



T.C.
NEVŞEHİR HACI BEKTAŞ VELİ ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ

.../.../20....

Proje Bilgileri					
Projenin Adı	Kadmiyum (Cd) maruziyetinin, <i>Phaseolus vulgaris</i> (L.) (Fasulye) ve <i>Cicer arietinum</i> (Nohut) Türlerinin stres genleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi				
Proje No	Neübab 16/2F21				
Başlama Tarihi	31/12/2016		Bitiş Tarihi	16/06/2018	
Destek Miktarı (TL)	29992	Gerçekleşen Miktar (TL)	27692,65	Kalan Miktar (TL)	2219,35

Yukarıda bilgileri verilen Yürütücüsü olduğum Bilimsel Araştırma Projesine ilişkin Sonuç Raporu ekte verilmektedir.
Bilgilerinize arz ederim.

Dr. Öğrt. Üyesi Musa KAR
Fen Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

İmza

EK: Sonuç Raporu (32 sayfa)



BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ SONUÇ RAPORU

Kadmiyum (Cd) maruziyetinin, *Phaseolus vulgaris* (L.) (Fasulye) ve *Cicer arietinum* (Nohut) Türlerinin stres genleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Assessment of the effect of cadmium (Cd) exposure on stress genes of *Phaseolus vulgaris* (L.) (Bean) and *Cicer arietinum* (Chickpea) Species

Proje No:
Neübab 16/2F21

Proje Yürütücüsü:
Musa KAR
Fen Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Araştırmacılar:
Şahlan ÖZTÜRK
Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi
Çevre Mühendisliği

Enver Ersoy ANDEDEN
Fen Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Ezgi KESKİN TALDARI
Fen Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

NEÜ BAP
Nevşehir, 2018

ÖZET

Kadmiyum (Cd) maruziyetinin, *Phaseolus vulgaris* (L.) (Fasulye) ve *Cicer arietinum* (Nohut) Türlerinin stres genleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Bu çalışmanın amacı oksidatif stres sonucu üretilen ve bitki acısında oldukça tehlikeli olduğu düşünülen hücrel hidrojen peroksit (H_2O_2) konsantrasyonunun bitkinin antioksidan mekanizmasında genlerin ekspresyonu başlamasına olan etkisini ortaya koymaktır. Bu doğrultuda, hidroponik ortamda yetiştirilen *Cicer arietinum* (Nohut) ve *Phaseolus vulgaris* (L.) (Fasulye) bitki köklerine oksidatif stresi harekete geçirmek için farklı süre ve konsantrasyonlarda kadmiyum (Cd) metali uygulanmıştır. Uygulama sonucu meydana gelen oksidatif stres birincil göstergesi olan lipit peroksidasyon sonucu oluşan malondialdehit (MDA), H_2O_2 miktarları ölçülmüştür. Daha sonra antioksidan savuma sisteminde önemli görevleri olan, metallothionein (*MT2*), Cu/Zn süper oksit dismutaz (*Cu/Zn-SOD*), Glutatyon redüktaz (*GRI*), Katalaz (*CAT*) ve Glutatyon-S- transferaz (*GST*) enzimlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Her iki bitki türünde Cd maruziyetine bağlı olarak MDA ve H_2O_2 konsantrasyonlarında oldukça kararlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. Stres genleri ekspresyonlarına bakıldığında nohut bitkisinde stres genleri *MT2* 12 saatlik Cd uygulamasında yüksek ifade düzeylerine sahipken, *GRI* ve *Cu/Zn-SOD* genlerinin ifade seviyeleri kinetiği 24 saatlik uygulamaya kadar artış gösterdiği ve 48 saatlik uygulamada mRNA seviyelerinde azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. *CAT* enzimi ise 12 saatlik maruziyette ekspresyon seviyesinde bir artış görülmezken 24 saatlik ve 48 saatlik Cd maruziyetinde eksprese olmaya devam ettiği tespit edilmiştir.

Fasulye bitkisindeki stres genleri ekspresyonuna bakıldığında, *Cu-Zn/SOD* ve *MT2* ekspresyonu 24 saatlik maruziyette artarken 48 saatlik maruziyette azalmıştır. *GST* gen ekspresyonu oksidatif stresin başlangıç düzeyinde oldukça yüksek eksprese edilirken maruziyet süresi arttıkça ekspresyon seviyesinde düşüş tespit edilmiştir. *CAT* geni ekspresyonunda 12 ve 48 saatlik uygulamada bir değişim tespit edilemezken 24 saatlik konsantrasyonda bir azalma tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda stres alakalı genlerin ekspresyonu sinyalizasyon mekanizmasında hücrenin oksidatif durumu ve H_2O_2 konsantrasyonu ile alakalı olabileceği, belli bir konsantrasyona kadar stres enzimi genlerin ekspresyonunu arttırabileceği, daha yüksek H_2O_2 konsantrasyonun gen ekspresyon seviyelerinde azalmaya neden olabileceği ilk kez bu çalışma ile tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Oksidatif sinyalizasyon, Reaktif oksijen türleri, Gen ekspresyonu

ABSTRACT

Assessment of the effect of cadmium (Cd) exposure on stress genes of *Phaseolus vulgaris* (L.) (Bean) and *Cicer arietinum* (Chickpea) Species

The aim of this study is to demonstrate the effect of the cellular hydrogen peroxide (H₂O₂) concentration, which is thought to be oxidative stress-end-produced and highly dangerous to plant, to induce the expression of genes in the antioxidant mechanism of the plant. In this direction, cadmium (Cd) metal was applied at different durations and concentrations to trigger oxidative stress in *Cicer arietinum* (Chickpea) and *Phaseolus vulgaris* (L.) plant roots grown in hydroponic media. The amount of malondialdehyde (MDA), H₂O₂, which is the primary indicator of oxidative stress, was determined. Subsequently, enzymes such as metallothionein (*MT2*), Cu / Zn superoxide dismutase (*Cu / Zn-SOD*), Glutathione reductase (*GRI*), Catalase (*CAT*) and Glutathione-S- transferase (*GST*) enzymes, which have important roles in the antioxidant defense system, have been examined. The mRNA expression levels of important antioxidant defense system enzymes such as metallothionein (*MT2*), Cu / Zn superoxide dismutase (*Cu / Zn-SOD*), glutathione reductase (*GR1*), catalase (*CAT*) and Glutathione-S-transferase (*GST*) have been examined. It has been determined that there is a fairly steady increase in MDA and H₂O₂ concentrations due to Cd exposure in both plant species. In *C. arietinum*, *MT2* stress genes had a high level of expression at the 12-hour application; the kinetics of expression levels of *GRI* and *Cu-Zn/SOD* genes increased until 24 hours of application and there was a decrease in mRNA levels in 48 hours of application. It has been observed that *CAT* continues to be expressed after 24-hours and 48-hours of Cd exposure. In *P. vulgaris* the *Cu-Zn/SOD* and *MT* expressions increased at 24-hour exposure, they decreased at 48-hour exposure. The *GST* gene is highly expressed at the beginning level of the oxidative stress, while a decrease in the level of expression was detected as the exposure time increased. Statistically significant *i* was detected in *CAT* gene expression at 12 hour application, however, a decrease in expression level was detected in the 24 and 48-hour application. As a result of this study, it was found that the expression of stress-related genes can be related to the oxidative status of the cell and the H₂O₂ concentration in the mechanism of signalization, it may up-regulate the expression of the stress genes until a certain concentration degree, while a higher concentration of H₂O₂ may down-regulate the gene expressions.

Keywords: Oxidative signaling, Reactive oxygen species, Gene expression

1. GİRİŞ

Bitkiler sessil yaşamları gereği doğada birçok olumsuz koşullarla baş etmek zorundadır. Bu olumsuz koşullar biyotik ve abiyotik stresler olarak iki ana gruba ayrılır. Özellikle sıcaklık, kuraklık, tuzluluk gibi abiyotik stresler bitkilerin en çok maruz kaldığı streslerin başında gelmektedir. Bitkilerde oldukça yıkıcı etkiye neden olan bu stresler geri dönüşümsüz fizyolojik ve morfolojik değişimlere sebep olmaktadır. Ayrıca bu abiyotik stresler sonucu tarım ürünlerinde beklenen verim ile elde edilen verim arasında oldukça büyük farklar meydana gelmekte ve ekonomik olarak ciddi kayıplara sebep olmaktadır (Boyer 1982). O yüzden en sık karşılaşılan abiyotik koşulların tarımsal ürünlerde meydana getirdiği fizyolojik ve morfolojik etkiler ve bu etkilerle basa çıkma yolları oldukça geniş bir şekilde çalışılmaktadır (Jain and Chattopadhyay 2010; Arefian and Malekzadeh Shafaroudi 2015). Kuraklık, tuzluluk ve sıcaklığın yanında en çok bilenen bir diğer abiyotik stres faktörü de ağır metal stresidir. Evsel atıklar, endüstriyel atıklar ve zirai faaliyetler sonucu yoğun gübre kullanımı yer altı sularına ve zirai alanlara oldukça yüksek konsantrasyonlarda ağır metal yüklenmesine sebep olmaktadır. Bunun sonucunda bitkilerdeki ağır metal stresi metabolizmaya zarar vererek, iyon dengesini bozarak hücre geçirgenliğini etkileyerek bitki büyümesini ve ürün miktarını sınırlandırmaktadır (Schützendübel and Polle 2002; Dalvi and Bhalerao 2013).

