oxidative changes in wheat (*Triticum aestivum* L.)", *Photosynthetica*, **46**: 339–345.
- Tiedemann, A.V. (1997). "Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*", *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **50**: 151–166.
- Toppi, L.S.D., Fossati, F., Musetti, R., Mikerezi, I. and Favali, M.A. (2002). "Effects of hexavalent chromium on maize, tomato and cauliflower plants", *Journal of Plant Nutrition*, **25**: 701–717.
- Tripathi, A.K., Tripathi, S. and Tripathi, S. (1999). "Changes in some physiological and biochemical characters in *Albizia lebbek* as bio-indicators of heavy metal toxicity", *Journal of Environmental Biology*, **20**: 93–98.
- Tripathi, R.D. and Smith, S. (2000). "Effect of chromium (VI) on growth and physiology of giant duckweed *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleiden", In: Yunus, M., Singh, N., de Kok, L.J., (Eds.), *Environmental Stress: Indication, Mitigation and Eco-conservation*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 195–205.

- Tripathi, B.N. and Gaur, J.P. (2004). “Relationship between copper and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp.”, *Planta*, **219**: 397–404.
- Tseng, T.S., Tzeng, S.S., Yeh, C.H., Chang, E.C., Chen, Y.M. and Lin, C.Y. (1993). “The heat-shock response in rice seedlings—isolation and expression of cDNAs that encode class-I low-molecular-weight heat-shock proteins”, *Plant and Cell Physiology*, **34**: 165–168.
- Tuomainen, M.H., Nunan, N., Lehesranta, S.J., Tervahauta, A.I., Hassinen, V.H., Schat, H., Koistinen, K.M., Auriola, S., McNicol, J. and Kärenlampi, S.O. (2006). “Multivariate analysis of protein profiles of metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* accessions”, *Proteomics*, **6**: 3696–3706.
- TÜİK (2009). “Bitkisel Üretim İstatistikleri”, Ankara–Türkiye.
- Vajpayee, P., Rai, U.N., Ali, M.B., Tripathi, R.D., Yadav, V. and Sinha, S. (2001). “Chromium induced physiological changes in *Vallisneria spiralis* L. and its role in phytoremediation of tannery effluent”, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **67**: 246–256.
- van Assche, F. and Clijsters, H. (1990). “Effects of metals on enzyme activity in plants”, *Plant Cell and Environmental*, **13**: 195–206.
- Van Breusegem, F. and Dat, J.F. (2006). “Reactive oxygen species in plant cell death”, *Plant Physiology*, **141**: 384–390.
- Vanlerberghe, G.C. and McIntosh, L. (1997). “Alternative oxidase: from gene to function”, *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **48**: 703–734.
- Vazquez, M.I.D., Poschenrieder, C. and Barcelo, J. (1987). “Chromium VI induced structural changes in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.)”, *Annals of Botany*, **59**: 427–438.
- Verbruggen, N. and Hermans, C. (2008). “Proline accumulation in plants: a review”, *Amino Acids*, **35**: 753–759.
- Vernay, P., Gauthier-Moussard, C. and Hitmi, A. (2007). “Interaction of bioaccumulation of heavy metal chromium with water relation, mineral nutrition

- and photosynthesis in developed leaves of *Lolium perenne* L.”, *Chemosphere*, **68**: 1563–1575.
- Vernay, P., Gauthier–Moussard, C., Jean, L., Bordas, F., Faure, O., Ledoigt, G. and Hitmi, A. (2008). “Effect of chromium species on phytochemical and physiological parameters in *Datura innoxia*”, *Chemosphere*, **72**: 763–771.
- Vranová, E., Inze, D. and Van Breusegem, F. (2002). “Signal transduction during oxidative stress”, *Journal of Experimental Botany*, **53**: 1227–1236.
- Wallace, A., Soufi, S.M., Cha, J.W. and Romney, E.M. (1976). “Some effects of chromium toxicity on bush bean plants grown in soil”, *Plant and Soil*, **44**: 471–473.
- Wellburn, A.R. (1994). “The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution”, *Journal of Plant Physiology*, **144**: 307–313.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inze, D. and Van Camp, W. (1997). “Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C-3 plants”, *EMBOJ*, **16**: 4806–4816.
- Wollgiehn, R. and Neumann, D. (1999). “Metal stress response and tolerance of cultured cells from *Silene vulgaris* and *Lycopersicon peruvianum*: Role of heat stress proteins”, *Journal of Plant Physiology*, **154**: 547– 553.
- Wu, L.H., Luo, Y.M., Christie, P. and Wong, M.H. (2003). “Effects of EDTA and low molecular weight organic acids on soil solution properties of a heavy metal polluted soil”, *Chemosphere*, **50**: 819–822.
- Xiang, C. and Oliver, D.J. (1998). “Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in Arabidopsis”, *Plant Cell*, **10**: 1539–1550.
- Yang, M.N., Wang, J., Wang, S.H. and Xu, L.L. (2003). “Salicylic acid induce aluminum tolerance by modulation of citrate efflux from roots of *Cassia tora* L.”, *Planta*, **217**: 168–174.