Bitkilerin metallere maruz bırakılması sonucunda ortaya çıkan etkiler fayda zarar ilişkisi çerçevesinde gerekli metallere ve gereksiz metallere olmak üzere iki farklı sınıfta kategorize edilir. Bakır (Cu), demir (Fe), nikel (Ni) ve çinko (Zn) gibi temel mikro besinler, bitkinin metabolizması için kritik olan 1500'den fazla proteinde kofaktör olarak işlev görür. Örneğin, Cu, fotosentez ve mitokondriyal solunum için önemlidir; Zn içeren enzimler, transkripsiyon ve translasyonda önemli düzenleyicidir. Bu nedenle, bu önemli metallere çok düşük veya yüksek seviyeleri bitki büyümesini ve gelişimini olumsuz şekilde etkilemektedir. Bununla birlikte, Cd, Pb ve Hg gibi gerekli olmayan metallere düşük konsantrasyonları bile, bitkilerde biyokimyasal ve fizyolojik süreçleri bozar ve bitki verimliliğini düşürür (Cuypers et al. 2016). Kadmiyum, oldukça zehirli olan doğada en sık rastlanan ağır metallere başında gelmektedir. Antropojenik ve zirai faaliyetler sonucu ciddi çevre kirliliğine sebep olan Cd suda yüksek çözünürlüğe sahip olması nedeniyle de bitki için esansiyel olmamasına rağmen bitkiler tarafından akümüle edilebilmektedir. Bitkiler tarafından akümüle edilen kadmiyum dolaylı yollarla besin zincirine girerek insanlar ve canlı organizmalar üzerinden oldukça yıkıcı etkiler meydana getirebilmektedir. Kadmiyum, bitkilerde sinyalleşme reseptörlerini bloke etme, membran geçirgenliğini bozarak ATP sentezini etkileme ve en önemlisi bitki için oldukça

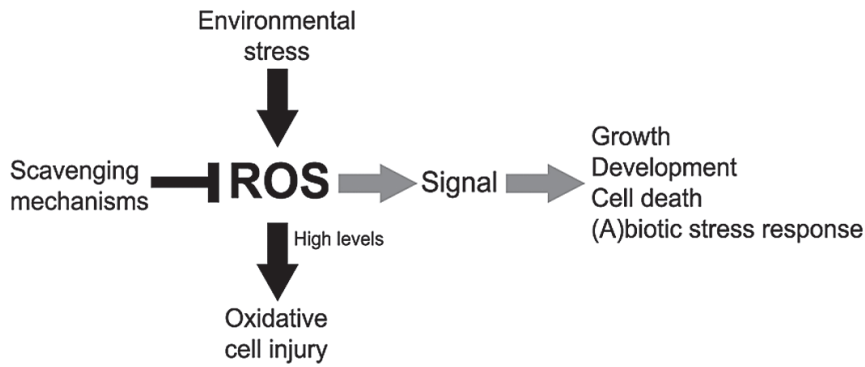
tehlikeli olan oksidatif stresin meydana gelmesini ve reaktif oksijen üretimini tetiklemek gibi etkilere neden olmaktadır (Chen et al. 2003; Souguir et al. 2013).

Bitkiler doğada sessil oldukları için bu streslerle başa çıkmak için çevrelerinde meydana gelen değişime uyum sağlayıp büyümek için farklı stratejiler geliştirmişlerdir. Moleküler düzeyde bu stratejiler gen ekspresyonu, regülasyonu ve transkripsiyonun yeniden düzenlenmesi, mRNA modifikasyonu ve stres proteinlerinin sentezlenmesi olarak ortaya çıkmıştır. Stres altındaki bitkilerde stres için özel düzenlemeler ile transkripsiyonlarını değiştirir ve bunun sonucu olarak bitkilerin enzim-protein çeşitliliği artar (Qin et al. 2008; Karimi and Mohsenzadeh 2017).

Abiyotik strese maruz kalan bitki hücrelerinde, hücredeki yıkıma bağlı olarak reaktif oksijen türlerinin meydana gelmesi ve oldukça ciddi zararlar vermesi kaçınılmaz bir sonudur. Reaktif oksijen türlerinden (ROT) en çok bilinenleri singlet oksijen (O_2^{\cdot}) gibi oksijen radikali ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi radikal olmayan bileşiklerdir. Bitkiler, ROT'un zararlı etkilerini gidermek için antioksidan olarak bir dizi enzim bulundurlar. Tüm enzimler, farklı ROT'ları scavenge için koordineli olarak çalışırlar. Bu enzimler geniş olarak iki sınıfta sınıflandırılabilir: (1) ROT ile doğrudan reaksiyona giren ve seviyelerini düşüren enzimler (SOD, CAT ve POX) ve (2) antioksidan oksitlenmiş formları üreten enzimler - askorbat peroksidaz ve glutatyon redüktaz (APX, GR) gibi (Kumar and Ganeshkhind 2017). Cu/Zn-SOD ökaryotik ve bakteriyel hücrelerin sitoplazmasında 32 kDa yapıda olan süper oksit ($O_2^{\cdot-}$) molekülünü H_2O_2 ve O_2 ye dönüştüren homodimerik bir proteindir (Hart et al. 1999). Tipik katalaz (CAT) reaksiyonu iki H_2O_2 molekülünün suya ve O_2 'ye dönüşmesidir (Mhamdi et al. 2010). Glutatyon S-transferazlar (GST), oksidatif olarak üretilen bileşiklerin indirgenmiş glutatyon konjugasyonunu katalize eder ve metabolizmadan uzaklaştırılmasını kolaylaştırır (Dalton et al. 2009). Metallothionein Sülfür içeren kalıntıları sayesinde metallerin detoksifikasyonunda oldukça önemli bir göreve sahiptir (Souguir et al. 2013).

Uzun yıllar boyunca bilim adamları ROT türlerinin çok tehlikeli olduğu ve hücreye çok büyük zararlar verdiği konusunda fikir birliğinde olmuş ve genellikle çalışmalarını stres sonucu meydana gelen ROT türlerinin hücre üzerindeki yıkıcı etkilerini ve ROT ile mücadele eden antioksidan enzim aktiviteleri üzerinde yoğunlaştırmışlardır (Duman and Ozturk 2010; Štolfa et al. 2015, 2016) Son zamanlarda ROT un bitkilerde sinyal yollarında önemli bir role sahip olduğu, biyotik ve abiyotik streslere cevapları harekete geçiren önemli bir komponent olduğu ve bitki metabolizmasında ve programlı hücre ölümlerinde etki olduğu bilim adamları tarafından vurgulanmaktadır (Romero-puertas et al. 2004; Del Río Luis Alfonso and Puppo 2009; Mittler 2017). Son yıllarda ortaya atılan “oksidatif sinyalizasyon” tanımlamasına göre

önemli bir reaktif oksijen radikali olan H_2O_2 nin tahmin edildiği kadar zararlı olmadığı hatta bazı gen ekspresyonlarının başlaması önemli bir çok sinyal yollarının açılıp kapanmasında için oldukça gerekli olduğu vurgulanmıştır (Romero-puertas et al. 2004; Del Río Luis Alfonso and Puppo 2009). Bitkiler kullandıkları O_2 'nin yaklaşık % 1'ini ROT sentezinde kullanılır. Bunlara süperoksit anyon, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve singlet oksijen vb. dâhildir. ROT aerobik metabolizma ürünleridir. (Halliwell 2006). Yüksek reaktivlik, yarılanma ömrü ve lipitlerde çözünürlükleri nedeniyle diğer sinyal moleküllerinden ayırt edilirler (Autreaux and Toledano 2007). Bitki hücresinde, ROT üretim konsantrasyonuna bağlı olarak bunlar zararlı ve aynı zamanda avantajlı moleküller olarak kabul edilir. Düşük veya orta konsantrasyonda, ROT, bitkilerde sayısız hücrel tepkilere müdahale eden hücre içi sinyal mekanizmasında ikinci haberciler olarak çalışır, yüksek konsantrasyonda oksidatif hasara neden olabilmektedir (Vanderauwera et al. 2009) (Şekil 1).



Şekil 1. ROT aktivitesinin iki etki mekanizması

Bu çalışmada; oldukça zengin protein içeriğine sahip olduklarından dolayı dünyada en fazla tarımsal üretimi yapılan bitki türleri olan nohut (*Cicer arrinetium*) ve fasulye (*Phaseolus vulgaris*) türleri, oldukça tehlikeli ve zehirli ağır metallerin başında gelen Cd maruziyetine vermiş olduğu cevaplar moleküler düzeyde incelenmiştir. Hücrenin oksidatif durumu tespit etmek için lipit peroksidasyon ve H_2O_2 konsantrasyonları tespit edilmiştir. Özellikle antioksidan stres enzimleri mRNA'sı ekspresyonunda meydana gelen değişiklikler ve hücrel H_2O_2 konsantrasyonu ile olan ilişkisi bu iki bitkide ilk kez tespit edilmeye çalışılmıştır

2. Materyal-Metod

2.1. Bitki materyali ve yetiştirme koşulları

Cicer arrinetium ve *Phaselious vulgaris* tohumları 25 derece nemli perlit içinde kökleri ve ilk yaprakları çıkana kadar çimlendirme işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra içerisinde 40 ml Sigma Hoagland's No. 2 Basal Salt Mixture çözeltisi bulunan 400 ml beherler içinde hidroponik ortamda köklerin uzaması sağlanmıştır. Kök uzunlukları 10-15 cm (14 gün) olduktan sonra beherlere konsantrasyonlar sırasıyla 50, 100 ve 200 µM olacak şekilde CdCl₂ eklenmiştir. 12, 24 ve 48 saatlik süreler ile Cd'ya maruz bırakılmıştır. Yetiştirme çemberinde ışık/karanlık fotoperiyodu 16:8 olarak ayarlanmış. Bütün uygulamalar 3'er tekrar olarak yapılmıştır.

2.2. Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi (MDA Analizi)

Bitkide stres etkisini göstermek ve gen ifadesi düzeyleriyle karşılaştırmak amacıyla malondialdehit (MDA) analizi ile lipit peroksidasyonu belirlenmiştir (Hodges et al. 1999).

Malondialdehit (MDA) Analizi

1- 100 mg yaprak örneği %80'lik 1 ml alkol ile homojenize edilir. 3000 g de +4 °C'de 10 dk santrifüj edilir.

2- Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant ikiye bölünür;

a) 1 hacim alınır + 1 hacim %20'lik TCA (trichloroaceticacid) + 1 hacim %0,01'lik BHT (butylated hydroxytoluene) eklenir. (**-TBA**)

b). 1 hacim alınır + 1 hacim %0,65 TBA (2-thiobarbituric acid) içeren %20'lik TCA + 1 hacim %0,01'lik BHT eklenir. (**+TBA**)

3- a ve b şeklinde ayrılmış ve yukarıdaki şekilde hazırlanmış olan tüpler 95 °C'de 25 dk inkübasyon sonrası ani bir şekilde soğutma amacıyla buza alınır.

4- Soğuyan örnek 3000 g'de 10 dk santrifüj edilir ve süpernatant alınır.

5- Birinci aşamada 532-600 nm'de, ikinci aşamada ise 532-600-440 nm'de ölçülür. Spektrofotometrede okunan değerler ile yüzde MDA seviyelerinin hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanılmıştır.

ABS=Absorbans

MDA=Malondialdehit

1- ((ABS 532+TBA)-(ABS 600+TBA)-(ABS 532-TBA)-(ABS 600-TBA)= A

2- ((ABS 440+TBA)-(ABS 600+TBA)x0,0971=B

3- nmol MDA/ml= (A-B/157000)x10⁶

2.3. H₂O₂ konsantrasyonunun belirlenmesi

Hücrel H₂O₂ determinasyonu için Junglee ve ark. Kullandıkları yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır (Junglee et al. 2014). Kök dokuları (500 mg) %0.1 (w/v) lik 5 ml trichloroacetic acid (TAC) ile +4 derecede homojenize edilmiş ve 12.000 rpm de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Ayrı bir tüpe süpernetandan 0.5 ml alınmış üzerine 0.5 ml 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) eklenmiş daha sonra 1 M potassium iodide (1ml) eklenmiştir. Absorbans 280 nm de quartz küvet ile ölçülmüş ve Junglee ve ark.'ın gradual H₂O₂ konsantrasyonları kullanarak hesapladıkları standart eğri denklemine göre hücredeki H₂O₂ konsantrasyonu tespit edilmiştir (Junglee et al. 2014).

2.4. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Total RNA izolasyonu Thermo GeneJET Plant RNA Purification Kit kullanılarak üreticinin kullanım klavuzundaki yönergelerine göre yapıldı. Donovix marka mikro hacim spektrofotometresi kullanılarak 260/280 ve 230/260 nanometredeki absorbans değerleri ölçülerek RNA yoğunlukları tespit edildi ve cDNA sentezinde kullanıldı. First strand cDNA sentezi için ise RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit kullanıldı.

2.5. Kantitatif gerçek zamanlı PCR analizi

Gerçek zamanlı real time analizi Bioneer Exicycler Tm 96 fast cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Real time amplifikasyonu için AccuPower® DualStar™ qPCR PreMix kullanıldı. Bu premixin hazırlanması için 1 µl forward primer, 1µl reverse primer, 5 µl cDNA ve 13 µl DEPC-water eklenerek son hacim 20 µl olarak ayarlanmıştır. Kontrol primer olarak house-keeping gen actin kullanılmıştır. Primer dizileri Nohut için Tablo 1 de Fasulye için Tablo 2 de verilmiştir.

Tablo 1. Nohut bitkisi için kullanılan primerlerin baz dizisi

Gen	Primer Çifti	Sekans(5' – 3')	PRC ürün boyu	Gene Bank erişim numarası
Metallothionein-	MT2 F MT2 R	ATGTCTTGCTGTGGTGGT AAC TCATTTGCAGGTGCAAGG GTTG	240	GQ900702
Superoxidedismut a	Cu- ZnSOD F Cu- ZnSOD R	TAACTTCAGTCAGGAGGG AG GGAGTTTGGTCCAGTGAG A	276	AJ012739.1
Catalase	Cat F Cat R	TGCCCCGAGATGGATAGA GGTTGGCGAGGACCTTAA CT	161	AJ131046.1
Glutathione reductase	GR1 F GR1 R	GTTGGTCTTAGTGAGGAA CAGG CTTGCCGCCAGATATTG TA	161	KF276973
Actin_3	Actin F Actin R	TGTCTTGAGTGGTGGTTCT AC CTTGCCGCCAGATATTG TA	202	XM_00449353 5.1

Tablo 2. Fasulye bitkisi için kullanılan primerlerin bazı dizisi

Gen	Primer çifti	sekans (5' – 3')	Referans
Metallothionein gen	MT2 F MT2 R	ACGGCTGCTCAGGCTGCAAG ACAGGGGTCGCATTGGCAGT	(Barrera-Figueroa et al. 2007)
Superoksid dismutaz	Cu-ZnSOD F Cu-ZnSOD R	CAAGAGTCCCAATGCTGTGAACC CACTGCATCCCAGGAAACAAG	(Nanjareddy et al. 2016)
Katalaz	Cat F Cat R	CACATCCAGGAGAATTGGAGG CCAGCTTTGCTGATGAGGGTG	(Nanjareddy et al. 2016)
Glutathione S-transferase	GST F GST R	AGCTCTTCAAGGACACTGAGCCAA AGCCTTGGGGTTAAGAGGAG	(Oliveira et al. 2015)
Actin_11	Actin F Actin R	TGCATACGTTGGTGATGAGG AGCCTTGGGGTTAAGAGGAG	(Oliveira et al. 2015)

2.6. İstatistiksel Analiz

Gerçek zamanlı kantitatif PCR sonuçları analizinde hedef genin kaç kat eksprese oldugunu tespit etmek için Livak ve Schmittgen'in $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılmıştır (Livak and Schmittgen 2001). Ayrıca gruplar arasında farkın tespiti için tek yönlü varyans analizi ve post-hoc (Duncan) testi uygulanmıştır. Bütün istatistiksel hesaplamalar SPSS 22 paket program ile yapılmıştır.

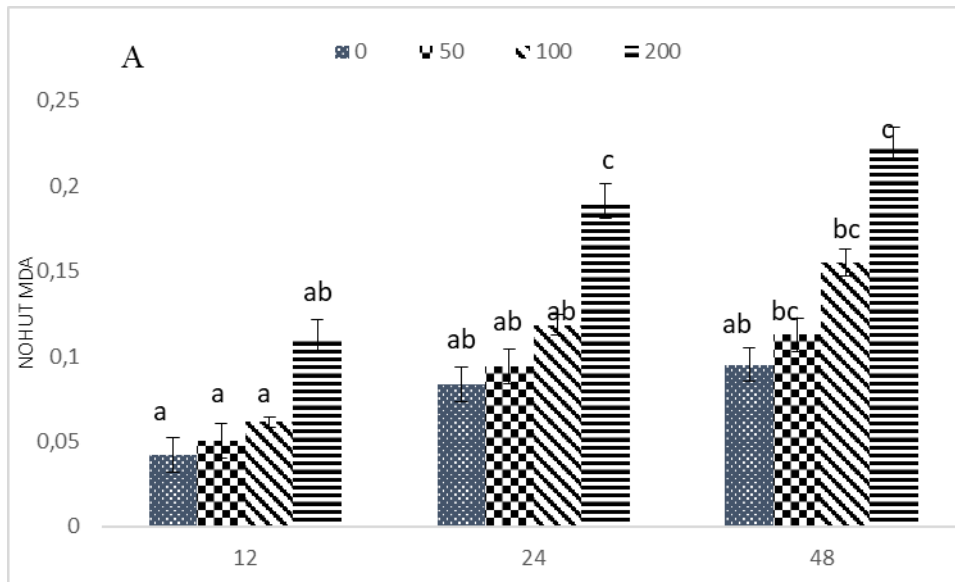
3. Bulgular

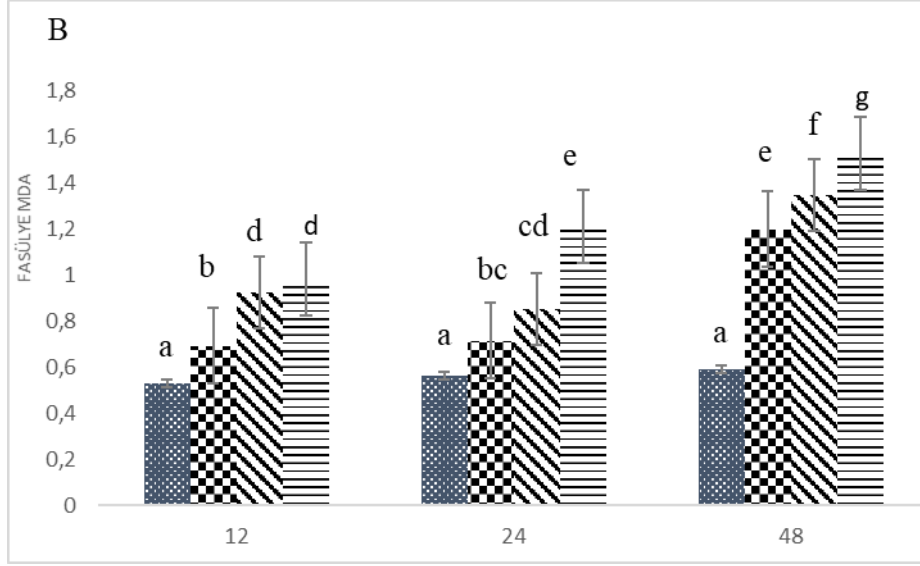
3.1. Lipit peroksidasyon (MDA)

Nohut ve fasulye de Cd akümülayonun hücre membranına verdiği zararı belirlemek ve hücrenin oksidatif durumunu tespit etmek için MDA içerikleri hesaplanmıştır. (Şekil 2).

Nohut bitkisinde Cd maruziyetinin MDA içeriğine etkisi $p < 0.05$ düzeyinde önemli olduğu bulunmuştur. Ayrıca maruziyet süresi arttıkça da MDA içeriğinde bir artışın olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan post-Hoc analizinde ise 24 ve 48 saatlik 200 μM Cd konsantrasyonu uygulamasında MDA içeriğinin diğer konsantrasyondaki MDA miktarlarına göre istatistiksel olarak daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak, en düşük MDA aktivitesi de 12 saatlik kontrol, 50 ve 100 μM Cd maruziyetinde tespit edilmiştir (Şekil 2-A).

Benzer şekilde fasulye bitkisinde de Cd konsantrasyonunun MDA içeriğine etkisi $p < 0.05$ düzeyinde önemli olduğu bulunmuştur. Ayrıca maruziyet süresi arttıkça da MDA içeriğinde bir artışın olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan post-Hoc analizinde ise bütün konsantrasyonlarda tespit edilen MDA akümülayonu istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu, istatistiksel olarak en yüksek MDA miktarı 200 μM Cd uygulamasında tespit edilmiştir.





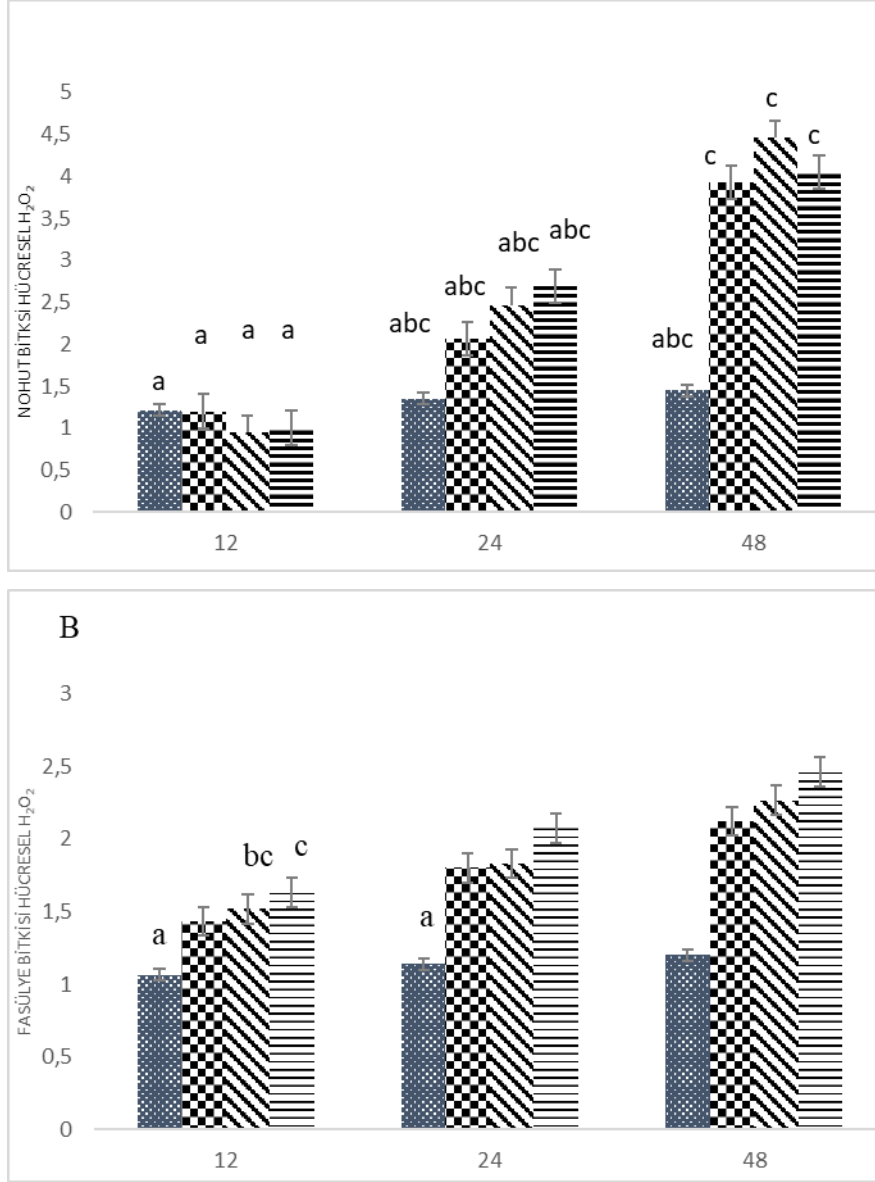
Şekil 2. Farklı süre ve konsantrasyonlarda Cd maruz kalmış Nohut (A) ve Fasulye (B) bitkilerinde MDA içeriği. Farklı harfler MDA konsantrasyonları arasında istatistiksel farkı göstermektedir.