- Yoshiba, Y., Kiyosue, T., Nakashima, K., Yamaguchi–Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (1997). “Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress”, *Plant Cell Physiology*, **38**: 1095–1102.
- Zayed, A., Lytle, C.M., Qian, J.H. and Terry, N. (1998). “Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops”, *Planta*, **206**: 293–299.
- Zayed, A.M. and Terry, N. (2003). “Chromium in the environment: factors affecting biological remediation”, *Plant and Soil*, **249**: 139–156.
- Zeng, F.R., Mao, Y., Cheng, W.D., Wu, F.B. and Zhang, G.P. (2008). “Genotypic and environmental variation in chromium, cadmium and lead concentrations in rice”, *Environmental Pollution*, **153**: 309–314.
- Zhen, Y., Qi, J.L., Wang, S.S., Su, J., Xu, G.H., Zhang, M.S., Miao, L., Peng, X.X., Tian, D. and Yang, Y.H. (2007). “Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by Al toxicity in soybean”, *Physiologia Plantarum*, **131**: 542–554.
- Zeid, I.M. (2001). “Responses of *Phaseolus vulgaris* to chromium and cobalt treatments”, *Biologia Plantarum*, **44**: 111–115.
- Zou, J., Yu, K., Zhang, Z., Jiang, W. and Liu, D. (2009). “Antioxidant response system and chlorophyll fluorescence in chromium (VI)-treated *Zea mays* L. Seedlings”, *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, **51**: 23–33.
- Zurayk, R., Sukkariyah, B. and Baalbaki, R. (2001). “Common hydrophytes as bioindicators of nickel, chromium and cadmium pollution”, *Water Air and Soil Pollution*, **127**: 373–388.



## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Behiye URUŞAK  
**Doğum Yeri** : Manisa  
**Doğum Tarihi** : 27.09.1985  
**Yabancı Dili** : İngilizce

### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

**Lise** : Manisa Cumhuriyet Lisesi, 2003  
**Lisans** : Afyon Kocatepe Üniversitesi, 2008  
**Yüksek Lisans** : Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011

### Yayımları (SCI ve diğer)

1. Yıldız, M., Cenkci, S., Terzi, H., Uruşak, B., Arıkan, E.S., “Bazı elit arpa (*Hordeum vulgare* L.) çeşitlerinin krom toleransının belirlenmesi”, EKO 2010 Ekoloji Sempozyumu, 5-7 Mayıs 2010, Aksaray.
2. Yıldız, M., Terzi, H., Uruşak, B., 2011, “Bitkilerde krom toksisitesi ve hücrel cevaplar”, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, **27**: 163-176.
3. Yıldız, M., Terzi, H., Cenkci, S., Arıkan, E.S., Uruşak, B., 2011, “Bitkilerde tuzluluğa toleransın fizyolojik ve biyokimyasal markörleri”, Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi, **1**: 1-33.
4. Yıldız, M., Uruşak, B., Terzi, H., 2011, “Türkiye’de ekimi yapılan bazı arpa çeşitlerinin erken fide evresinde krom(VI) toleransı üzerine bir ön çalışma”, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, Baskıda.
5. Yıldız, M., Terzi, H., Cenkci, S., Uruşak, B., 2011, “Physiological and biochemical responses of Cr-tolerant and Cr-sensitive barley cultivars exposed to chromium(VI)”, SCI kapsamında uluslararası dergide incelemede.