3.2. H₂O₂ konsantrasyonu

Nohut ve Fasulye bitkisi kök hücrelerinde meydana gelen oksidatif stres sonucu oluşan H₂O₂ konsantrasyonları Şekil 3 de verilmiştir.

Nohut bitkisinde konsantrasyon ve süreye bağlı olarak H₂O₂ konsantrasyonunda doğrusal bir artış gözlenmiş, istatistiksel olarak en yüksek H₂O₂ konsantrasyonuna 48 saat 50, 100 ve 200 µM'lık uygulamalarda rastlanmıştır. 12 saatlik uygulamadaki bütün Cd konsantrasyonlarında tespit edilen H₂O₂ miktarı ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. 24 saatlik Cd uygulamasında meydana gelen H₂O₂ konsantrasyonları açısından kendi aralarında anlamlı bir fark tespit edilemezken 12 saatlik uygulamadan istatistiksel olarak farklı olduğu bulunmuştur (p<0.05) (Şekil 3-A).

Fasulye de uygulama süresi ve konsantrasyon arttıkça H₂O₂ konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre kararlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. 12 saatlik uygulamada 100 ve 200 µM Cd konsantrasyonlarında meydana gelen H₂O₂ miktarı arasında istatistiksel bir fark tespit edilemezken en yüksek H₂O₂ akümüülasyonu 48 saat 200 µM lık uygulamada tespit edilmiştir.(p<0.05) (Şekil 3-B)



Şekil 3. Nohut ve Fasülye bitkisinde meydana gelen H₂O₂ konsantrasyonları

3.3. Antioksidan stres ile ilişkili genlerin ifade düzeylerinin incelenmesi

3.3.1. Nohut Bitkisinde stres ile ilişkili genlerin ifade düzeylerinde meydana gelen değişiklikler

Sucul ortamda yetiştirilen nohut bitkisi köklerinin Cd maruziyetine vermiş olduğu cevaplar moleküler olarak değerlendirildi. Oksidatif stres enzimleri olan *MT*, *GRI*, *Zn/Cu-SOD* ve *CAT* genlerinin transkript seviyeleri gerçek zamanlı kantitatif PCR yöntemi ile köklerden izole edilen RNA kullanılarak tespit edilmiştir. Ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişim kontrol geni olarak aktin'in ekspresyonuna göre değerlendirilmiştir.

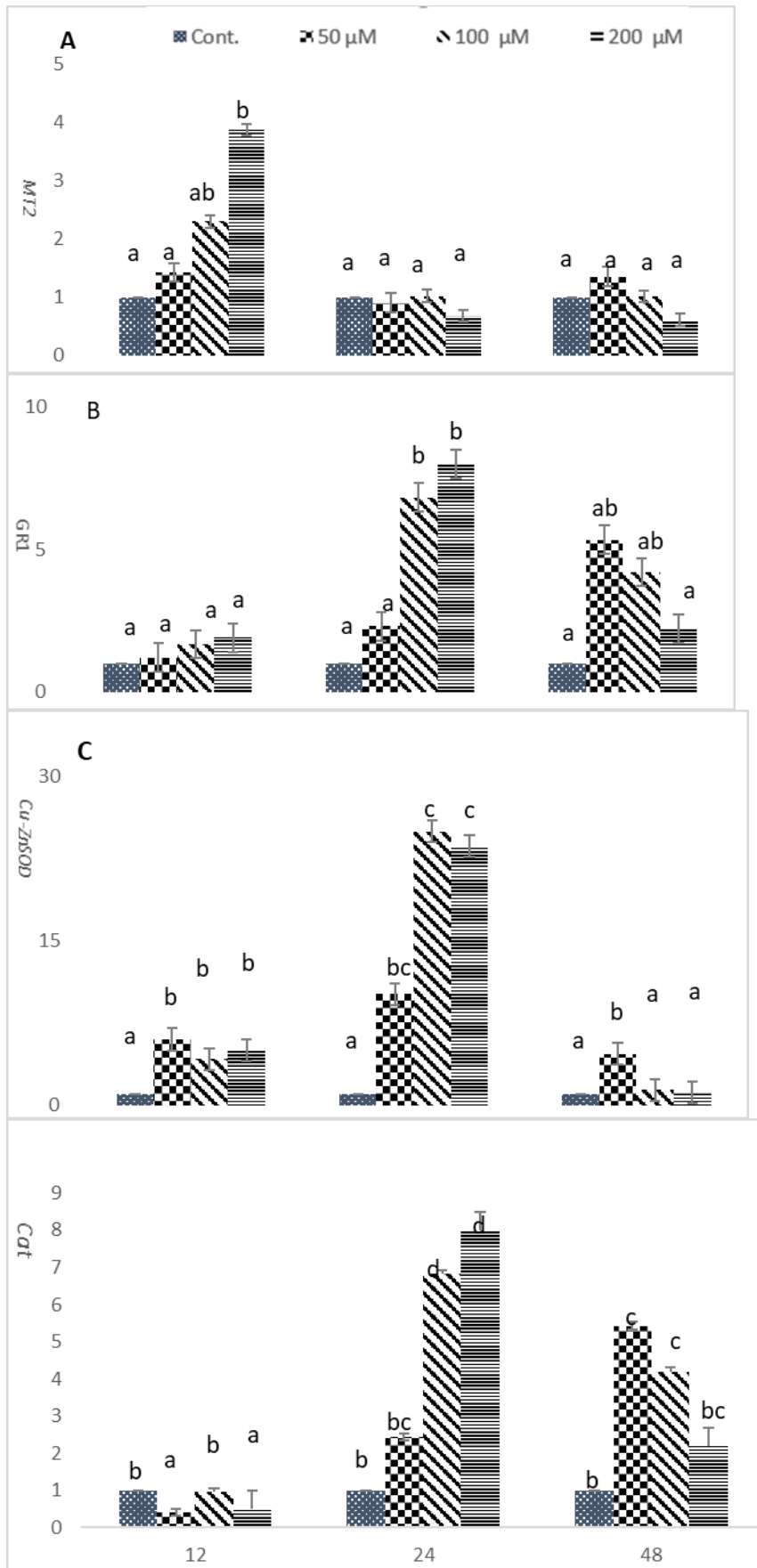
Metallothionein geninin (*MT2*), ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişikliğe bakıldığı zaman 12 saat 100 µM ve 12 saat 200 µM lık Cd uygulamasında aktinin ekspresyonundan

yaklaşık 4 kat fazla olduğu tespit edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Diğer Cd konsantrasyonlarında ise Metallothionein geni ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir Şekil 4 (A).

GSH reductase (GR1) geni ekspresyonunda meydana gelen değişikliğe bakıldığı zaman 12 saatlik uygulamadaki Cd konsantrasyonlarında ekspresyonda istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana gelmezken 24 saatlik 100 ve 200 µM konsantrasyonda kontrol geni olan aktin ekspresyonuna göre anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Daha sonra 48 saatlik uygulamadaki GR1 ekspresyonunda ise 24 saatlik uygulama sonucu meydana gelen ekspresyona göre bir azalma meydana geldiği görülmüştür. Bunlara ek olarak, 48 saatlik Cd uygulamalarındaki ekspresyon düzeyinde anlamlı bir azalma olduğu hatta 48 saat 200 µM uygulamadaki ekspresyon seviyesinin 12 saatlik ekspresyonu ile aynı seviyeye indiği ve kontrol grubu ile istatistiksel olarak bir farkını olmadığı tespit edilmiştir Şekil 4 (B).

Superoksit dismutaz (Cu-Zn SOD), geninin ekspresyon seviyesine bakıldığı zaman 12 saatlik 50, 100 ve 200 µM Cd uygulaması sonucu ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştır. istatistiksel olarak en fazla anlamlı olan artış 24 saatlik 100 ve 200 µM Cd uygulamasında gerçekleşmiş, 48 saatlik uygulama sonucunda ise ekspresyon seviyesi azalarak kontrol grubu ile aynı seviyeye gelmiştir Şekil 4 (C).

Catalase (CAT) gen ekspresyonuna bakıldığı zaman diğer gen ekspresyonlarından farklı olarak 12 saatlik 50 ve 200 µM uygulamadaki Cd maruziyetinde ki ekspresyon seviyesinin kontrol seviyesinden daha düşük olduğu gözlemlenirken 24 saatlik uygulamadaki 100 ve 200 µM konsantrasyonlarda ekspresyon seviyesi dramatik bir şekilde artmıştır. 48 saatlik uygulamada Cd konsantrasyonlarında ekspresyon seviyelerinde ise 24 saatlik uygulamaya göre azalma tespit edilmiş ancak diğer gen ekspresyon seviyelerinde farklı olarak 12 saatlik uygulamadaki ekspresyon seviyesinden istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edilmiştir Şekil 4 (D).



Şekil 4. Nohut Bitkisi stres alakalı genlerin ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişiklikler

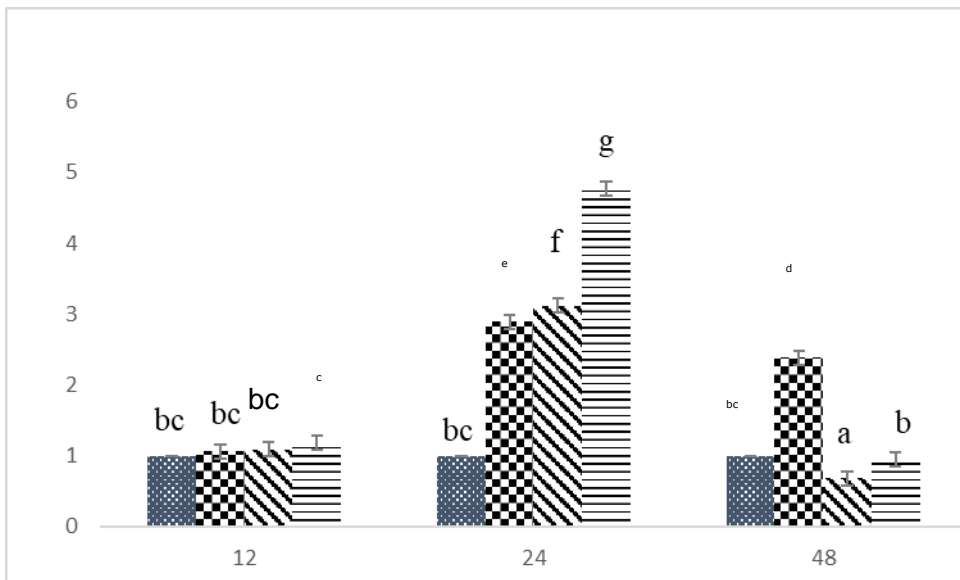
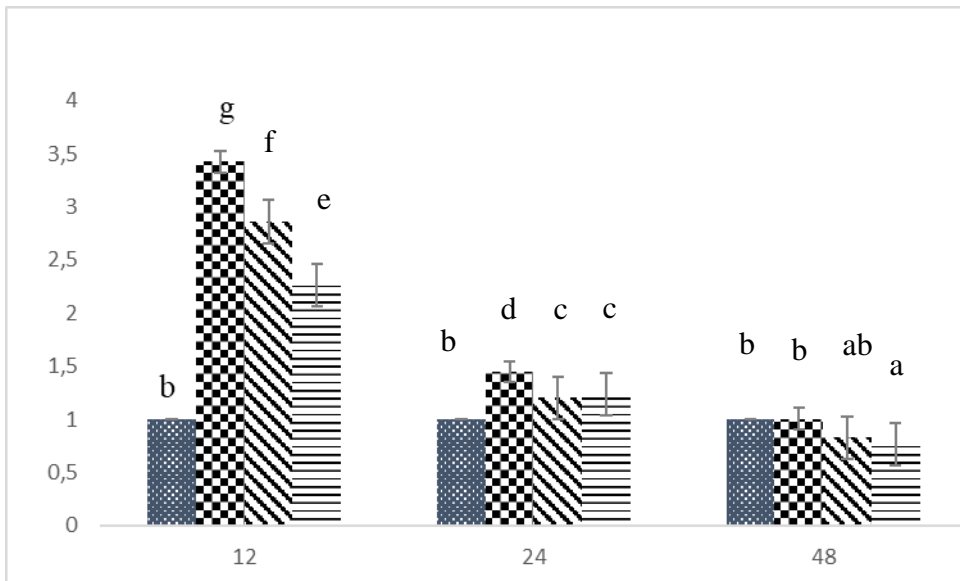
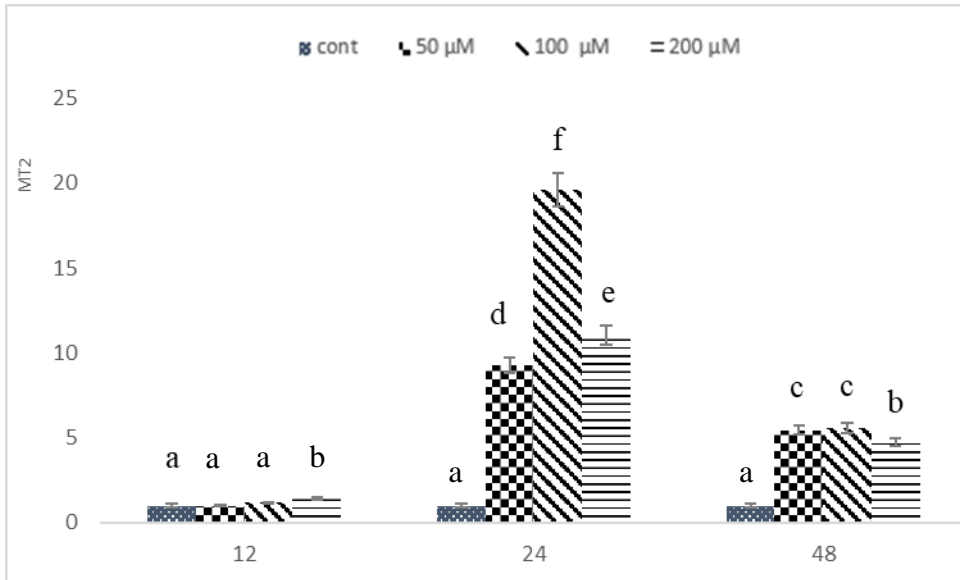
3.3.1. Fasulye Bitkisinde stres ile ilişkili genlerin ifade düzeylerinde meydana gelen değişiklikler

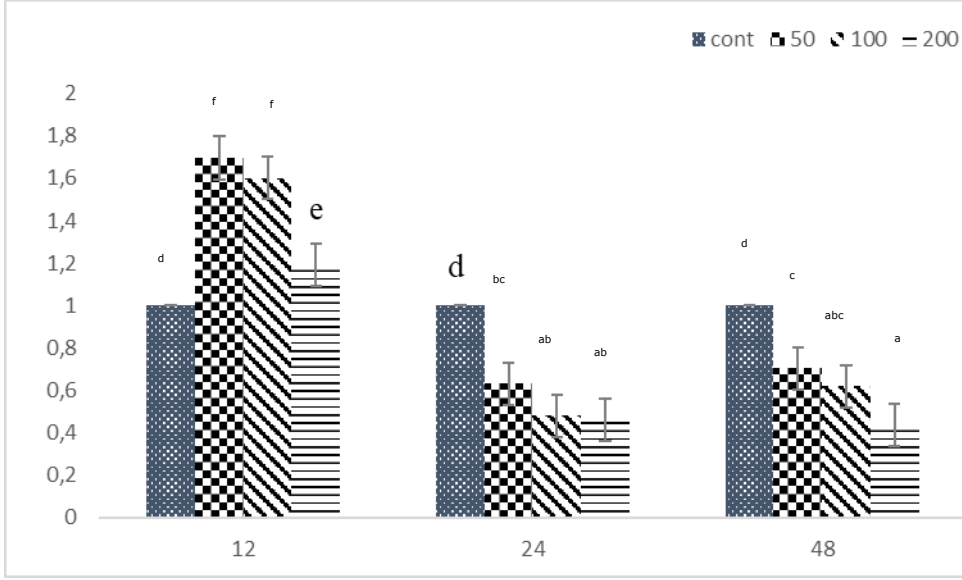
Metallationin gen ekspresyon seviyelerine bakıldığı zaman 12 saatlik kadmiyum uygulaması sonucundaki gen ekspresyon seviyesi 200 µM lık uygulamada istatikselsel olarak önemli bir artış göstermiştir. 24 saatlik uygulamaya bakıldığında ekspresyon seviyelerinin dramatik olarak artış meydana geldiği tespit edilmiş en yüksek ekspresyon seviyesine de 200 µM lık konsantrasyonda rastlanmıştır. 48 saatlik uygulamada ise s4 saatlik uygulamadaki ekspresyon seviyesine nazaran bir azalma meydana gelmiş istatistiksel 200 µM'lık maruziyetteki ekspresyon seviyesi 50 ve 100 µM'lık ekspresyon seviyesinden düşük olduğu tespit edilmiştir.(p <0.05) (Fig 3-A).

Gulutahione S-transferaz gen ekspresyonuna bakıldığında 12 saatlik 50 µM'lık uygulamada kontrol geni olan Aktin'den yaklaşık 6 kat daha fazla eksprese edilmiştir aynı zamanda bu ekspresyon seviyesi diğer uygulama arasında da en yüksek düzeydir. 24 saatlik konsantrasyon da ise istatistiksel olarak en yüksek ekspresyon yine 50 µM lık seviyede gözlenmiş ancak 12 saatlik uygulamadan daha düşük seviyede eksprese edildiği tespit edilmiştir. 48 saatlik uygulama da ise konsantrasyonlar arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır (p<0.05) (Şekil 3-B).

Cu/Zn Sod enzimi 12 saatlik Cd maruziyetinde ekspresyon seviyesi anlamlı düzeyde artış göstermemiştir. 24 saatlik maruziyette ise istatistiksel olarak en yüksek ekspresyon seviyesine 200 µM lık uygulamada rastlanmıştır. 48 saatlik uygulamada ise ekspresyon seviyeleri 24 saatlik uygulamaya göre azalmış ancak istatistiksek olarak en yüksek ekspresyon 100 µM'lık uygulamada tespit edilmiştir. 24 saatlik uygulamada kontrol geninden yaklaşık 7 kat fazla ekspresyonun gerçekleştiği 200 µM'lık konsantrasyonda meydana gelen ekspresyon düzeyi 48 saatlik uygulamada istatistiksel olarak kontrol ile aynı düzeye inmiştir (p<0.05) (Şekil 3-C).

Catalase geni diğer stres geni ekspresyonlarından oldukça farklı davranış sergilemiştir. 12 saatlik uygulamadaki konsantrasyonlar arasında ekspresyon açısından istatistiksek bir fark tespit edilemezken, diğer stres genlerinin önemli düzeyde ekspresyon artışı gösterdiği konsantrasyonlarda CAT geni ekspresyonu kontrol geni ekspresyonundan daha düşük düzeyde gerçekleşmiştir. 48 saatlik uygulamada ise ekspresyon seviyesi 24 saatlik uygulamadaki konsantrasyonlara göre artış göstermiş olsa da 48 saatlik uygulamadaki konsantrasyonlar arasında istatikselsel bir fark tespit edilememiştir (P<0.05) (Şekil. 3-D).





Şekil 5. Fasulye Bitkisi stres alakalı genlerin ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişiklikler

4. Tartışma

Bu araştırmada; 12,24 ve 48 saatlik sürelerde 50 µM, 100 µM ve 200 µM Cd stresi uygulanmış nohut (*Cicer arrinetium*) ve fasulye (*Phaseolus vulgaris*) bitkisinde meydana gelen oksidatif stresin göstergesi olan lipit peroksidasyon sonucu oluşan MDA miktarı analiz edilmiştir. Ayrıca oksidatif stresin başlıca ürünü olan başlıca ROT biri olan H₂O₂ konsantrasyonları belirlenmiştir. Antioksidan stres savunmasında ilişkili olduğu düşünölen *MT2*, *GRI*, *Cu-Zn SOD* ve *CAT* genlerinin nohut kökündeki mRNA seviyeleri belirlenmiş fasulye için ise benzer genlerin ekspresyon düzeyleri incelenmiş faklı olarak GR1 yerine GST enziminin ekspresyon düzeylerinde meydana değişiklik açıklanmaya çalışılmıştır. Bu yolla her iki bitkide stres anında meydana gelen ekspresyon seviyesindeki artma ve azalma kontrol gen olan aktin ekspresyonu baz alınarak araştırılmış ve ekspresyondaki meydana gelen değişiklikler ile H₂O₂ konsantrasyonu arasındaki ilişki nohut ve fasulye bitkilerinde ilk kez açıklanmaya çalışılmıştır.

Oksidatif strese neden olan serbest radikaller hücreyi oluşturan tüm yapılarla reaksiyona girebilirler ancak bu etkileşime en hassas yapılar lipitlerdir. Serbest oksijen radikallerinin dokulara etkisi ile oluşan, lipit peroksidasyonu esnasında bir dizi reaksiyon sonucu meydana gelen, oldukça reaktif olan metabolik ürünlerden bir tanesi malondialdehit (MDA)'tir (Gawel et al. 2004). MDA miktarı reaktif oksijen türlerinin hücre zarına vermiş oldukları hasar derecesini yansıtabilir, çünkü lipit peroksidasyonunun son ayrışma ürünüdür. Ayrıca birçok değişik antioksidan enzim aktivitesi çalışmalarında da oksidatif stresin meydana getirdiği etkiyi göstermek için ilk olarak MDA aktivitesi hesaplanmış ve artan stres koşullarına paralel olarak hücre zarındaki peroksidasyonun ürünü olan MDA konsantrasyonlarının arttığı tespit edilmiştir (Singh et al. 2006; Razinger et al. 2008; Duman et al. 2010). Bu çalışmada da diğer çalışmalara paralel olarak her iki bitki türünde de Cd maruziyetine bağlı olarak bütün konsantrasyonlarda MDA konsantrasyonunda istikrarlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir.

Metallotioninler düşük moleküler ağırlıklı, sistein açısından zengin olduğu için ağır metallere karşı oldukça yüksek affiniteye sahip stres tepki proteinleridir (Kısa et al. 2017). Farklı dokularda farklı gelişim evrelerinde ve ağır metal stresleri altında mRNA düzeylerini belirlemek için birçok gen ekspresyon çalışmaları yürütölmüştür. MT gen ekspresyon düzeyleri dokuya özgü veya gelişim evresi le bağlantılı olarak ayrıca ağır metal stresinin yoğunluğuna göre ekspresyon düzeyleri de değişmiştir (Hossain et al. 2012). Ahn ve arkadaşları *Brassica napans* bitkisini Fe ağır metaline maruz bırakmışlar farklı MT gene ekspresyonlarını incelemişlerdir. MT2 geni 3 saatlik uygulamada down regule olduğunu

bulmuşlardır (Ahn et al. 2012). Souguir ve ark. *Vicia faba* köklerine kadmiyum uygulamış MT gen ekspresyonunda en yüksek ekspresyon düzeyini 12 saatlik 200 µM konsantrasyonda tespit etmiş 24 ve 48 saatlik konsantrasyonda ekspresyon seviyesinin düştüğü bulmuştur (Souguir et al. 2013). Bizim çalışmamız da fasulye bitkisinde en yüksek MT2 ekspresyonu 24 saatlik konsantrasyonlarda görülürken bu çalışmaya benzer şekilde 48 saatlik konsantrasyonlarda ekspresyon seviyesi azalmıştır. Bizim çalışmamızın sonucu Tombuloğlu ve ark. yapmış oldukları çalışma ile de paralellik göstermektedir.

Nohut bitkisi kökünde Metallotionin ekspresyonu incelendiğinde; daha önceki çalışmalarda yüksek konsantrasyonlardaki ağır metallerin MT gen ekspresyonunu arttırdığı vurgulanmıştır (Goupil et al. 2009) Tamas et al. Yapmış oldukları çalışmalarında arpa kökünde Cd maruziyetinin MT seviyesini arttırdığını bildirmiştir (Tamás et al. 2008). Bu çalışmaların aksine Tombuloğlu ve ark. Bor uyguladıkları domates bitkisinin köklerinde belli bir konsantrasyona kadar Mt ekspresyonunda up-regulasyon gözlemlemiş ancak metal konsantrasyonu arttıkça MT ekspresyonu down regulation olduğunu bildirmiştir. Mevcut çalışmamız da benzer şekilde 12 saatlik Cd maruziyetlerinde MT ekspresyon seviyesi artarken uzun süreli maruziyet sonucu ekspresyon seviyesi azalmış daha sonra değişmemiştir. Bu bulgular Sougir ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma ile paralellik göstermektedir (Souguir et al. 2013).

Nohut bitkisi köklerinde GR1 ve Cu-Zn/SOD enziminde, 24 saatlik maruziyet sonucunda meydana gelen ekspresyon seviyesindeki artış Tombuloğlu ve ark. Destekler niteliktedir (Tombuloglu et al. 2012). GR1 ve Cu-Zn/Sod Enzimi ROT türlerinin detoksifiye edilmesinde oldukça etki rol alan antioksidan enzimlerin basında gelmektedir. Goupil ve ark. Yapmış olduğu çalışmada domates bitki köklerinde arsenik uygulamış en yüksek ekspresyon seviyesini 160 µM arsenik uygulamasında olduğu tespit ederken 640 µM uygulamadaki ekspresyonu daha düşük bulmuştur. Ayrıca Torres fasulye bitkisinin kuraklık stresine maruz bırakmış GR enzimi ekspresyon seviyesinin stres süresi uzadıkça düştüğünü gözlemlemiştir (Torres-Franklin et al. 2008). Bizim çalışmamız bu çalışmaları destekler nitelikte Cd maruziyeti uzadıkça ve konsantrasyon arttıkça ekspresyon seviyelerin de azalma meydana gelmiştir.

Cu/Zn SOD enzimi hücre çekirdeği ve sitoplazmasında bulunur hücreyi Reaktif oksijenin yıkıcı etkisinde korumak için öncül ilk hatta yer alır. Daha önceki çalışmalarda da belirtildiği abiyotik stres koşullarında SOD enzim aktivitesi artmaktadır (Faralli et al. 2015). Ancak Sougir yapmış olduğu çalışmada SOD ekspresyonun maruziyetin ilk 12 saatinde artmış olduğunu diğer konsantrasyonlarda azalma meydana geldiğini bildirmiştir (Souguir et al.

2013). Bu çalışmaya benzer şekilde bizim bulgularımızda; SOD enzim aktivitesi en yüksek ekspresyonunu 24 saatlik uygulamada gerçekleştirirken 48 saatlik uygulamada ekspresyon seviyesi düşmüştür.

Fasulye bitkisinde incelenen GST enzimi, hücreye zarar verebilecek özellikte olan hidrofobik ve elektrofilik komponentlerin Gultathione (GSH) ile bağlanmasını sağlar. GSH'a bağlanan komponentler ise hücrel detoksifikasyon yollarına tabiidir (Daniel 1993). Büyüme faktörleri, patojenler, herbisitler, hormonlar ve hücrel stres maddeleri gibi bir dizi faktör, GST genlerinin sentezlenmesine neden olur. The signal by which electrophilic compounds regulate GST gene espression is believed to be a pro-oxidant state in the cells probably resulting from a reduced GSH content (Chen et al. 1996). Bu görüşe paralel olarak bu çalışmada; en yüksek GST ekspresyon seviyesi 12 saatlik 50 µM'lık konsantrasyonda bulunmuş, 48 saatlik uygulamadaki konsantrasyonlar arasında istatistiksel bir fark tespit edilememiştir. Ayrıca bir reviev makalesinde H₂O₂ üretimini inhibe edildiğinde, glutatyon S-transferaz (GST) kodlayan genler tanımlandığını vurgulamaktadır (Apel and Hirt 2004). Bu çalışmada da bu gorusu destekler nitelikte; H₂O₂ akümülyasyonun kontrol seviyesi ile aynı olduğu 12 saat 50 µM lık uygulamada ekspresyon seviyesi oldukça yüksek iken 48 saatlik uygulamada konsantrasyonlar arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır

Antioksidan enzim ailesinde olan SOD, bitkilerde oksidatif strese karşı büyük bir öneme sahip savunma sistemidir ve hemen hemen tüm bitki türlerinin bütün hücresinde bulunur. Oksidatif hasara karşı ilk savunma hattı olarak SOD, toksik O₂⁻radikallerinin H₂O₂ ve moleküler oksijene dönüşmesini veya katalize eder. Fasulye bitkisinde meydana gelen oksidatif stres sonucu, özellikle Cu-Zn/SOD enziminde meydana 24 saatlik maruziyet sonucunda gelen ekspresyon seviyesindeki artış Tombuloğlu ve ark. destekler niteliktedir (Tombuloğlu et al. 2012). Goupil ve ark. Yapmış olduğu çalışmasında domates bitki köklerinde arsenik uygulamış en yüksek SOD ekspresyon seviyesini 160 µM arsenik uygulamasında olduğu tespit ederken 640 µM uygulamadaki ekspresyonu daha düşük bulmuştur (Goupil et al. 2009). Bizim çalışmamız da bu çalışmaları destekler nitelikte Cd maruziyeti uzadıkça ve konsantrasyon arttıkça ekspresyon seviyelerin de azalma meydana gelmiştir Daha önceki çalışmalarda da belirtildiği abiyotik stres koşullarında SOD enzim aktivitesi artmaktadır (Faralli et al. 2015). Ancak Sougir yapmış olduğu çalışmada SOD ekspresyonunun maruziyetin ilk 12 saatinde artmış olduğunu diğer konsantrasyonlarda azalma meydana geldiğini bildirmiştir (Souguir et al. 2013). Bu çalışmaya benzer şekilde bizim bulgularımızda; SOD enzim aktivitesi en yüksek ekspresyonunu 24 saatlik uygulamada gerçekleştirirken 48 saatlik uygulamada ekspresyon seviyesi düşmüştür.

Katalaz enzimi toksik olan H_2O_2 yi H_2O ve O_2 ye katalize ettiği için H_2O_2 nin detoksifikasyonunda oldukça önemlidir. Ayrıca soydam-aydın ve ark. yapmış oldukları çalışmalarında domates bitkisinde CAT enzim aktivitesini ve ekspresyonlarını incelemiş enzim aktivitesi artarken ekspresyon seviyesinde azalma olduğunu bildirmiştir (Soydam Aydın et al. 2016). Benzer şekilde Saanen ve ark. Arabidopsis thaliana bitkisini uranyuma maruz bırakmış CAT ekspresyonunun azaldığını söylemiştir. Faüslye bitkisini kullandığımız çalışmamızda bu çalışmalara paralel şekilde 24 saatlik uygulamadaki konsantrasyonlarda CAT enzim ekspresyonu kontrol genine göre düşerken diğer uygulamalardaki CAT ekspresyonları arasında istatistiksel bir fark tespit edilememiştir. Souguir ve ark. SOD, GR1 ve MT2 gibi antioksidan alakalı stres genlerinin ekspresyonlarının azaldığı konsantrasyonlarda CAT enziminin ekspresyonunun artarak devam ettiğini bulmuştur (Souguir et al. 2013). Bu çalışmanın aksine bizim çalışmamızda diğer stres genlerinin ekspresyonunun anlamlı artış gösterdiği konsantrasyonda CAT enzim ekspresyonunun azalmış olması H_2O_2 nin indükleyici etkisi olarak yorumlanabilir.

Nohut bitkisi CAT gene ekspresyonuna bakıldığında diğer diğer enzimlerin ekspresyon seviyeleri 48 saatlik konsantrasyonda kontrol seviyesine dönerken CAT geninin dönmediği ve ekspresyona devam ettiği tespit edilmiştir. Benzer şekilde Vicia faba köklerine Cd uygulanan CAT hariç diğer stres enzimleri ekspresyonu 12 saatlik uygulamada artıp 24 ve 48 saatler de azaldığı tespit edilirken Cat geni ekspresyonunun 24 ve 48 saatlik uygulamada aynı düzeyde olduğunu tespit etmişlerdir (Souguir et al. 2013). *Withania somnifera* 7 gün boyunca bakır (Cu) metaline maruz bırakılmış CAT geni ekspresyon profili incelemiştir. Cu stresi 20 ve 50 μM konsantraonlarda ekspresyon seviyesini kontrol grubuna göre arttırırken 100 ve 200 μM 'lık konsantrasyonlarda ekspresyonun azalttığı tespit edilmiştir. (Rout and Sahoo 2013). Benzer şekilde bu çalışmada da CAT genin -çalışmadaki diğer stres genlerinden farklı olarak- ekspresyon seviyesi azalmış ama exprese edilmeye devam edilmiştir.

Del Rio reviev makalesinde bütün maddeler zehirdir zehirle ilacın tek farkı dozdur deyişine vurgu yapmıştır (Del Río 2015). Son zamanlarda bitkiler tarafından üretilen Reaktif oksijen türlerinin yıkıcı etkilerinden ziyade bilim adamları ROT'un büyüme, gelişme, programlı hücre ölümü ve çevresel streslere karşı verilen cevaplar üzerindeki etkilerini araştırmak üzerine yoğunlaşmışlardır (Gill and Tuteja 2010; Baxter et al. 2014; Del Rio and Lopez-Huertas 2016). Ayrıca del Rio ve Farnese Reaktif oksijen türlerinin hayati fonksiyonlarındaki önemlerini vurgulayan reviev makale yayınlamışlardır (Del Río 2015; Farnese et al. 2016). Nohut bitkisi açısından bakıldığında çalışmamızda da hücreler arası H_2O_2 konsantrasyonu oksidatif stresin göstergesi olarak Cd maruziyetine uygulama süresi boyunca artmaya devam

etmiştir. Bunun aksine stres enzimlerinden MT2 geni ekspresyonunda H₂O₂ konsantrasyonu artarken bir düşüş meydana gelmiş, Gr1 ve Cu-Zn SOD ise gen ekspresyonunda 24 saatlik uygulamada en yüksek seviye çıkmış ancak h₂o₂ konsantrasyonunun en yüksek seviyede olduğu zamanlarda da ekspresyon seviyesi oldukça düşmüştür. Cat geni ise H₂O₂ konsantrasyonu artış gösterirken ekspresyona devam etmiştir. Vanderauwera yapmış olduğu çalışmada ROT konsantrasyonunun belli bir seviyeye kadar hayatı fonksiyonlarda sinyalizasyon görevi yaparken yüksek konsantrasyonların oksidatif hücre hasarına yol açacağını bildirmiştir (Şekil 1.) (Vanderauwera et al. 2009). Bizim bulgularımızdaki gen ekspresyonunun 24 saatlik uygulamadaki artıştan sonra meydana gelen azalma bu bulguları destekler nitelikte olabilir. Ayrıca Soydam-Aydın ve arkadaşları patlıcan bitkisine Cu ve Zn metalini uygulamışlar da stres enzimlerinin belli bir konsantrasyondan sonra ekspresyon seviyesinin azaldığını tespit etmişlerdir (Soydam-Aydın et al. 2015). Bizim çalışmamız da bu bulguları destekler niteliktedir. Souguir ve ark. Vicia faba ile yapmış olduğu çalışmada bizim çalışmamızdaki bulgulara benzer sonuçlar elde etmiş ve meydana ekspresyon seviyesindeki azalmanın H₂O₂ konsantrasyonundaki artış ile bir bağlantısı olabileceğini vurgulamışlardır (Souguir et al. 2013).

Benzer şekilde fasulye bitkisine uygulanan marıziet sonucunda oksidatif stresin önemli sonuçlarında biri olarak H₂O₂ konsantrasyonunda istikrarlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. Hücresel ROT üretimi birçok uyarana tepki olarak gerçekleşir, bununla birlikte kuraklık, tuzluluk, patojen saldırısı gibi çevresel streslerden sonucu üretilen ve temizlenen ROT arasındaki denge muhafaza edilmelidir. Ayrıca Son zamanlarda bitkiler tarafından üretilen Reaktif oksijen türlerinin yıkıcı etkilerinden ziyade bilim adamları ROT'un büyüme, gelişme, programlı hücre ölümü ve çevresel streslere karşı verilen cevaplar üzerindeki etkilerini araştırmak üzerine yoğunlaşmışlardır (Gill and Tuteja 2010; Baxter et al. 2014; Del Rio and Lopez-Huertas 2016). Hücrede sinyal moleküllerinin gerektiğinde açtığı -gerektiğinde kapattığı bir çok farklı sinyalizasyon yolları vardır. Bu nedenle, sinyal moleküllerini üretimi, fonksiyonu yerine getirmek için sıkı bir şekilde düzenlenmeli ve arzulanan miktarda sentezlenmelidir, daha sonrasında hücrede amacına hizmet ettikten sonra kısa zamanda ortadan kaldırılması gerekir. (Kumar et al. 2017). İlginçtir, bitkiler tarafından alınan O₂'nin% 2'sinin ROT üretimi için kullanıldığı tahmin edilmektedir (Bhattacharjee 2005). Etkin antioksidan mekanizması, hücrede ROT hissettiğinde harekete geçirilir; bunlar tamamen ROT'u etkili bir sinyal molekülü yaparlar. Stres koşulları, redoks sinyaline dönüştürülen hücresel dengesizliği indükler, bu nedenle de spesifik cevapları çoklu seviyelerde aktive eder. (Scheibe ve Dietc 2012).

Mevcut çalışmamızda MT geni ve SOD genleri ekspresyon seviyesi 24 saatlik konsantrasyonda en yüksek düzeyde tespit edilmiş 48 saatlik konsantrasyonlarda ise düşüş gözlemlenmiştir. Öte yandan H₂O₂ konsantrasyonları kararlı bir şekilde artış göstermişlerdir. H₂O₂ nin sürekli artış göstermesi ve 48 saatlik konsantrasyonda maksimum seviyede SOD ve MT2 ekspresyon düzeylerinin düşmesi H₂O₂'nin sinyalizasyon molekülü olduğunu vurgulayan çalışmalarını destekler niteliktedir (Farnese et al. 2016).

GST enzim ekspresyonu oksidatif stresin başladığı 12 saatlik konsantrasyonda maksimum düzeye ulaşmış diğer konsantrasyonlarda azalma eğilimi gösterirken 48 saatlik konsantrasyonlardaki ekspresyonlar arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır. Bu durumda da GST enziminin pre-oksidatif durumlarda daha aktif olduğu ve artan H₂O₂ konsantrasyonunun GST ekspresyonu için baskılayıcı bir komponent olabileceğini göstermektedir (Khan 2017).

CAT enzimi açısından bakıldığında zaman daha önce yapılmış olan bir çalışmada ekspresyon düzeyleri ve aktivitesi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Soydam Aydın et al. 2016). Bu çalışmada da H₂O₂ nin ekspresyon düzeylerini arttırdığına dair bir kanıt bulunamamış ancak diğer enzim ekspresyonlarının arttığı konsantrasyon olan 24 saatlik uygulamalarda CAT ekspresyon düzeyinin down-regüle etmiş olması H₂O₂ nin sinyalizasyon da görevli olduğu konusunda bir ipucu olabilir.

5. Sonuç

Cd ağır metale maruz bırakılan *Phaseolus vulgaris* ve *Cicer arrinetium* bitkilerinde oksidatif stres göstergesi olan MDA miktarı ve H₂O₂ konsantrasyonları kararlı bir artış göstermiştir. Oksidatif stres alakalı enzimlerin ekspresyonuna göz atıldığı zaman, H₂O₂, -orta seviyede konsantrasyon olarak tanımlayabileceğimiz 24 saatlik konsantrasyonlarında- MT, Cu/Zn SOD ve nohut bitkisinde GR1 enzimlerin ekspresyonlarının artmasına sebep olurken ederken 48 saatlik uygulamada azalmasına neden olduğu söylenebilir. Ayrıca fasulye bitkisinde GST enzimi düşük konsantrasyondaki H₂O₂ ortamında yüksek düzeyde ekspresyon edilirken, orta düzeydeki H₂O₂ konsantrasyonunda azalmış yüksek düzeydeki H₂O₂ konsantrasyonunda ekspresyon seviyesi kontrol ile aynı düzeye inmiştir. CAT enziminde orta düzeydeki H₂O₂ konsantrasyonunda ekspresyon seviyesi azalmış edilmiş diğer konsantrasyonlarda değişmemiştir. Fasulye ve nohut bitkilerine Cd maruziyeti sonucu stres gen ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişiklik ilk kez bu çalışma da incelenmiştir. Yapılan çalışmada elde edilen bulgular daha sonra yapılacak olan bilim dünyası için oldukça yeni bir kavram olan “oksidatif sinyalizasyon” başlığı ile yapılacak çalışmalara katkı sağlayabilecektir.

6. Kaynakça

- Ahn YO, Kim SH, Lee J, et al (2012) Three Brassica rapa metallothionein genes are differentially regulated under various stress conditions. *Mol Biol Rep* 39:2059–2067. doi: 10.1007/s11033-011-0953-5
- Apel K, Hirt H (2004) REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373–399. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701
- Arefian M, Malekzadeh Shafaroudi S (2015) Physiological and gene expression analysis of extreme chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes in response to salinity stress. *Acta Physiol Plant* 37:1–11. doi: 10.1007/s11738-015-1945-1
- Barrera-Figueroa BE, Peña-Castro JM, Acosta-Gallegos JA, et al (2007) Isolation of dehydration-responsive genes in a drought tolerant common bean cultivar and expression of a group 3 late embryogenesis abundant mRNA in tolerant and susceptible bean cultivars. *Funct Plant Biol* 34:368–381. doi: 10.1071/FP06224
- Baxter A, Mittler R, Suzuki N (2014) ROT as key players in plant stress signalling. *J Exp Bot* 65:1229–1240. doi: 10.1093/jxb/ert375
- Boyer JS (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218:443–448. doi: 10.1126/science.218.4571.443
- Chen W, Chao G, Singh KB (1996) The promoter of a H₂O₂-inducible, Arabidopsis glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *Plant J* 10:955–966. doi: 10.1046/j.1365-313X.1996.10060955.x
- Chen YX, He YF, Luo YM, et al (2003) Physiological mechanism of plant roots exposed to cadmium. *Chemosphere* 50:789–793. doi: 10.1016/S0045-6535(02)00220-5
- Cuypers A, Hendrix S, Amaral dos Reis R, et al (2016) Hydrogen Peroxide, Signaling in Disguise during Metal Phytotoxicity. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2016.00470
- Dalton DA, Boniface C, Turner Z, et al (2009) Physiological Roles of Glutathione S-Transferases in Soybean Root Nodules. *Plant Physiol* 150:521–530. doi: 10.1104/pp.109.136630
- Dalvi A, Bhalerao S (2013) Response of Plants towards Heavy Metal Toxicity: An overview of Avoidance, Tolerance and Uptake Mechanism. *Ann Plant Sci* 2:362–368.
- Daniel V (1993) Glutathione S-transferases: gene structure and regulation of expression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 28:173–207. doi: 10.3109/10409239309086794
- Del Río LA (2015) ROT and RNS in plant physiology: An overview. *J Exp Bot* 66:2827–

2837. doi: 10.1093/jxb/erv099
- Del Rio LA, Lopez-Huertas E (2016) ROT generation in peroxisomes and its role in cell signaling. *Plant Cell Physiol* 57:1364–1376. doi: 10.1093/pcp/pcw076
- Del Río Luis Alfonso, Puppo A (2009) Signaling and Communication in Plants.
- Duman F, Ozturk F (2010) Nickel accumulation and its effect on biomass, protein content and antioxidative enzymes in roots and leaves of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). *J Environ Sci* 22:526–532. doi: 10.1016/S1001-0742(09)60137-6
- Duman F, Urey E, Temizgul R, Bozok F (2010) Biological responses of a non-target aquatic plant (*Nasturtium officinale*) to the herbicide, tribenuron-methyl. *Weed Biol Manag* 10:81–90. doi: 10.1111/j.1445-6664.2010.00372.x
- Faralli M, Lektemur C, ROTellini D, Gürel F (2015) Effects of heat shock and salinity on barley growth and stress-related gene transcription. *Biol Plant* 59:537–546. doi: 10.1007/s10535-015-0518-x
- Farnese FS, Menezes-Silva PE, Gusman GS, Oliveira JA (2016) When Bad Guys Become Good Ones: The Key Role of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in the Plant Responses to Abiotic Stress. *Front Plant Sci* 7:471. doi: 10.3389/fpls.2016.00471
- Gaweł S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P (2004) Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomości Lek (Warsaw, Pol 1960)* 57:453–5.
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48:909–930. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- Goupil P, Souguir D, Ferjani E, et al (2009) Expression of stress-related genes in tomato plants exposed to arsenic and chromium in nutrient solution. *J Plant Physiol* 166:1446–1452. doi: 10.1016/j.jplph.2009.01.015
- Hart PJ, Balbirnie MM, Ogihara NL, et al (1999) A structure-based mechanism for copper-zinc superoxide dismutase. *Biochemistry* 38:2167–2178. doi: 10.1021/bi982284u
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, et al (1999) the Thiobarbituric Anthocyanin for Estimating Lipid Peroxidation in Plant Tissues Containing and Other Interfering. *207:604–611*. doi: 10.1007/s004250050524
- Hossain MA, Piyatida P, da Silva JAT, Fujita M (2012) Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. *J Bot* 2012:1–37. doi: 10.1155/2012/872875
- Jain D, Chattopadhyay D (2010) Analysis of gene expression in response to water deficit of

- chickpea (*Cicer arietinum* L.) varieties differing in drought tolerance. *BMC Plant Biol* 10:24. doi: 10.1186/1471-2229-10-24
- Junglee S, Urban L, Sallanon H, Lopez-lauri F (2014) Optimized Assay for Hydrogen Peroxide Determination in Plant Tissue Using Potassium Iodide. *Am J Anal Chem* 5:730–736. doi: 10.4236/ajac.2014.511081
- Karimi J, Mohsenzadeh S (2017) Expression of some Genes in Response to Cadmium Stress in *Triticum aestivum*. *Int Lett Nat Sci* 63:10–17. doi: 10.18052/www.scipress.com/ILNS.63.10
- Khan NA (2017) Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress.
- Kısa D, Öztürk L, Doker S, Gökçe İ (2017) Expression analysis of metallothioneins and mineral contents in tomato (*Lycopersicon esculentum*) under heavy metal stress. *J Sci Food Agric* 97:1916–1923. doi: 10.1002/jsfa.7995
- Kumar V, Ganeshkhind C (2017) Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress. doi: 10.1007/978-981-10-5254-5
- Kumar V, Khare T, Sharma M, Wani SH (2017) ROT-induced signaling and gene expression in crops under salinity stress. In: *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress*. pp 159–184
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 25:402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, et al (2010) Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *J Exp Bot* 61:4197–4220.
- Mittler R (2017) ROT Are Good. *Trends Plant Sci* 22:11–19. doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.002
- Nanjareddy K, Blanco L, Arthikala M-K, et al (2016) A Legume TOR Protein Kinase Regulates *Rhizobium* Symbiosis and Is Essential for Infection and Nodule Development. *Plant Physiol* 172:2002–2020. doi: 10.1104/pp.16.00844
- Oliveira MB, de Andrade R V., GROTSi-de-Sá MF, Petrofeza S (2015) Analysis of genes that are differentially expressed during the *Sclerotinia sclerotiorum*-*Phaseolus vulgaris* interaction. *Front Microbiol* 6:1–14. doi: 10.3389/fmicb.2015.01162
- Qin D, Wu H, Peng H, et al (2008) Heat stress-responsive transcriptome analysis in heat susceptible and tolerant wheat (*Triticum aestivum* L.) by using Wheat Genome Array. *BMC Genomics* 9:432. doi: 10.1186/1471-2164-9-432

- Razinger J, Dermastia M, Koce JD, Zrimec A (2008) Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) caused by short-term cadmium exposure. *Environ Pollut* 153:687–694. doi: 10.1016/j.envpol.2007.08.018
- Romero-puertas MC, Rodriguez-serrano M, Corpas FJ, et al (2004) Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂·- and H₂O₂ in pea leaves. *Plant, Cell Environ* 27:1122–1134. doi: 10.1111/j.1365-3040.2004.01217.x
- Rout JR, Sahoo SL (2013) Antioxidant enzyme gene expression in response to copper stress in *Withania somnifera* L. *Plant Growth Regul* 71:95–99. doi: 10.1007/s10725-013-9806-7
- Schützendübel A, Polle A (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* 53:1351–1365. doi: 10.1016/S0981-9428(02)01411-0
- Singh N, Ma LQ, Srivastava M, Rathinasabapathi B (2006) Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L. *Plant Sci* 170:274–282. doi: 10.1016/j.plantsci.2005.08.013
- Souguir D, El Ferjani E, Ledoigt G, Goupil P (2013) Transcript accumulation of stress-related genes in *Vicia faba* roots under a short exposure to cadmium. *Plant Biosyst - An Int J Deal with all Asp Plant Biol* 3504:1–9. doi: 10.1080/11263504.2013.822432
- Soydam-Aydin S, Buyuk I, Cansaran-Duman D, Aras S (2015) Roles of catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) genes in stress response of eggplant (*Solanum melongena* L.) against Cu(+2) and Zn(+2) heavy metal stresses. *Environ Monit Assess* 187:726. doi: 10.1007/s10661-015-4939-y
- Soydam Aydin S, Büyük İ, Gökçe Gündüzer E, et al (2016) Domates bitkisinde kurşun (Pb) ve kadmiyumun (Cd) lipit peroksidasyonu, katalaz (CAT) enzim aktivitesi ve gen ekspresyon profiline etkisi. *Tarim Bilim Derg* 22:539–547.
- Štolfa I, Pfeiffer TŽ, Špoljarić D, et al (2015) Heavy Metal-Induced Oxidative Stress in Plants: Response of the Antioxidative System BT - Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress. In: Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ (eds). Springer International Publishing, Cham, pp 127–163
- Štolfa I, Špoljarić Maronić D, Žuna Pfeiffer T, Lončarić Z (2016) Glutathione and Related Enzymes in Response to Abiotic Stress BT - Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses. In: Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ (eds). Springer International Publishing, Cham, pp 183–211
- Tamás L, Dudíková J, Ďurčėková K, et al (2008) Alterations of the gene expression, lipit

- peroxidation, proline and thiol content along the barley root exposed to cadmium. *J Plant Physiol* 165:1193–1203. doi: 10.1016/j.jplph.2007.08.013
- Tombuloglu H, Semizoglu N, Sakcali S, Kekec G (2012) Boron induced expression of some stress-related genes in tomato. *Chemosphere* 86:433–438. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.09.035
- Torres-Franklin ML, Contour-Ansel D, Zuily-Fodil Y, Pham-Thi AT (2008) Molecular cloning of glutathione reductase cDNAs and analysis of GR gene expression in cowpea and common bean leaves during recovery from moderate drought stress. *J Plant Physiol* 165:514–521. doi: 10.1016/j.jplph.2007.03.011
- Vanderauwera S, Hoerberichts FA, Breusegem F Van (2009) Hydrogen Peroxide-Responsive Genes in Stress Acclimation and Cell Death. In: *Reactive Oxygen Species in Plant Signaling*: Springer. pp 149–164

EKLER

Tablo 1. Mali Bilanço ve Açıklamaları

	Makine Teçhizat	Sarf Malzemesi	Hizmet Alımı	Toplam, TL
Onaylanan	2870,00	21192,50	5850	29912
Kullanılan	2.870,00	20550,85	4572,30	27692,65
Kalan	0	941,65	1277,70	2219,35